



Sociedad  
Española  
de **Ciencias**  
**Hortícolas**

**86**

**OCTUBRE**  
**2021**

# **ACTAS DE HORTICULTURA**

**Comunicaciones Técnicas**  
**Sociedad Española de**  
**Ciencias Hortícolas**

**XVI Congreso Nacional de**  
**Ciencias Hortícolas**

**Córdoba**  
**17-21 de octubre de 2021**

## **Análisis de la diversidad genética de accesiones de peral prospectadas en zonas de montaña de Aragón**

F.J. Bielsa, P. Irisarri<sup>1,2</sup>, P. Errea<sup>1,2</sup>, A. Pina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Hortofruticultura. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.

<sup>2</sup> Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 CITA-Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, España.

**Autor para correspondencia:** [pirisarri@cita-aragon.es](mailto:pirisarri@cita-aragon.es)

**Palabras clave:** Identificación varietal, Estructura de población, Microsatélites (SSRs), *Pyrus communis* L., Recursos fitogenéticos

### **Resumen**

**El peral europeo (*Pyrus communis* L.) es uno de los cultivos frutales más importantes de las regiones templadas de todo el mundo. En los últimos años, debido a la introducción de nuevas variedades comerciales, ha tenido lugar una pérdida de variedades locales de gran valor por su adaptabilidad a las condiciones medioambientales de las zonas de cultivo. En este estudio, se han caracterizado molecularmente 178 accesiones de peral prospectadas en zonas de montaña de Aragón, junto a 74 variedades de referencia seleccionadas de entre las más cultivadas, mediante 14 microsatélites (SSRs). La variabilidad alélica encontrada mostró un alto grado de polimorfismo con una media de 17,93 alelos por locus. Esto ha permitido detectar 228 genotipos únicos de las 252 accesiones estudiadas, resaltando la singularidad del material vegetal analizado. Las relaciones genéticas de similitud se estimaron a través de análisis UPGMA, poniendo de manifiesto que más del 67% del material local de peral se encuentra agrupado en subgrupos distintos de aquellos que contienen la mayor parte de los cultivares extranjeros. Por otro lado, los análisis de estructura genética permitieron su clasificación en tres grupos genéticos principales. En conclusión, el material prospectado ha presentado una gran variabilidad genética, lo que supone un interés potencial para futuras investigaciones que profundicen en la búsqueda de genes de interés, como son los relacionados con resistencia a plagas y enfermedades y calidad del fruto.**

### **INTRODUCCIÓN**

España es el noveno productor de peral (*Pyrus communis* L.) en el mundo con una producción anual de unas 330.670 toneladas (FAO, 2019). La superficie dedicada a su cultivo ha estado tradicionalmente ubicada en el valle del Ebro, que actualmente recoge el 80% de las hectáreas destinadas a este cultivo (MAPA, 2017). Sin embargo, la evolución del cultivo de peral en España ha tomado una proyección decreciente durante los últimos años. Además, la diversidad genética desde finales de la década de los 70 ha disminuido a causa de la introducción de variedades extranjeras que han desplazado las variedades locales tradicionales (Iglesias y Casals, 2013) y el cambio en los medios de producción y abandono progresivo de la vida rural (Errea, 2007). Para evitar esta pérdida de variabilidad genética se han impulsado distintas iniciativas para la conservación de los recursos fitogenéticos y su utilización en los programas de mejora genética vegetal (Urrestarazu et al., 2016). Dentro de este marco, se iniciaron trabajos de prospección de accesiones de peral en zonas montañosas de Aragón con el objetivo de caracterizar e identificar las variedades locales prospectadas y evaluar y determinar su diversidad y estructura genética de la población conservada en la colección de variedades del CITA de Aragón.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Caracterización genética

Se han caracterizado 178 accesiones obtenidas de zonas montañosas de Aragón junto a 74 variedades de referencia de origen tanto nacional como internacional mediante 14 marcadores moleculares SSR marcados en el extremo 5' con los fluorocromos 6-FAM, VIC, NED o PET usando tres PCR-multiplex. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador iCycler thermal cycler (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA) siguiendo las condiciones descritas en Bielsa et al (2021). Los fragmentos de ADN obtenidos fueron separados en un secuenciador ABI Prism 3730 (Applied Biosystems) y finalmente se analizaron y asignaron los tamaños de los fragmentos con el software Peak Scanner 2.0 (Applied Biosystems).

### Diversidad genética y estructura poblacional

La diversidad genética se evaluó mediante el número de marcadores polimórficos, el número total de alelos de la colección, el número medio de alelos por locus, las heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), los estadísticos  $F$  de Wright, las frecuencias alélicas, los alelos raros y alelos únicos mediante el software SPAGeDI (Hardy y Vekemans, 2002). Además, se calculó el número efectivo de alelos y el poder discriminante de los locus. Las relaciones genéticas se han estudiado utilizando un dendrograma construido en el software R (R Core Team, 2017) siguiendo el método UPGMA. La estructura genética de la población se determinó mediante un análisis bayesiano de los genotipos únicos utilizando el software STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al 2000). Los resultados obtenidos se procesaron con el programa Structure Harvester para determinar la división más probable ( $K$ ) entre  $K=1$  y  $K=11$  siguiendo el método propuesto por Evanno et al., (2005). La estructura genética revelada fue validada a través de un Análisis Factorial de Correspondencias (AFC) utilizando el software DARwin v.6.0.21 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006) y el grado de diferenciación se cuantificó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) en Genodive (Meirmans y van Tienderen, 2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la diversidad genética de las 252 accesiones conservadas en la colección del CITA mostró un elevado grado de polimorfismo para los 14 marcadores moleculares SSR. Estos marcadores amplificaron un total de 251 alelos, dando una media de alelos por locus de 17,93. De los 251 alelos amplificados 163 resultaron ser alelos raros (frecuencia  $< 0.05$ ), y se encontraron 41 alelos únicos. La presencia de alelos raros y alelos únicos, así como la riqueza alélica es ligeramente superior en el material local en comparación con las variedades de referencia. Tanto la heterocigosidad esperada (0,82) como la observada (0,82) confirman un grado de variabilidad genética elevado, que además de ser similar a estudios en otras colecciones españolas ( $H_o:0,74$ ;  $H_e:0,80$ ; Ferreira dos Santos et al., 2011) denota la labor de prospección desempeñada durante los últimos años y la caracterización del banco de germoplasma de peral de montaña del CITA. Además del elevado grado de diversidad genética y riqueza alélica que es posible encontrar en la colección, destaca el porcentaje de triploides (32.9%) que podría indicar la selección favorecida hacia estas accesiones, con un fruto de mayor tamaño, por parte de los agricultores.

