

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE UN CLON DE FRUTILLA MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

Giambiasi Mario¹, Vicente Esteban², Arruabarrena Ana¹

¹Laboratorio de Biotecnología, INIA Salto Grande, Salto, Uruguay.

²Programa Nacional de Producción Hortícola, INIA Salto Grande, Salto, Uruguay.

Mail: aarruabarrena@inia.org.uy

Introducción

La frutilla es un producto tradicional de la horticultura del noroeste de Uruguay. El cultivo se realiza en unidades de producción familiar, en pequeñas superficies que utilizan una importante cantidad de mano de obra. Actualmente en Salto se produce más del 50% de la frutilla nacional. La zona está especializada en la producción precoz de invierno e inicios de la primavera. Las variedades utilizadas son en su gran mayoría provenientes del programa de mejoramiento genético de INIA (Vicente *et al.*, 2012).

El programa comenzó en 1992 y busca obtener cultivares con calidad superior de fruta, resistencia a enfermedades y adaptadas a las condiciones del Uruguay. Previamente a liberarse una nueva variedad se validan los clones avanzados en predios de productores representativos (Vicente *et al.*, 2004).

A comienzos del año 2017 surgieron dudas sobre la identidad de un clon avanzado en el predio de uno de los validadores. Este genotipo concordaba con las características morfológicas del clon N25.1, valioso por su alta resistencia a enfermedades de tallo y raíz.

Los marcadores microsatélites (SSR) son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma. Son considerados por la mayoría de autores una poderosa herramienta para estudios genéticos dado a que presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes, repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente (Goldstein y Schlotterer, 1999). En el laboratorio de Biotecnología de INIA Salto Grande se cuenta con un set de marcadores moleculares SSR de Frutilla previamente seleccionados y ajustados (Arruabarrena *et al.*, 2016)

En este trabajo se planteó estudiar la identidad del clon avanzado de frutilla y confirmar si se trata de N25.1.

Materiales y Métodos

Se recolectaron muestras de hoja y se extrajo ADN del clon problema (sitio 1), de otro predio de validación (sitio 2) y de la planta original mantenida en el banco de germoplasma de INIA Salto Grande. También se recolectaron hojas y se extrajo ADN del clon R14.1, que tiene como uno de sus parentales al clon N25.1.

Se utilizó un set de 4 marcadores moleculares (loci SSR) previamente ajustados y seleccionados en el laboratorio de Biotecnología de INIA SG para realizar el estudio. Para confeccionar la matriz y analizar los resultados se utilizó información adicional de las

configuraciones alélicas de otros genotipos relacionados o no a N25.1 para dar mayor confiabilidad al método. Los genotipos utilizados, su origen y la relación con N25.1 se detallan en la Tabla 1.

Para el análisis filogenético se generó una matriz binaria, donde los alelos fueron contados como “1” para presente y “0” para ausente. Las relaciones genéticas entre genotipos se calcularon por el método de similitud genética propuesto por Nei y Li (1979). La matriz de distancias generada se utilizó para construir un dendrograma por medio del coeficiente Dice y el método UPGMA utilizando el software SplitsTree4.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos determinaron que el clon N25.1 del banco de germoplasma de INIA y el obtenido en el 2, tienen la misma configuración alélica que el clon sin identificar del sitio 1. En la Tabla 1 se detalla la configuración alélica de cada uno de los genotipos analizados. Los alelos presentes en el clon N25.1 están resaltados. El resto de los genotipos estudiados comparten algunos alelos con el clon de referencia, pero en ningún caso comparten la totalidad.

Tabla 1. Configuración alélica de los 4 marcadores (FG7cd, D11, FG1cd y FG2cd) en los genotipos analizados en este trabajo. Los números corresponden con el tamaño en pares de bases del alelo presente. Los espacios vacíos indican la ausencia de ese alelo.

| Genotipo | FG7cd | marcador D11 | | | | | | FG1cd | FG2cd | Relación con N25.1 |
|---------------|---------------------|---------------------|--|--|--|-------------|---------------------|-------------------------|---------------------|----------------------|
| Clon Sitio1 | 255 264 272 315 | 203 209 212 | | | | | 229 | 489 501 507 | 398 406 418 424 437 | se sospecha N25.1 |
| N25.1 Sitio 2 | 255 264 272 315 | 203 209 212 | | | | | 229 | 489 501 507 | 398 406 418 424 437 | N25.1 |
| N25.1 INIA | 255 264 272 315 | 203 209 212 | | | | | 229 | 489 501 507 | 398 406 418 424 437 | clon original |
| R14.1 | 255 264 315 328 | 203 212 | | | | | 229 | 489 495 507 | 398 406 418 424 437 | hijo de N25.1 |
| Q75.1 | 255 264 315 328 | 209 215 218 | | | | | 232 489 501 507 | 406 418 | 437 | hijo de N25.1 |
| Q75.3 | 255 264 272 328 | 209 212 215 | | | | | 232 489 501 507 517 | 418 | 437 | hijo de N25.1 |
| Q80.1 | 255 264 272 315 328 | 209 215 | | | | | 232 489 501 507 517 | 398 406 418 424 437 | 437 | hijo de N25.1 |
| N6.3 | 255 264 315 328 | 209 212 215 218 | | | | | 232 489 501 507 517 | 378 418 | 437 442 | sin relación directa |
| O6.6 | 255 264 290 315 | 203 209 212 215 | | | | 226 | 232 489 501 507 517 | 378 406 418 | 437 442 | sin relación directa |
| Agata | 255 264 315 328 | 209 215 | | | | | 232 489 495 501 507 | 378 406 418 | 437 | sin relación directa |
| Guapa | 255 264 290 315 328 | 203 209 215 | | | | | 232 489 501 507 | 378 398 406 418 424 437 | 437 | sin relación directa |
| Yurí | 255 264 272 315 | 209 215 | | | | | 232 489 507 517 | 378 406 418 424 437 | 437 | sin relación directa |
| Camarosa | 255 264 290 315 | 203 209 212 215 | | | | | 232 489 501 507 517 | 378 418 | | presente en pedigree |
| Aromas | 255 264 272 315 | 209 212 215 | | | | 226 229 232 | 489 495 507 517 | 418 424 437 | 437 | presente en pedigree |
| Oso Grande | 255 264 315 | 209 212 215 | | | | | 232 489 501 507 517 | 378 406 418 | 437 | presente en pedigree |
| S. Charlie | 255 264 272 290 | 203 209 212 215 | | | | 226 229 232 | 489 501 507 | 378 406 418 424 437 | 437 | presente en pedigree |
| Addie | 255 264 272 309 | 209 212 215 218 220 | | | | | 232 489 495 507 | 418 437 442 | 442 | presente en pedigree |

