

Análisis de QTLs de fecha de floración en material vegetal local de cerezo

A. Calle¹, L. Cai², A. Iezzoni² y A. Wünsch¹

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

²Department of Horticulture, Michigan State University. 1066 Bogue St, East Lansing MI (48824-1325), United State of America.

Palabras clave: SNP, ‘Cristobalina’, ‘Ambrunés’, adaptación, mejora genética.

Resumen

Seis familias de cerezo (n=411) que descienden de cultivares locales de cerezo están siendo utilizadas para el análisis de QTLs de caracteres de interés para la mejora del cultivo. La fecha de floración es un carácter importante para la adaptación porque depende de las necesidades de frío y calor, y porque puede verse afectada por las condiciones climáticas. En este trabajo se ha realizado un análisis de QTLs de este carácter en este material vegetal. Para ello se han utilizado las seis poblaciones de forma combinada utilizando el software FlexQTL™ y un mapa de ligamiento de una de las familias que desciende de la variedad local ‘Cristobalina’, que tiene muy bajas necesidades de frío. Todos los individuos fueron genotipados con SNPs (‘RosBREED cherry 6K SNP array’) y la fecha de floración fue evaluada durante cuatro años. Este análisis ha permitido identificar los principales QTLs que controlan el carácter en este material.

INTRODUCCIÓN

La fecha de floración es un carácter importante para el cultivo de especies frutales como el cerezo (*Prunus avium* L.). La fecha de floración depende de las condiciones climáticas y de las necesidades de frío y calor que varían en función de cada genotipo (Dirlewanger et al., 2012). La adaptación de una variedad implica que la floración ocurra cuando las condiciones climáticas son favorables. En regiones como Aragón, una floración excesivamente temprana puede suponer daños por frío causados por heladas tardías. Sin embargo, variedades de bajas necesidades de frío, que generalmente presentan floración temprana (Alburquerque et al., 2008), son interesantes para extender el cultivo a zonas menos frías.

Estudios genéticos sobre la fecha de floración en especies frutales del género *Prunus*, subgénero *Cerasus*, como son el cerezo y el guindo (*Prunus cerasus*) han identificado varios QTLs (Quantitative Trait Loci) responsables de este carácter (Dirlewanger et al., 2012; Castède et al., 2014; Cai et al., 2018). Los principales QTLs asociados a este carácter en estas especies están localizados en los grupos de ligamientos (GL) 1 y 4. Tradicionalmente, los análisis de QTLs se han llevado a cabo usando una o pocas familias y en una o varias localizaciones, lo que limita la detección de QTLs, ya que muchos alelos no se encuentran presentes en el material analizado o la magnitud de éstos es demasiado baja como para ser considerada (Bink et al., 2014). Durante los últimos años se han desarrollado estrategias de mapeo de QTLs que se basan en el uso de varias poblaciones simultáneamente (Bink et al., 2008). El uso de diferentes familias con diferente fondo genético permite mejorar la detección de QTLs al incrementar el número de alelos

presentes y el efecto de estos. Recientemente, Cai et al. (2018) han aplicado esta metodología con éxito para el análisis de fecha de floración en guindo.

En este trabajo se ha realizado una aproximación similar para estudiar la fecha de floración en cerezo. Para ello se han analizado de forma combinada seis familias de cerezo que segregan para este carácter. Estas familias descienden de 6 parentales diferentes. Entre los cultivares parentales están ‘Cristobalina’ y ‘Ambrunés’ que son cultivares locales interesantes para la mejora del cultivo ya que presentan algunos caracteres de interés. En lo que se refiere a fecha de floración, ‘Cristobalina’ es de floración extra-temprana y tiene muy bajas necesidades de frío (Tabuenca, 1983; Albuquerque et al., 2008) y ‘Ambrunés’ presenta floración temprana-media. El resto de parentales ‘BC-8’, ‘Brooks’, ‘Lambert’ y ‘Vic’ presentan floración media a tardía en las condiciones de Zaragoza (Gella et al., 2001). Este estudio permitirá identificar los QTLs que controlan este carácter con el fin de poder utilizarlos en la implementación de protocolos de selección precoz para floración extra-temprana o tardía a partir de este material.