De los 252 genotipos estudiados se obtuvieron un total de 228 genotipos únicos y 210 genotipos representados por una sola accesión, es decir con un alto nivel de vulnerabilidad. Los 42 duplicados encontrados se dividieron en 18 grupos de identidad diferentes. El análisis UPGMA reveló el agrupamiento de algunas accesiones de montaña locales junto a variedades tradicionales de origen francés sugiriendo la presencia de intercambio genético que se ha realizado de manera histórica a través de los Pirineos por medio del injerto. Además, el 67%

del material local no se encuentra agrupado con cultivares extranjeros, por lo que cabe pensar que dicho material posee una gran singularidad y potencial interés en futuras investigaciones. El análisis bayesiano de los 228 genotipos únicos mostró una división más probable de la población en 3 subgrupos ( $K=3$ ) en la que el 73% de las accesiones estaba fuertemente asignada a su grupo correspondiente ( $q_i \geq 0,8$ ). Mientras que los grupos 3.1 y 3.2 engloban el 87,2% de las accesiones locales, el grupo 3.3 contiene el 65,3% de las variedades de referencia y tan sólo un 12,8% de las accesiones prospectadas. Además, los grupos 3.1 y 3.2 presentan una ligera diferencia en el grado de variabilidad genética en comparación con el grupo 3.3 (Tabla 1). El análisis de coordenadas principales, confirmó la división de la población en 3 grupos, donde los dos ejes principales explicaban el 8,55% y 7,30% de la varianza respectivamente. Finalmente, el análisis de la varianza molecular o AMOVA, mostró diferencias significativas entre los 3 grupos identificados por el método bayesiano. El valor global de  $F_{st}$  fue 0,025, sugiriendo una diferencia moderada pero significativa ( $P < 0,001$ ) entre los 3 grupos.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), proyectos RTA2015-00052-C02-02 y RFP2015-00015-00-00, y por el grupo consolidado de investigación A12 del Gobierno de Aragón.

### Referencias

- Bielsa, F.J., Irisarri, P., Errea, P., Pina, A., 2021. Genetic Diversity and Structure of Local Pear Cultivars from Mountainous Areas from Aragon (Northeastern Spain). *Agronomy* 11, 1778. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091778>
- Errea, P. (2007). El patrimonio frutal de los pueblos abandonados de Aragón. *Naturaleza Aragonesa: Revista de La Sociedad de Amigos Del Museo Paleontológico de La Universidad de Zaragoza*, 19(ISSN 1138-8013), 33–40.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611–2620.
- FAO. (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Stat. database World Wide Web. <http://faostat.fao.org>.
- Ferreira dos Santos, Allívia Rouse, Ramos-Cabrer, A. M., Díaz-Hernández, M. B., & Pereira-Lorenzo, S. (2011). Genetic variability and diversification process in local pear cultivars from northwestern Spain using microsatellites. *Tree Genetics and Genomes*, 7(5), 1041–1056. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0393-3>.
- Hardy, O. y Vekemans, X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618–620.
- Iglesias, I., & Casals, E. (2013). Evolución de la producción de pera en España y análisis del mercado. *Vida Rural*.
- MAPA. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/encuestasplantaciones-arboles-frutales/>
- Meirmans, P.G.; Van Tienderen, P.H. genotype and genodive: Two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* 2004, 4, 792–794.
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J. P. (2006). DARwin Software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- R Core Team. (2017). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.r-project.org/>.
- Urrestarazu, J, Pina, A., Espiau, M., & Errea, P. (2016). Frutales de pepita. In J. I. Ruiz de Galarreta, J. Prohens, & R. Tierno (Eds.), *Las variedades locales en la mejora genética de plantas*. (pp. 215–237). SECG.

Urrestarazu, Jorge, Royo, J. B., Santesteban, L. G., & Miranda, C. (2015). Evaluating the influence of the microsatellite marker set on the genetic structure inferred in *Pyrus communis* L. *PLoS ONE*, 10(9), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138417>.

Tabla 1. Medidas de diversidad genética para cada uno de los grupos genéticos definidos con STRUCTURE para K = 3. Porcentaje de accesiones con una asignación robusta al grupo (%  $q_i > 0,8$ ), número de alelos ( $N_A$ ), número de alelos por locus ( $N_A / \text{locus}$ ), He: heterocigosidad esperada y Ho: heterocigosidad observada.

Genetic group	% $q_i > 0,8$	$N_A$	$N_A / \text{locus}$	He	Hobs
<b>K=3</b>					
<b>G3.1</b>	72,09%	136	9,71	0,81	0,77
<b>G3.2</b>	70,67%	126	9	0,78	0,90
<b>G3.3</b>	76,11%	123	8,79	0,74	0,78