



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN

# *ANALISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE FRUTALES RECUPERADOS. NUEVOS AVANCES EN LA IDENTIFICACION VARIETAL*



Ana Pina  
Unidad de Hortofruticultura  
CITA de Aragón  
Zaragoza.

\* Recuperación, evaluación y documentación de germoplasma frutal autóctono en vías de extinción. INIA (RF2009-00015-00-00). 2009-2012



2. MÉRITOS CIENTÍFICOS.

Objetivo 1- Prospección y georeferenciación

1.1 – Prospección selectiva de nuevo material

1.2 Georeferenciación

Objetivo 2- Recuperación y Caracterización

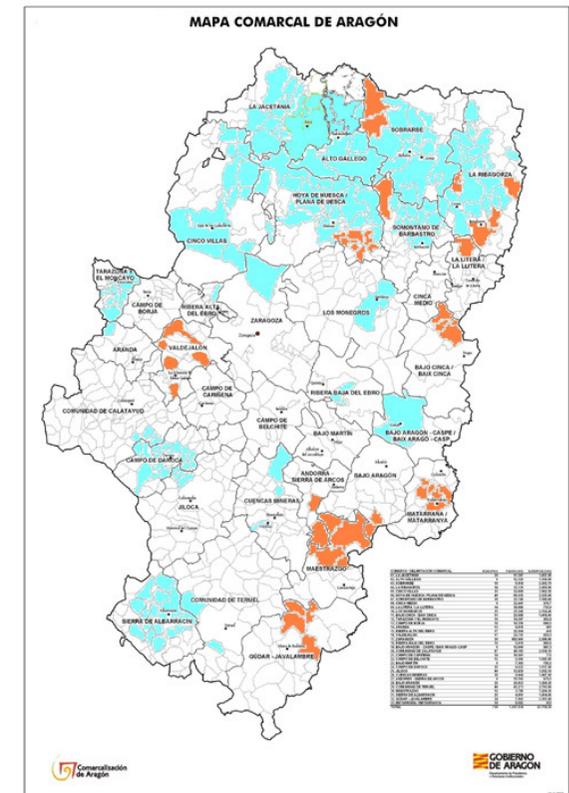
2.1 Recuperación

2.2 Caracterización

Caracterización molecular.

Caracterización pomológica.

Objetivo 3. Conservación y documentación



- Los cultivares autóctonos representan una importante fuente de variabilidad que requiere de su preservación para ser utilizados en programas de mejora.

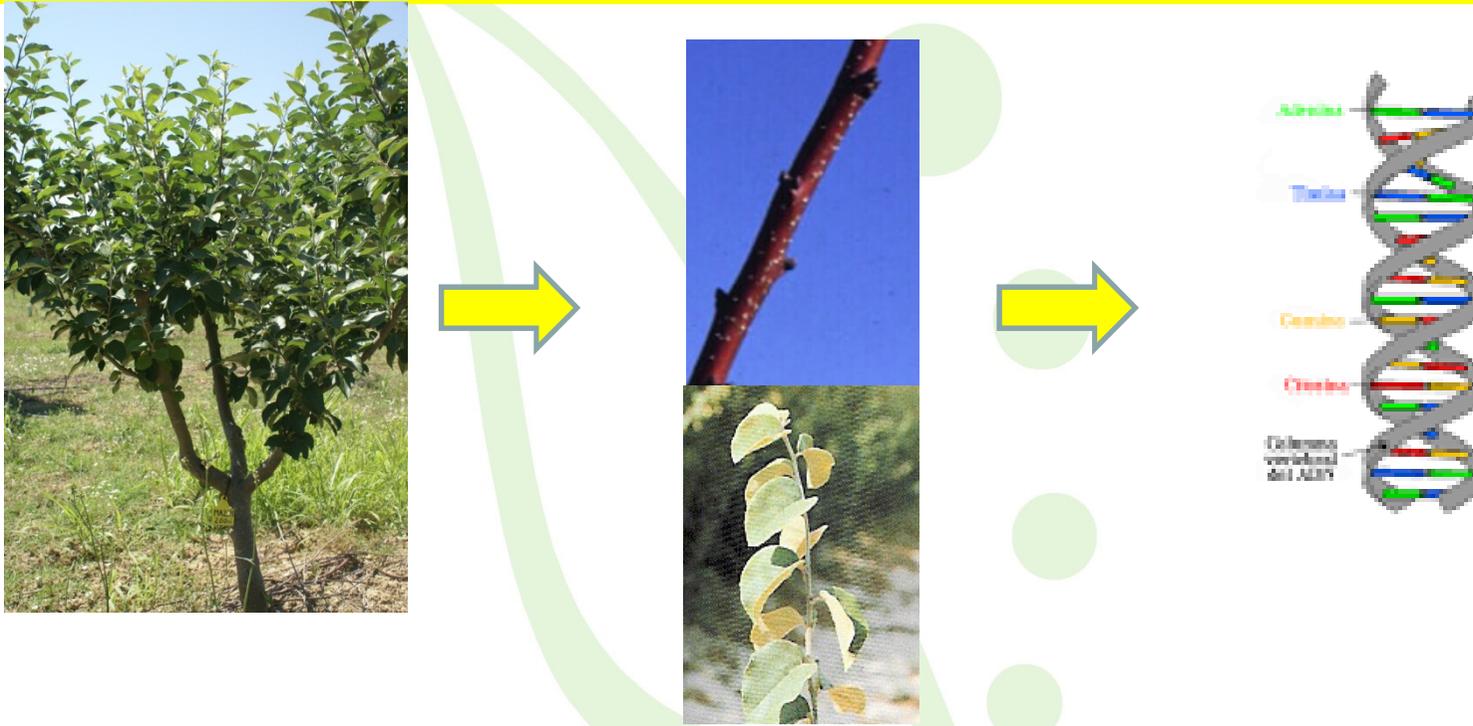
- \* Criterios de selección :
  - Calidad de fruto*
  - Valor nutracéutico*
  - Productividad*
  - Resistencia a plagas y enfermedades*
  - Época de maduración*
  - .....

- \* Existe una gran tradición en el cultivo de manzano, peral y ciruelo en España..



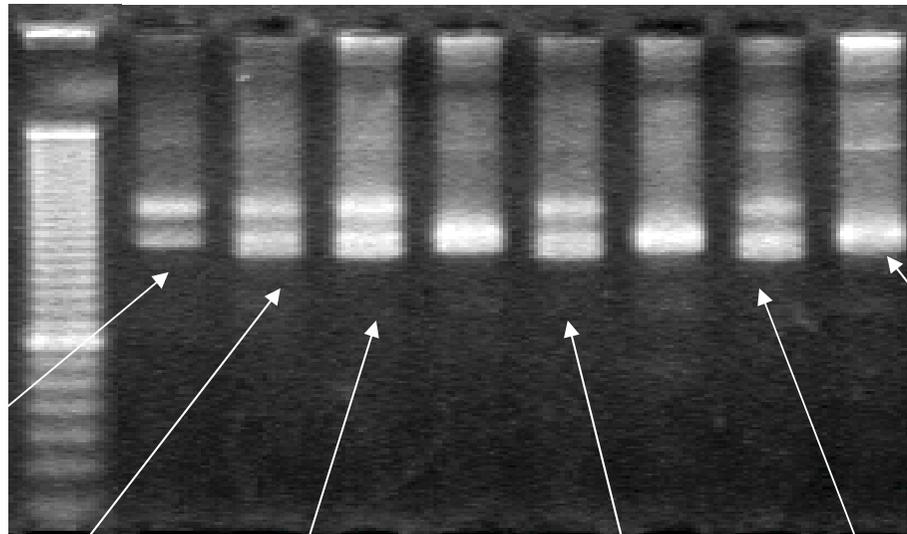


## Marcadores moleculares\_ Identificación basada en el genotipo \_ Estudio del ADN



- Es independiente del estado de desarrollo
- No está influenciado por el ambiente
- Puede realizarse en cualquier época del año
- Complementar la caracterización morfológica

