

Estructura genética de ciruelo europeo en el Noreste español

J. Urrestarazu^{1,2}, P. Errea¹, C. Miranda², L.G. Santesteban² y A. Pina¹

¹ Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana, 930, 50059, Zaragoza, Spain

² Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación, Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosadía s/n, 31006 Pamplona, Spain

Palabras clave: *Prunus domestica* L., diversidad, marcadores moleculares, germoplasma.

Resumen

La evaluación de la diversidad y estructura genética en ciruelo europeo (*Prunus domestica* L) es difícil dado el carácter hexaploide de la especie. Con la finalidad de estimar el nivel de diversidad de germoplasma de ciruelo europeo del Noreste español e identificar su estructura genética se han empleado marcadores nucleares y cloroplásticos. El material estudiado incluye niveles de diversidad similares a los encontrados en otras áreas de Europa. En cuanto a la estructura genética, se identificó un primer nivel con dos grupos genéticos principales, uno formado por variedades de referencia del tipo 'Reina Claudia' junto al 25% de los genotipos locales, y otro mucho más diverso. Este último grupo se dividió en dos grupos, uno formado por la mayoría de los genotipos locales (~70%) junto a referencias españolas y francesas antiguas, y otro por 24 variedades de referencia y seis genotipos locales. Un tercer nivel de partición identificó cinco grupos genéticos. En conjunto, se puso de manifiesto que la estructura genética del ciruelo en España es compleja y está condicionada por un factor de proximidad geográfica.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de ciruelo europeo en España hasta 1940-1950 se basaba, fundamentalmente, en 'Reina Claudia Verde', 'Reina Claudia de Oullins' y 'Reina Claudia de Bavay'. Además, entre otras, destacaba el cultivo de algunas variedades locales, tales como 'Arandana' o 'Imperial Roja', así como de otras extranjeras ('Reina Claudia Violeta', 'd'Ente' o 'Washington'), las cuales, a pesar de que su cultivo era relativamente importante en algunas regiones específicas, su cultivo no estaba lo suficientemente extendido a nivel nacional como para poder considerarlas variedades principales (Herrero, 1964). En aquella época existía una amplia documentación sobre el cultivo tradicional del ciruelo europeo en España, siendo la descripción más detallada sobre este tema la "Cartografía de Frutales en Hueso y Pepita" (Herrero, 1964) donde se proporcionaba valiosa información sobre posibles sinonimias y sobre la distribución de las principales variedades a nivel regional. Sin embargo, el conocimiento que actualmente existe sobre la diversidad en esta especie a nivel nacional es muy escaso. Esta situación ha propiciado que se hayan llevado a cabo en los últimos años prospecciones con el fin de recuperar material tradicional de esta especie para su conservación en colecciones de germoplasma y así facilitar su posterior estudio y uso en nuevos programas de mejora de la especie. Los objetivos de este estudio son discernir la estructura genética de *P. domestica* L. del Noreste de España, así como profundizar en las relaciones genéticas que existen entre el material español y un conjunto muy diverso de variedades de referencia. En este trabajo, se combina el uso de marcadores

nucleares y cloroplásticos para dilucidar el patrón de diversidad genética, de estructura y de diferenciación de *P. domestica* L. del Noreste de la Península Ibérica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se han caracterizado 120 accesiones de ciruelo europeo prospectadas en el Noreste español y un conjunto de 46 variedades de referencia, conjunto elegido con la idea de incluir: (i) variedades españolas antiguas, (ii) variedades francesas antiguas, que por la proximidad geográfica podrían tener relaciones importantes con el germoplasma español, (iii) una amplia representación de variedades del grupo ‘Reina Claudia’, cuya presencia en el pasado es considerada como muy importante a nivel nacional, y (iv) un conjunto diverso de variedades internacionales, algunas de ellas mencionadas en la literatura como importantes en España en el pasado, al menos a nivel regional.

Caracterización genética

Cada accesión se caracterizó mediante marcadores nucleares y cloroplásticos. Respecto a los marcadores nucleares, se amplificaron 21 SSRs mediante cuatro PCRs múltiples siguiendo las condiciones descritas en Urrestarazu et al. (2018). Los productos de PCR se separaron en un secuenciador ABI 3730 y se analizaron mediante Peak Scanner v1. Los análisis de ADN cloroplástico se basaron en la amplificación de seis regiones no codificantes y su posterior digestión con tres enzimas de restricción (HinfI, TaqI y AluI) tal y como se detalla en Urrestarazu et al. (2018).

