

Actas del IV Congreso Universitario Internacional en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria – 2023



Editores: Dr. Santiago García Martínez y Dra. María Serrano Mula



Actas del IV Congreso Universitario Internacional en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria – 2023

Editores:

Dr. Santiago García Martínez y Dra. María Serrano Mula

ISBN:

978-84-09-57202-1

Fecha de edición:

22/12/2023

Editorial:

Universidad Miguel Hernández de Elche

Maquetación:

Servicio de Innovación y Planificación Tecnológica (SIPT)



Puesta a punto de un marcador molecular para identificar la presencia del alelo *alcobaça* en el tomate De colgar

A. García¹, P. Carbonell¹, J.A. Cabrera¹, A. Grau¹, A. Alonso¹, J.J. Ruiz¹ y S. García-Martínez¹

¹ Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO), EPSO-UMH carretera de Beniel km 3,2, 03312 Orihuela, España, e-mail: sgarcia@urnh.es

Resumen

El tomate De colgar o De penjar es un tipo varietal o conjunto de variedades muy populares en todo el arco mediterráneo español. Se trata de un tomate que ha sido seleccionado por los agricultores y que es apreciado por su jugosidad, sabor y especialmente por su facilidad de ser restregado en el pan. Su nombre deriva de las técnicas tradicionales de los agricultores, que cuelgan en la pared racimos de tomates cosidos por sus cálices o pedúnculos, y donde pueden llegar a permanecer largo tiempo sin perder su calidad y textura. Esto se debe a la presencia de un gen de larga vida en su ADN, conocido como alelo *alcobaça* (*alc*), el cual se asocia a la ralentización de la maduración postcosecha. En el presente trabajo, se ha diseñado un marcador molecular que permitirá controlar el alelo *alc* en laboratorio en un proceso rápido, preciso y de bajo coste. Para ello, se ha transformado un marcador CAPS, basado en un SNP entre los alelos *alc* y *ALC*, en un marcador para la técnica HRM. Se han realizado diversas pruebas para optimizar la PCR y el *melting*, con el objetivo de diferenciar inequívocamente los individuos homocigotos y heterocigotos. Este marcador será de gran utilidad para el genotipado de una gran colección de tomate De colgar, permitiendo identificar las accesiones con el alelo *alc* sin necesidad de realizar largos estudios postcosecha.

Palabras clave: HRM, De penjar, tradicional, *melting*, genotipado

Development of a molecular marker to identify the presence of the *alcobaça* allele in the De colgar tomato

Abstract

The De colgar or De penjar tomato is a varietal type or group of varieties very popular in the Spanish Mediterranean coast. It is a tomato selected by farmers and appreciated for its juiciness, flavour and especially for its ease of being rubbed into bread. Its name derives from the traditional techniques developed by the farmers, since they hang in the wall bunches of tomatoes sewn by their stalks, where they can stay for a long time without depreciation in quality or texture. This is explained by the presence of a long-life gene in its DNA known as *alcobaça* (*alc*) allele, which performances slowing down postharvest ripening. In currently work, we have designed a molecular marker that will allow to control the *alc* allele in the laboratory in a fast, accurate and low-cost procedure. For this, we converted a CAPS marker, based on a SNP between *alc* and *ALC* alleles, into a marker for HRM method. We performed several experiments to optimise the PCR and melting, with the aim to unequivocally distinguish the homozygous and heterozygous samples. This marker will be very useful to genotyping a great De colgar tomato collection, allowing identify the accessions carrying the *alc* allele without the need to perform long postharvest studies.

Keywords: HRM, De penjar, traditional, melting, genotyping

Introducción

El aumento de la demanda de productos tradicionales y con buen comportamiento postcosecha han ocasionado un creciente interés sobre el tomate De penjar o De colgar. Se trata de un tipo varietal tradicional cultivado en la zona mediterránea española, obtenido por los agricultores a partir de la selección de cruces espontáneos. Es apreciado por sus características organolépticas, tamaño reducido, facilidad para ser restregado en el pan y por su comportamiento postcosecha, pudiendo ser superior a los 6 meses en casos extremos según las condiciones pre y postcosecha (Casals, 2012).

