



COMPLEMENTARY TOOLS UTILIZED IN THE PEA (*Pisum sativum* L.) BREEDING PROGRAM AT UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO



HERRAMIENTAS COMPLEMENTARIAS UTILIZADAS EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DE ARVEJA (*Pisum sativum* L.) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Guindón M.F.¹, Cazzola F.¹, Bermejo C.J.¹, Espósito M.A.^{1,3}, Gatti I.², Cointry E.L.¹

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IICAR-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Zavalla, Argentina;

²CIUNR, Consejo de Investigadores de la Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina;

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA INTA Oliveros, Ruta Nacional 11 km 353, Oliveros, Santa Fe.

Corresponding author:
Cointry, E. L.
ecointry@unr.edu.ar

ORCID 0000-0001-5906-7291

Cite this article as:

Guindón M.F., Cazzola F., Bermejo C.J., Espósito M.A., Gatti I., Cointry E.L. 2021. HERRAMIENTAS COMPLEMENTARIAS UTILIZADAS EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DE ARVEJA (*Pisum sativum* L.). BAG. Journal of Basic and Applied Genetics Vol XXXII Issue 2: 25–31.

Received: 10/14/2020

Accepted: 10/29/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2021.32.02.03

ISSN online version: 1852–6322

ABSTRACT

Conventional breeding can be complemented by different strategies that increase the efficiency of the methodologies and the current rate of increase in yields in order to meet demand. The use of molecular markers with the aim of developing linkage maps of the species, the use of Blup (Best Linear Unbiased Prediction) for an efficient selection of progenitors to hybridize, the use of *in vitro* culture to artificially increase the number of F₁ plants or the use of digital phenotyping for efficient digital characterization that can be performed during the periodic and routine regeneration of accessions in germplasm collections.

Key words: Molecular markers, Blup, *in vitro* culture, digital phenotyping.

RESUMEN

El mejoramiento convencional puede ser complementado mediante diferentes estrategias que incrementen la eficiencia de las metodologías y la tasa actual de aumento de los rendimientos a fin de satisfacer la demanda. El uso de marcadores moleculares con el objetivo de desarrollar mapas de ligamiento de la especie, el uso de Blup (*Best Linear Unbiased Prediction*) para una selección eficiente de progenitores a hibridar, el uso del cultivo *in vitro* para incrementar artificialmente el número de plantas F₁ o el uso de fenotipificación digital para una eficiente caracterización digital que puede realizarse durante la regeneración periódica y rutinaria de accesiones en colecciones de germoplasma.

Palabras clave: Marcadores moleculares, Blup, cultivo *in vitro*, fenotipificación digital.

INTRODUCCIÓN

La arveja (*Pisum sativum* L.) es una leguminosa autógama de estación fría y anual que se origina en áreas del Medio Oriente, el este del Cáucaso, Irán y Afganistán, y el oeste de la cuenca mediterránea (Smýkal *et al.*, 2011). Su genoma está organizado en siete pares de cromosomas ($2n=2x=14$) y el tamaño del genoma haploide se estima en 4,45 Gb (Smýkal *et al.*, 2012). Fueron y son hasta el día de hoy una fuente importante de alimento para animales y humanos. La especie es rica en proteínas, almidón de digestión lenta, azúcares solubles, fibra, minerales y vitaminas (Dahl *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta que el aumento de la población mundial requerirá una mayor producción de cultivos es necesario entonces, incrementar la tasa actual de aumento de los rendimientos para satisfacer esta demanda (Tester y Langridge, 2010). Para ello pueden recurrirse a diferentes estrategias.

Utilización de marcadores moleculares

En este contexto, el desarrollo de mapas de ligamiento se constituye en una herramienta útil para maximizar la probabilidad de éxito, ya que son herramientas poderosas para la investigación genética y el mejoramiento, y son el primer paso en: a) el análisis de rasgos cualitativos y cuantitativos; b) la introgresión de genes deseables y loci de rasgos cuantitativos (QTL); y c) clonación posicional o basada en mapas de genes responsables de rasgos económicamente importantes (Semagn *et al.*, 2006). Diferentes tipos de marcadores se han utilizado para desarrollar mapas de ligamiento de densidad moderada en arveja. Loridon *et al.* (2005), Sun *et al.* (2014) y Yang *et al.* (2015) utilizaron SSR (*Simple Sequence Repeats*); Deulvot *et al.* (2010) utilizaron SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*); Mishra *et al.* (2009) emplearon ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) y Barilli *et al.* (2010) construyeron sus mapas usando STS (*Sequence Tagged Sites*). Nosotros propusimos el uso de *Sequence Related Amplified Polymorphism* (SRAP) (Li y Quiros, 2001) para generar una serie de marcadores distribuidos en todos los cromosomas de arveja. Desde su desarrollo, estos marcadores se han empleado en una amplia gama de especies para la estimación de la diversidad genética (Bermejo *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2017; Kumar y Agrawal, 2017), en la construcción de mapas (Martin *et al.*, 2013; Padmakar *et al.*, 2015) y en análisis QTL (Liu *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2016).

