

Construcción de mapas de ligamiento de alta densidad en cerezo para la realización de análisis genéticos de caracteres de interés de material vegetal local

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: *Prunus avium* L., mapas de ligamiento, RosBREED cherry 6K SNP array, ‘Cristobalina’.

Resumen

Algunas variedades locales de cerezo exhiben caracteres de interés para la mejora del cultivo. La variedad ‘Cristobalina’ destaca por unas bajas necesidades de horas frío, maduración temprana y auto-compatibilidad entre otros. Con el fin de investigar la genética de algunos de estos caracteres, se han desarrollado varias familias que descienden de ‘Cristobalina’ y que segregan para estos caracteres. En este trabajo, 3 de estas familias han sido utilizadas para la construcción de mapas de ligamiento de alta densidad que permitan un análisis de QTLs de caracteres de interés. Estas familias incluyen una familia F₁ y dos familias F₂. Los individuos de estas familias fueron genotipados mediante SNPs utilizando el ‘RosBREED cherry 6K SNP array’ y los datos fueron usados para la construcción de los mapas de ligamiento. Los mapas genéticos construidos incluyeron de 511 a 816 marcadores en 8 grupos de ligamiento y comprendieron una distancia genética de entre 622.4 y 726.0 cM. Los mapas obtenidos fueron similares a otros obtenidos en la especie, pero se observaron diferencias con el genoma de melocotonero. Estos mapas serán utilizados para el estudio genético de caracteres cuantitativos de interés en la mejora del cultivo.

INTRODUCCIÓN

El cerezo (*Prunus avium* L.), perteneciente a la familia de la *Rosaceae*, es uno de los principales frutales de hueso cultivados. Su producción y superficie han aumentado a nivel mundial un 30% durante las dos últimas décadas, alcanzando 440.000 ha y 2.3 millones de toneladas en el año 2016 (FAOSTAT, 2018). Este incremento en la producción unido a las demandas de consumidores, hacen necesario introducir nuevas variedades que puedan dar respuesta a sus necesidades. Para ello es necesario desarrollar herramientas que permitan optimizar la mejora genética del cultivo y la utilización de los recursos genéticos disponibles que puedan aportar carácter de interés.

Los mapas genéticos permiten, mediante los análisis de QTLs, realizar estudios genéticos de caracteres de interés para su posterior utilización en la selección asistida por marcadores. En cerezo, inicialmente se realizaron mapas de ligamientos utilizando isoenzimas, RAPDs y/o SSRs (Stockinger et al., 1996; Boškovi y Tobutt 1998; Dirlwanger et al., 2004). Más recientemente, y debido al desarrollo de nuevas tecnologías, se están realizando mapas genéticos de alta densidad utilizando otros marcadores como SNPs (Klages et al., 2013, Guajardo et al., 2015, Wang et al., 2015).

En España existen variedades locales que presentan caracteres de interés para el cultivo. Concretamente la variedad ‘Cristobalina’ destaca por unas bajas necesidades de horas frío, maduración temprana y auto-compatibilidad entre otros. Con el fin de investigar la genética de algunos de estos caracteres se han desarrollado varias familias que descienden de ‘Cristobalina’ y que segregan para estos caracteres. Debido a la auto-incompatibilidad gametofítica presente en cerezo, esta especie no se puede autofecundar y por ello, hasta el momento, solo se han construido mapas de ligamiento a partir de cruzamientos. Sin embargo, el cultivar ‘Cristobalina’ es un mutante autocompatible lo que ha permitido el desarrollo de familias de autofecundación.

