

## Caracterización molecular y evaluación de la diversidad genética de manzano prospectado en la provincia de Álava

J. Urrestarazu<sup>1</sup>, M. Loidi<sup>1</sup>, E. Ortún<sup>2</sup>, A. Robles<sup>2</sup>, C. Miranda<sup>1</sup>, L. G. Santesteban<sup>1</sup> y J. B. Royo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona

<sup>2</sup>Red de Semillas de Euskadi. Carranza (Vizcaya)

**Palabras clave:** microsatélite, diversidad, identidad, *Malus x domestica*, manzano

### Resumen

La recuperación de variedades locales y tradicionales, así como su caracterización, son dos de las actividades prioritarias en el ámbito de la conservación de recursos fitogenéticos. El Grupo responsable del Banco de germoplasma de manzano de la Universidad Pública de Navarra, en colaboración con la 'Red de Semillas de Euskadi', ha realizado durante los últimos 5 años una prospección de material autóctono en la provincia de Álava que, en el caso del manzano, ha permitido localizar 91 individuos de interés potencial. El objetivo de este trabajo fue evaluar dichos individuos desde el punto de vista de la variabilidad que aporta el mismo en relación a la que se conserva en los bancos de germoplasma del Noreste español. La identidad del material se realizó comparando sus perfiles alélicos obtenidos a través de 17 SSR, con el de 39 variedades de referencia seleccionadas de entre las más cultivadas y con el del conjunto de accesiones conservadas en los Bancos de la Universidad Pública de Navarra, de la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza) y de la Universidad de Lleida, que ya se había caracterizado con los mismos 17 SSR. Las relaciones genéticas de similitud se estimaron a través de análisis UPGMA. En el conjunto de accesiones prospectadas se identificaron 44 genotipos no incluidos en el material conservado y dos alelos que no habían sido detectados con anterioridad. Se encontraron también diferencias entre las frecuencias alélicas del material prospectado y las referencias. En conjunto, los resultados ponen de manifiesto el interés del material prospectado

### INTRODUCCIÓN

El Banco de germoplasma de manzano de la Universidad Pública de Navarra (UPNa, Pamplona) es uno de los siete que integran la Red de Colecciones del Programa Nacional de Conservación y Utilización de Recursos Fitogenéticos para esta especie (INIA, 2011). Actualmente incluye 282 accesiones, en su mayor parte autóctonas o de muy antigua introducción en el Norte de Navarra (Royo et al., 2009), y junto con las incluidas en las colecciones de la Universitat de Lleida (UdL, Lleida) y Estación Experimental de Aula Dei (EEAD, Zaragoza), representan una gran parte de la variabilidad de la población de manzano autóctona del Noreste español (Urrestarazu et al., 2011). No obstante todavía quedan zonas de interés potencial sin explorar suficientemente, por lo que el Grupo responsable del Banco de la UPNa, en colaboración con la 'Red de Semillas de Euskadi', inició hace 5 años una prospección sistemática en la provincia de Álava y actualmente ya se dispone en vivero de 91 accesiones susceptibles de ser incluidas en el Banco. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el interés del material prospectado desde el punto de vista de la variabilidad que

aporta el mismo en relación a la que ya se dispone actualmente en los tres Bancos del Noreste español citados anteriormente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Análisis mediante SSR

Los 91 manzanos prospectados fueron caracterizados con un conjunto de 17 microsátélites (Guilford et al. 1997; Hokanson et al. 1998; Liebhard et al. 2002; Silfverberg-Dilworth et al. 2006) distribuidos en todos los grupos de ligamiento del manzano a través de tres PCR múltiples (Tabla 1). Cada PCR se desarrolló en un volumen final de 10  $\mu$ l, utilizando 10 ng de ADN, 0.10  $\mu$ M de cada primer, excepto para CH02c11 (0.15  $\mu$ M) y CH02c06 (0.40  $\mu$ M), y 1 X multiplex PCR Master mix (Qiagen). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante una desnaturalización inicial de 15 min a 95°C, seguida de cinco ciclos touchdown de 30 s a 95°C, 1 min a 65°C (-1°C/ciclo) y 1 min a 72°C, seguidos de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C y una etapa final de 30 min a 72°C. La resolución de los fragmentos se llevó a cabo en un secuenciador ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems) y los productos de PCR fueron analizados mediante el software Peak Scanner versión 1.0. (Applied Biosystems).