Para su desarrollo se generó una población de mapeo F_2 derivada de un cruzamiento inicial entre dos cultivares DDR11 (*The Indian Council of Agriculture Research*) y Zav25 (material local derivado de nuestro programa) que son contrastantes para la mayoría de las características relacionadas con el rendimiento, como el número de vainas y semillas por parcela. Se evaluaron

un total de 25 combinaciones de cebadores SRAP en plantas F_2 y en ambas líneas parentales, generando 208 bandas/marcadores polimórficos. Este primer mapa de ligamiento (Guindón *et al.*, 2016) constó de 112 marcadores genéticos distribuidos en 7 grupos de ligamiento (LG), que cubren un total de 528,8 cM. La longitud de los LG varió de 47,6 a 144,3 cM (media 75,54 cM), con 9 a 34 marcadores.

Posteriormente y en un trabajo en conjunto con el Dr. Thomas Warkentin del *Crop Development Centre, Department of Plant Sciences*, de la Universidad de Saskatchewan, (Canadá), se profundizó en el desarrollo de un mapa de ligamiento genético usando SRAP, SSR y SNP para identificar QTL que controlan los caracteres relacionados con el rendimiento. Una población F_2 y sus familias $F_{2:3}$ derivadas de un cruce inicial entre cvs. Explorer (desarrollada por Svalof Weibull en Suecia), variedad a semi-áfila, con color verde de cotiledón y vainas y granos de tamaño intermedio y DDR14 (desarrollada por *Indian Council of Agriculture Research*), foliosa, con cotiledón color amarillo, vainas y granos de gran tamaño, fueron evaluadas con SRAP, SSR y técnicas GBS, que demostraron ser eficientes, generando un conjunto de 872 marcadores polimórficos para mapeo de ligamiento. El mapa resultante constó de 128 genes marcadores distribuidos en 9 grupos de ligamiento (LG) (Figura 1 a y b), que cubrieron 655,5 cM. La longitud de los LG osciló entre 49,1 y 114,8 cM, con 8 a 26 marcadores. La detección de QTL fue realizado utilizando el método mapeo de intervalo compuesto (CIM). Se detectaron un total de 45 QTL a través del generaciones y ambientes evaluados. Todos ellos fueron QTL importantes que explicaron más del 10% de la variación fenotípica (Guindón *et al.*, 2019b).

Estos estudios nos permiten aplicar estos conocimientos en el programa de mejora asistida por marcadores moleculares.

Selección eficiente de progenitores a hibridar: Uso de BLUP

Diferentes criterios han sido empleados para la selección de variedades a hibridar para generar una población F_2 susceptible de ser seleccionada. Un primer criterio está basado en la explotación de la heterosis para diferentes caracteres agronómicos luego de la hibridación ya que existe una correlación positiva entre heterosis y alta frecuencia de líneas recombinantes transgresivas (Rieseberg *et al.*, 1999; Espósito *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2015, Guindón *et al.*, 2018). Un segundo criterio consiste en la selección de variedades basado en sus valores fenotípicos, pero no es el más adecuado al estar estos valores fenotípicos influenciados por el efecto de las desviaciones ambientales. Un tercer criterio está basado en la utilización de valores genotípicos.

