

## DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE MANZANO PROSPECTADO EN ZONAS DE MONTAÑA DE ARAGÓN

A. Pina, J. Urrestarazu, P. Errea

Unidad de Hortofruticultura, CITA de Aragón. Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza. E-mail: perrea@aragon.es

**Palabras clave:** microsatélites, variabilidad, identificación, *Malus x domestica* Borkh.

### INTRODUCCIÓN

La diversidad y estructura genética de una gran parte del manzano conservado en el Noreste español fue evaluada en Urrestarazu et al. (2012). Aunque en este trabajo se incluyeron algunas accesiones prospectadas en Aragón, trabajos llevados a cabo en los últimos 10 años en el CITA en zonas de montaña, revelaron la importancia de esta especie en este área geográfica en las últimas décadas, así como el interés en profundizar en el conocimiento de la diversidad de manzano procedente de estas zonas. A través de varios proyectos de investigación se inició una prospección sistemática en zonas de montaña de las tres provincias aragonesas con el objetivo de recuperar variedades tradicionales que de esta especie aún persisten en la región. Su recuperación y conservación, así como su caracterización, es de gran relevancia ya que este material constituye una fuente de diversidad genética no suficientemente explorada. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la diversidad y determinar la estructura genética de manzano prospectado en Aragón en los últimos años.

### MATERIAL Y MÉTODOS

*Análisis mediante SSR.* Ciento ochenta y tres manzanos prospectados en las tres provincias aragonesas fueron caracterizados junto a 23 variedades de referencia con 20 SSRs a través de cinco PCR múltiples. Cada PCR múltiple fue desarrollada en un volumen final de 12.5  $\mu$ l, utilizando 20 ng de ADN, 0.10 or 0.15  $\mu$ M de cada primer y 1X PCR Master mix (Qiagen). Las condiciones de amplificación de las múltiples PCR1 y PCR2 fueron idénticas respectivamente a las denominadas como C y A en Urrestarazu et al. (2012). Para las múltiples PCR3, PCR4 y PCR5 se empleó una desnaturalización inicial de 15 min a 95°C, seguida de diez 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 55°C, 1 min a 72°C y una etapa final de 30 min a 72°C. La separación de los fragmentos se llevó a cabo en un secuenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

*Diversidad y estructura genética.* Se calculó para cada marcador el número de alelos totales, el número de alelos efectivos y la heterocigosidad observada y esperada. Las relaciones de similitud genética entre las accesiones fueron determinadas por medio de análisis UPGMA empleando el coeficiente de similitud de Nei y Li. La estructura genética se determinó mediante análisis de agrupamiento bayesiano usando Structure v 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) realizando 10 repeticiones del análisis bajo el modelo de admixis, con 2 105 iteraciones de “burn-in” seguidas de 5 105 iteraciones. El número de grupos (K) más ajustado a los datos se determinó según el método de Evanno et al. (2005). La estructura genética revelada fue validada a través de un Análisis Factorial de Correspondencias (AFC) y el grado de diferenciación se cuantificó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 20 SSRs empleados fueron polimórficos y amplificaron un total de 256 alelos, de los cuales 146 fueron alelos infrecuentes (frecuencia < 0.05). El número de alelos osciló entre 6 y

21 alelos por locus (media de 12.8), mientras que dada la gran proporción de alelos poco frecuentes, el número medio de alelos efectivos fue de 5.67. La heterocigosidad esperada media fue alta (0.80), en la línea de los valores obtenidos en manzano de otras regiones españolas. Se detectó un 29% de accesiones duplicadas entre las 183 analizadas. Ocho parejas de accesiones se diferenciaron sólo por un alelo, y cinco más en dos. Estas ligeras diferencias en  $\leq 2$  loci podrían considerarse mutaciones somáticas. Además, otras 15 parejas de genotipos compartieron al menos un alelo en cada locus, indicando que podrían estar relacionados por hibridación.

La estructura genética de los 151 genotipos únicos (130 accesiones prospectadas más 21 variedades de referencia) se determinó mediante 16 SSRs, tras eliminar del análisis aquellos que podrían presentar alelos nulos. El número de grupos más probable en los que se estructuró el material fue  $K=4$ . Más del 60% de las accesiones estudiadas quedó localizado en grupos distintos de aquellos en los que quedaron integradas la mayoría de las variedades foráneas de referencia, lo que podría indicar el carácter singular de una gran parte del material prospectado. El grado de diferenciación genética detectada entre los grupos determinados ( $F_{ST}=0.07$ ;  $P<0.001$ ), así como los resultados obtenidos mediante análisis complementarios (AFC y dendrograma UPGMA), fueron coherentes con los obtenidos con el análisis de agrupamiento bayesiano.

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto el interés de proseguir con trabajos de prospección de manzano en áreas montañosas de Aragón. Este material ha persistido sin ninguna influencia humana bajo condiciones adversas durante mucho tiempo, por lo que esta variabilidad podría ser importante en la identificación de genes de interés de resistencia a estreses bióticos y abióticos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INIA RF2009-00015-00-00 y RF2011-00017-C05-00.

## **REFERENCIAS**

- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611–2620.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945–959.
- Urrestarazu, J., Miranda, C., Santesteban, L.G. and Royo, J.B. 2012. Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers. *Tree. Genet. Genomes*. 8:1163–1180.