- **Conservación y utilización de los recursos genéticos:**
  - Caracterización genotipos
    - Identificación, gestión de colecciones
  - Variabilidad genética
    - Estrategias conservación, diseño cruzamientos



- **Identificación variedades:**

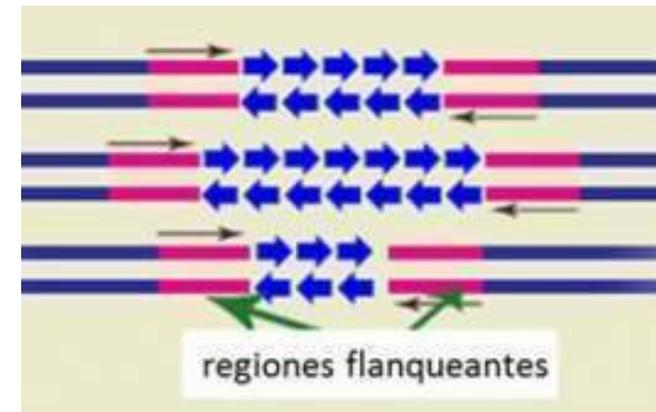
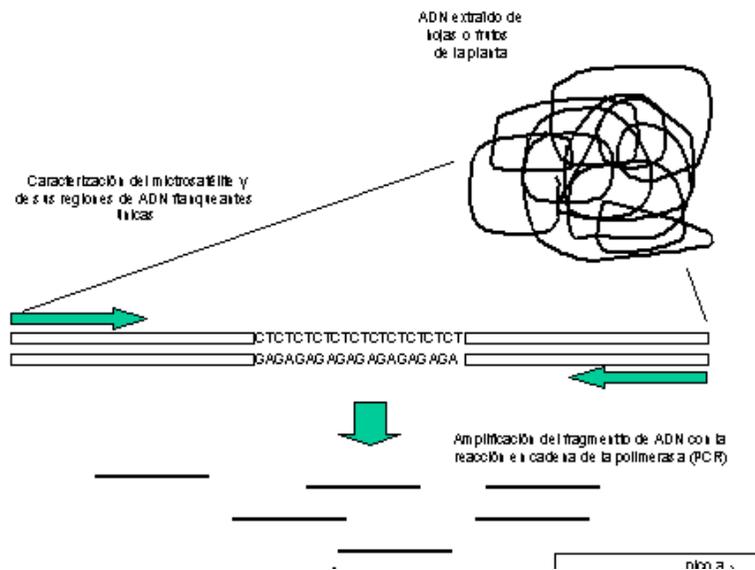
- Isoenzimas, RFLPs, RAPDs, AFLPs, SSRs.....

- SSRs:

- \* Secuencias de ADN no codificante repetidas en tandem. 2-10 pb.

- \* Distribuidos de forma uniforme.

- \* Longitud variable.



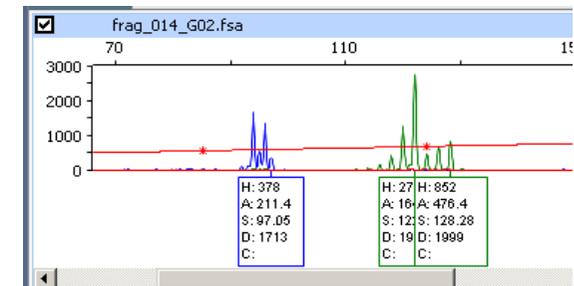
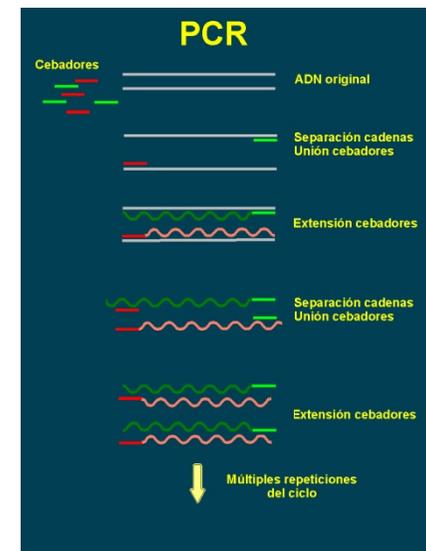
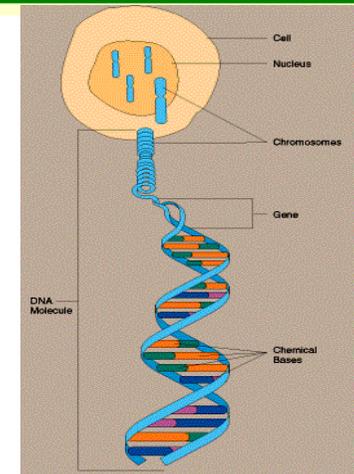
# Introducción\_Mejora Génetica

Reproducibilidad → Estandarización

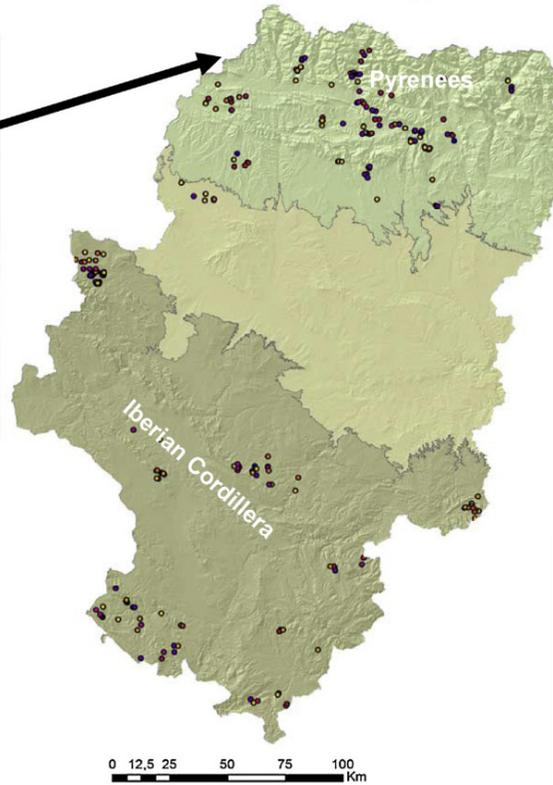
Polimorfismo → Discriminación

Codominancia → Genética

Aplicación sencilla → Transferencia



# Material vegetal recuperado



183 accesiones manzano

120 accesiones ciruelo

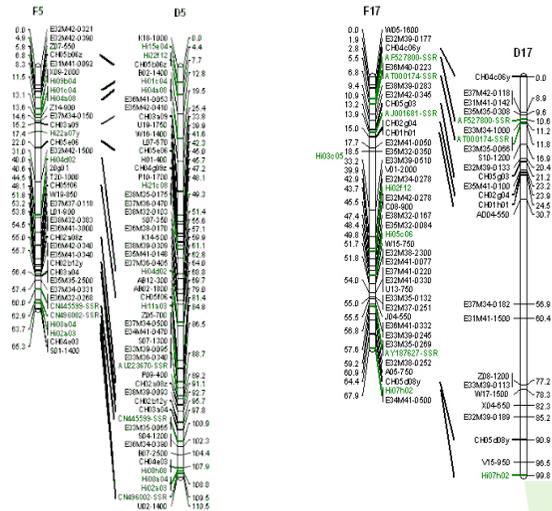
142 accesiones perales



Manzano, Alto Gállego

# Identificación varietal manzano

Se utilizaron 20 microsatélites (SSRs)



