



Estudio de la base genética del carácter nectarina integrando análisis moleculares con genómica en una colección amplia de germoplasma de *Prunus persica* (L. Batsch.)

Soria F.E.*¹, Aballay M.M.*¹, Valentini G.H.¹ y Sánchez G.*¹

*Lab. de Biotecnología, ¹EEA San Pedro, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2930 San Pedro, Argentina.
Contacto: sanchez.gerardo@inta.gov.ar

Introducción

Una de las características comerciales más utilizadas para clasificar el fruto del duraznero ($2n=2x=16$) es la presencia o ausencia de tricomas en su piel, denominándolo durazno o nectarina respectivamente (Figura 1). El carácter durazno/nectarina fue descrito como monogénico (G/g) y se ha asociado la ausencia de tricomas a la inserción de un retrotransposón en el gen candidato *PpeMYB25* (Vendramin et al., 2014). Considerando que el fenotipo durazno es dominante, las nectarinas deberían ser mutantes homocigotas para la inserción. **El objetivo de este trabajo** fue estudiar a nivel molecular el carácter durazno/nectarina en la colección de germoplasma de la EEA San Pedro.

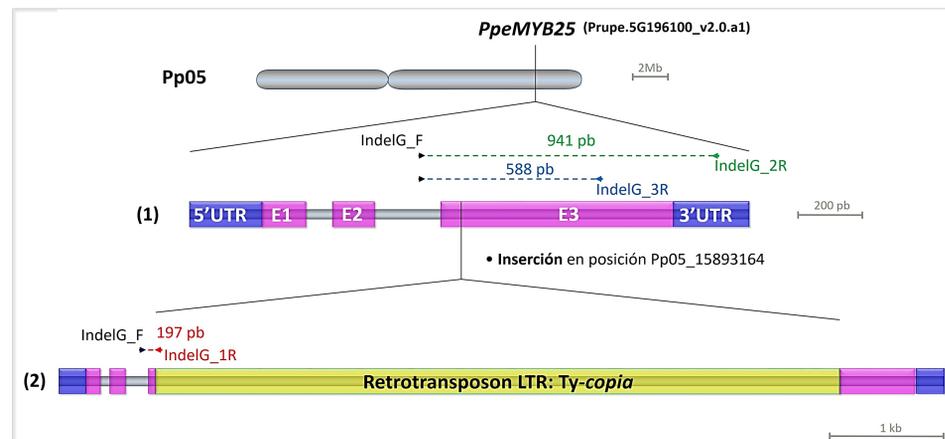
Materiales y Métodos

Caracterización fenotípica de 147 accesiones de duraznero



Análisis molecular

• **Locus G:** descripción de la localización y estructura del gen candidato para el carácter durazno/nectarina. (1) Alelo de referencia de durazno, G, sin la inserción. (2) Alelo alternativo, g.



• **EL análisis del locus G se realizó a través de PCR Multiplex con tres primers.** La caracterización para mayoría las accesiones se realizó a través del **Marcador IndelG**, en PCRs con los primers *IndelG_F*, *IndelG_2R* y *IndelG_1R* diseñados por Vendramin et al. (2014). **Marcador IndelG-Op (IndelG-Optimizado):** debido a dificultades de amplificación, se diseñó el primer el *IndelG_3R* (5'-TACTTATGATATTAACGCCATGC-3') para utilizarlo de manera alternativa al primer *IndelG_2R*, con el fin de optimizar las PCRs al disminuir la diferencia en longitud (peso molecular) de los amplicones esperados. **El ciclo** fue modificado a partir de Vendramin et al. (2014), utilizando una menor temperatura de annealing (de 60 y 54 °C para el marcador *IndelG* e *IndelG-Op*, respectivamente) y un mayor tiempo de extensión (1 min).