Sus frutos se conservan colgados (“penjats”, confiriéndole su nombre) en el techo de los desvanes, previamente cosidos en ramilletes, a temperatura ambiente. Esta aptitud postcosecha les diferencia tanto de otras variedades de tomate tradicionales, cuya vida útil suele ser de 5 a 9 días, como de las variedades larga vida comerciales (*long shelf life*), cuyo comportamiento durante el almacenamiento es debido a la incorporación de genes de larga vida (Casals, 2012).

La larga conservación del tomate De penjar, la cual habitualmente puede llegar hasta los 4 meses sin producirse grandes pérdidas (concretamente 127 días de promedio, variando entre 78 y 139 días; Casals et al., 2012), se debe a la presencia del alelo mutante *alcobaça* (*alc*), descrito por primera vez por Almeida (1961). Se trata de una mutación monogénica que afecta a un gen regulador de la maduración. Concretamente, se debe a la sustitución de una base de timina por una de adenina en la secuencia del gen NAC-NOR en la posición 1100 de la secuencia AY573803 de Genbank (Casals et al., 2012). El gen NAC-NOR afecta a la síntesis del etileno, un papel importante en la maduración del fruto del tomate (Gao et al., 2020). Por consecuencia, la maduración es más lenta (Casals et al., 2012).

Los marcadores moleculares son una herramienta muy empleada para el genotipado y la selección de plantas en los programas de mejora. Hasta el momento, para la identificación de la presencia del alelo *alcobaça* en muestras De penjar se ha empleado CAPS (*Cleaved Amplified Polimorphic Sequences*) y AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (Casals 2012; Casals et al., 2012). Sin embargo, el uso de CAPS, en comparación con la técnica HRM (*High Resolution Melting*) es mucho más lento, debido a que requiere de la realización de una PCR, digestión y preparación de gel de electroforesis (Mader et al., 2008; Shavrukov, 2016). Por ello se ha decidido diseñar un marcador para HRM, basado en el SNP (*Single nucleotide polymorphism*) asociado a la mutación *alc* (Casals et al., 2012)

El HRM es una técnica simple y rápida, que consiste en una PCR cuantitativa (qPCR) para conseguir un nivel de amplificación óptimo del fragmento que presenta el SNP, seguido de un proceso de “melting” (desnaturalización progresiva del ADN). Esto permite identificar distintos alelos debido a la diferencia de energía de enlace existente entre los nucleótidos (Liew et al., 2004).

El objetivo principal de este trabajo es diseñar un marcador molecular basado en un SNP para identificar el alelo *alc* a partir de la técnica HRM.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se utilizaron 40 plantas control de genotipo conocido: ocho mutantes *alc* homocigotos (*alc/alc*), 12 heterocigotos (*ALC/alc*) y 20 homocigotos con maduración normal (*ALC/ALC*); 23 de estos controles fueron facilitados por el equipo de Joan Casals (Fundació Miquel Agustí, Cataluña), y el resto los aporta el propio grupo de Biodiversidad Agrícola y Mejora Genética de Variedades del CIAGRO-UMH.

Extracción de ADN y cuantificación

La extracción del ADN de las muestras se realizó por el método del SDS (Dellaporta et al., 1983), y posteriormente se resuspendió el precipitado de ADN en 50 μ l de agua estéril. Todas las muestras de ADN se cuantificaron usando NanoPhotometer N50 (IMPLEN), y se realizaron diluciones para reducir su concentración a 20-30 ng/ μ l.

Diseño de marcador molecular para HRM

El diseño del nuevo marcador se basó en el polimorfismo de tipo SNP entre los alelos *alc* y *ALC*, descrito previamente por Bota et al. (2014) en el gen NAC-NOR. A partir de este se diseñaron diferentes cebadores mediante el programa Primer3 y se seleccionaron los más adecuados en función del tamaño del amplicón (Tabla 1) y la posición del SNP en el amplicón.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores escogidos