### Identidad genética y diversidad

La evaluación de la identidad del material prospectado ( $MAT_P$ ) se realizó a través de comparaciones con material de referencia (REF), previamente caracterizado con el mismo conjunto de SSR. El material de referencia estuvo formado por 39 variedades internacionales ( $REF_{INT}$ ) elegidas para representar un amplio rango de diversidad genética en manzano cultivado, así como por 252 accesiones únicas de tipo local conservadas ( $REF_{LOC}$ ) en los Bancos de germoplasma de la UPNa, UdL y EEAD. Las relaciones de similitud genética entre el material prospectado y el de referencia se determinaron por medio de análisis UPGMA empleando el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979) mediante el software NTSYSpc versión 2.11f (Rohlf, 1998). Las características diferenciales del material prospectado respecto al de referencia se determinaron evaluando la presencia de alelos no detectados previamente en este último y estimando las posibles diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas por locus mediante la prueba  $Chi^2$  entre el material prospectado y el de referencia ( $MAT_P$  vs  $REF_{LOC}$  y  $MAT_P$  vs  $REF_{INT}$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los *loci* amplificados en este estudio fueron polimórficos, pero debido a que la amplificación del locus NZ05g08 fue irregular se decidió eliminarlo del estudio. La comparación entre el material prospectado y de referencia permitió determinar que 34 manzanos prospectados tenían perfiles de SSR idénticos a alguna de las referencias (Tabla 2), de tal forma que 13 de ellos fueron genéticamente idénticos a cuatro variedades internacionales de referencia, ‘Reineta Blanca’, ‘Red Delicious’, ‘Reina de Reinetas’ y ‘Fuji’, y otros 21 presentaron idéntico perfil genético al de nueve accesiones de tipo local conservadas en alguno de los tres Bancos. Entre el resto del material, se encontraron 8 grupos, compuestos por entre dos y cinco individuos, que presentaban el mismo perfil de SSR. Por lo tanto, en el conjunto de 91 individuos prospectados se detectó un total de 44 genotipos únicos (el 48% de la prospección) distintos al material ya conservado en los Bancos del Noreste español y al material internacional de referencia. En el conjunto de accesiones únicas, los 16 SSR amplificaron un total de 184 alelos, de los cuales 96 estaban presentes en más del 5% de los genotipos (alelos frecuentes). Se encontró que dos de los alelos identificados, el de 193 pb en CH04e05

(presente en la accesión ‘Manzanas Picudas’) y el de 227 pb en CH04f10 (presente en ‘Manzana de San Juan’), no habían sido detectados con anterioridad. La evaluación de la distribución de las frecuencias alélicas mostró que éstas fueron similares entre el material único prospectado en la provincia de Álava y el material de referencia de tipo local para todos los *loci* menos para CH01h02, mientras que, comparadas con las de las referencias internacionales, fueron distintas para la mayoría de los *loci*.

En conjunto, los resultados obtenidos han permitido identificar entre el material prospectado en Álava 44 genotipos de manzano que no estaban presentes en los Bancos de manzano de la UPNa, UdL y EEAD, y que, además, presentan características que contribuyen a ampliar la diversidad genética conservada en estos Bancos. Se ha puesto de manifiesto el interés de proseguir con trabajos de prospección de manzano en zonas del Noreste español no suficientemente exploradas ya que aún es posible encontrar material con características genéticas diferenciales respecto al material conservado.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto INIA 2004-008-C03-00. Los autores desean agradecer al Dr. Valero Urbina y al Dr. Álvaro Blanco su colaboración.