Lorenzana y Bernardo (2009) evaluaron la precisión de diferentes métodos para la predicción de valores

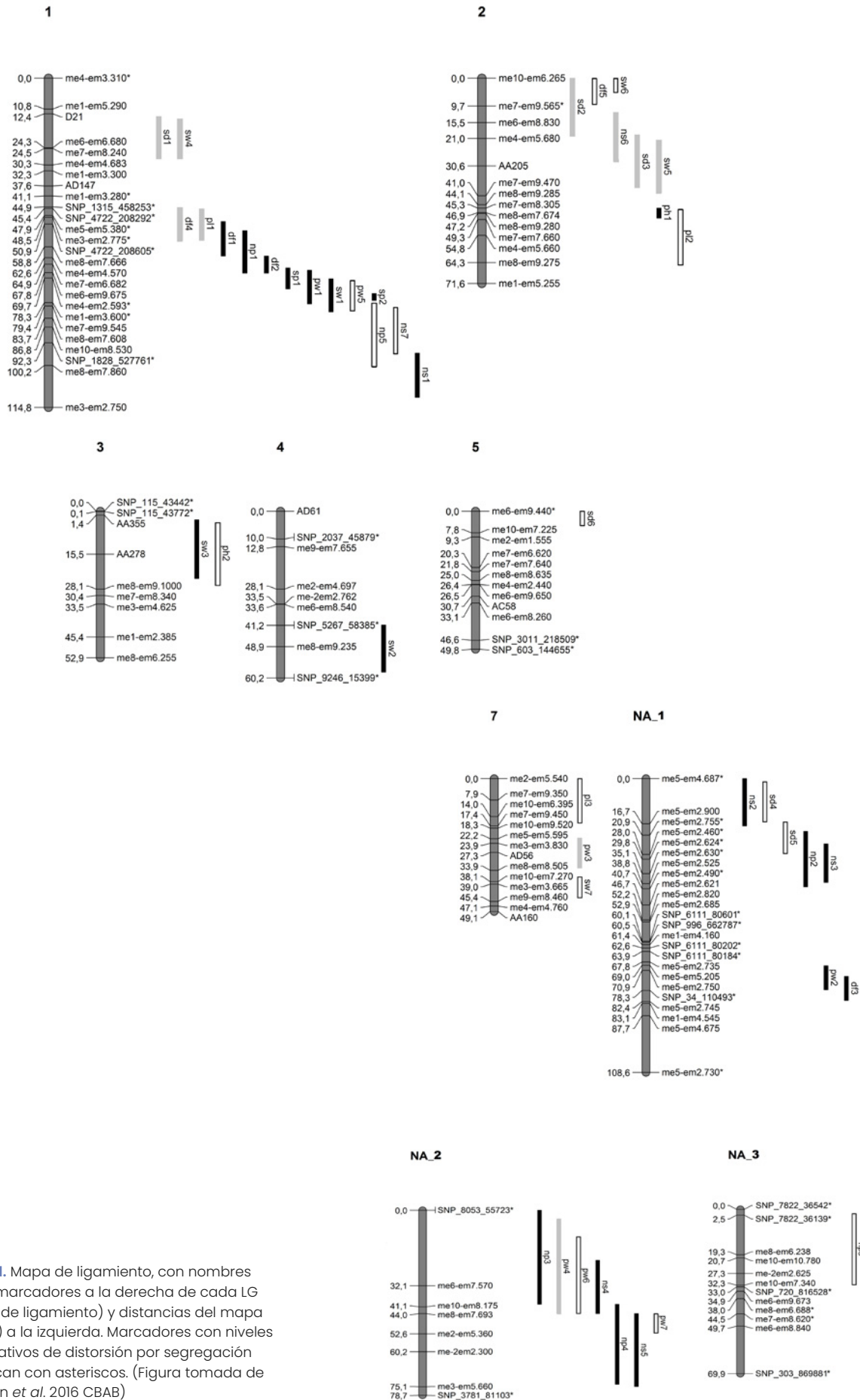


Figura 1. Mapa de ligamiento, con nombres de los marcadores a la derecha de cada LG (grupo de ligamiento) y distancias del mapa (en cM) a la izquierda. Marcadores con niveles significativos de distorsión por segregación se indican con asteriscos. (Figura tomada de Guindón *et al.* 2016 CBAB)