Marcador	Secuencia cebadores (5'-3')	Longitud amplicón PCR (pb)
Alc-2	F – GGGCTGCAACATCGGGTTAT R – ACCTTTTGTGTTCCACCGGA	76
Alc-5	F – GCTGCAACATCGGGTTATTGG R – ACCCCAACTTTTGTGTTCCA	80
Alc-7	F – AAATATCCTAACGGGCGGAGG R – CCTTTTGTGTTCCACCGGAAG	103
Alc-10	F – AAATCGGGCTGCAACATCG R – ACCCCAACTTTTGTGTTCC	87

PCR y electroforesis

Se realizó una PCR y posterior electroforesis en gel de agarosa al 3% con ocho muestras aleatorias y los cuatro marcadores seleccionados. Este primer paso nos permite comprobar que los amplicones derivados de los marcadores amplifican adecuadamente y que presentan un tamaño adecuado. Se descartaron aquellos marcadores que no se visualizaban correctamente en el gel, debido a que una inadecuada amplificación podría interferir en las curvas de *melting* y por tanto en la identificación del alelo *alcobaça* mediante la técnica de HRM.

Puesta a punto del marcador para HRM

Las pruebas de HRM se realizaron en placas de 96 pocillos mediante el instrumento Lightcycler® 480 de Roche, el cual realiza la PCR y posteriormente el *melting* de las muestras permitiendo, mediante el análisis por software, diferenciar los genotipos en función de la temperatura de *melting* (T_m). El programa empleado consistió en una etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 min (4,4 °C/s), seguido de 45 ciclos de PCR (cada ciclo son 15 s a 95°C, 15 s a 60°C y 10 s a 72°C) a una temperatura de hibridación de los cebadores de 60°C, un *melting* de 60 a 95 °C con una adquisición continua de temperatura de 0,06 °C/s (previa etapa de enfriamiento de 95°C a 40°C), y finalmente una etapa de enfriamiento hasta 40°C (etapa de 30 s).

Inicialmente se realizó una prueba con quince muestras control aleatorias para seleccionar el marcador en función de los resultados de la amplificación de la PCR (forma de la curva y posición del *crossing point*) y según la capacidad para diferenciar los genotipos tras el *melting*. La mezcla de reacción para el proceso de HRM consistió en 5 μ l de *Master mix* 2x (Roche; Cat. No. 04909631001), 0,20 μ l de cada cebador a 10 mM, 1,20 μ l de MgCl₂ a 25 mM y 2,50 μ l H₂O, junto con 1 μ l de ADN de las muestras control, incluyendo además un blanco.

Tras ello se llevaron a cabo distintas pruebas para mejorar la detección de los tres genotipos del polimorfismo en todo el material vegetal. Se realizó un ensayo con variaciones en la concentración de MgCl₂ (1,2; 1,4; 1,6 μ l) debido a su efecto sobre el funcionamiento de la Taq polimerasa y, por tanto, en la amplificación durante la PCR (Markoulatos et al., 2002). Sin embargo, debido a la dificultad para

distinguir los dos genotipos homocigotos se probó con la introducción de 5,25, 7, 8,75 y 10,5 ng/μl de ADN de una muestra de genotipo conocido *ALC/ALC* (técnica *spike*) a cada una de las muestras control. Esta técnica es usada para aumentar la formación de heterodúplex en muestras con alelo mutante *alc*, facilitando la diferenciación entre los genotipos homocigotos en el proceso de *melting* (Liew et al., 2004; Palais et al., 2005).

Por último, se realizó una prueba con todo el material vegetal para verificar los resultados obtenidos.

Análisis de las curvas de *melting* obtenidas por HRM

Finalizadas las pruebas, se visualizaron las curvas de *melting* normalizadas y el *difference plot*, el cual agrupa las curvas en función de su forma y T_m , con el software asociado al Lightcycler[®] 480. Esto nos permitió determinar la concentración óptima de $MgCl_2$ y de ADN *spike* para poder identificar mediante HRM la presencia del alelo *alcobaça* en muestras de tomate De penjar.

Resultados y Discusión

La electroforesis en gel de agarosa (Figura 1) reveló una mala amplificación mediante el marcador Alc-5, ya que la mitad de las muestras ensayadas con este marcador no presentaron una buena visualización del amplicón derivado. Los marcadores Alc-2, Alc-7 y Alc-10 amplificaron con éxito, por lo que se emplearon para la prueba en HRM.