### Referencias

- Guilford P., Prakash S., Zhu J.M., Rikkerink E., Gardiner S., Bassett H. and Forster R. 1997. Microsatellites in *Malus x domestica* (apple): Abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor and Appl Genet* 94:249-254.
- Hokanson S.C., Szewc-McFadden A.K., Lamboy W.F. and McFerson J.R. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection. *Theor and Appl Genet* 97:671-683.
- INIA. 2011. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Inventario Nacional de Recursos Fitogenéticos. <http://wwwx.inia.es/webcrf/CRFesp/Paginaprincipal.asp>.
- 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.
- 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.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc- Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Publishing Ltd., Setauket, NY.
- Royo J.B., González J., Laquidáin, M.J., Miranda C. and Santesteban L.G. 2009. El manzano autóctono de Navarra. Catálogo de las accesiones del Banco de Germoplasma de la Universidad Pública de Navarra. Universidad Pública de Navarra. Pamplona.
- Silfverberg-Dilworth E., Matasci C.L., Van de Weg W.E., Van Kaauwen M.P.W., Walser M., Kodde L.P., Soglio V., Gianfranceschi L., Durel C.E., Costa F., Yamamoto T., Koller B., Gessler C. and Patocchi A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genet Genomes* 2:202-224.
- Urrestarazu J., Laquidáin M.J., Miranda C., Santesteban L.G. and Royo J.B. 2011. Comparative analysis of the genetic diversity maintained in Apple germplasm Banks from Northeastern Spain. *Acta Hort.* 918:655-660.

Tabla 1. Código de los SSR, grupo de ligamiento (LG), detalles de las PCR, rango y número de alelos detectados en el material de referencia y en el material prospectado.

Locus	LG	Fluorocromo / PCR múltiple	Rango (pb) en REF <sup>4</sup>	Nº alelos en REF	Nº alelos en MAT <sub>p</sub> <sup>5</sup>	Alelos detectados en MAT <sub>p</sub> <sup>6</sup> (pb)
Hi02c07 <sup>1</sup>	1	VC / C	103-150	13	9	103- <b>107</b> - <b>111</b> - 113 - 115 - <b>117</b> - <b>127</b> - <b>148</b> - <b>150</b>
CH02c06 <sup>2</sup>	2	PET / C	203-266	21	14	<b>208</b> - 218 - 230 - 232 - <b>234</b> - <b>236</b> - <b>238</b> - 240 - 242 - <b>244</b> - 246 - 250 - 252 - 254
GD12 <sup>3</sup>	3	NED / C	140-191	12	7	<b>140</b> - 148 - 150 - <b>152</b> - 154 - 161 - 183
CH05f06 <sup>2</sup>	5	NED / B	165-191	13	12	<b>165</b> - <b>171</b> - 173 - 175 - <b>177</b> - 179 - 181 - 183 - <b>185</b> - 187 - <b>189</b> - <b>191</b>
CH03a07 <sup>2</sup>	6	VC / C	181-227	22	10	181 - <b>183</b> - 185 - 191 - <b>193</b> - 201 - 205 - <b>207</b> - 225 - <b>227</b>
CH04e05 <sup>2</sup>	7	PET / A	177-229	17	12	177 - <b>193</b> - 200 - 204 - <b>206</b> - 212 - 217 - <b>219</b> - <b>221</b> - <b>223</b> - <b>225</b> - 227
CH01h10 <sup>2</sup>	8	PET / A	89-135	14	8	93 - 100 - 104 - 105 - 111 - <b>117</b> - <b>119</b> - <b>121</b>
CH01h02 <sup>2</sup>	9	NED / A	230-254	12	10	<b>230</b> - <b>232</b> - 234 - <b>238</b> - <b>240</b> - 242 - <b>244</b> - 246 - <b>247</b> - 250
CH02e11 <sup>2</sup>	10	PET / B	205-241	16	11	209 - 217 - <b>219</b> - <b>221</b> - <b>225</b> - 229 - 231 - 233 - 235 - <b>237</b> - 239
CH02a08 <sup>2</sup>	11	VC / A	205-258	19	12	<b>207</b> - <b>209</b> - 211 - <b>213</b> - 217 - <b>223</b> - 225 - <b>227</b> - <b>229</b> - <b>246</b> - 248 - 254
CH01f02 <sup>2</sup>	12	6-FAM / A	159-214	19	16	<b>159</b> - 169 - 173 - 179 - 181 - 183 - 187 - <b>189</b> - <b>191</b> - 193 - <b>195</b> - <b>197</b> - <b>205</b> - <b>207</b> - <b>212</b> - <b>214</b>
GD147 <sup>3</sup>	13	PET / C	127-160	13	12	<b>127</b> - 135 - <b>139</b> - 142 - 144 - <b>146</b> - <b>148</b> - <b>150</b> - 152 - 154 - <b>156</b> - <b>158</b>
CH04c07 <sup>2</sup>	14	VC / B	95-141	17	13	95 - 97 - 101 - <b>105</b> - 107 - <b>109</b> - <b>111</b> - 113 - <b>115</b> - 121 - <b>130</b> - 134 - <b>141</b>
CH02c09 <sup>2</sup>	15	VC / B	231-257	13	10	231 - 237 - <b>241</b> - 243 - <b>247</b> - 249 - 251 - 253 - 255 - <b>257</b>
CH04f10 <sup>2</sup>	16	6-FAM / C	173-263	30	18	173 - 187 - 191 - 193 - <b>201</b> - <b>217</b> - 223 - <b>225</b> - <b>227</b> - <b>229</b> - <b>235</b> - 237 - <b>239</b> - 241 - 243 - 247 - <b>249</b> - <b>251</b>
CH01h01 <sup>2</sup>	17	6-FAM / B	97-143	16	10	111 - 113 - 115 - 117 - 119 - <b>121</b> - <b>125</b> - <b>127</b> - 130 - <b>143</b>