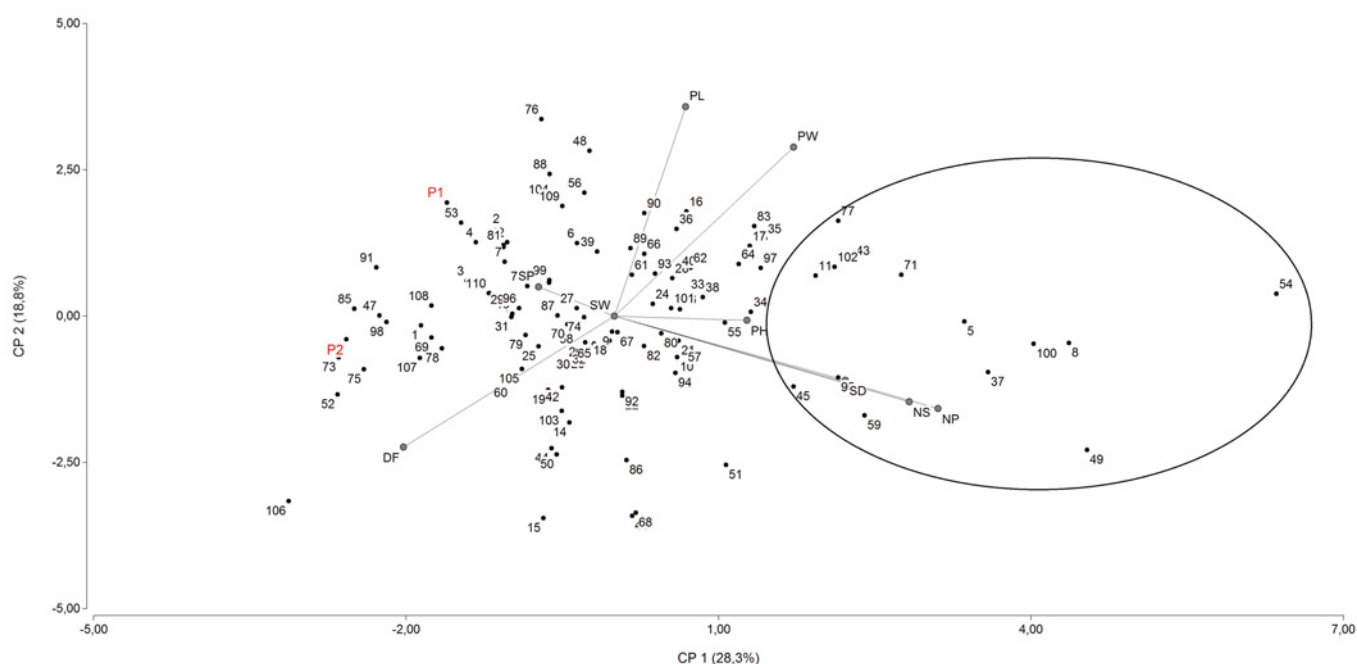


Figura 1. Relaciones entre las 110 familias F_3 derivadas de Explorer (P2) y DDR14 (P1) en base al análisis de componentes principales. Las familias dentro del círculo son transgresivas para número de semillas y vainas. La posición de los padres es indicada en rojo.

genotípicos y concluyeron que el enfoque BLUP (*Best Linear Unbiased Prediction*) es el mejor método para predecir los valores genotípicos en poblaciones biparentales ya que se corrigen mejor las variaciones extrañas, se pueden analizar datos desbalanceados y se puede incorporar la información del pedigrí (Piepho *et al.*, 2008).

Guindón *et al.* (2018) aplicaron BLUP para la predicción de valores genotípicos utilizando datos morfológicos de diferentes años correspondientes a las variedades progenitoras, la generación F_1 y las poblaciones F_3 ya que la población F_2 al no poderse replicar fue imposible establecer el modelo lineal para la obtención de los valores BLUP. Este análisis permitió la corrección por efectos ambientales. Estas estimaciones se utilizaron para el análisis genético de diferentes caracteres. Se observó heterosis para número de vainas (27,1%) y número de semillas (23,3%), caracteres que tienen un efecto directo sobre el rendimiento.

Un análisis de componentes principales (PCA) se realizó utilizando datos de BLUP para obtener una representación gráfica de la estructura de relaciones de las 110 familias F_3 (Figura 2). Se calcularon las distancias de Manhattan y la matriz de distancias se sometió a un análisis de agrupamiento utilizando el promedio ponderado.

Mediante el uso de BLUP y de un análisis de componente principales, fue posible elegir familias con buen desempeño lo que muestra la importancia de estas metodologías para los programas de mejora de arveja.

