

# IDENTIFICACIÓN DE REGIONES GENÓMICAS QUE CONTROLAN CARACTERES DE INTERÉS EN EL FRUTO DE TOMATE POR SECUENCIACIÓN DE GRUPOS DISCREPANTES<sup>1</sup>

Vazquez, Dana V.<sup>1,2</sup>; Pereira da Costa, Javier H.<sup>1,3</sup>; Ila-Berenguer, Eudald<sup>4</sup>; van der Knaap, Esther<sup>4</sup>; Rodríguez, Gustavo R.<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. <sup>2</sup>Beca Fundación Nuevo Banco de Santa Fe. <sup>3</sup>IICAR-CONICET. <sup>4</sup>The Ohio State University, Ohio, EEUU  
Área: Ingeniería, Sub-área: Agronomía

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate es de fundamental importancia en la actividad hortícola nacional e internacional. Es uno de los cultivos principales en cuanto a superficie sembrada y rendimiento. La semilla mejorada genéticamente constituye la principal fuente de agregado de valor a los productos primarios agrícolas. Sin embargo, el país posee un perfil netamente importador de semillas hortícolas, especialmente para tomate.

La morfología del fruto en tomate tiene importancia económica, histórica y biológica. Desde el punto de vista económico la forma del fruto define el destino de la producción (mercado en fresco o industria) y la elección del consumidor en el mercado en fresco (Rodríguez et al 2013). Desde el punto de vista histórico, la forma del fruto ha sido un criterio de selección durante el proceso de domesticación y mejoramiento del cultivo. Y desde el punto de vista biológico, la morfogénesis es un mecanismo complejo y diverso entre los distintos tipos de órganos y entre las especies (Rodríguez et al 2015). En consecuencia nos enfocamos en la morfología del fruto en tomate para identificar genes candidatos y descubrir los mecanismos moleculares subyacentes a la diversidad presente en los frutos.

## OBJETIVO

El objetivo del trabajo fue estudiar la variabilidad genética para caracteres de morfología de fruto en cruzamientos entre cultivares de tomate e identificar regiones en el genoma que controlan estos caracteres por tecnologías de secuenciación de última generación.

## METODOLOGÍA

Se eligieron como genotipos progenitores cuatro cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum*) que difieren para características de fruto de interés, tales como peso, número de lóculos, y regularidad externa del fruto. Se obtuvieron mediante castración y polinización manual los híbridos F<sub>1</sub> y luego por autofecundación las poblaciones F<sub>2</sub> derivadas de los cruzamientos: Old Brooks x Voyage y Yellow Stuffer x Heinz 1439. Se cosecharon un promedio de 8 frutos por planta en 122 plantas de la generación F<sub>2</sub> Heinz 1439 x Yellow Stuffer y 79 plantas de la generación F<sub>2</sub> Old Brooks x Voyage. La cosecha fue realizada en forma manual y escalonada a medida que los frutos alcanzaban la madurez. Se tomó en cada fruto el peso (en g), y luego se los cortó transversalmente por su diámetro mayor para cuantificar el número de lóculos. Se escaneó cada mitad del fruto y a partir de las imágenes se realizó la medición automática de atributos morfológicos con el software *Tomato Analyser 3.0* (Rodríguez et al 2010). Los atributos que analizamos con el software fueron área y grado de uniformidad de la superficie exterior (GUSE). Como el progenitor Voyage presenta la

---

<sup>1</sup>Segregación mendeliana de *QTLs* que controlan caracteres de fruto en tomate para su localización precisa en el genoma. PICT 2012-1671  
Rodríguez, Gustavo

característica de tener carpelos no fusionados, se evaluó visualmente esta característica en la población F<sub>2</sub> Old Brooks x Voyage. Se estimaron en las poblaciones F<sub>2</sub> los valores medios y desvíos estándares para todos los caracteres. Se analizó la normalidad de los caracteres por la prueba de Shapiro-Wilk. También se realizaron los histogramas de frecuencia para cada carácter. Se estimó la heredabilidad en sentido amplio o Grado de Determinación Genética (GDG) a través de una ANDEVA. Se evaluó la existencia de correlación fenotípica entre todos los caracteres (Mariotti y Collavino 2014).

Para identificar las regiones genómicas subyacentes a la variabilidad en la morfología de los frutos se utilizó la metodología *QTL-seq* (Takagi et al 2013). Se tomó como carácter de estudio el tipo de carpelo (fusionado vs no fusionado) en la población F<sub>2</sub> Old Brooks x Voyage. Para formar los *bulks* (grupos) se escogieron en la población F<sub>2</sub> 10 plantas que mostraron carpelos fusionados y 10 plantas que mostraron carpelos no fusionados. ADN de buena calidad y cantidad extraído por protocolos estándares (Bernatzky y Tanksley 1986; Fulton et al 1995) fueron homogeneizados en concentración y mezclados por grupos (fusionados vs no fusionados). Las muestras de los dos grupos se enviaron a secuenciar en un *flow cell de 2x101 pair ended* con una cobertura del genoma de 16X en el Centro de Acceso a la Tecnología del Genoma o GTAC (Universidad de Washington, Saint Louis, Missouri, USA) con un equipo Illumina HiSeq 2500. Las secuencias fueron alineadas contra la secuencia de referencia (The Tomato Genome Consortium 2012) a través de la herramienta *bowtie2*. Otras herramientas bioinformáticas se utilizaron para identificar el polimorfismo molecular subyacente a las diferencias fenotípicas de los dos grupos (Illa-Berenguer et al 2015).