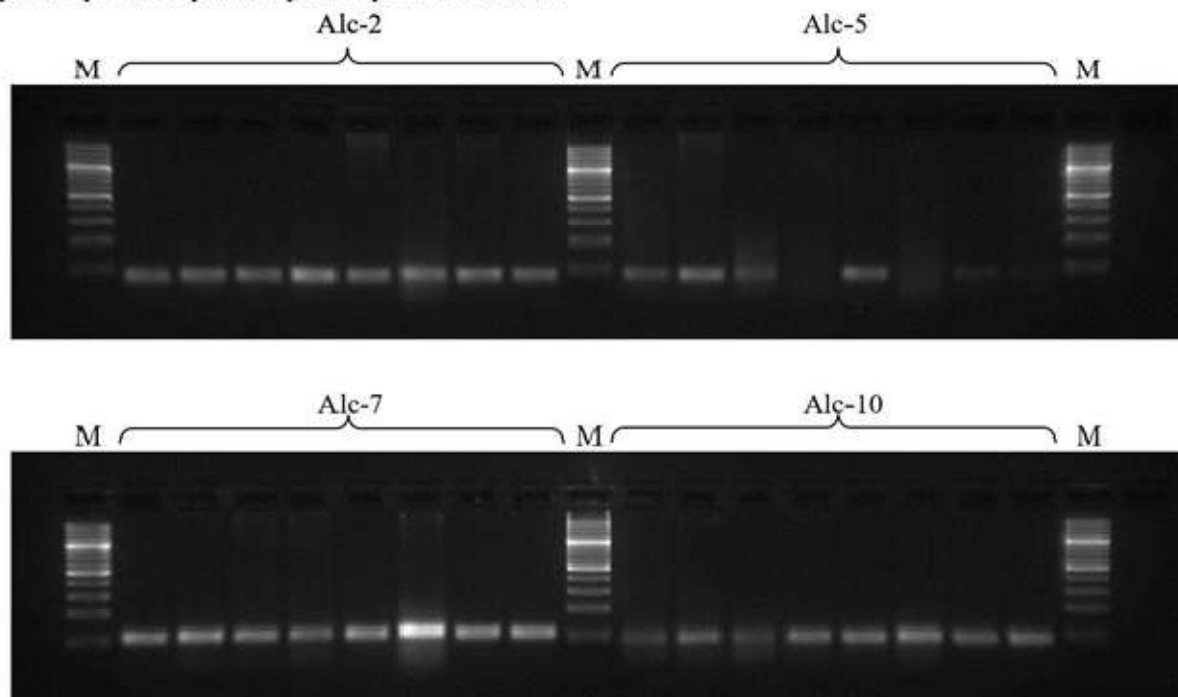


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 3% para la comprobación de la ampliación de los marcadores diseñados (Alc-2, Alc-5, Alc-7 y Alc-10). M: Marcador de tamaño molecular 100 pb DNA ladder plus de Thermo-Fisher.

Tras la primera prueba en HRM se descartaron los marcadores Alc-2 y Alc-7 en base a sus curvas de amplificación en la PCR cuantitativa. Ambos marcadores presentaron un *crossing point* (C_p) mayor a 30 en la mayoría de sus muestras (Figura 2), superando el rango óptimo (25-30 ciclos), y alcanzaron la meseta a diferentes alturas, siendo por tanto una amplificación inadecuada (Rouleau et al., 2009; Borràs et al., 2011). El Alc-10, por contra, presentó un C_p óptimo (alrededor de 25-28 ciclos) y mayor homogeneidad en las curvas de amplificación. Ninguno de los tres marcadores permitió diferenciar entre los homocigotos *ALC* y *alc*. El software agrupa las curvas de *melting* en dos grupos (Figura 3):

homocigotos (curva verde) y heterocigotos (curva rosa), lo cual es habitual en SNPs de tipo 4, donde el cambio de base A/T no permite diferenciar entre los homocigotos, ya que generan una T_m muy similar. Este problema no se presentó en los heterocigotos porque tras la amplificación se generan heterodúplex, los cual se traduce en cambios en la curva de *melting* haciéndola muy distinta a la curva de los homocigotos (Liew et al., 2004; Palais et al., 2005).