Uso del cultivo *in vitro*

En los programas de mejoramiento se requiere una gran cantidad de individuos F_2 para realizar el proceso de selección correctamente, pero a menudo hay pocas plantas disponibles ya que ciertos cruzamientos producen pocas semillas F_1 , probablemente debido a diferencias en la estructura de la flor que dificultan la castración manual. Para obtener más semillas F_2 , es necesario entonces proceder a incrementar artificialmente el número de plantas F_1 .

Se han reportado estudios de regeneración *in vitro* en arveja, utilizando diferentes explantos, como nudos cotiledonales (Rajput y Singh, 2010), cotiledones (Pniewsky *et al.*, 2003), folíolos inmaduros (Fujioka *et al.*, 2000), embriones cigóticos (Sánchez y Mosquera, 2006) y semillas maduras (Zhihui *et al.*, 2009). Espósito *et al.* (2012) desarrollaron un protocolo rápido, eficiente y reproducible para la regeneración de brotes *in vitro* y el enraizamiento de dichos vástagos para la obtención de múltiples genotipos F_1 usando semillas maduras (Figura 3).

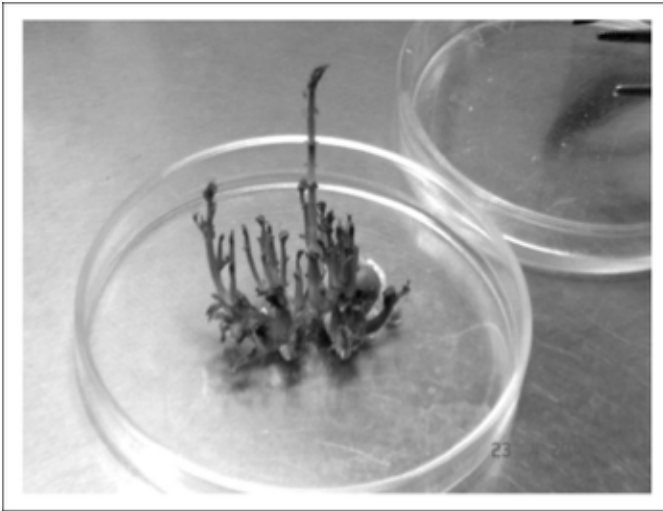


Figura 3. Múltiples vástagos desarrollados de la semilla original.

Las plántulas regeneradas se trasplantaron al suelo en macetas, encontrándose que el 60% de los vástagos regenerados enraizaron en un período de seis semanas. Generalmente, las tasas de mortalidad se debieron a tallos y raíces débiles que no pudieron adquirir los nutrientes del suelo cuando son transferidas del medio agarizado. Las plántulas que desarrollaron normalmente se trasplantaron a macetas y en invernadero cultivándose hasta la madurez.

Este procedimiento se puede utilizar en programas de mejoramiento lo que permitirá trabajar con más plantas siempre que los cruces tengan poca producción de semillas.

Uso de fenotipificación digital

La fenotipificación de plantas vincula la genómica con la ecofisiología y la agronomía. Por lo general, se realiza mediante tecnología no destructiva, automatizada y basada en imágenes, y genera información para la eficiente caracterización digital y que se puede realizar durante la regeneración periódica y rutinaria de accesiones en colecciones de germoplasma. Gatti *et al.* (2017) estudiaron 92 accesiones del género *Pisum* de diferentes especies y subespecies durante dos ciclos de cultivo midiendo caracteres asociados al tamaño y color de semillas y vainas utilizando imágenes digitales. Estas características obtenidas por fenotipificación digital, demostraron ser marcadores adecuados para la evaluación de la diversidad genética y útiles en el análisis evolutivo, permitiendo la discriminación de las principales especies silvestres y cultivadas del género *Pisum*. También se la ha utilizado para fenotipificar varios parámetros del estado fitosanitario, como contenido de clorofila (Dutta Gupta *et al.*, 2013), contenido de nitrógeno (Vollmann *et al.*, 2011) y estado

de la enfermedad (Porob *et al.*, 2017).

Durante el almacenamiento de la arveja pueden ocurrir pérdidas significativas en el color, debido a la pérdida de clorofila o al blanqueado de las semillas y este deterioro influye en la comercialización y en la decisión de compra por parte de los consumidores. La magnitud de esta pérdida de color puede ser estudiada a partir de la técnica de envejecimiento acelerado, que implica someter a las semillas a condiciones severas de temperatura y humedad relativa y usar el fenotipificación digital es para medir dicho deterioro. Guindón *et al.* (2019 a), demostraron la existencia de un comportamiento diferencial de las variedades en el mantenimiento del color verde de las semillas mediante esta metodología, pudiendo así también ser aplicada en procesos de selección durante la obtención de nuevas variedades.

