

# ¿QUÉ PUEDEN HACER LAS TECNOLOGÍAS "ÓMICAS" POR UN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DE DURAZNERO?

## LA EXPERIENCIA EN LA EEA SAN PEDRO DEL INTA

### EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL DURAZNERO

Según las últimas estadísticas de la FAO, Argentina durante el 2016 produjo 248.000 toneladas (Tn) de duraznos y nectarinas, ubicándose como el undécimo productor a nivel mundial y el segundo en el hemisferio Sur después de Chile.

En la región noreste de la provincia de Buenos Aires se encuentra uno de los mayores polos productivos de duraznos y nectarinas para el consumo en fresco, concentrándose el 90% de esta producción en los partidos de San Pedro y Baradero. En la actualidad, se comercializan 72 variedades de duraznos y 23 variedades de nectarinas en el mercado central de Buenos Aires.

Esta amplia oferta se debe en parte al dinamismo de la renovación varietal de este frutal, que obliga a las instituciones a mantener programas de mejoramiento activos para sostener el suministro de nuevos genotipos.

Un programa clásico de mejoramiento genético de duraznero involucra el cruzamiento mediante polinizaciones controladas entre parentales elegidos y la posterior selección de individuos de la población en base a su fenotipo. La selección fenotípica involucra frecuentemente las evaluaciones a campo del árbol y análisis de los frutos en el laboratorio. Para aumentar las chances de obtener combinaciones genéticas favorables, las poblaciones deben tener el mayor número de individuos posibles, en el caso de duraznero típicamente resultan entre 200 a 500 híbridos.

Debido al periodo juvenil de la especie, desde la polinización hasta la primera evaluación de un cruce pueden pasar entre 3 y 4 años. Este período puede extenderse si se considera que comúnmente en las primeras campañas de producción de fruta no se expresa todo el potencial del genotipo; se pueden perder años de evaluación por climas atípicos o ataque de plagas y que además se re-

ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGROPECUARIA  
SAN PEDRO, INTA.



**DR. EN BIOLOGÍA MOLECULAR  
MAXIMILIANO ABALLAY**



**ING. AGR. GABRIEL VALENTINI**  
M.N. 12739\*19\*01



**ING. AGR. MARIA ELENA  
DAORDEN**  
M.N. 13066\*01\*01



**DR. EN BIOTECNOLOGIA  
GERARDO SÁNCHEZ**

quiere de al menos dos campañas de evaluación para considerar el efecto ambiental. Los altos costos (insumos, mano de obra, etc) necesarios para mantener las poblaciones de mejora estimulan a los mejoradores a adoptar tecnologías que supongan un atajo para obtener genotipos elite. Si bien existen diversas biotecnologías que pueden aplicarse a un programa de mejora de duraznero, en la actualidad la utilización de marcadores moleculares resulta la más adoptada.

## UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN LA MEJORA. LA TRANSICIÓN DESDE EL ANÁLISIS MARCADOR A MARCADOR A LA GENÓMICA

Los marcadores moleculares (MM) tienen dos aplicaciones principales en los programas de mejora: 1) En la elección de los genotipos parentales a cruzar y 2) En la selección temprana de individuos de las poblaciones de mejora. Respecto al segundo punto, realizar una preselección de plantas cuando están en semillero o vivero permite llevar a campo solo aquellos individuos que expresarán características deseadas. Por tanto, una forma de aumentar la eficiencia del programa de mejora es realizar una mayor cantidad de cruzamientos pero llevar a campo solo individuos preseleccionados por MM (100-300). De esta forma sólo se dedicará tiempo (y costos) a la evaluación de