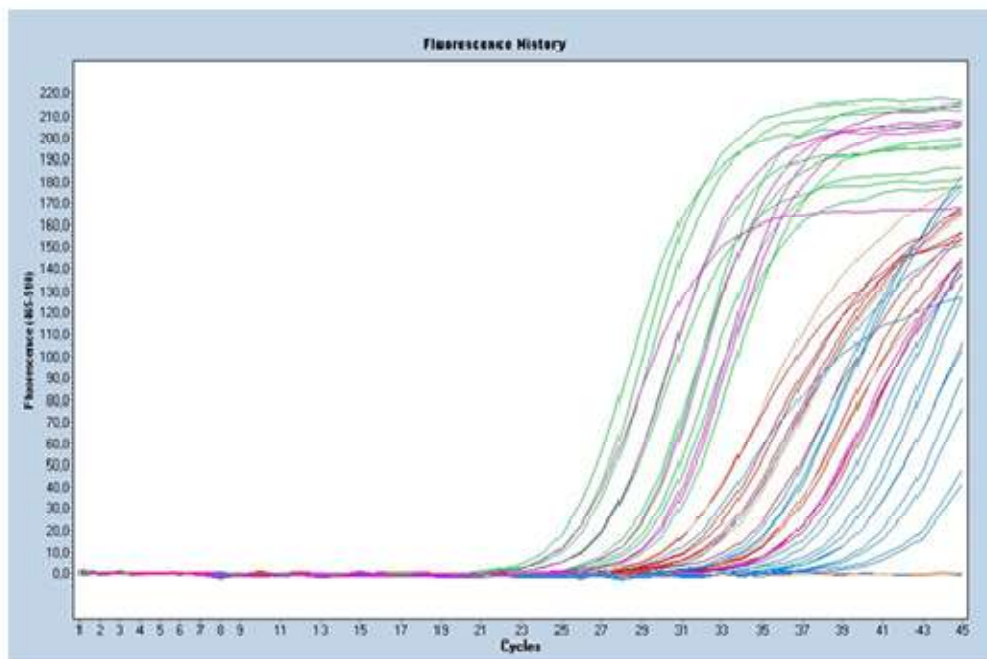


Figura 2. Curvas de amplificación de los marcadores Alc-2, Alc-7 y Alc-10 para las muestras control mediante qPCR. Las curvas verdes y rosas corresponden con Alc-10; las rojas y azules a Alc-2 y Alc-7.

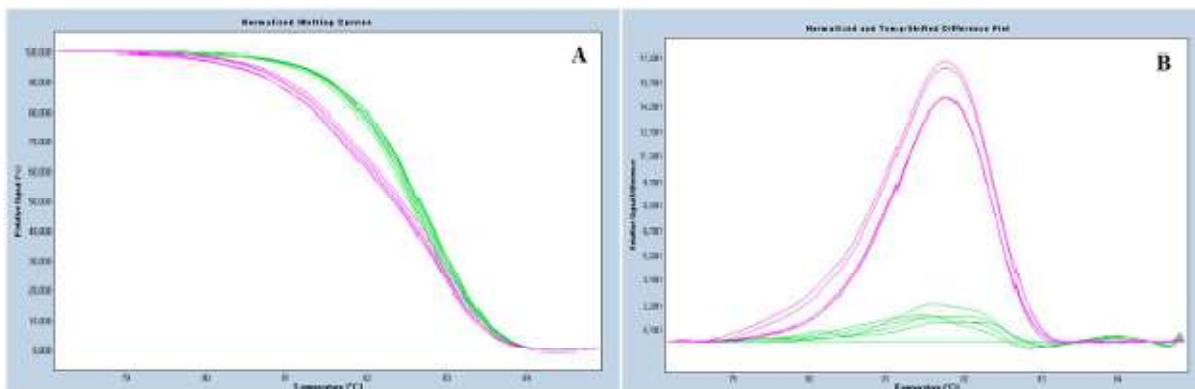


Figura 3. Curvas de HRM de las muestras control mediante el marcador Alc-10. **A)** Curvas normalizadas tras el *melting*. **B)** *Difference plot* o expresión gráfica de los grupos diferenciados. Heterocigotos: rosa; Homocigotos *alc* y *ALC*: verde.