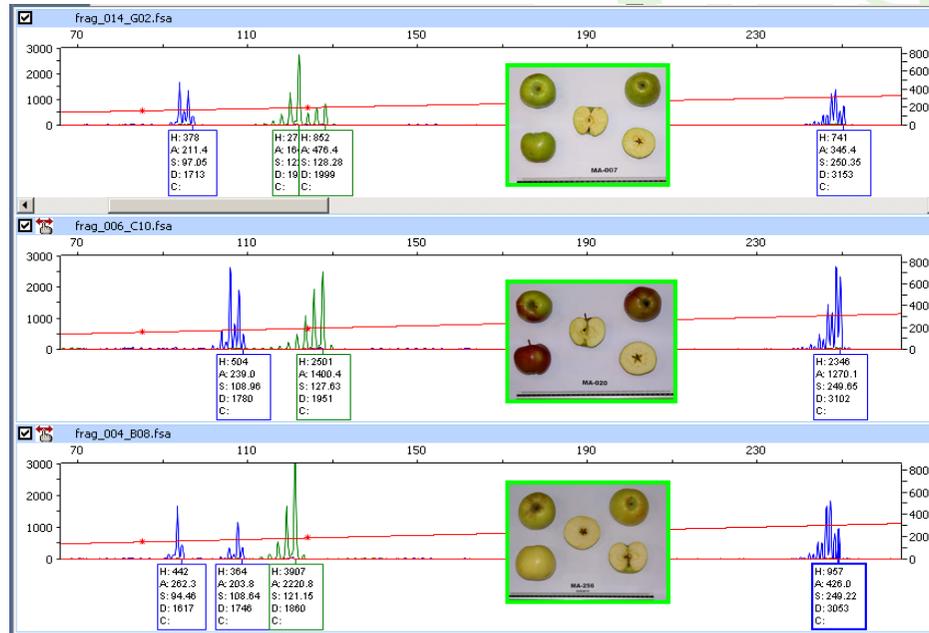
## Cultivares de referencia

Table 1

Set of apple cultivars used as references in this study. OS: Old Spanish cultivars, IC1: International cultivars grown in Spain since at least 1950s, IC2: Other international cultivars.

Cultivar name	Type	Reported parentage
Esperiega	OS	Unknown
Florina	IC2	PRI 612-1 × Jonathan
Fuji	IC2	Ralls Janet × Delicious
Golden Delicious	IC1	Unknown
Golden Supreme	IC2	Chance seedling of G. Delicious
Granny Smith	IC2	Unknown
Mondial Gala	IC2	Gala mutation
Ortell	OS	Unknown
Ozark Gold	IC2	AT 291 × Golden Delicious
Pinova	IC2	Clivia × Golden Delicious
Prima	IC2	PRI 14-510 × NJ. 123249
Red Boskoop	IC2	Unknown
Red Spur	IC2	Starking Delicious mutation
Reine des Reinettes	IC1	Unknown
Reinette Blanche	IC1	Unknown
Reinette de Huesca	IC1	Unknown
Reinette Encarnada	IC1	Unknown
Reinette Grise	IC1	Unknown
Rome Beauty	IC1	Unknown
Royal Gala	IC2	Gala mutation
Telamon	IC2	Wjcek × Golden Delicious
Verde Doncella	OS	Unknown
Vista Bella	IC2	Complex parentage (Judyred × Starr × Williams × Melba × Sonar)

## Reacciones PCR múltiplex



# Identificación varietal manzano

20 SSRs → 256 alelos → 12.8 alelos/ locus

## 151 genotipos únicos

- ❑ 130 accesiones locales
- ❑ 21 cultivares referencia

## 29 % accesiones duplicadas

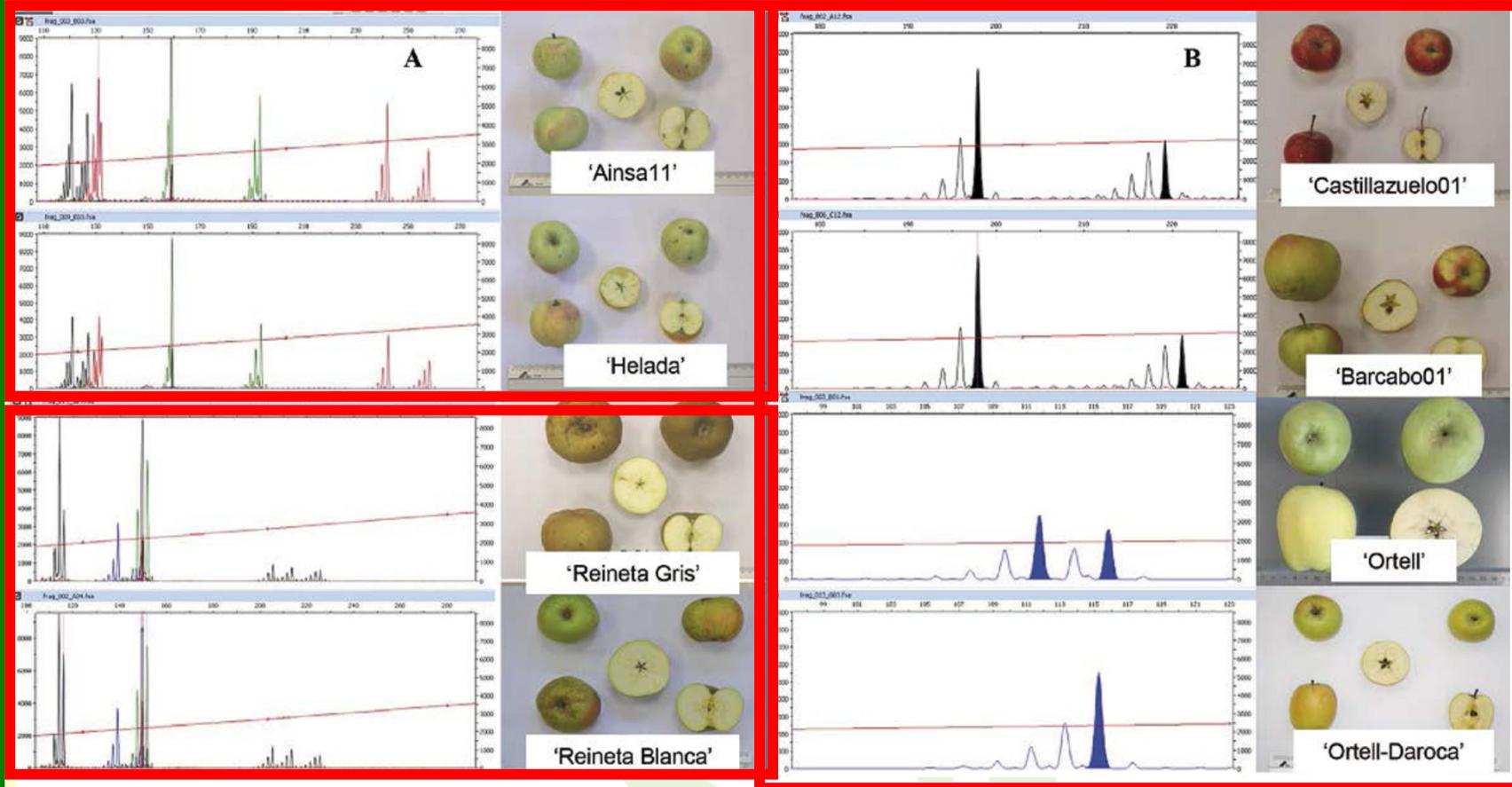
- Alta proporción de alelos identificados a frecuencias bajas entre el material local.
- Evidencia de la riqueza y singularidad que todavía es posible encontrar en parcelas abandonadas