MATERIALES Y MÉTODOS

La fecha de floración de 411 individuos provenientes de seis poblaciones de cerezo y sus respectivos parentales, fue evaluada durante 4 años consecutivos (2015, 2016, 2017 y 2018). La fecha de plena floración fue estimada cuando el 75% de las yemas de flor alcanzaron la plena floración, y esta fecha se transformó en GDH (growing degree hours) usando el método descrito por Richardson et al. (1974), y en días julianos para el análisis de QTLs. Estas familias incluyen cuatro familias tipo F₁ [‘Vic’ × ‘Cristobalina’ (N=158), ‘Ambrunés’ × ‘Cristobalina’ (N=40), ‘Brooks’ × ‘Cristobalina’ (N=29), ‘Lambert’ × ‘Cristobalina’ (N=14)], y dos familias tipo F₂ [autofecundación de ‘Cristobalina’ (N=97) y la autofecundación de la selección BC-8 (N=68)] (Tabla 1). La extracción del ADN y el genotipado de los individuos fue realizado utilizando el ‘RosBREED 6K Cherry SNP array’ siguiendo el protocolo descrito por Calle et al. (2018 a, b). Se utilizó como referencia el mapa de ligamiento de ‘Vic’ x ‘Cristobalina’ (Calle et al., 2018, en prensa). El análisis de QTLs en las familias fue implementado utilizando el software FlexQTL™ (Bink et al., 2008) utilizando modelos iniciales de 1, 3 y 5 QTLs para determinar la sensibilidad. Simulaciones Monte Carlo vía cadenas de Markov con una longitud de 500.000 iteraciones para cada número inicial de QTLs fueron llevados a cabo hasta alcanzar al menos 100 muestras de cadenas efectivas. El número, la posición y el efecto de los QTLs fue determinado usando dos veces el logaritmo neperiano del factor de Bayes (2lnBF). Valores de 2lnBF superiores a 2, 5 y 10 indican evidencias de QTLs positivas, fuertes y decisivas, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fenotipado de la fecha de floración reveló una gran variación entre los cultivares usados como parentales y entre las familias. ‘Cristobalina’, un cultivar con pocas necesidades de horas frío (Tabuenca, 1983; Albuquerque et al., 2008), floreció de media entre 19 y 27 días antes que el resto de cultivares parentales (‘Ambrunés’ +19; ‘Brooks’ +20; ‘Vic’ +25; ‘Lambert’ +27, respecto al día de floración de ‘Cristobalina’). En las familias, la floración media varió entre 75 y 90 días julianos (Tabla 1), siendo la familia resultante de la autofecundación de ‘Cristobalina’ la más temprana con una floración media de entre 12 y 15 días anterior al resto de poblaciones (Tabla 1). La heredabilidad estimada de todos los individuos fue de 0.88, similar a los valores obtenidos previamente para la heredabilidad de este carácter (0.88-0.92) en otras familias de cerezo (Dirlewanger et al., 2012; Castède et al., 2014).

Para el análisis de QTLs de los 5696 marcadores disponibles en el RosBREED cherry 6K SNP array, 1269 marcadores fueron usados para llevar a cabo los análisis de QTLs, tras superar un proceso de filtrado previo. El análisis de QTLs en todo el genoma permitió la identificación de siete posibles QTLs relacionados con la fecha de floración en este material. Estos resultados preliminares indican que los QTLs con mayor porcentaje de varianza explicada para este carácter están localizados en los GL 1 (máx. $2\ln BF = 13.3$) y 2 (máx. $2\ln BF = 32.8$). El QTL localizado en el GL1 está localizado en la misma posición que otros QTLs identificados para este carácter en cerezo (Castède et al., 2014). En esta posición están localizados genes *Dormancy Associated MADS-box* (DAM) relacionados con la salida de la latencia y con la regulación de los requerimientos térmicos (Castède et al., 2015). Sin embargo, un QTL mayor previamente no identificado fue localizado en la parte final del GL 2. Este QTL explica el mayor porcentaje de varianza fenotípica de todos los QTLs detectados en este trabajo, y puede estar relacionado con la floración extra-temprana del cultivar ‘Cristobalina’. La confirmación de estos resultados y el estudio de genes candidatos en el QTL del GL2 pueden ayudar a entender la floración extra-temprana de ‘Cristobalina’ y a avanzar en el conocimiento del control genético de este carácter. El estudio de los haplotipos de los QTLs identificados permitirá además establecer estrategias de selección precoz para floración temprana o tardía a partir de este material.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INIA RTA2015-00027-00-00 y RFP2015-00015-00-00. A. Calle ha sido financiado por el Departamento de Industria e Innovación del Gobierno de Aragón (Subvenciones destinadas a la contratación de personal investigador en formación 2015-2019). El servicio de genotipado fue llevado a cabo por CEGEN-PRB2-ISCIH, financiado por el proyecto PTE/0001, ISCIH-SGEFI/FEDER