Diversidad alélica, estructura poblacional y diferenciación genética

Dado que la determinación de la composición alélica en especies poliploides es complicada, se compararon todos los genotipos codificando los alelos como presentes o ausentes, lo que se conoce como fenotipo alélico. Para cada locus, se estimó: el número de alelos observados por locus (A_O), el número efectivo de alelos (A_E) y el número de alelos infrecuentes por locus (A_R). La estructura genética se determinó usando STRUCTURE v2.3.4. Se realizaron 10 repeticiones del análisis bajo el modelo de admixis, con 200.000 iteraciones de “burn-in” seguidas de otras 500.000 iteraciones. El grado de diferenciación entre los grupos obtenidos con STRUCTURE se cuantificó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad genética

En relación a los marcadores nucleares, el número medio de alelos por locus (23,4) fue ligeramente superior al detectado en germoplasma sueco (22,7; Sehic et al., 2015) y croata (18,7; Halapija Kazija et al., 2014), e inferior al encontrado en material tradicional francés (29,0; Horvath et al., 2011). A pesar del elevado número de alelos identificados, el número medio de alelos efectivos (A_E) fue bajo (9,21), lo que indica que un número importante aparece en la población a una frecuencia muy baja; de hecho, el 35,4% y 10,3% de los alelos aparecen, en menos del 5% y 1% de los genotipos, respectivamente.

Los marcadores cloroplásticos permitieron clasificar el germoplasma evaluado en ocho haplotipos (H1 a H8), número ligeramente superior al detectado utilizando la misma metodología en el análisis de 80 variedades francesas de la colección Nacional Francesa donde se identificaron cinco (Horvath et al., 2011). En nuestro estudio, H1 fue con diferencia el haplotipo más común, con una frecuencia de 0,86; H5 fue el segundo más

frecuente (0,08), mientras que los haplotipos restantes aparecieron sólo en uno o en dos genotipos. La presencia de un haplotipo mayoritario se observó también en el material de *P. domestica* conservado en la Colección Nacional Francesa, lo que puede ser indicativo de la existencia de un número limitado de fundadores durante el período en el que el ciruelo se introdujo en Europa Occidental (Horvath et al., 2011).

Estructura genética. Divisiones principales y subestructura de la diversidad

El análisis de estructura indicó que el germoplasma podía dividirse en dos o tres grupos, aunque también aparecía un pico algo menos pronunciado en $K=5$. En especies con una historia evolutiva compleja, como es el ciruelo europeo, los métodos de agrupación bayesiana pueden detectar estructuras genéticas a diferentes niveles, por lo que para poder delinear distintos niveles de subestructura es recomendable analizar los resultados no sólo para el valor de K más probable. Por ello, se analizaron los resultados para $K=2$, $K=3$ y $K=5$ (Fig. 1).

Para $K=2$, aproximadamente el 25% de los genotipos locales quedaron agrupados en G2.1 con todas las variedades de referencia del grupo ‘Reina Claudia’, un grupo varietal cuya preponderancia en el pasado a nivel nacional en términos de distribución geográfica y producción ha sido ampliamente documentada (Herrero, 1964). El resto de los genotipos locales quedaron agrupados en G2.2 junto con todas las variedades de referencia no pertenecientes al grupo ‘Reina Claudia’. Esta estructura principal no cambió, ya que el grupo ‘Reina Claudia’ (G2.1) permaneció esencialmente idéntico y correspondió a los grupos G3.1 y G5.1 en $K=3$ y $K=5$, respectivamente (Figura 1). Estos resultados confirman que el grupo varietal ‘Reina Claudia’ podría haberse originado a partir de un fondo genético distinto al de otros grupos morfológicos de ciruelo europeo (Horvath et al., 2011).

El considerar valores de K superiores a 2 permitió identificar niveles de subestructura que delineaban más en detalle la diversidad del germoplasma estudiado. Para $K=3$, G2.2 se dividió en G3.2 y G3.3. El primer grupo incluyó cerca del 70% de los genotipos locales, los cuales aparecieron agrupados junto a variedades de referencia tanto españolas como francesas, como ‘Monsieur Hâtif’, ‘de la Rosa’, ‘Saint Antonin’ o ‘Catalonia’. Por el contrario, G3.3 incluyó 24 variedades de referencia, y sólo seis genotipos locales. Para $K=5$, G3.2 y G3.3 se dividieron en dos grupos cada uno ($G3.2 = G5.2 + G5.3$, y $G3.3 = G5.4 + G5.5$). Los grupos G5.2, G5.3 y G5.4 fueron similares en tamaño (30, 41 y 27 genotipos, respectivamente), mientras que G5.5 sólo incluyó tres genotipos. Los genotipos de G5.2 y G5.3 eran mayoritariamente locales, ya que sólo 10 de sus 71 genotipos eran variedades de referencia, principalmente de origen francés y español. G5.4 incluyó a la mayoría de los genotipos incluidos en G3.3. A pesar de que G5.5 estaba únicamente formado por tres genotipos, es destacable que dos de los tres genotipos presentaban dos haplotipos cloroplásticos de baja frecuencia (H2 y H3).