## Selección local



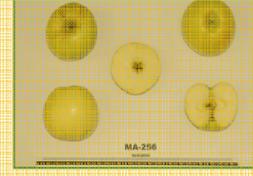
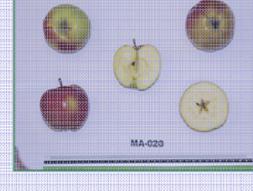
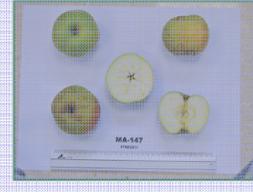
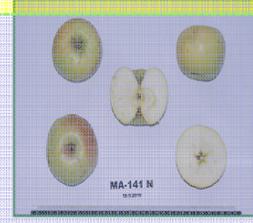
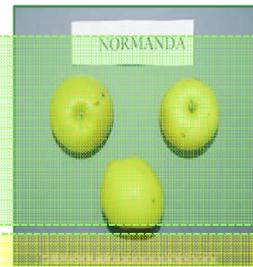
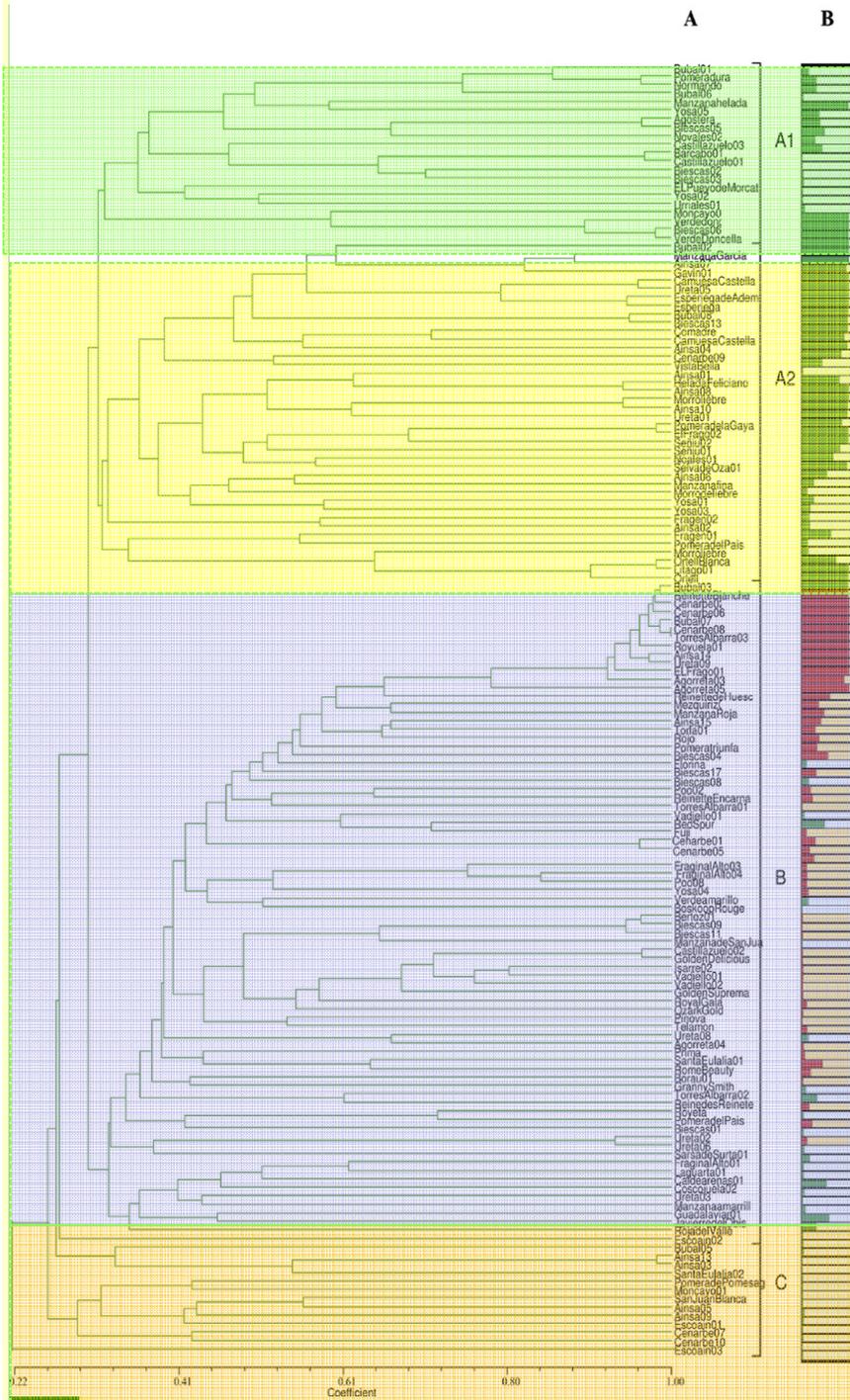
# Identificación varietal manzano



Accesiones con el mismo perfil genético \_Diferencias fenotípicas

31% accesiones triploides

# cación varietal manzano



**Accesiones locales**

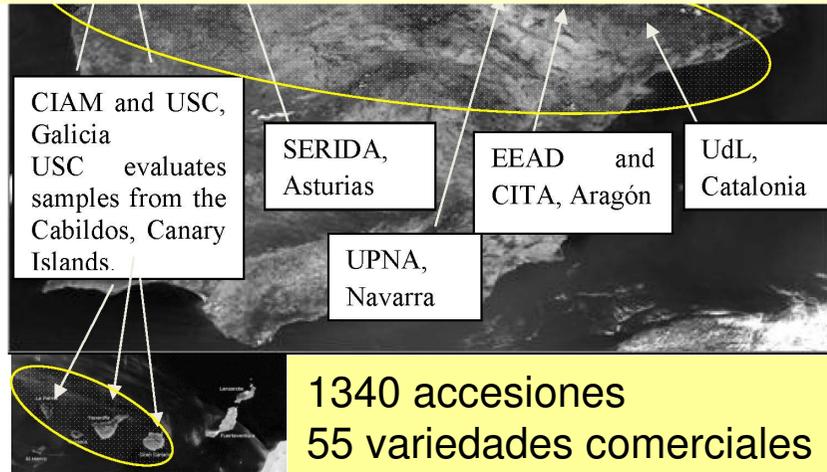
**Antiguos cultivares españoles** 'Esperiega', 'Ortell', 'Verde Doncella', 'Comadre' y 'Camuesa'...

\* Cultivares **internacionales cultivadas en España al menos desde 1950:** 'Belleza de Roma', 'Reina de Reinetas', 'Reineta de Huesca', 'Reineta Encarnada', 'Royal Gala' y 'Golden Delicious'.

\* Cultivares **comerciales modernos:** como 'Florina', 'Fuji', 'Golden Suprema', 'Ozark Gold', 'Pinova', 'Prima', 'Telamón' y 'Red Spur'...

**Accesiones locales**

# INIA RF2011-00017-C05-00. Armonización de la metodología de caracterización, evaluación de la diversidad genética y definición de la colección nuclear del germoplasma de manzano conservado en los Bancos de Germoplasma españoles.