BIBLIOGRAFÍA

- Barilli E., Satovic Z., Rubiales D., Torres A.M. (2010) Mapping of quantitative trait loci controlling partial resistance against rust incited by *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in a *Pisum fulvum* L. intraspecific cross. *Euphytica* 175: 151-159.
- Bermejo C., Gatti I., Caballero N., Cravero V., Martin E., Cointry E. (2014) Study of diversity in a set of lentil RILs using morphological and molecular markers. *Aust. J. Crop Sci.* 8: 689.
- Dahl W., Foster L., Tyler R. (2012) Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British J. Nutrition* 108: 3-10.
- Deulvot C., Charrel H., Marty A., Jacquin F., Donnadiou C., Lejeune Hénaut I., Burstin J., Aubert G. (2010) Highly-multiplexed SNP genotyping for genetic mapping and germplasm diversity studies in pea. *BMC Genomics* 11: 468-478.
- Dutta Gupta S., Ibaraki Y., Pattanayak A.K. (2013) Development of a digital image analysis method for real-time estimation of chlorophyll content in micropropagated potato plants. *Plant Biotechnol. Rep.* 7: 91-97.
- Espósito M.A., Almirón P., Gatti I., Cravero V., López Anido F., Cointry E.L. (2012) A rapid method to increase F_1 plants number in breeding pea programs (*Pisum sativum* L.). *Genet. Mol. Res.* 1: 2729-2732.
- Espósito M.A., Bermejo C., Gatti I., Guindón M.F., Cravero V., Cointry E.L. (2014) Prediction of heterotic crosses for yield in *Pisum sativum* L. *Sci. Hortic.* 177: 53-62.
- Fujioka T., Fujita M., Iwamoto K. (2000) Plant regeneration of Japanese pea cultivars by *in vitro* culture of immature leaflets. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 69: 656-658.
- Gatti I., Guindón F., Bermejo C., Cointry E.L. (2017) Analysis of variability and phylogeny in *Pisum* (*Pisum* spp.) using digital

