



SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TOMATE. Biotecnología para el sector productivo

Ana Arruabarrena¹, Matías González Arcos²,
Leticia Rubio², Gustavo Giménez²

¹Unidad de Biotecnología

²Programa Nacional de Producción Hortícola

SELECCIÓN ASISTIDA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO

La selección asistida por marcadores moleculares (SAM) es una potente herramienta biotecnológica que permite a los mejoradores seleccionar plantas con determinadas características de interés en cualquier etapa de su desarrollo. La herramienta se basa en la detección de secuencias de ADN altamente relacionadas con características de interés productivo (marcador molecular). Por lo tanto, podemos definir la SAM como la selección de una característica determinada en una planta a través de la presencia de un marcador molecular.

IMPACTO DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO DE TOMATE

El uso de SAM en mejoramiento genético de tomate comenzó en la década de los 80 utilizando isoenzimas

como marcadores para seleccionar genotipos con resistencia a nematodos. A partir de estos hallazgos, se han desarrollado varios mapas genéticos de tomate donde se pueden encontrar numerosos marcadores moleculares ligados a genes que determinan características de interés y que, por lo tanto, pueden ser utilizados para SAM.

En la actualidad, los marcadores moleculares más utilizados se basan en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica de biología molecular permite obtener varias copias de un fragmento de ADN específico que luego puede identificarse en un gel de agarosa mediante la técnica de electroforesis (Figura 1, abajo).

En tomate, los marcadores moleculares suelen utilizarse de forma rutinaria para evaluar la pureza de lotes de semilla híbrida. También se utiliza SAM en los programas de mejoramiento para realizar tamizados de germoplasma utilizando marcadores ligados a genes de resistencia a enfermedades (ver ejemplo de aplicación en Figura 1) o a genes relacionados con la calidad de fruto. Además, suelen utilizarse marcadores moleculares para acelerar los procesos de retrocruzas con el objetivo de incorporar uno o pocos genes de una planta donante en un genotipo de interés.

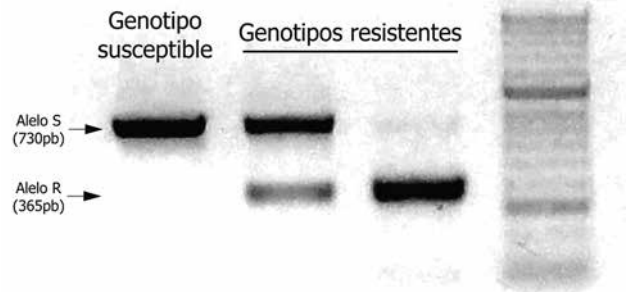
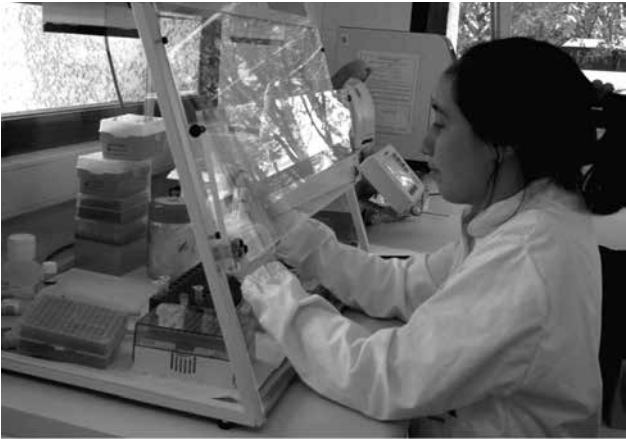


Figura 1 - Arriba: Montaje de la reacción de PCR. Abajo: Gel de agarosa que ejemplifica la detección de los alelos de resistencia (R) y susceptibilidad (S) a enfermedades para las tres posibles combinaciones: alelo de susceptibilidad y resistencia en homocigosis y la combinación de ambos en heterocigosis. Foto: A. Arruabarrena

MEJORAMIENTO GENÉTICO Y SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES PARA TOMATE EN URUGUAY

INIA comenzó a trabajar en mejoramiento genético de tomate en el año 2005 con un proyecto de mejoramiento

to para tomate de industria que tuvo como producto la liberación de dos variedades en el año 2011: ‘Repique’ y ‘Milongón’ (1). En 2012, comenzó una nueva línea de trabajo focalizada en la obtención de variedades de tomate de mesa. Se trabaja para generar cultivares mejor adaptados a las diferentes zonas, ciclos y sistemas de producción, que contribuyan a aumentar la eficiencia de la producción, considerando un escenario de alta exigencia en calidad de fruta, restricciones en mano de obra, aumento de costos de producción y disminución del uso de fitosanitarios. Para cumplir este objetivo es necesario el trabajo en equipo con la integración de diferentes técnicos y disciplinas. Es así que junto con esta línea de trabajo comenzó en coordinación un proyecto que integra las áreas de Biotecnología, Mejoramiento Genético y Fitopatología. El objetivo del mismo es implementar la SAM en el mejoramiento de tomate por resistencia a enfermedades.