Posteriormente se realizaron pruebas con diferente concentración de $MgCl_2$ utilizando el marcador Alc-10, con el objetivo de diferenciar los genotipos homocigotos. La concentración de esta sal en la reacción incide notablemente en la calidad de la amplificación y, por tanto, en el *melting* posterior (Markoulatos et al., 2002). En este sentido, destacan los resultados de la amplificación con 1,2 μ l de $MgCl_2$ 25 mM (Figura 4.A). Sin embargo, la variación de este parámetro no presentó efecto notable sobre la diferenciación de los tres genotipos (Figura 4.B).

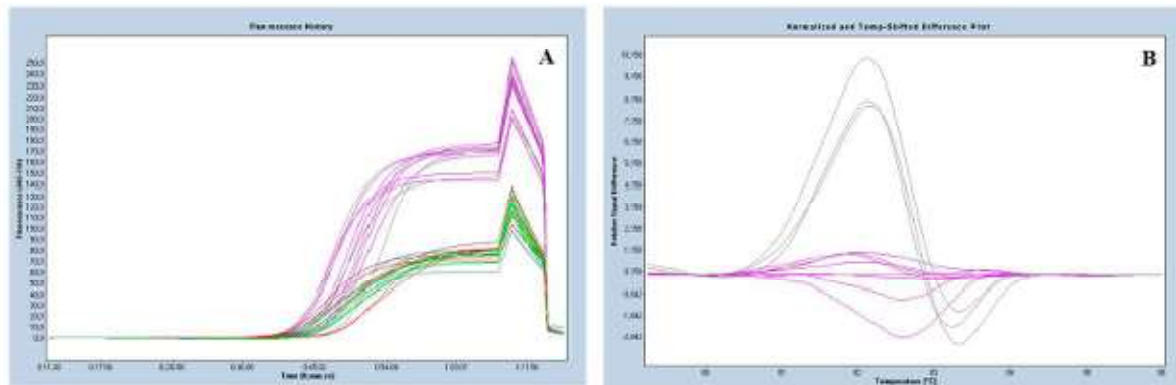


Figura 4. Curvas de HRM de la prueba de $MgCl_2$ con las muestras control mediante el marcador Alc-10A) Curvas de amplificación mediante qPCR. Curvas rosas y lilas: 1,2 μl $MgCl_2$; Otros colores: 1,4 y 1,6 μl $MgCl_2$.
B) *Difference plot* a 1,2 μl $MgCl_2$. Heterocigotos: gris; Homocigotos *alc* y *ALC*: rosa.

El empleo de la técnica *spike* permitió separar los homocigotos *alc* de las muestras *ALC*, así como de los heterocigotos en las muestras control (Figura 5). Esto se apreció principalmente a las concentraciones de 5,25, 7 y 8,75 $ng/\mu l$. Las curvas de HRM de las muestras homocigotas *alc* variaron respecto a las *ALC* debido a que el ADN añadido (de genotipo *ALC/ALC*) generaba heterodúplex en las muestras homocigotas *alc*, modificando la temperatura de *melting* (Liew et al., 2004). Las curvas de las homocigotas *ALC* no se vieron afectadas al añadir ADN del mismo tipo. Tampoco hubo variación apreciable en las muestras heterocigotas.

Para las pruebas posteriores, se optó por la concentración de 7 $ng/\mu l$ de ADN *spike*, ya que fue la que ofreció los resultados más claros en la diferenciación de los tres genotipos.