Number of identified alleles in:

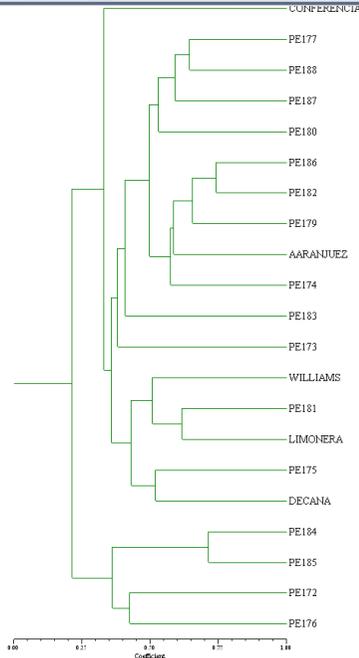
	Total	USC/CIAM	UPNA	SERIDA	CITA	UdL	EEAD	Reference cultivars			
S	16	14	11	12	11	9	11	8			
C	18	18	13	15	12	13	14	11			
G	25	23	16	18	16	14	16	12			
C	24	21	17	19	15	16	17	12			
H	15	10	12	9	8	8	8	6			
C	17	14	15	14	12	11	11	11			
C	21	19	14	15	14	12	11	9			
GD12	3	138-190	10.7	17	14	11	11	12	9	6	
CH02c09	15	231-257	13.9	13	13	12	11	10	11	12	8
CH02d08	11	205-256	15.9	19	18	18	18	14	12	16	11
CH03d07*	6	183-233	21.3	25	20	20	18	21	16	17	12
CH04e05	7	165-227	13.9	24	20	14	15	13	14	15	9
CH05f06*	5	164-190	12.4	13	13	12	11	10	10	12	9
<b>Mean</b>			<b>19.0</b>	<b>16.7</b>	<b>14.2</b>	<b>14.3</b>	<b>12.9</b>	<b>11.9</b>	<b>13.2</b>	<b>9.5</b>	

Alineamiento de datos SSR entre las distintas colecciones

Número de genotipos identificados: **738**  
Duplicados = **46%**

# Identificación varietal peral

142 accesiones y cultivares de referencia



Locus	Referencia	Tipo de repetición	Fluorocromo	Nº alelos	Rango alelos (bp)	Ho
<b>28f4</b>	Guilford et al. (1997)	Perfecto	6-FAM	8	94-115	0.51
<b>05g8</b>	Guilford et al. (1997)	Perfecto	VIC	9	101-132	0.83
<b>CH01E12</b>	Gianfranceschi et al. (1998)	Perfecto	6-FAM	8	235-260	0.89
<b>CH01H01</b>	Gianfranceschi et al. (1998)	Perfecto	6-FAM	7	96-126	0.74
<b>CH01F02</b>	Gianfranceschi et al. (1998)	Perfecto	VIC	14	153-181	0.95
<b>CH01H10</b>	Gianfranceschi et al. (1998)	Perfecto	PET	10	98-122	0.64
<b>CH02B12</b>	Gianfranceschi et al. (1998)	Imperfecto	NED	13	101-153	0.69
<b>02b1</b>	Guilford et al. (1997)	Perfecto	PET	5	255-266	0.45
<b>CH02D11</b>	Gianfranceschi et al. (1998)	Perfecto	PET	13	99-130	0.84
<b>Nº alelos totales</b>				<b>87</b>		
<b>Nº alelos/locus</b>				<b>9.7</b>		

# Identificación varietal ciruelo

## 15 SSRs evaluados

Locus		LG	T x E linkage map	Repeat type
UDP96-005		1	29.2 cM	(AC) <sub>16</sub> TG(CT) <sub>2</sub> CA(CT) <sub>11</sub>
CPPCT029		1	65.1 cM	(CT) <sub>24</sub>
UDP97-402	★	2	29.3 cM	(AG) <sub>17</sub>
UDP98-406		2	80.2 cM	(AG) <sub>15</sub>
BPPCT 007		3	11.2 cM	(AG) <sub>22</sub> (CG) <sub>2</sub> (AG) <sub>4</sub>
UDP96-008		3	36.4 cM	(CA) <sub>23</sub>
pchgms2		4	7 cM	(CT) <sub>24</sub>
BPPCT 017	★	5	20.10 cM	(GA) <sub>28</sub>
BPPCT037	★	5	25.60 cM	(GA) <sub>25</sub>
BPPCT 038		5	32.9 cM	(GA) <sub>25</sub>
UDP98-412	★	6	72.0 cM	(AG) <sub>28</sub>
UDP96-010		6	43.80 cM	(GT) <sub>21</sub> (GAGT) <sub>4</sub> (GA) <sub>18</sub>
CPPCT033	★	7	38.9 cM	(CT) <sub>16</sub>
UDP98-409		8	44.5 cM	(AG) <sub>19</sub>
BPPCT006	★	8	14.1 cM	(AG) <sub>19</sub>