Referencias

- Albuquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A. and Burgos, L. 2008. Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Env. and Exp. Bot.* 64:162-170.
- Bink, M.C.A.M., Jansen, J., Madduri, M., Voorrips, R.E., et al. 2014. Bayesian QTL analyses using pedigreed families of an outcrossing species, with application to fruit firmness in apple. *Theor. Appl. Genet.* 127:1073-1090.
- Bink, M.C.A.M., Boer, M.P., ter Braak, C.J.F., Jansen, J., Voorrips, R.E. and van de Weg, W.E. 2008. Bayesian analysis of complex traits in pedigreed plant populations. *Euphytica* 161:85–96.
- Cai, L., Stegmeir, T., Sebolt, A., Zheng, C., Bink, M.C.A.M. and Iezzoni, A. 2018. Identification of bloom date QTLs and haplotype analysis in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*). *Tree Genet Genomes* 14:22.
- Calle A, Cai L, Iezzoni A, Wünsch A. (2018) ‘High density linkage maps constructed in sweet cherry (*Prunus avium* L.) using cross- and self-pollination populations reveal chromosomal homozygosity in inbred families and non-syntenic regions with the peach genome’. *Tree Genetics and Genomes* 14:37.
- Calle A, L. Cai, A. Iezzoni, A. Wünsch. (in press) ‘Construction of a high density SNP marker linkage map of ‘Vic’ x ‘Cristobalina’ in sweet cherry’. *Acta horticulturae*.
- Castède, S., Campoy, J.A., Le Dantec, L., Quero García, J., Barreneche, T., Weden, B. and Dirlewanger, E. 2015. Mapping of candidate genes involved in bud dormancy and flowering time in sweet cherry (*Prunus avium*). *Plos ONE* 10(11) e0143250.

- Castède, S., Campoy, J.A., Quero García, J., Le Dantec, L., Lafargue, M., Barreneche, T., Weden, B. and Dirlewanger, E. 2014. Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: flowering date dissected into chilling and heat requirements. *New Phytologist* 202:703-715.
- Dirlewanger, E., Quero-García, J., Le Dantec, L., Lambert, P., Ruiz, D., Dondini, L., Illa, E., Quilot-Turion, B., Audergon, J.M., Tartarini, S., Letourmy, P. and Arús, P. 2012. Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. *Heredity* 109(5):280-292.
- Gella, R., Fustero, R. y Rodrigo, J. 2001. Variedades de cerezo, Zaragoza: Servicio de Investigación Agroalimentaria. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10532/2423>.
- Peace, C., Bassil, N., Main, D., Ficklin, S., Rosyara, U.R., Stegmeir, T., Sebolt, A., Gilmore, B., Lawley, C., Mockler, T.C., Bryant, D.W., Wilhelm, L. and Iezzoni, A. 2012. Development and evaluation of a genome-wide 6K SNP array for diploid sweet cherry and tetraploid sour cherry. *Plos ONE* 7(12). e48305
- [Richardson, E.A., Seeley, S.D. and Walter, D.R. 1974.](#) A model for estimating the completion of rest for 'Redhaven' and 'Elberta' peach trees. *HortScience* 9(4):331-332.
- Tabuenca, M.C. 1983. Winter chilling requirements of cherry varieties. I Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (Valencia). Comunicaciones, SECH: 661-667.

Tabla 1. Familias de cerezo analizadas y fecha de floración media de 4 años en GDH y días julianos.

Familia	Tipo familia	N	GDH			Fecha floración		
			Mín	Max	Media	Mín	Max	Media
'Ambrunés' × 'Cristobalina'	F1	40	7691	9720	8629	83	93	87
'Brooks' × 'Cristobalina'	F1	29	7614	9601	8615	79	96	87
'BC-8' autofecundación	F2	68	6946	10394	8735	78	101	88
'Cristobalina' autofecundación	F2	97	5848	8067	6743	67	88	75
'Lambert' × 'Cristobalina'	F1	14	8259	10022	9202	86	95	90
'Vic' × 'Cristobalina'	F1	158	7816	10468	9000	82	100	89

N: Número de individuos; Mín: Mínimo; Máx: Máximo.