SAM PARA GENES DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES DE TOMATE

En los sistemas productivos de tomate de mesa de nuestro país es muy ventajoso contar con cultivares que presenten resistencia a múltiples patógenos. Por un lado, se necesitan resistencias a patógenos de suelo como hongos y nematodos y también a patógenos virales para los cuales no son efectivos los controles químicos. En muchos casos, estas resistencias dictan si un cultivar puede ser plantado en determinado lugar y ciclo de producción. Por otro lado, se convive con varios patógenos que causan enfermedades foliares, para los cuales la resistencia genética permite implementar un control integrado más eficiente, en muchos casos disminuyendo el uso de agroquímicos y haciendo un manejo de la enfermedad más amigable con el ambiente. Se ha implementado exitosamente la utilización de marcadores moleculares asociados a varios genes de resistencia entre los que se encuentran resistencia al virus de la Peste Negra, marchitez por Fusarium, Nematodos y otros patóge-

Cuadro 1 - Detalle de enfermedades, patógenos causales y genes de resistencia actualmente seleccionados mediante SAM.

Enfermedad	Patógeno	Gen de resistencia
Peste Negra	género <i>Tospovirus</i> (TSWV, GRSV, TCSV)	Sw-5
Mosaico del tomate	Virus del Mosaico de Tomate	Tm-2 ²
Marchitamiento por Fusarium	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Raza 1)	I
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Raza 2)	I-2
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Raza 3)	I-3
Marchitamiento por Verticillium	<i>Verticillium dahliae</i>	Ve
Agallas radiculares (Nematodos)	<i>Meloidogyne</i> sp	Mi
Peca bacteriana	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Pto
Begomovirus	género <i>Begomovirus</i> (varias especies mono y bipartitas)	Ty-1

nos que se detallan en el Cuadro 1. Los genes mencionados en el Cuadro 1 son genes dominantes de resistencia cualitativa y pueden ser de amplio espectro o solamente efectivos para ciertas razas o aislados de patógenos. Por ejemplo, el gen *Sw-5* otorga resistencia a varias especies de *Tospovirus* (Peste Negra) por lo que se considera de amplio espectro. Sin embargo, los diferentes genes de resistencia a marchitez por *Fusarium*, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (1, I-2 o I-3) confieren resistencia a diferentes razas del patógeno, siendo en este caso considerados raza específicos.

Teniendo en cuenta la alta especificidad de algunos genes de resistencia con los que se trabaja, es imprescindible determinar qué especies, razas o aislados de los patógenos en cuestión son los causantes de las enfermedades en nuestras condiciones. Por ejemplo, para el caso de Begomovirus (familia del Virus de la Cuchara), en nuestro país está reportada la especie "Tomato Rugose Yelow Leaf Curl Virus, (ToRYLCV) (2)" y recientemente se ha detectado la presencia de otra especie llamada "Tomato Yellow Vein Streak Virus (ToYVSV)(3)". Los genes de resistencia a Begomovirus que se conocen (genes *Ty*) fueron evaluados en países donde predominan otras especies del virus. Por lo tanto, es necesario realizar estudios para determinar si estos genes de resistencia funcionan con las especies de Begomovirus uruguayas.

¿QUÉ VENTAJAS TRAE EL USO DE SAM EN NUESTRO PROGRAMA DE MEJORAMIENTO?

Aumento en la eficiencia de selección

La principal ventaja que aporta esta tecnología es el aumento de la eficiencia en la selección dentro del programa de mejoramiento. El aumento de la eficiencia se basa en la capacidad de seleccionar plantas en etapas tempranas del desarrollo, sin la necesidad de montar ensayos biológicos de resistencia y monitoreando varios genes a la vez. De esta forma, se pudo seleccionar la línea 'LT12' que posee los genes *Sw5*, *Tm2²*, *Ve*, *Mi*, *I*, *I-2*. Este resultado hubiera llevado varios años de selección en diferentes ciclos, incluyendo ensayos y testajes biológicos. Aplicando SAM se pudo obtener esta línea en solo 4 ciclos de selección (dos años a partir del cruzamiento en un doble ciclo anual).

Otra ventaja en este aspecto es que la SAM permite identificar plantas individuales que poseen determinada combinación de genes deseada. En el tomate cultivado, algunos genes se encuentran en posiciones del genoma muy cercanas pero en cromosomas homólogos diferentes ya que provienen de distintas fuentes. Se dice que están en repulsión, ya que la presencia de un gen determina con una alta probabilidad la ausencia del otro en plantas homocigotas. Utilizando SAM se pudo monitorear la segregación de genes en repulsión dentro de una misma familia y así seleccionar plantas que posean ambos genes en el mismo cromosoma (en acoplamiento). Este acoplamiento es de alto interés en

mejoramiento y fue logrado, en este proyecto, para los genes *Mi* y *Ty-1* localizados en el cromosoma 6.