✓ Ausencia de amplificación

✓ Difícil de puntuar

✓ Bajo nivel de polimorfismo

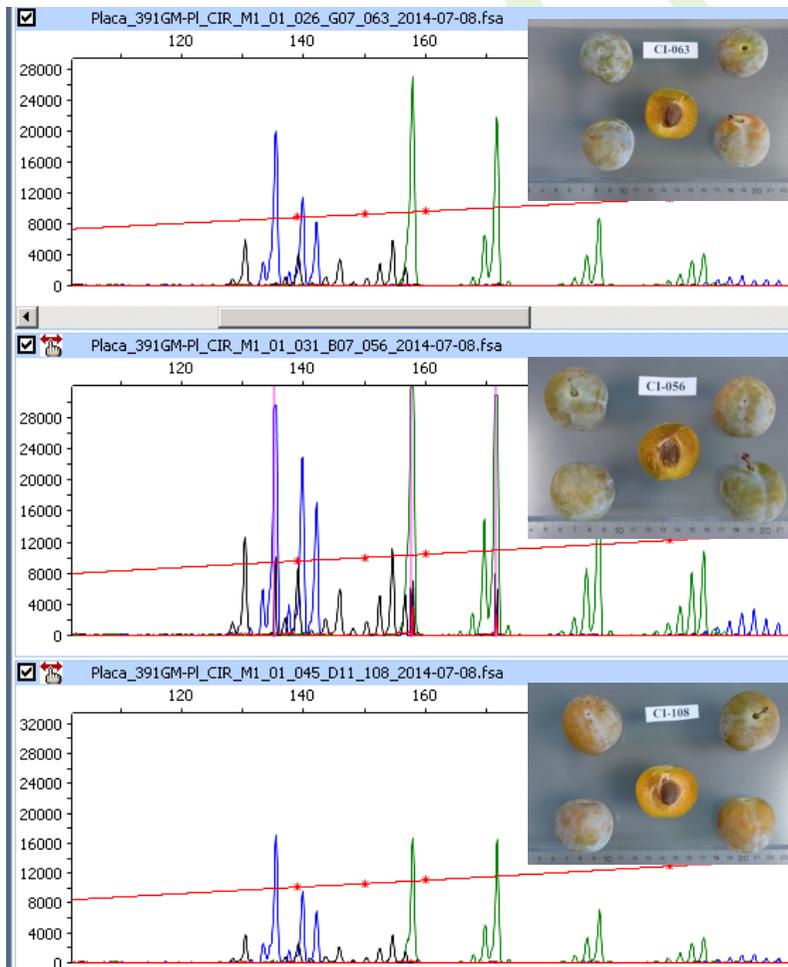


SSR excluidos de análisis posteriores

# Identificación varietal ciruelo

9 SSRs → 172 alelos → 19.1 alelos / locus

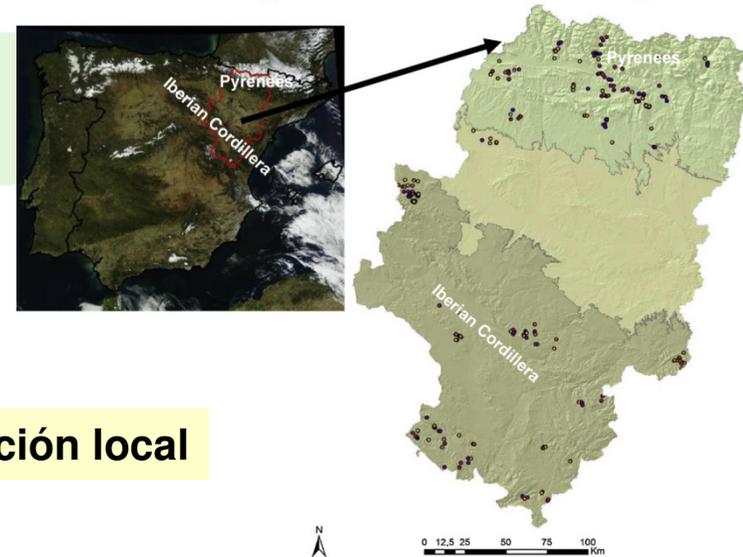
27% accesiones duplicadas



Selección local

131 genotipos únicos

- 90 accesiones locales
- 41 cultivares de referencia

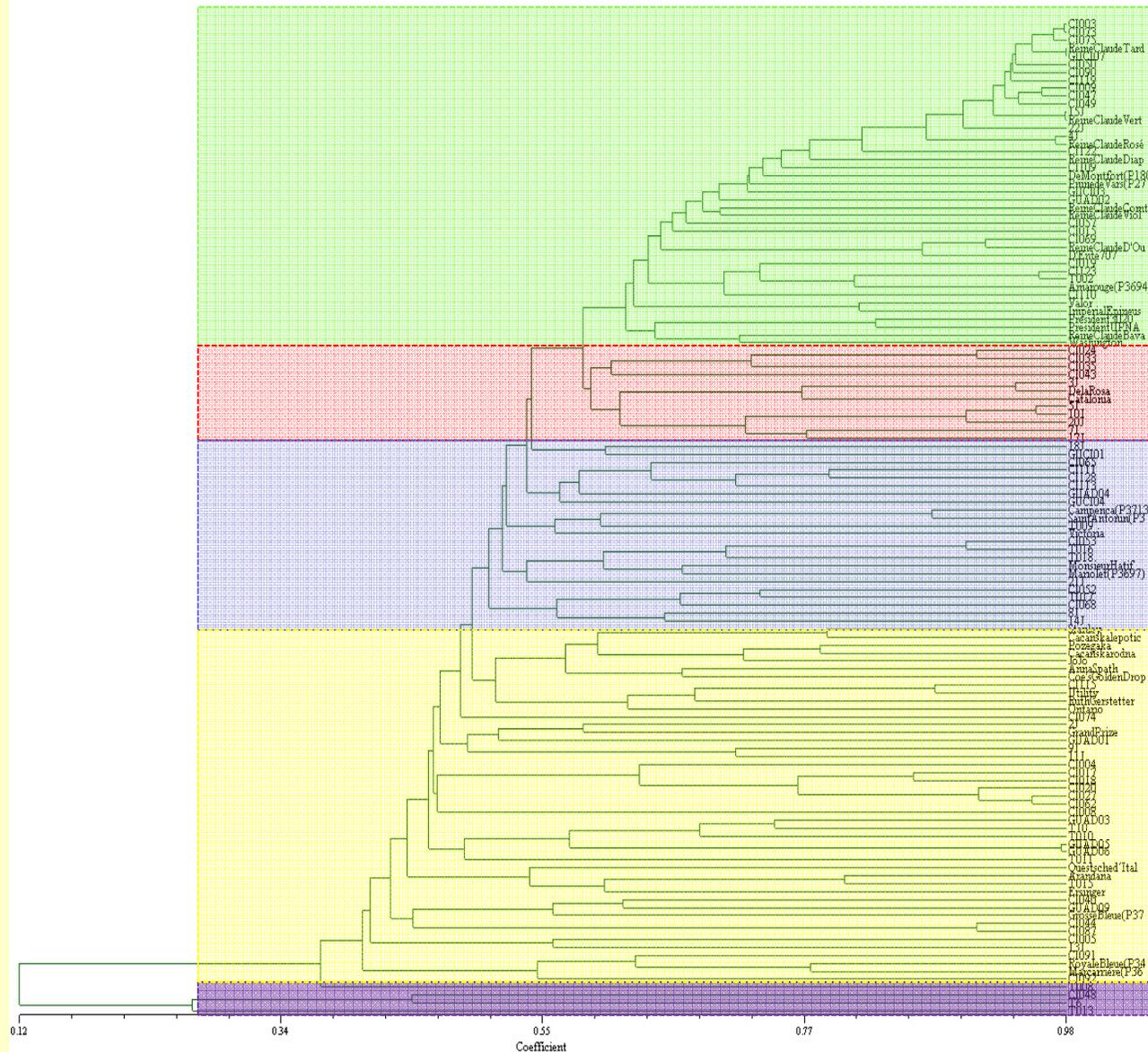


SSR ANALYSES

# Identificación varietal ciruelo

## Relaciones genéticas entre accesiones locales y de referencia

GENETIC DIVERSITY



Grupo REINA CLAUDIA



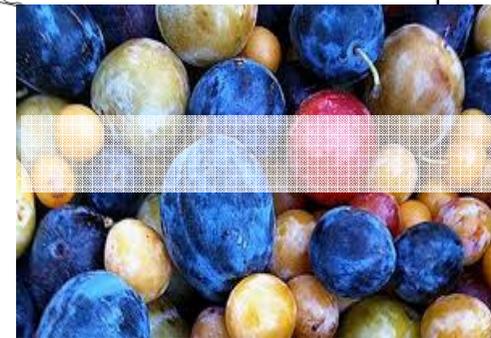
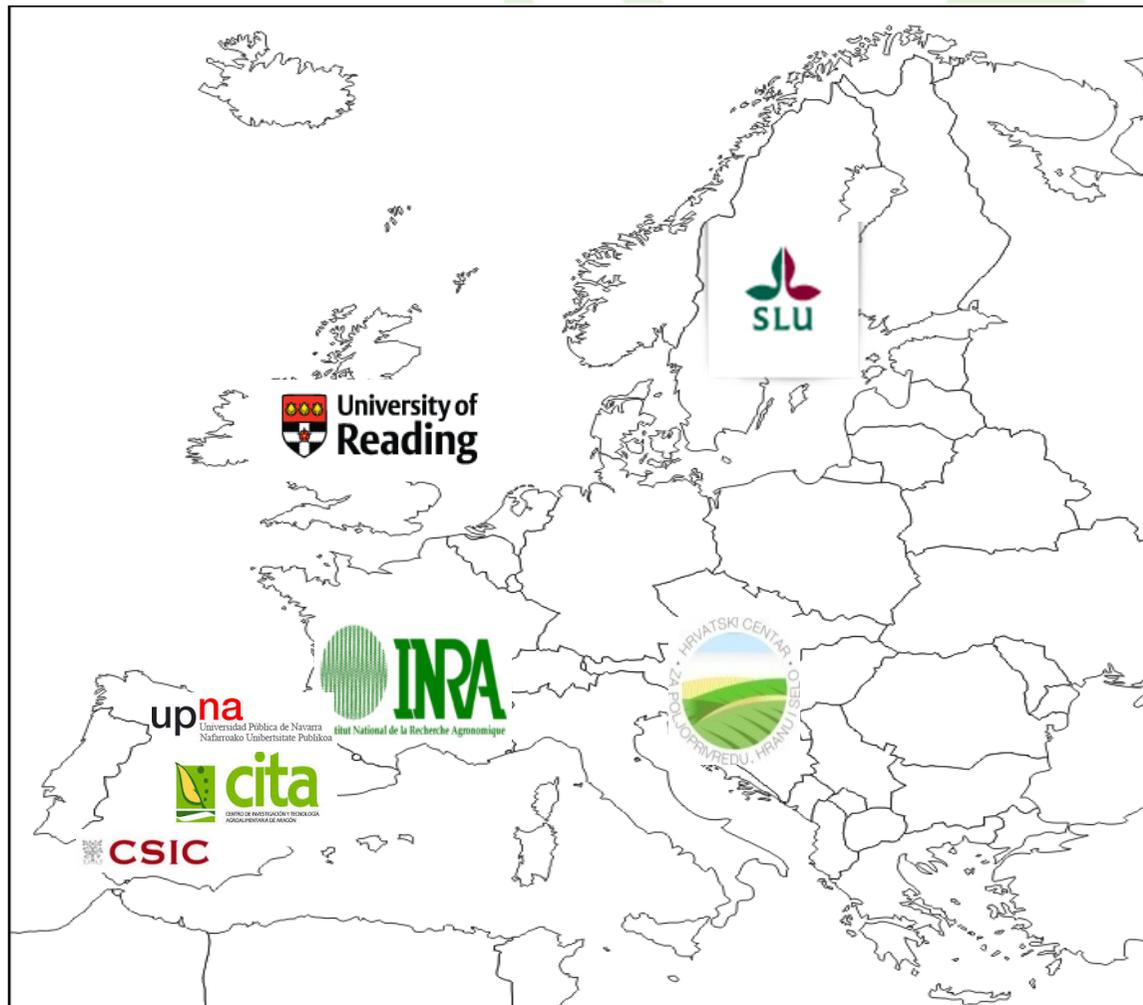
Locales ESPAÑOLAS.