En este trabajo, 3 familias de cerezo descendientes de la variedad ‘Cristobalina’ han sido utilizadas para la construcción de mapas de ligamiento de alta densidad usando el array de SNPs ‘RosBREED cherry 6K SNP array v1’. Estos mapas permitirán el análisis genético de caracteres cuantitativos de interés para la mejora del cultivo. Los mapas obtenidos fueron comparados con otros desarrollados en la especie, y la posición genética de los marcadores localizados en los mapas fue comparada con su posición física en los genomas de cerezo y melocotonero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tres familias de cerezo, una procedente del cruzamiento de ‘Vic’ × ‘Cristobalina’ (V×C, N=161), y dos procedentes de autopolinizaciones, una de ‘Cristobalina’ (C×C, N=97) y otra de un descendiente del cruzamiento de ‘Brooks’ × ‘Cristobalina’ (B×C2, N=67), fueron utilizadas en este trabajo para la construcción de mapas de ligamientos de alta densidad. El ADN de todos los individuos de las familias y de los parentales fue extraído usando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, EEUU). Las muestras fueron genotipadas utilizando el RosBREED Cherry 6K Illumina® SNP array v1 (Peace et al., 2012) en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen). El análisis de SNPs se realizó utilizando el software GenomeStudio™ y los mapas de ligamientos fueron construidos utilizando el software JoinMap 4.1. El algoritmo de mapeo de máxima verosimilitud con parámetros por defecto fue utilizado para la construcción de los grupos de ligamiento, y la frecuencia de recombinación se transformó en distancia genética usando la función de mapeo de Kosambi.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la familia V×C se observaron 842 SNPs informativos. De estos, 483 fueron heterocigotos en el parental ‘Vic’, 526 en ‘Cristobalina’, y 167 SNPs fueron heterocigotos en ambos cultivares a la vez. Para las familias C×C y B×C2, 526 y 589 SNPs fueron heterocigotos para sus respectivos parentales, respectivamente, y por tanto informativos para la construcción de los mapas de ligamientos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en otros cultivares de cerezo evaluados con el mismo array (Peace et al., 2012).

En todos los mapas de ligamientos los marcadores se agruparon en 8 grupos de ligamientos correspondientes a los 8 cromosomas del genoma del cerezo. Los mapas de ‘Vic’ y ‘Cristobalina’ obtenidos a partir de la familia V×C tuvieron 313 y 370 SNPs respectivamente, distribuidos en 707.2 y 659.6 cM. En estos mapas la distancia media entre marcadores fue de 3.1 y 4.0 cM (Tabla 1). En la familia C×C, de los 526 SNPs heterocigotos, 511 fueron mapeados en los 8 grupos de ligamientos, cubriendo una distancia genética total de 634.1 cM (Tabla 1). Para la familia B×C2 se obtuvo un mapa genético de 552 SNPs, con una distancia genética de 622.4 cM (Tabla 1). El número de marcadores, la distancia genética y la densidad de estos mapas fue similar a los mapas

previamente obtenidos usando el mismo array (Klagges et al., 2013). Sin embargo, se detectaron regiones con pocos marcadores, por ejemplo, en los grupos de ligamiento 2 y 3 de 'Vic', o 1 y 7 de 'Cristobalina' (Tabla 1). Estas regiones podrían ser homocigotas y por tanto no segregantes para análisis de QTLs. Sin embargo, es necesario evaluar más marcadores para confirmar la homocigosis en estas regiones.

En los mapas de los parentales 'Vic' y 'Cristobalina' se obtuvo una menor densidad de marcadores que en los mapas de C×C y B×C2, debido a las diferentes estrategias llevadas a cabo para construir los mapas de las poblaciones F₁ y F₂. En las poblaciones F₂ todos los marcadores heterocigotos fueron utilizados, mientras que en el mapa de los parentales 'Vic' y 'Cristobalina' solo aquellos marcadores heterocigotos en uno de los parentales y homocigotos en el otro fueron utilizados para la construcción de los mapas. Lo que confirma la utilidad de las familias F₂ para la construcción de mapas de ligamiento.

La comparación de la posición genética de los marcadores mapeados con su posición en los genomas de cerezo (Shirasawa et al., 2017) y melocotonero (Verde et al., 2017) confirmó un alto grado de similitud con ambos genomas. Sin embargo, se observó una región invertida en la parte superior del GL 5 en los mapas de 'Vic' y B×C2 que también ha sido observada previamente en otros cultivares de cerezo (Klagges et al., 2013; Guajardo et al., 2015) y que confirma la posible presencia de una región invertida entre el genoma del melocotonero y del cerezo en la parte superior del cromosoma 5.

El desarrollo de estos mapas genéticos permitirá investigar el control genético de caracteres de interés en cerezo a partir de material vegetal local. Además, estos mapas han proporcionado información sobre el impacto de la autofecundación en el genoma de cerezo y permitirán conocer el efecto de la endogamia en la especie.