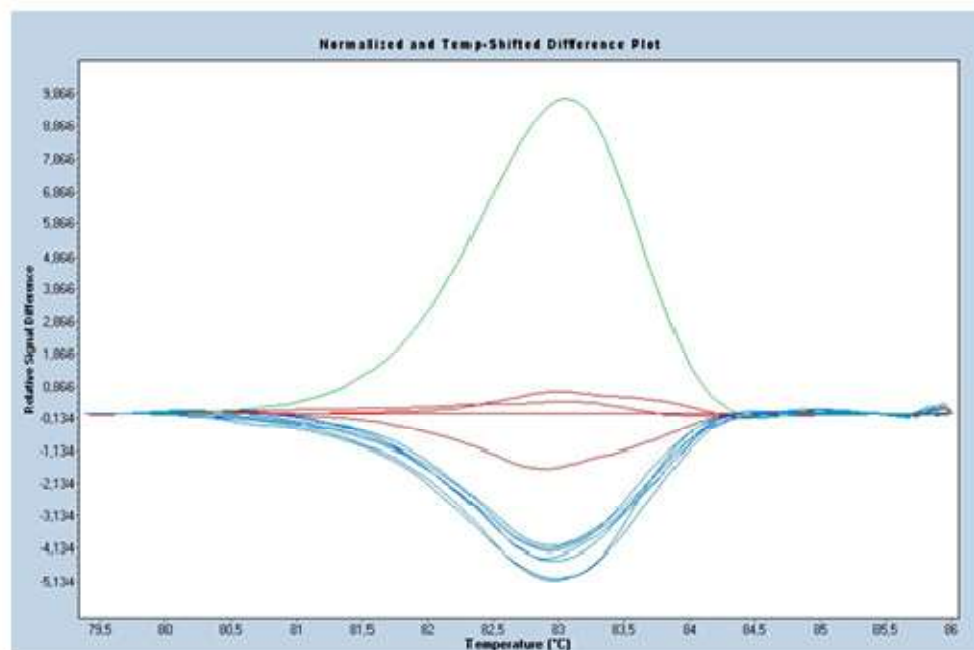


Figura 5. Curvas de HRM (*Difference plot*) de las muestras control amplificadas mediante el marcador Alc-10, añadiendo 7 $ng/\mu l$ de ADN *ALC/ALC* (*spike*) a cada muestra. Heterocigotos: verde; Homocigotos *alc*: rojo; Homocigotos *ALC*: azul.

Finalmente, se analizó todo el material vegetal (40 muestras), utilizando el marcador Alc-10 junto con la incorporación de 7 $ng/\mu l$ de ADN *ALC/ALC*. Como se observa en la Figura 6, esta técnica permite la diferenciación de alelo *alc* mediante HRM.

