

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ACCESIONES LOCALES DE MANZANO PROSPECTADAS EN ZONAS DE MONTAÑA DE ARAGÓN

**Pina A., Abós E., Errea P.**

Unidad de Fruticultura, CITA de Aragón. Avda de Montañana, 930, 50059, Zaragoza, España

**Palabras claves:** cultivares, diversidad genética, *Malus x domestica*, microsatélites.

### INTRODUCCIÓN

La selección efectuada por los agricultores en sus huertos familiares durante generaciones, ha generado una gran diversidad de material vegetal frutal de calidad, que constituyen un claro patrimonio genético. Sin embargo, durante los años 50 y 60 tiene lugar un acusado proceso migratorio que dejó vacías la mayor parte de las localidades, con pérdidas demográficas que en ocasiones supuso más del 75% de la población de principios de siglo, siendo la provincia de Huesca la que sufrió los mayores abandonos de pueblos de toda España (Lasanta, 1990). La reducción del número de variedades cultivadas ha originado que un elevado número de variedades autóctonas de manzano seleccionadas durante generaciones hayan desaparecido del mercado al ser desplazadas por otras de orígenes diversos, pero que en general presentan menor adaptación a las condiciones medioambientales de muchas zonas productoras (sensibilidad a enfermedades, plagas, heladas primaverales, falta de producción). En Aragón, la superficie dedicada al cultivo del manzano es de 3.844 ha con una producción de 80.736 toneladas, correspondiendo un 57 % de la producción a la variedad 'Golden Delicious' (MARM, 2012). En este trabajo se ha realizado la caracterización molecular de accesiones locales de manzano prospectadas en zonas de montaña de las tres provincias aragonesas con el objetivo de valorar la diversidad genética y su futura introducción en el mercado, así como el enriquecimiento de la biodiversidad de los actuales bancos de germoplasma para la incorporación de caracteres de interés en programas de mejora.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Las extracciones de ADN a partir de hojas jóvenes se realizaron en las 183 accesiones locales prospectadas en las tres provincias de Aragón y en variedades de referencia procedentes del banco de germoplasma de manzano del CITA de Aragón. Se utilizaron un conjunto de 12 marcadores microsatélites (SSRs) ampliamente distribuidos en los 17 grupos de ligamiento del manzano (28f4, 05g8, CH01E12, CH01H01, CH01F02, CH01H10, CH02B12, 02b1, CH02D11, COL, CH02D08, CH04E05) y previamente descritos para esta especie (Guilford et al., 1997; Gianfranceschi et al., 1998; Liebhard et al., 2002). Los cebadores 'forward' fueron marcados en el extremo 5' con fluorocromos tipo 6-FAM, VIC, PET y NED y se realizaron cuatro PCR múltiples. Los productos de PCR se visualizaron en un secuenciador ABI PRISM 3130 y se analizaron con el programa Peak Scanner versión 1.0. La variabilidad genética se determinó mediante el cálculo del número de alelos por marcador, la frecuencia de cada alelo, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y la esperada ( $H_e$ ) y el número efectivo de alelos ( $N_e$ ). Se utilizó el programa informático NTSYSpc v2.10e para calcular las relaciones de similitud genética entre los genotipos de manzano prospectados y de referencia mediante un análisis de agrupamiento utilizando el método UPGMA ('Unweighted Pairwise Group Method') a partir de la matriz de similitud obtenida de la proporción de fragmentos comunes (Nei y Li, 1979).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo los 12 marcadores utilizados amplificaron un total de 203 alelos en 183 accesiones locales de manzano analizadas. El conjunto de SSRs amplificaron una media de 17 alelos por locus que oscila entre 11 y 27, en un rango de 93 – 259 bp. La heterocigosidad observada para cada locus fue calculada como el número de individuos heterocigotos del número total de individuos analizados para cada locus, con un valor medio de 0,58, y varía entre 0,24 y 0,97. Asimismo, los valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) fueron mayores que la observada ( $H_o$ ), detectándose un exceso de homocigotos con algunos SSRs. La mayoría de los loci estudiados mostraron al menos un genotipo con tres alelos excepto CH02B12, de tal forma que fue posible detectar individuos diploides y triploides. Se han encontrado 16 genotipos de 183 (9%) que presentaron un solo locus con un tercer alelo, comprobando que el tercer alelo también existía en otros cultivares diploides y triploides de referencia. Otros 30 genotipos de 183 (16%) presentaron tres alelos en más de un locus. Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán evaluar la variabilidad genética que aportan estas variedades locales de manzano prospectados en zonas de montaña de Aragón en relación a la que se conserva en los principales bancos de germoplasma de manzano españoles (INIA, UPNA, SERIDA, EEAD, CIAM, USC).

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por los proyectos nº RF2004-00030 y nº RF2009-00015 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Fondos FEDER y por el Gobierno de Aragón (grupo consolidado de Aragón A12).

## REFERENCIAS

- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., and Gessler, C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076.
- Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J.M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H., Forster, R. 1997. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): Abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94: 249-254.
- Lasanta, T. 1990. Diversidad de usos e integración espacial en la gestión tradicional del territorio en las montañas de Europa occidental. En: *Geología de las áreas de montaña*. J.M. García Ruiz (ed). 235-266.
- Liebhart, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C.D., Tarchini, R., Van de Weg, E., and Gessler, C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Mol. Breed.* 10: 217-241.
- MARM. 2012. Anuario de estadística del ministerio de medio ambiente y medio rural y marino 2010. Ministerio de medio Ambiente y medio Rural y Marino, Madrid.
- Nei, M., and Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 5269-5273.