<sup>1</sup>Silfverberg-Dilworth et al. (2006); <sup>2</sup>Liebhart et al. (2002); <sup>3</sup>Hokanson et al. (1998); <sup>4</sup>Material de referencia; <sup>5</sup>Material prospectado (genotipos ≠ al material de referencia)

<sup>6</sup>En negrita se señala los alelos infrecuentes (frecuencia < 0.05) y en negrita y subrayado los alelos exclusivos del MAT<sub>p</sub>.

Tabla 2. Grupos de identidad entre material prospectado y de referencia

Grupo de Identidad	Manzanos con el mismo perfil alélico para los 16 SSRs			
	Variedad/Accessión de referencia <sup>1</sup>	Manzanos prospectados		
1	<b>Reineta Blanca</b>	Manzana Reineta (A-002) Vitoria-04 (A-023) Reineta (A-058)	Manzana Reineta Gris (A-003) Vitoria-06 (A-025) Orduña-10 (A-062)	Vitoria-03 (A-022) Reineta (A-053) Ribera-06
2	<b>Red Delicious</b>	Reineta Reina (A-059)	Ribera-04 (A-085)	
3	<b>Reina de Reinetas</b>	Vitoria-08 (A-027)		
4	<b>Fuji</b>	L'mel rouge (A-039)		
5	<b>Urtebete (BMZ064)</b>	Manzana de año (A-007) Manzana de año (A-018) Manzana de año (A-047)	Manzana de año (A-012) Manzana de año (A-034) Orduña-12 (A-064)	Manzana de año (A-013) Costera-03 (A-037)
6	<b>Reineta Encarnada (BMN0266)</b>	Manzana Roja (A-004)	Manzana de año (A-008)	Manzana Reineta Verde (A-061)
7	<b>Anís Sagarra (BMN0014)</b>	Vitoria-01 (A-020)	Manzana de sidra (A-043)	
8	<b>Calvilla Roja (BMN0100)</b>	Vitoria-05 (A-024)	Vitoria-07 (A-026)	
9	<b>Landetxo (BMN0270)</b>	Artziniega-01 (A-011)		
10	<b>Transparente (BMZ061)</b>	Manzana de año (A-017)		
11	<b>Orache (BMN0280)</b>	Vitoria-10 (A-029)		
12	<b>Orteil (BMZ036)</b>	Manzano morro liebre (A-042)		
13	<b>Errotz-01 (BMN0136)</b>	Orduña-06 (A-054)		
14	<b>Muslo de Dama (BMN0099)</b>	Reineta-reina (A-070)		
15		Artziniega-02 (A-014) Orduña-02 (A-046)	Reineta (A-035) Reineta Blanca (A-073)	Manzana Reineta Verde (A-041)
16		Lahoz-01 (A-075) Ribera-03 (A-084)	Ribera-01 (A-080)	Ribera-02 (A-083)
17		Amurrio-01 (A-005)	Orduña-03 (A-050)	
18		Manzana Reineta Verde (A-060)	Orduña-11 (A-063)	
19		Vitoria-09 (A-028)	L'cous (A-040)	
20		Costera-01 (A-033)	Ondategi-01 (A-044)	
21		Legutiano-01 (A-038)	Orduña-04 (A-051)	
22		Orduña-01 (A-045)	Orduña-09 (A-057)	

<sup>1</sup>Las variedades internacionales se señalan en negrita; las accesiones locales conservadas en Bancos se señalan en negrita y cursiva