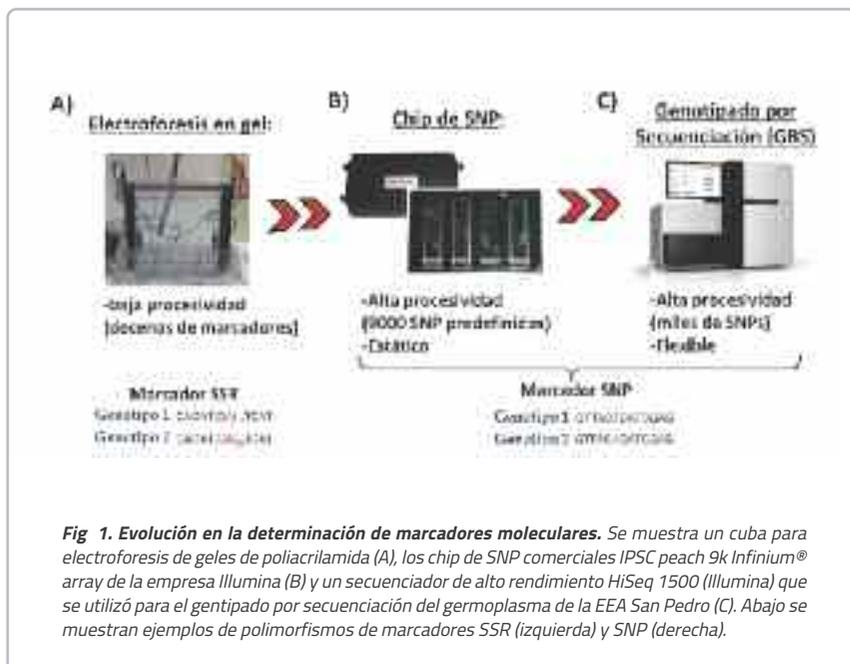


**Fig 2. Tecnología metabolómica para el análisis de VOC en durazno.** Los compuestos volátiles orgánicos que emanan del fruto definen su aroma. Estos mismos compuestos son responsables del sabor cuando se liberan durante el masticado en la boca. Mediante Cromatografía Gaseosa Acoplada a Espectrometría de Masa se puede detectar y cuantificar 110 compuestos en un único análisis.

los demás caracteres sobre un grupo elite aumentando las probabilidades de éxito de encontrar selecciones promisorias en las cruces iniciales. Hace más de 10 años se comenzó con el uso de MM en la EEA San Pedro, en esas primeras experiencias se utilizaban para comprobar el carácter híbrido (Fig. 1).

Analizando tres marcadores del tipo SSR se determinó que entre un 5 a 10% de los individuos de las poblaciones obtenidas no eran híbridos verdaderos, sino que provenían de autofecundaciones o polinizaciones extrañas. Si bien identificar estos individuos no deseados es ventajoso, el ahorro es mínimo. En la selección asistida por MM (SAM), donde se identifican aquellos individuos que expresarán un carácter de interés (o bien no expresarán un carácter

no deseado), el descarte es mayor y por tanto el ahorro. No obstante, se debe contar con un marcador asociado al carácter a mejorar o invertir en su identificación ad-hoc. Para lo último, se requiere generar una población de mapeo que segregue para el carácter de interés para luego genotipar y fenotipar la población con el objetivo de mapear (es decir situar) la región del cromosoma que controla dicho carácter. Para que el análisis resulte exitoso, el genotipado debe saturar todos los cromosomas de la especie lo cual se volvió más accesible con el advenimiento de las tecnologías genómicas que permiten el escrutinio de varios miles de marcadores en un único análisis. En duraznero la primer plataforma de genotipado de alta capacidad se basó en un "chip" de ADN comercial con el que se pueden indagar 9000 marcadores del tipo SNP (del inglés "Single Nucleotide Polymorphisms") por individuo analizado.



**Fig 1. Evolución en la determinación de marcadores moleculares.** Se muestra un cuba para electroforesis de geles de poliacrilamida (A), los chip de SNP comerciales IPSC peach 9k Infinium® array de la empresa Illumina (B) y un secuenciador de alto rendimiento HiSeq 1500 (Illumina) que se utilizó para el genotipado por secuenciación del germoplasma de la EEA San Pedro (C). Abajo se muestran ejemplos de polimorfismos de marcadores SSR (izquierda) y SNP (derecha).

Esta tecnología genómica fue utilizada para identificar MM asociados a caracteres como: tiempo de cosecha, tiempo de floración, requerimientos térmicos y contenido de compuestos volátiles en una población de mapeo desarrollada por el IVIA de España. Los volátiles (VOCs) son un grupo heterogéneo de compuestos que definen el aroma y sabor del fruto (Fig. 2).

En el caso del durazno, se han descrito a las lactonas y los ésteres como compuestos claves a la hora de definir el flavor del fruto y se ha desarrollado una tecnología metabolómica basada en cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas que permite el análisis de 110 compuestos volátiles del fruto del durazno en un único análisis, lo que representa el 90% de los compuestos identificados hasta la fecha. Combinando la tecnología metabolómica para el fenotipado con la genómica permitió identificar tres regiones del genoma de duraznero que controlan los niveles de un grupo de lactonas y ésteres.

Sólo el 5% de los individuos de la población poseían la combinación favorable de alelos que aumentan el contenido de estos volátiles que determinan el aroma y sabor del fruto. Por tanto, si estos MM fueran utilizados para pre-seleccionar individuos que se lleven a campo, se evaluarían los demás características (como performance agronómica por ejemplo) en un grupo elite de genotipos que desarrollarían frutos de buena calidad organoléptica.

En la actualidad los costos de los análisis metabolómicos resultan restrictivos para ser aplicados como criterios de selección en poblaciones de mejora, por tanto una estrategia factible sería identificar marcadores asociados en poblaciones más pequeñas (100-200 individuos) para luego utilizarlos en la selección temprana de individuos en una segunda población generada a partir de los mismos genotipos parentales.

## IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍAS "OMICAS" EN EL PROGRAMA DE LA EEA SAN PEDRO. ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS

El chip comercial para la identificación SNP en durazno es un sistema estático, es decir permite identificar un grupo predefinido de 9000 marcadores. El genotipado por secuenciación (GBS) ha emergido como una tecnología más favorable con respecto al chip comercial debido a que permite identificar SNPs polimórficos nuevos en los materiales analizados en cada estudio. Con el objetivo de genotipar la colección de germoplasma de la EEA San Pedro, desarrollamos un protocolo de GBS para el duraznero.

Esta tecnología se basa en la secuenciación de ADN de una porción del genoma que se obtiene mediante la digestión controlada con enzimas de restricción que debe optimizarse para cada especie. Analizamos diferentes combinaciones de enzimas, obteniendo una condición que mantiene la mayor proporción de

genoma para el posterior análisis. Bajo estas condiciones se secuenciaron dos genotipos parentales de nuestro programa de mejora, Dixiland y Summerprince, con el objetivo de poner a punto la tecnología.

El análisis de los datos de secuencia permitió la identificación de 1211 SNPs polimórficos distribuidos en los 8 cromosomas de esta especie. Con el protocolo optimizado se realizó recientemente la secuenciación de toda la colección de germoplasma de la EEA San Pedro que está formado por más de 200 genotipos de durazneros y nectarinas con orígenes genéticos diversos.

El análisis bioinformático de estos datos nos permitirá obtener el set completo de SNPs de cada genotipo de la colección resultando un paso fundamental para emprender la mejora con mayores garantías. Esta información tendrá como aplicación inmediata la elección de los mejores parentales de futuros cruzamientos de acuerdo a las distancias genéticas o el nivel de heterocigosidad de los genotipos de la colección. Otra aplicación directa será la identificación molecular inequívoca de un grupo de selecciones obtenidas en el programa de mejoramiento de la EEA San Pedro e inscriptas en el INASE recientemente.

El análisis integrado de los datos genómicos (es decir el set de SNP) con datos fenotípicos (caracteres medidos en la colección de germoplasma) permitirá identificar marcadores asociados a diferentes caracteres de interés para la mejora.

Está previsto el análisis metabolómico de la colección de germoplasma que permitirá no sólo caracterizar analíticamente la calidad organoléptica de cada cultivar sino también identificar los loci que controlen el contenido de cada compuesto volátil. Luego de la comprobación de estas asociaciones en poblaciones de mapeo se podrá realizar SAM para el mejoramiento del sabor y aroma de los duraznos.

### Bibliografía relacionada

1. Sánchez, G. (2016) "Implementar Biotecnología en los programas de mejora de frutales". En: *Desafíos para la fruticultura del Noreste de la provincia de Buenos Aires*. Revista *Agropost*, 142, 12.
2. Sánchez, G., Daorden, M.E., Valentini, G.H. and Pacheco, M.G. (2008) Molecular characterization of an Argentinean peach breeding program progeny. 18th EUCARPIA General Congress: Modern Variety Breeding for Present and Future Needs. Valencia, Spain.
3. Sánchez, G., Martínez, J., Romeu, J.F., García, J., Monforte, A.J., Badenes, M.L. and Granell, A. (2014) The peach volatillome modularity is reflected at the genetic and environmental response levels in a QTL mapping population. *BMC Plant Biology*, 14, 137.
4. Romeu, J.F., Monforte, A.J., Sánchez, G., Granell, A., García-Brunton, J., Badenes, M.L. and Ríos, G. (2014) Quantitative trait loci affecting reproductive phenology in peach. *BMC plant biology*, 14, 52.
5. Sánchez, G., Besada, C., Badenes, M.L., Monforte, A.J. and Granell, A. (2012) A Non-Targeted Approach Unravels the Volatile Network in Peach Fruit. *PLoS ONE*, 7, e38992.
6. Aguirre, N., Valentini, G.H., Filippi, C.V., Cervigni, G.L., Daorden, M.E. and Sánchez, G. (2017) Implementando tecnologías genómicas al programa de mejoramiento de la EEA San Pedro: Desarrollo de un protocolo de GBS para duraznero. Encuentro Latinoamericano *Prunus Sin Fronteras*, San Pedro, Argentine.
7. Daorden, M.E., Valentini, G.H. and Sánchez, G. (2017) El programa de mejoramiento de la EEA San Pedro: obtención de 30 selecciones avanzadas de duraznero, aptas para el cultivo en la costa norte bonaerense. Encuentro Latinoamericano *Prunus Sin Fronteras*, San Pedro, Argentine.