Cultivares FRANCESAS

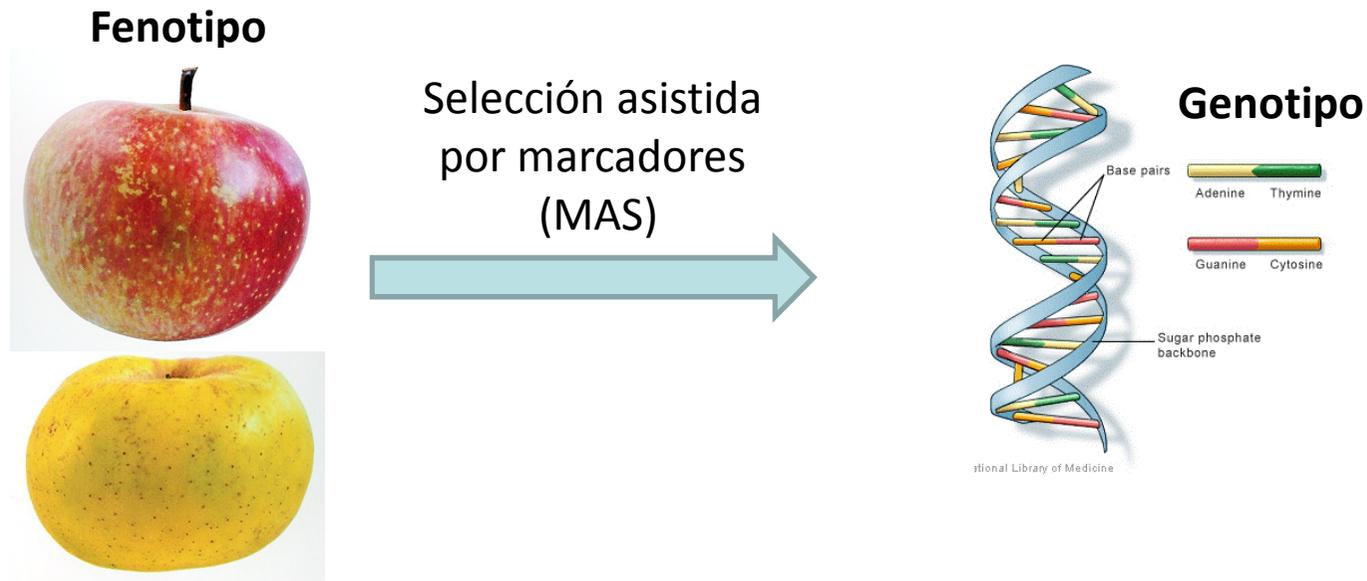
Grupo heterogéneo variedades INTERNACIONALES.

Grupo DIFERENCIADO

## \* Diversidad genética a nivel Europeo



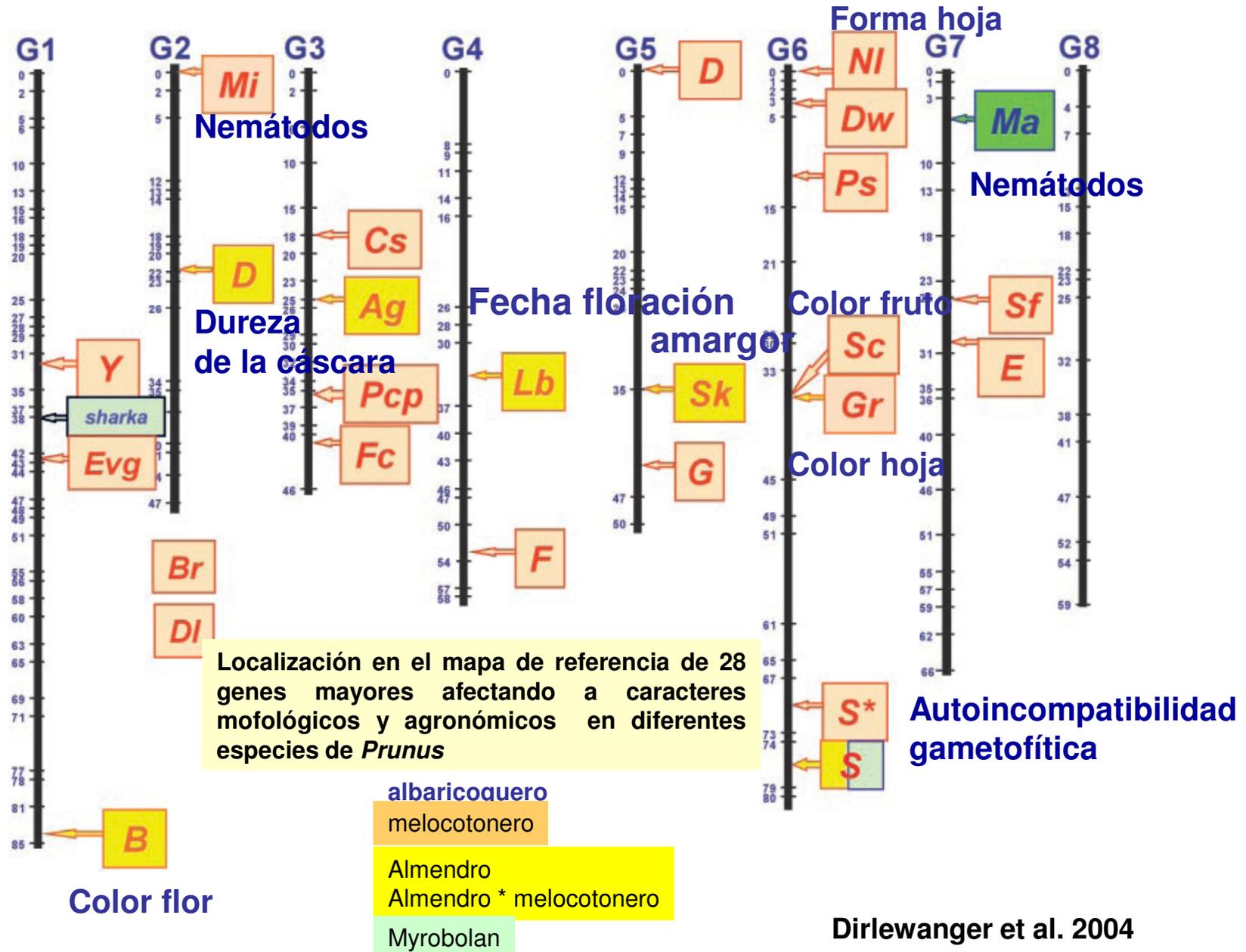
# Nuevos avances en identificación varietal