## RESULTADOS

Estudios variabilidad genética en la Población F<sub>2</sub> Heinz 1439 x Yellow Stuffer

Caracteres	X	DE	GDG	Probabilidad
Peso (g)	70,60	25,11	0,43	<0,0001
Número de lóculos	4,27	1,02	0,28	<0,0001
Área (cm <sup>2</sup> )	22,94	6,33	0,53	<0,0001
GUSE	1,60	0,47	0,20	<0,0001

Tabla 1: Valores promedios (X), desvíos estándares (DE), GDG y su valor de probabilidad para todos los caracteres evaluados en la generación F<sub>2</sub> Heinz 1439 x Yellow Stuffer.

	Número de lóculos	Área (cm <sup>2</sup> )	GUSE
Peso (g)	0.47 ****	0.92 *****	0.19 *
Número de lóculos		0.53 *****	0.19 *
Área (cm <sup>2</sup> )			0.37 ****

Tabla 2: Correlaciones de Pearson entre todos los caracteres evaluados en la generación F<sub>2</sub> Heinz 1439 x Yellow Stuffer. \*P<0,05; \*\*\*\*\*P< 0,00001; \*\*\*\* P < 0,0001.

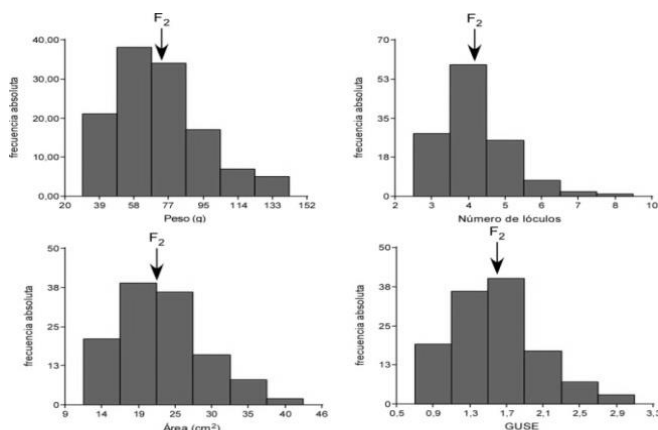


Gráfico 1: Histograma de frecuencias para los caracteres evaluados en la generación F<sub>2</sub> Heinz 1439 x Yellow Stuffer.

## Estudios de variabilidad genética en la Población F<sub>2</sub> Old Brooks x Voyage

Caracteres	X	DE	GDG	Probabilidad
Peso (g)	74,57	34,23	0,50	<0,0001
Área (cm <sup>2</sup> )	26,35	8,85	0,62	<0,0001
Número de locúlos	6,60	2,78	0,69	<0,0001
GUSE	2,52	1,20	0,36	<0,0001

Tabla 3: Valores promedios (X), desvíos estándares (DE), GDG y probabilidad para todos los caracteres evaluados en la generación F<sub>2</sub> Old Brooks x Voyage.

	Número de locúlos	Área (cm <sup>2</sup> )	GUSE
Peso (g)	0,63 *****	0,89 *****	0,49 *****
Número de locúlos		0,5 *****	0,71 *****
Área (cm <sup>2</sup> )			0,47 ****

Tabla 4: Correlaciones de Pearson entre todos los caracteres evaluados en la generación F<sub>2</sub> Old Brooks x Voyage. \*\*\*\*\* P<0,00001; \*\*\*\*P <0,0001.

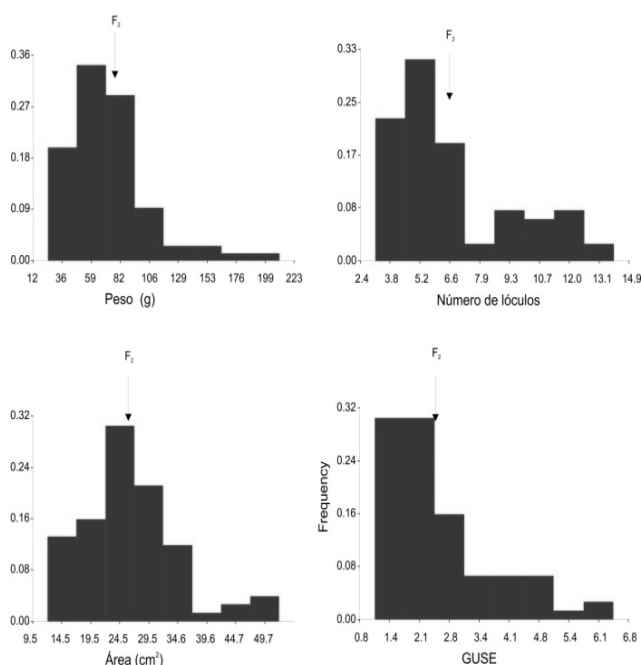


Gráfico 2: Histograma de frecuencias para la generación F<sub>2</sub> Old Brooks x Voyage