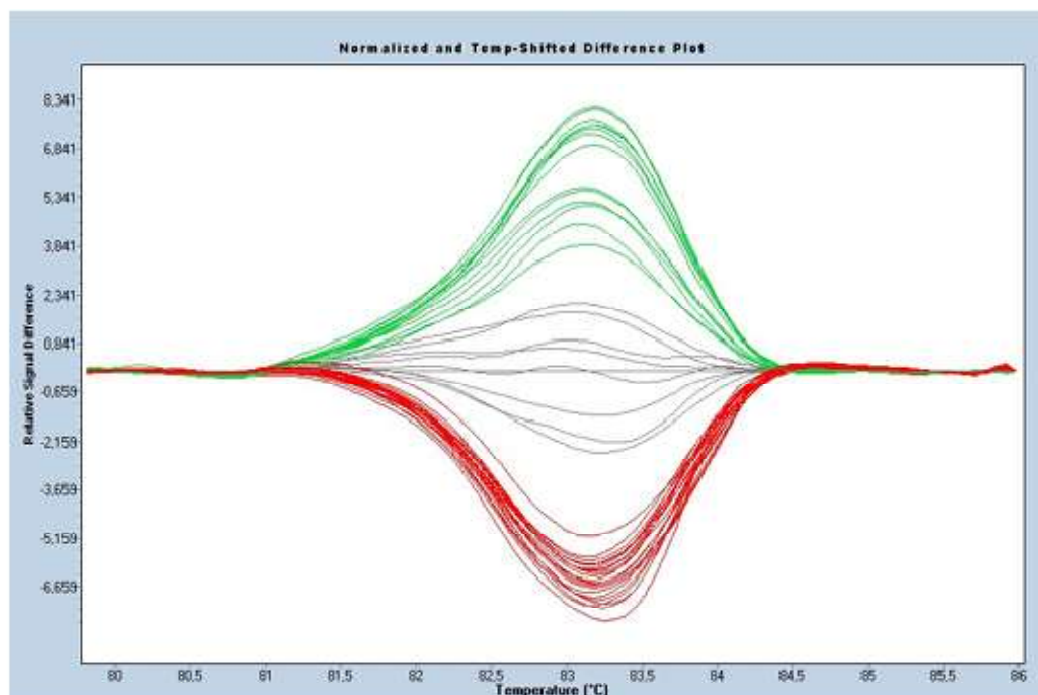


Figura 6. Curvas de HRM (*Difference plot*) del material vegetal de estudio empleando el marcador Alc-10 y 7 ng/ μ l de ADN *ALC/ALC* (*spike*). Heterocigotos: verde; Homocigotos *alc*: gris ; Homocigotos *ALC*: rojo.

Conclusiones

El SNP que permite la identificación del alelo *alcobaça* en muestras de penjar presenta dificultad para detectarse a través de un marcador de HRM, siendo necesario ajustar las variables principales de esta técnica, tales como el diseño previo de los cebadores y el volumen de $MgCl_2$, además es necesario la introducción de ADN de genotipo conocido *ALC/ALC* a cada una de las muestras para promover la formación de heterodúplex en las individuos homocigotas *alc* y conseguir diferenciarlos claramente. Concluimos que el marcador Alc-10, junto con la adición de 7 ng/ μ l de ADN *ALC/ALC* y 1,20 μ l $MgCl_2$ 25 mM a cada muestra, permite controlar el alelo *alcobaça* mediante la técnica de HRM.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias al proyecto I+D+i PID2022-137735OR-C32, financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER, UE.

Bibliografía

- Almeida, J. L. F. (1961). Um novo aspecto de melhoramento do tomato. *Agricultura*, 10, 43-44.
- Bota, J., Conesa, M. À., Ochogavía, J. M., Medrano, H., Francis, D. M., Cifre, J. (2014). Characterization of a landrace collection for Tomàtiga de Ramellet (*Solanum lycopersicum* L.) from the Balearic Islands. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61, 1131-1146. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0096-3>
- Borràs, E., Jurado, I., Hernan, I., Gamundi, M. J., Dias, M., Martí, I., Carballo, M. (2011). Clinical pharmacogenomic testing of KRAS, BRAF and EGFR mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing. *BMC cancer*, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-406>
- Casals Missio, J. (2012). Filogènia i variabilitat genètica de les varietats tradicionals de tomàquet (*Solanum lycopersicum* L.) Montserrat/Pera de Girona i Penjar: estratègies per a la millora de la seva qualitat organolèptica. <http://dx.doi.org/10.5821/dissertation-2117-94679>
- Casals, J., Pascual, L., Cañizares, J., Cebolla-Cornejo, J., Casañas, F., Nuez, F. (2012). Genetic basis of long shelf life and variability into Penjar tomato. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 219-229. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-0622-6>



- Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1, 19-21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Gao, Y., Wei, W., Fan, Z., Zhao, X., Zhang, Y., Jing, Y., Fu, D. Q. (2020). Re-evaluation of the nor mutation and the role of the NAC-NOR transcription factor in tomato fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 71(12), 3560-3574. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa131>
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., Wittwer, C. (2004). Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical chemistry*, 50(7), 1156-1164. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.032136>
- Mader, E., Lukas, B. & Novak, J. (2008). A Strategy to Setup Codominant Microsatellite Analysis for High-Resolution-Melting-Curve-Analysis (HRM). *BMC Genet* 9, 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-69>
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of clinical laboratory analysis*, 16(1), 47-51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>
- Palais, R. A., Liew, M. A., Wittwer, C. T. (2005). Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping. *Analytical biochemistry*, 346(1), 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.08.010>
- Rouleau, E., Lefol, C., Bourdon, V., Coulet, F., Noguchi, T., Soubrier, F., Lidereau, R. (2009). Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome. *Human mutation*, 30(6), 867-875. <https://doi.org/10.1002/humu.20947>
- Shavrukov, Y. N. (2016). CAPS markers in plant biology. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 6, 279-287. <https://doi.org/10.1134/S2079059716030114>