La diferenciación genética entre los grupos obtenidos por el método de agrupamiento bayesiano mostró una diferenciación moderada ($p < 0,001$) para los tres niveles de K estudiados. La variación entre grupos representó el 11,4%, 10,8% y 12,7% de la variación total al considerar las divisiones obtenidas en $K = 2, 3$ y 5 , respectivamente.

Los resultados de este estudio han puesto de manifiesto que la estructura genética en la que se organiza el germoplasma de ciruelo europeo del Noreste español es jerárquica. Se ha identificado un primer nivel con dos grupos genéticos principales, uno formado por variedades de referencia del tipo ‘Reina Claudia’ junto al 25% de los genotipos locales, y otro mucho más diverso. La estructura genética a otros niveles evidenció la existencia de una subestructura interna adicional, que permitió identificar hasta cinco grupos genéticos.

Además, el hecho de que ~70% de los genotipos locales estén agrupados con antiguas variedades de referencia españolas y francesas sugiere que la estructura genética está condicionada por un factor de proximidad geográfica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado con el proyecto RF2009-00015-00-00 (INIA) y el Grupo de Investigación A12 de Aragón. Los autores agradecen a M. Ordidge (University of Reading), M. Blouin (INRA), D. Halapija (Croatian Centre for Agriculture, Food and Rural Affairs), S. Szügyi (Research Institute for Fruit Growing and Ornamentals), A. Arbeloa (CSIC) y B. Royo (UPNA) por la cesión de hojas de algunas cvs. de referencia.

Referencias

- Halapija Kazija, D., Jelačić, T., Vujević, P., Milinović, B., Čiček, D., Biško, A., Pejić, I., Šimon, S., Mihaljević, M.Z., Pecina, M., Nikolić, D., Grahić, J., Drkenda, P. 2014. Plum germplasm in Croatia and neighbouring countries assessed by microsatellites and DUS descriptors. *Tree Genet. Genomes*. 10:761–778.
- Herrero, J. 1964. Cartografía de frutales de hueso y pepita. Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza. Consejo Superior de Investigaciones Científicas–CSIC.
- Horvath, A., Balsemin, E., Barbot, J.C., Christmann, H., Manzano, G., Reynet, P., Laígrat, F., Mariette, S. 2011. Phenotypic variability and genetic structure in plum (*P. domestica* L.), cherry plum (*P. cerasifera* Ehrh.) and sloe (*P. spinosa* L.). *Sci. Hortic.* 129:283–293.
- Sehic, J., Nybom, H., Hjeltnes, S.H., Gaši, F. 2015. Genetic diversity and structure of Nordic plum germplasm preserved ex situ and on-farm. *Sci. Hortic.* 190:195–202.
- Urrestarazu, J., Errea, P., Miranda, C., Santesteban, L.G., Pina, A. 2018. Genetic diversity of Spanish *Prunus domestica* L. germplasm reveals a complex genetic structure underlying. *PLoS ONE* 13:e0195591.

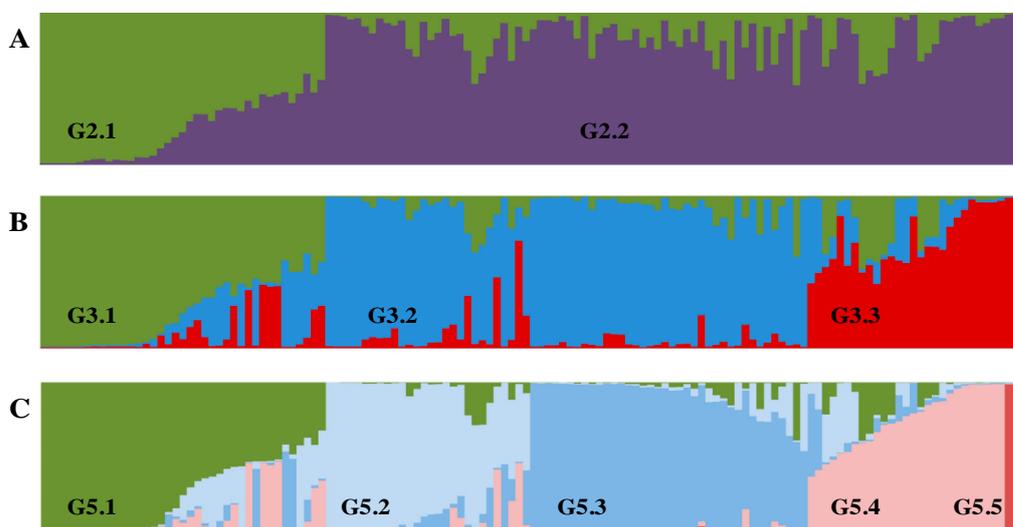


Fig. 1. Agrupamiento del germoplasma considerando $K=2$ (A), $K=3$ (B) y $K=5$ (C).