Todos los caracteres se distribuyeron de manera normal. Los valores de GDG fueron altamente significativos para todos los caracteres y variaron entre 0,20 para el carácter GUSE en la población F<sub>2</sub> Heinz 1439 x Yellow Stuffer y 0,69 para el número de locúlos en la Población F<sub>2</sub> Old Brooks x Voyage. Los caracteres evaluados estuvieron todos correlacionados entre sí ( $p < 0,05$ ) encontrándose los índices de correlación más altos entre los caracteres peso y área del fruto en ambas poblaciones.

En la población F<sub>2</sub> Old Brooks x Voyage, el carácter tipo de carpelo (fusionados versus no fusionados) segregó en forma mendeliana (relación 3:1,  $\chi^2 = 1,12$  ns) lo que indicaría que el carácter estaría controlado por un único locus.

La evaluación del polimorfismo molecular entre los grupos fenotípicos discrepantes a través de todo el genoma de tomate, permitió detectar una región localizada en la posición 41,41 Mb del cromosoma 6 asociada al tipo de carpelo fusionado versus no fusionado (Gráfico 3).

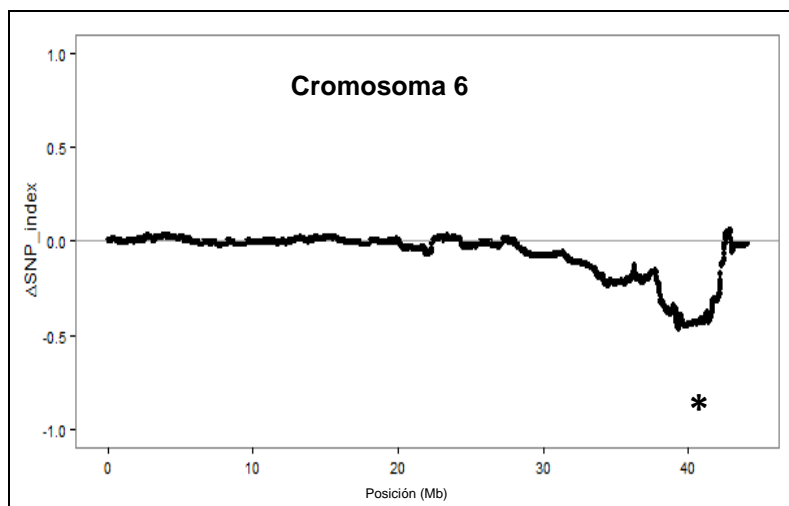


Gráfico 3: Identificación de la región genómica controlando tipo de carpelo en la población  $F_2$  Old Brooks x Voyage (marcada con un asterisco). Valores promedios de  $\Delta$ SNP-index calculados en ventanas de 2 Megabases (Mb) en el cromosoma 6 de tomate.

## CONCLUSIONES

Se concluye que en las poblaciones segregantes evaluadas se encontró variabilidad genética para caracteres relacionados a la morfología del fruto en tomate y que la aplicación de tecnologías de secuenciación de última generación (NGS) en grupos fenotípicos discrepantes en estas poblaciones permitiría identificar las regiones genómicas que controlan estos caracteres de interés.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bernatzky R, Tanksley SD** (1986) Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112:887-898
- Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD** (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology reporter* 13:207-209
- Illa-Berenguer E, Van Houten J, Huang Z, van der Knaap E.** (2015) Rapid and reliable identification of tomato fruit weight and locule number loci by QTL-seq. *Theoretical and Applied Genetics* 128: 1329-1342
- Mariotti JA y Collavino NG** (2014) Los caracteres cuantitativos en la mejora genética de los cultivos. Editorial OGE. Argentina. Pp 352.
- Rodríguez GR, Kim HJ, Van der Knaap E** (2013) Mapping of two suppressors of OVATE (sov) loci in tomato. *Heredity* 1–9
- Rodríguez GR, Moyseenko JB, Robbins MD, HuarachiMorejón N, Francis DM, van der Knaap E** (2010) Tomato Analyzer: A Useful Software Application to Collect Accurate and Detailed Morphological and Colorimetric Data from Two-dimensional Objects. *JoVE*. 37. <http://www.jove.com/index/details.stp?id=1856>, doi: 10.3791/1856.
- Rodríguez GR, Muños S, Anderson C, Sim S-C, Michel A, Causse M, Gardener BBM, Francis D, Van der Knaap E** (2011) Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. *Plant Physiology* 156: 275–85
- Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S, et al** (2013) QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant Journal* 74: 174–83
- The Tomato Genome Consortium G** (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635–41