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-ISCI, financiado por el proyecto PTE/0001, ISCI-SGEFI/FEDER.

Referencias

- Boškovic, R. and Tobutt, K.R. 1998. Inheritance and linkage relationships of isoenzymes in two interspecific cherry progenies. *Euphytica* 103: 273–286.
- Cachi, A.M. and Wünsch, A. 2011. Characterization and mapping of non-S gametophytic selfcompatibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J. Exp. Bot.* 62: 1847–1856.
- Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga-Calderé, F., Cosson, P., Howad, W., and Arús, P. 2004. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *PNAS* 101: 9891–9896.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Statistics Database. 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/>
- Guajardo, V., Solís, S., Sagredo, B., Gainza, F., Muñoz, C., Gasic, K. and Hinrichsen, P. 2015. Construction of high density sweet cherry (*Prunus avium* L.) linkage maps using microsatellite markers and SNPs detected by genotyping-by-sequencing (GBS). *PLoSOne* 10: 1–17.
- Klagges, C., Campoy J.A., Quero-García, J., Guzmán, A., Mansur, L., Gratacós, E., Silva, H., Rosyara, U.R., Iezoni, A., Meisel, L.A. and Dirlewanger, E. 2013. Construction and comparative analyses of highly dense linkage maps of two sweet cherry intra-

- specific progenies of commercial cultivars. PLoSOne 8(1): e54743.
- 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. PlosONE 7(12). e48305.
- Shirasawa, K., Isuzugawa, K., Ikenaga, M., Saito, Y., Yamamoto, T., Hirakawa, H. and Isobe, S. 2017. The genome sequence of sweet cherry (*Prunus avium*) for use in genomics assisted breeding. DNA Research 24(5): 499-508.
- Stockinger, E.J., Mullnix, C.A., Long, C.M., Brettin, T.S. and Iezzoni, A.F. 1996. A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. J. Hered. 87(3): 214-218.
- Verde, I., Jenkins, J., Dondini, L., Micali, S., Pagliarani, G., Vendramin, E., Paris, R., Aramini, V., Gazza, L., Rossini, L., Bassi, D., Troglio, M., Shu, S., Grimwood, J., Tartarini, S., Dettori, M.T. and Schmutz, J. 2017. The Peach v2.0 release: high-resolution linkage mapping and deep resequencing improve chromosome-scale assembly and contiguity. BMC Genomics 18: 1-18.
- Wang, J., Zhang, K., Zhang, X., Yan, G., Zhou, Y., Feng, L., Ni, Y. and Duan, X. 2015. Construction of commercial sweet cherry linkage maps and QTL analysis for trunk diameter. PlosONE 10(10):e0141261.

Tabla 1. Números de marcadores, distancia genética y distancia media entre marcadores. V y C corresponden a 'Vic' y 'Cristobalina' respectivamente. cM: centiMorgan.

		LG1	LG2	LG3	LG4	LG5	LG6	LG7	LG8	Total
Número de marcadores	V	100	10	23	28	44	29	54	25	313
	C	67	95	54	34	32	49	5	34	370
	V×C	185	111	89	100	92	95	68	76	816
	C×C	85	105	66	75	51	71	9	49	511
	B×C2	133	75	70	56	48	66	51	53	552
Distancia genética (cM)	V	169.8	65.3	64.2	75.7	79.2	106.7	68.7	77.6	707.2
	C	63.4	75.2	91.1	91.1	72.5	120.5	75.9	70.2	659.9
	V×C	150.3	79.8	89	78.5	71.3	108.9	76.1	72.1	726.0
	C×C	58.9	94.9	100.2	80.9	72.2	111.5	42.9	72.6	634.1
	B×C2	124.7	73.1	52.6	71.8	68.5	86.8	70.4	74.5	622.4
Distancia media entre marcadores (cM)	V	1.7	7.2	2.9	2.8	1.8	3.8	1.3	3.2	3.1
	C	0.9	0.7	1.7	2.8	2.3	2.5	18.9	2.1	4.0
	V×C	0.8	1.2	1.0	0.8	0.8	1.1	1.1	0.9	0.9
	C×C	0.7	0.9	1.5	1.0	1.4	1.6	5.3	1.5	1.7
	B×C2	0.9	0.9	0.7	1.3	1.4	1.3	1.4	1.4	1.2