Mejoramiento preventivo

Como la SAM es un tipo de selección indirecta, no es necesaria la presencia del patógeno para seleccionar por resistencia a una enfermedad. De esta forma, se puede seleccionar por resistencia a enfermedades causadas por patógenos que aún no están presentes o no están causando problemas serios en nuestras zonas de producción. Es el caso de la resistencia a marchitez por *Fusarium* raza 3 (gen *I-3*) y la resistencia a Begomovirus (gen *Ty-1*), que ya están incorporadas en nuestras nuevas líneas elite.

Caracterización de germoplasma

Los marcadores moleculares permiten, en cuestión de días, conocer qué genes de resistencia están presentes en determinado material genético. De esta forma se pueden programar los cruzamientos para generar poblaciones segregantes de mayor potencial. También se utilizan para caracterizar líneas avanzadas ya estabilizadas, como en el caso de la variedad 'Milongón' que posee los genes *Sw5*, *Tm2²*, *Ve*, *I*, *I-2* (Figura 2).



Figura 2 - Arriba: Cultivo de tomate del cultivar 'Milongón' Foto: M. González. Abajo: Geles de agarosa que indican la presencia de genes *Tm2²*(a.), *Sw5*(b.), *Ve*(c.), *I*(d.) e *I-2*(e.). Foto: A. Arruabarrena



Figura 3 - Evaluación preliminar de híbridos (F1) con resistencias múltiples en INIA Salto Grande. Fotos izquierda: M. González; derecha: P. Varela

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La SAM es una herramienta biotecnológica que al ser ajustada y aplicada en el programa de mejoramiento de tomate del INIA permitió acelerar de forma notable los procesos de mejora basado en un aumento de la eficiencia de selección. Es así que a dos años y medio de haber comenzado con los primeros cruzamientos se estaban evaluando en forma preliminar los primeros híbridos de tomate seleccionados a nivel local con resistencia a múltiples enfermedades (Figura 3). Estos híbridos fueron formados por la combinación de las mejores líneas elite seleccionadas con la contribución de la SAM para genes de resistencia a enfermedades.

Si bien en tomate hay disponible un número considerable de genes de resistencia ya descritos de uso y dominio públicos, para algunas enfermedades no se cuenta con marcadores moleculares asociados a genes de resistencia, ya sea porque no se han identificado o porque se han desarrollado con financiamiento privado y son de uso restringido. En nuestra región, algunas enfermedades como el oidio (causada por *Oidio neolycopersici*) y el virus de la clorosis del tomate (ToCV) (4) adquieren cierta importancia y no se cuenta con marcadores moleculares asociados a genes de resistencia para las mismas (Figura 4). Nuestro equipo se encuentra trabajando, en colaboración con investigadores



Figura 4 - Oídio, planta resistente (izquierda) y planta susceptible (derecha). Foto: M. González

de Embrapa Hortalizas (CNPB), para identificar las bases genéticas de la resistencia a estas enfermedades y luego desarrollar marcadores moleculares para utilizar en SAM en el mejoramiento de tomate. Actualmente también se está ajustando la detección del gen *og^c*, cuya presencia en homocigosis aumenta en forma considerable el contenido de licopeno en frutos maduros, lo que proporciona una mejor calidad culinaria y beneficios para la salud (Figura 5). La herramienta permitiría mejorar la eficiencia de selección al no perder los heterocigotas en forma temprana, a la vez que permitiría asistir programas de retrocruzas para este gen en líneas elite.



Figura 5 - Izquierda: línea 'FLA7547' que posee gen *og^c* que confiere alto contenido de licopeno en fruta madura. Derecha: cultivar comercial de referencia ('Elpida'). Foto: M. González

Referencias

- (1) González, M. *et al.* (2011). Primeros cultivares nacionales de tomate para industria: "Repique" y "Milongón" <http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/publicacion-2447.aspx>
- (2) Márquez-Martín, B *et al.* (2012). Diverse population of a new bipartite begomovirus infecting tomato crops in Uruguay. *Archives of Virology*, 157(6), 1137–1142.
- (3) Arruabarrena, A. *et al.* (2014). Primer reporte del begomovirus Tomato Yellow Vein Streak Virus (ToYVSV) en Uruguay. In 13^{er} Congreso Nacional de Horti-Fruticultura (p. 102)
- (4) Arruabarrena, A. *et al.* (2014). First report of Tomato chlorosis virus infecting tomato crops in Uruguay. *Plant Disease*, 98(10), 1445.