- Selección asistida por marcadores (MAS)
  - Acelerar la selección
    - Mapas genéticos
  - Selección caracteres de interés
    - Identificación de genes, QTLs, marcadores
  - Introducción de caracteres
    - Selección del genoma, reducción del lastre de ligamiento

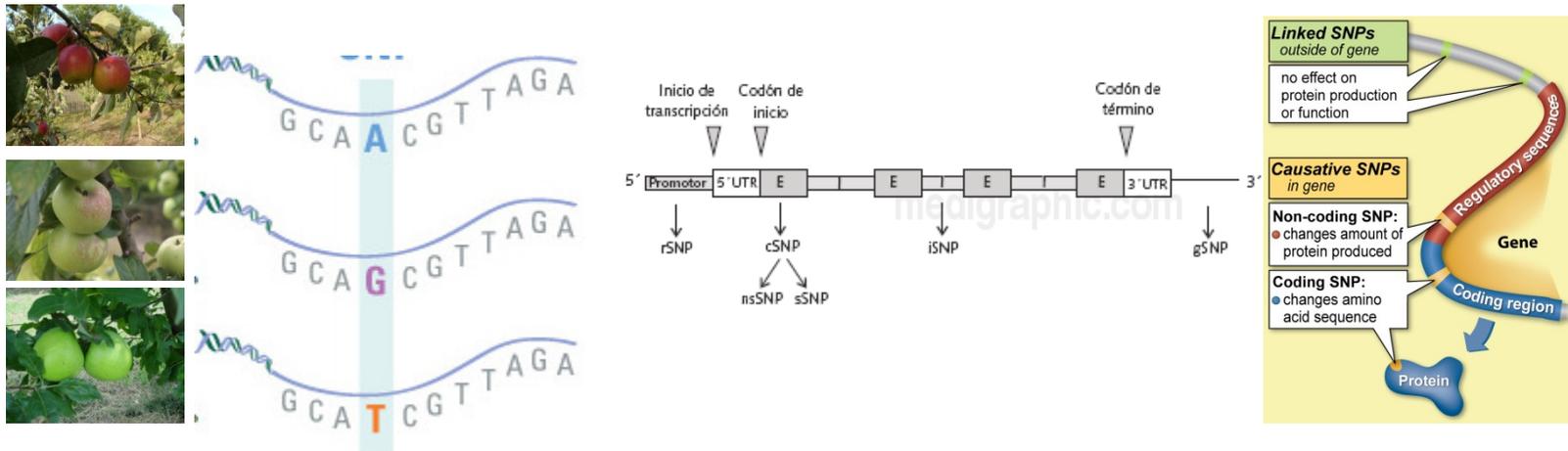
# Nuevos avances en identificación varietal

PPV



# Nuevos avances en identificación varietal\_Escala genómica

## POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SENCILLO (SNP)



- Elevada abundancia en el genoma de plantas. 1 SNP cada 1000 pb.
- Amplia distribución en el genoma.
- Uso simultáneo de cientos/miles de SNPs en un solo chip mediante multiplex.
- Posibilidad de transferirlos de los genotipos en los que están identificados a materiales relacionados.
- Aparecen en regiones codificantes y no codificantes de genes .

Cambios funcionales

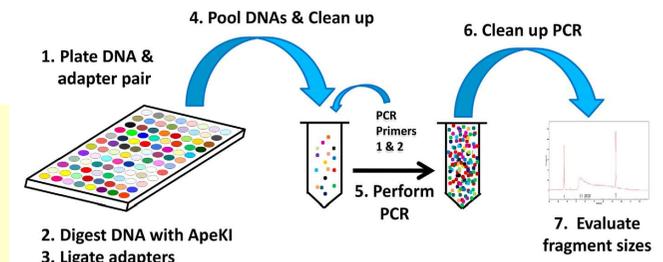
Asociación de SNPs con diferentes caracteres de interés agronómico.

# Nuevos avances en identificación varietal\_Escala genómica

## Nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento de ADN (ADNseq)

### Genotipado por secuenciación (GBS)

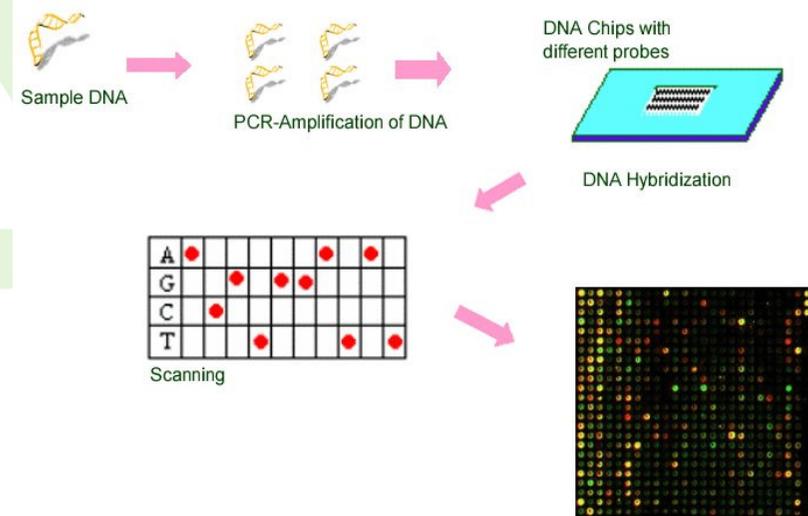
- Identificación de los polimorfismos.
- Desarrollo de amplias colecciones de SNPs.
- Genotipado de los mismos en diferentes poblaciones.



Elshire et al. 2012. Plos one 6 (5)

### Chips de ADN

- Plataformas de genotipado para el análisis de la diversidad genética de especies frutales.
- Re-secuenciación completa del genoma.



# Nuevos avances en identificación varietal\_Escala genómica

## Desarrollo de chips de ADN en especies frutales

- ❑ IRSC 8K Infinium (Chagné *et al.* 2012)
- ❑ 20K Infinium® (Bianco *et al.* 2014)
- ❑ Axiom® Apple480K (Bianco *et al.* 2015)



- Muy eficaz para caracterizar colecciones de germoplasma.
- Materiales de mejoramiento (incluidas poblaciones segregantes)
- Construcción de mapas de ligamiento de alta densidad.
- Identificación de QTLs en poblaciones biparentales.
- Estudios de asociación en colecciones de germoplasma.
- Selección genómica.

## Selección Genómica

Predecir el potencial genético de distintos individuos, sin tener que evaluarlos fenotípicamente .

### Tres fases del proceso de mejora:

- La caracterización y selección de fuentes de variación,
- La identificación de genes o regiones genómicas involucradas en el control de características de interés.
- El desarrollo de cultivares mejorados.





**GRACIAS POR SU ATENCIÓN**