Estudio del asociación

• La asociación del locus G con el carácter durazno/nectarina se estudió incluyendo un set de 7169 marcadores identificados por GBS, conformado por:



Conclusiones

- El marcador *IndelG* mostró deficiencia en la amplificación de alelo de referencia para durazno (941 pb) en algunas accesiones, dificultando el genotipado.
- Se desarrolló un marcador diagnóstico alternativo, *IndelG-Op*, que permite una amplificación más eficiente de los alelos. Este marcador se utilizó para determinar el genotipo en aquellos casos donde el genotipado por *IndelG* no se correspondió con el fenotipo.
- Se determinó el genotipo de 147 accesiones de la Colección de germoplasma de la EEA San Pedro para el carácter durazno/nectarina usando una combinación de los marcadores *IndelG* e *IndelG-Op*.
- Se estableció que el locus G es el más asociado al carácter durazno/nectarina en un análisis de GWAS con 7170 marcadores moleculares.
- Los resultados obtenidos se condicen con la base genética propuesta para el carácter durazno/nectarina.

Implicancias de este estudio:

- Selección asistida por marcadores:** posibilidad de predecir los resultados de cruzamientos entre 147 potenciales parentales y determinar de manera temprana el fenotipo en los programas de mejora.
- Futuros desarrollos biotecnológicos:** Evidencia que apoya el rol del gen *PpeMYB25* como responsable de la presencia de tricomas en el fruto del duraznero y que la ausencia de los mismos se debería a la inserción de un elemento retrotrasponible.

Resultados

Análisis molecular del locus G

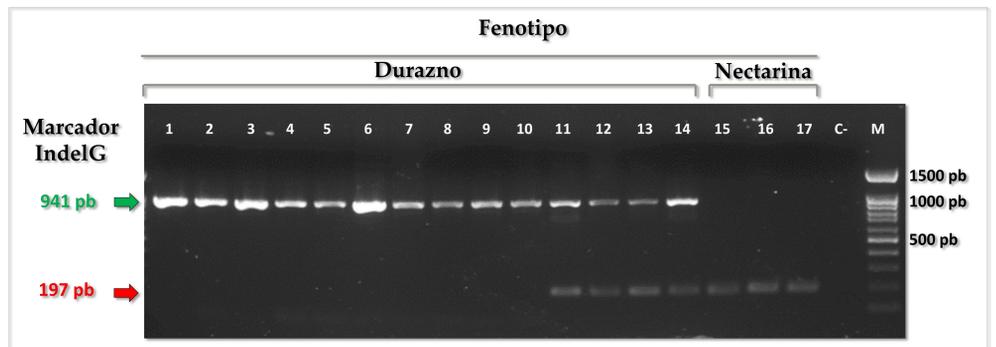


Figura 2. Perfil electroforético en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) de productos de PCR Multiplex con los primers *IndelG_F*, *IndelG_2R* e *IndelG_1R* (marcador *IndelG*). Los amplicones obtenidos permitieron discriminar la presencia (amplicón de 197 pb) o ausencia (amplicón de 941 pb) de la inserción y determinar el genotipo para carácter durazno/nectarina. **Accesiones:** (1) GISb 10-LH2, (2) Forastero, (3) Flordaguard, (4) Red Globe, (5) Flordaking, (6) June Gold, (7) María Blanca, (8) Flavorcrest, (9) Summerset, (10) Sirio, (11) Elegant Lady, (12) Milenio INTA, (13) Vesuvio, (14) DOFI 81315009, (15) María Dorata, (16) DOFI 88412001, (17) Fantasía. C-: control negativo. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