- phenotyping and morphological traits. *AJCS* 11 (12): 1599-1605.
- Guindón M.F., Agüero M.G., Cointry E. Evaluación del cambio de color en arveja (*Pisum sativum* L.) por efecto del envejecimiento acelerado. Comunicaciones Libres XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, 26- 27 noviembre 2019 (a), Rosario, Santa Fe, p. 57.
- Guindón M.F., Martin E., Cravero V., Cointry E. (2018) Transgressive segregation, heterosis and heritability for yield related traits in a segregating population of *Pisum sativum* L. *Exp. Agric.* 55: 610-620.
- Guindón F., Martín E., Cravero V., Gali Krishna K., Warkentin T.D., Cointry, E.L. (2019b) Linkage map development by G BS, SSR and SRAP techniques and yield-related QTLs in pea. *Mol. Breed.* 39: 54-70.
- Guindón M.F., Martin E., Zayas A., Cointry E., Cravero V. (2016) Evaluation of SRAP markers for mapping of *Pisum sativum* L. *Crop Breed. Appl. Biotech.* 16: 182-188.
- Joshi D.J., Ravindrababu Y., Patel A.M., Chauhan S.S. (2015) Heterosis studies for grain yield and its contributing traits in field pea (*Pisum sativum* (L.) var. arvense). *Asian J. Bioscience* 10: 158-161.
- Kumar J., Agrawal V. (2017) Analysis of genetic diversity and population genetic structure in *Simarouba glauca* DC. (an important bio-energy crop) employing ISSR and SRAP markers. *Ind. Crop Prod.* 100: 98-207.
- Li G., Quiros C.F. (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 103: 455-461.
- Liu Z., Bao D., Liu D. (2016) Construction of a genetic linkage map and QTL analysis of fruit-related traits in an F₁ red fuji x hongrou apple hybrid. *Open Life Sci.* 11: 487-497.
- Lorenzana R.E., Bernardo R. (2009) Accuracy of genotypic value predictions for marker-based selection in biparental plant populations. *Theor. Appl. Genet.* 120: 151-161.
- Loridon K., McPhee K., Morin J., Dubreuil P., Pilet Nayel M.L., Aubert G., Rameau C., Baranger A., Coyne C., Lejeune Henaut I., Burstin J. (2005) Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 111: 1022-1031.
- Martin E.A., Cravero V.P., Lopez Anido F., Cointry E.L. (2016) QTLs detection and mapping for yield-related traits in globe artichoke. *Sci. Hortic.* 202: 156-164.
- Martin E., Cravero V., Portis E., Scaglione D., Acquaviva E., Cointry E. (2013) New genetic maps for globe artichoke and wild cardoon and their alignment with an SSR-based consensus map. *Mol. Breed.* 32: 177-187.
- Mishra R.K., Kumar A., Chaudhary S., Kumar S. (2009) Mapping of the *multifoliolate pinna (mfp)* leaf-blade morphology mutation in grain pea *Pisum sativum*. *J. Genet.* 88: 227-232.
- Padmakar B., Kanupriya C., Latha P.M., Prashant K.S., Dinesh M.R., Sailaja D., Aswath C. (2015) Development of SRAP and SSR marker-based genetic linkage maps of guava (*Psidium guajava* L.). *Sci. Hortic.* 192: 158-165.
- Piepho H.P., Möhring J., Melchinger A.E., Büchse A. (2008) BLUP for phenotypic selection in plant breeding and variety testing. *Euphytica* 161: 209-228.
- Pniewsky T., Wachowiak J., Kapusta J., Legocki A. (2003) Organogenesis and long-term micropropagations polish pea cultivars. *Acta Soc. Bot. Pol.* 72: 295-302.
- Porob S., Naik G., Velingkar H., Amonkar D., Patil R., Bhat P. (2017) Plant Health Monitoring using Digital Image Processing. *IJETED* 7 (3): 147-151.
- Rajput V., Singh N.P. (2010) Studies on *in vitro* regeneration and direct organogenesis in pea (*Pisum sativum* L.). *Indian J Plant Physiol.* 15: 246-249.
- Rieseberg L., Archer M., Wayne R. (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* 83: 363-372.
- Sanchez E.A., Mosquera T. (2006) Establishing a methodology for inducing the regeneration of pea (*Pisum sativum* L.) explants, 'Santa Isabel' variety. *Agron. Colomb.* 24: 17-27.
- Semagn K., Bjørnstad A., Ndjiondjop M. (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotech.* 5 (25):2540-2568.
- Smýkal P., Kenicer G., Flavell A.J., Corander J., Kosterin O., Redden R.J., Ford R., Coyne C.J., Maxted N., Ambrose M.J., Ellis N.T.H. (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genet. Res.: Characterization and Utilization* 9: 4-18.
- Smýkal P., Aubert G., Burstin J., Coyne C., Ellis N., Flavell A., Ford R., Hýbl M., Macas J., Neumann P., McPhee K., Redden R., Rubiales D., Weller J., Warkentin T. (2012) Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. *Agronomy* 2: 74-115.
- Sun X., Yang T., Hao J., Zhang X., Ford R., Jiang J., Wang F., Guan J., Zong X. (2014) SSR genetic linkage map construction of pea (*Pisum sativum* L.) based on Chinese native varieties. *Crop J.* 2: 170-174.
- Tester M., Langridge P. (2010) Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327: 818-822.
- Vollmann J., Walter H., Sato T., Schweiger P. (2011) Digital image analysis and chlorophyll metering for phenotyping the effects of nodulation in soybean. *Comput. Electron Agric.* 75: 190-195.
- Yang T., Fang L., Zhang X., Hu J., Bao S., Hao J., Li L., He Y., Jiang J., Wang F., Tian S. (2015) High-throughput development of SSR markers from pea (*Pisum sativum* L.) based on next generation sequencing of a purified Chinese commercial variety. *PLoS One* 10: 1-14.

Zheng Y., Xu S., Liu J., Zhao Y., Liu J. (2017) Genetic diversity and population structure of Chinese natural bermudagrass (*Cynodon dactylon* L. Pers.) germplasm based on SRAP markers. PLoS One 12: e0177508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177508>.

Zhihui S., Tzitzikas M., Raemakers K., Zhengqiang M. (2009) Effect of TDZ on plant regeneration from mature seeds in pea (*Pisum sativum*). In Vitro Cell Dev. Biol. 45: 776-782.

—