El dendrograma resultante del análisis filogenético se observa en la Figura 1A donde se representan las distancias génicas entre los individuos analizados. En este caso los individuos del clon N25.1 y el clon problema (sitio1) se agrupan. El individuo más próximo a este grupo es R14.1 de acuerdo a lo esperado ya que uno de sus parentales es N25.1. Los marcadores moleculares permitieron discriminar los diferentes genotipos, emparentados y no emparentados, observado configuraciones alélicas diferentes entre ellos.

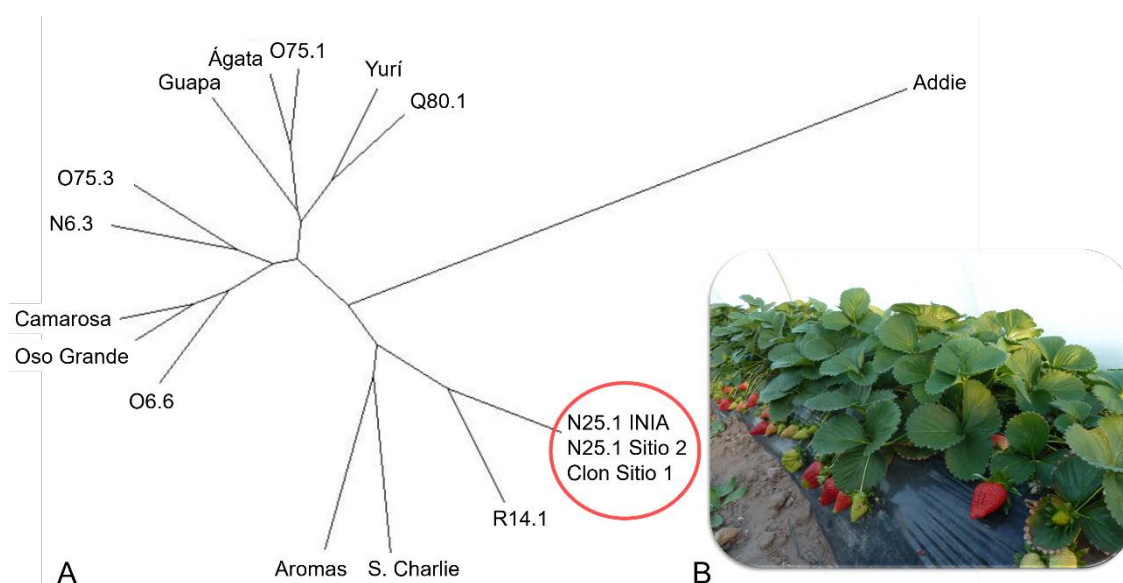


Figura 1. A. Análisis filogenético de los genotipos analizados. B. Planta de N25.1.

En la Figura 1B se pueden apreciar las características de la planta y de la fruta del clon N25.1. El clon se destaca por mostrar tolerancia a diferentes tipos de hongos de corona y raíz, además de excelente calidad de fruta.

Conclusiones

Los marcadores moleculares permitieron discriminar los diferentes genotipos, emparentados y no emparentados.

Se confirmó que el clon problema del sitio 1 corresponde a N25.1 ya que las configuraciones alélicas de los genotipos clon sitio 1, N25.1 sitio 2 y N25.1 INIA son idénticas.

Referencias bibliográficas

Nei, M., Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273.

Goldstein, B. D. y C. Schlotterer C. 1999. *Microsatellites evolution and applications*. Oxford University Press, New York, 352pp.

Vicente, E., Manzioni, A., González, M., Giménez, G., Barros, C., Vassallo, M. 2012. La producción de frutilla en salto: investigación, desarrollo e innovación. *Revista INIA*, diciembre 2012.

Vicente, E., Giménez, G., Manzioni, A., Cabot, M. 2004. Avances del programa de mejoramiento genético de frutilla en Uruguay. *Simpósio nacional de morango*. Pelotas. Palestras, Embrapa Clima Temperado, 38-45.

Arruabarrena A., Salvo M., Giambiasi M., Vicente E., Giménez G., Speranza P. 2016. Caracterización genética preliminar del programa de mejoramiento de frutilla de INIA, Uruguay. *XVI Congreso Latinoamericano de Genética*. Montevideo.