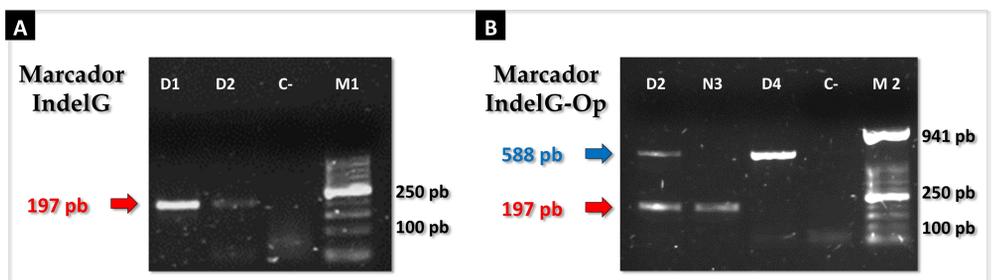


Figura 3. Perfil electroforético en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) de productos de PCR Multiplex para el marcador *IndelG* (A) e *IndelG-Op* (B). A)- En dos accesiones con fenotipo durazno, las PCRs para el marcador *IndelG* sólo amplificaron la banda de 197 pb, a pesar de que se esperaba la banda de 941 pb debido a su fenotipo. B)- Las PCRs Multiplex con los primers correspondientes al marcador *IndelG-Op* permitieron obtener de manera más eficiente los fragmentos de interés, en comparación a la combinación de primers utilizada para el marcador *IndelG*. Esto posiblemente se deba a la menor diferencia de longitud entre los amplicones, la que promueve que la reacción de amplificación se vea igualmente favorecida para uno u otro fragmento. Asimismo, estos fragmentos permitieron determinar la presencia o ausencia de la inserción y, por consiguiente, el genotipo de los durazneros D1 y D2. **Fenotipos:** (D) durazno y (N) nectarina. **Accesiones:** (1) Dur 95 Col Chica, (2) Red Crest, (3) Olympio, (4) Summer Lady. C-: control negativo. M1: marcador de peso molecular de 50 pb. M2: 50 pb + producto de amplificación de 941 pb.

Resumen del Genotipado

Tabla 1. Genotipo de las accesiones analizadas determinado con los marcadores moleculares codominante *IndelG* e *IndelG-Op* para el carácter durazno/nectarina.

Fenotipo	Genotipo			Total
	GG	Gg	gg	
Durazno	85	34	-	119
Nectarina	-	-	28	28

G: alelo de referencia de durazno, sin la inserción
g: alelo alternativo, caracterizado por un amplicón de 197 pb esperado para presencia de la inserción
-: no observado

Estudio de asociación

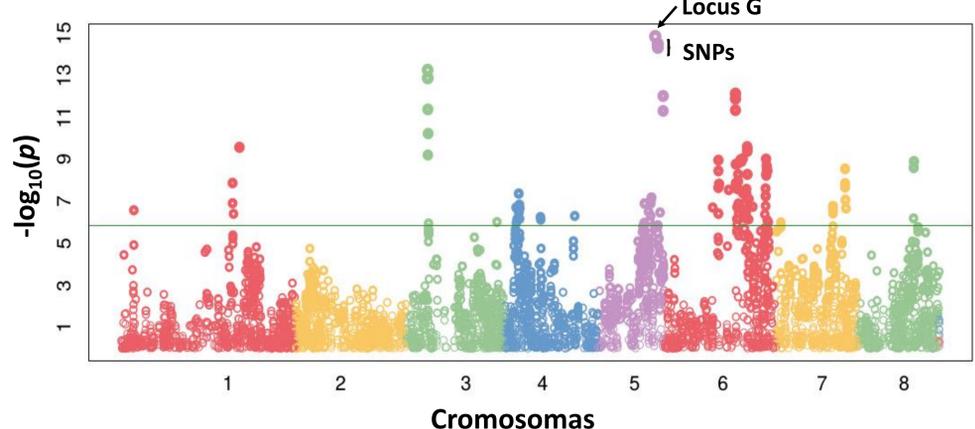


Figura 4. Manhattan plot obtenido a partir del estudio de asociación. Los datos para el locus G (Tabla 1) fueron incluidos en un análisis en conjunto con los datos de un set de marcadores obtenidos previamente a partir de una plataforma basada en ddRAD-seq. Como resultado, se observó que tres marcadores mostraron una mayor asociación al carácter en estudio ($-\log_{10}(p)$), siendo el marcador *Indel* el de mayor valor observado, seguido por dos SNP localizados a 700 kb *upstream*.

Bibliografía

•Vendramin E, Pea G, Dondini L, Pacheco I, Dettori MT, et al. (2014) A Unique Mutation in a MYB Gene Cosegregates with the Nectarine Phenotype in Peach. PLoS ONE 9(3): e90574. doi:10.1371/journal.pone.0090574