

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
VARIEDADES DEL BANCO DE
GERMOPLASMA DE MANZANO DEL
SERIDA**

**PROYECTO FIN DE MASTER
POR
NEREA LLAMERO GARCÍA**

JULIO, 2014





PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Enrique Dapena de la Fuente

CERTIFICA:

Que Dña. Nerea Llamero García ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 8ª promoción curso 2013-2014.

Oviedo, 16 de Julio de 2014

D. Enrique Dapena de la Fuente

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, quiero agradecer al Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario de Asturias (SERIDA), a su Director Gerente Koldo Osoro Otaduy, y a la Jefa del Departamento de Investigación Carmen Díaz Monforte, por el apoyo mostrado y por permitirme desarrollar mis trabajos en sus instalaciones. Al INIA y los fondos FEDER por la financiación económica a los proyectos, RF2011-00017-C05-04 y RFP2012-00022-00-00, en el marco de los cuales se encuadra el desarrollo de este proyecto de Master.

A mi tutor de proyecto: Enrique Dapena de la Fuente, por la oportunidad que me dio para entrar a formar parte de su equipo en el Programa de Investigación de Fruticultura del SERIDA y por todo lo que aprendí, así como el tiempo dedicado a ayudarme a sacar adelante este trabajo. Y a Manuel Rendueles de la Vega, por su ayuda, ánimo y sobre todo paciencia conmigo.

A la Universidad de Oviedo y todos los profesores del Master de Biotecnología Alimentaria, así como a mis compañeros (especialmente los de los dos primeros años) por adaptarse a mis horarios en los trabajos en grupo.

A mis compañeros en el SERIDA: Aitor, Loli, Marcos B., Marcos M., Mercedes, Paulino y todos aquellos sin los que mi estancia en el SERIDA hubiese sido sin duda completamente diferente. A Paula Moreno y a Manuel Blasco por la información facilitada y apoyo en el manejo de programas de análisis de datos.

A mis familiares y amigos, los que están y los que ya no están, por compartir mis alegrías y tristezas. A mis padres: Eduardo y Tere, por el apoyo incondicional y su disposición a ayudarme ante cualquier problema. A mi hermana Aroa, mi cuñado Héctor y el/la próximo/a miembro en mi familia, por su cariño, sus risas y su capacidad para distraerme. Y a mis pitufas por traer la alegría a mi casa y mi familia desde hace 7 años.

Y por último, a Adri, por aparecer en mi vida en el mejor momento y darme tanto cariño, ánimo y fuerza cada día.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
• Importancia del cultivo de manzano, la riqueza varietal y su caracterización	11
✓ <i>El manzano y su origen</i>	11
✓ <i>Producción de sidra</i>	12
• El Banco de Germoplasma de Manzano del SERIDA.	13
✓ <i>Evaluación, selección y mejora de variedades</i>	14
✓ <i>Caracterización morfológica y molecular</i>	14
OBJETIVO DEL TRABAJO	16
ANTECEDENTES SOBRE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	17
• Principales métodos y desarrollo del análisis molecular	17
• Marcadores moleculares en manzano	20
• Empleo de marcadores en el programa de investigación de manzano del SERIDA	20
MATERIAL VEGETAL Y METODOLOGÍA	21
• Material vegetal	21
• Recogida y almacenamiento de las muestras	21
✓ <i>Recogida de muestras</i>	21
✓ <i>Almacenamiento de muestras</i>	21
• Extracción del ADN	23

• Cuantificación del ADN	24
• Amplificación del ADN	24
• Análisis por electroforesis capilar	26
• Métodos de análisis de los datos	26
✓ <i>Análisis de diversidad</i>	26
✓ <i>Análisis de estructura genética</i>	26
RESULTADOS	28
• Identificación de variedades y determinación de sinonimias	28
• Polimorfismo y análisis de diversidad genética	30
• Análisis de estructura poblacional	31
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	34
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

RESUMEN

En Asturias, como consecuencia de la larga tradición en el cultivo de manzano, especialmente de manzano de sidra, se ha generado una gran diversidad varietal de manzano pudiendo considerarse un centro secundario de variación genética. En el SERIDA, se ha establecido un Banco de Germoplasma de Manzano donde se conservan un número importante de variedades locales, fruto de las prospecciones efectuadas en la región, y complementariamente se dispone de una amplia representación de variedades de manzana de sidra y de mesa de diversas procedencias.

A lo largo de los 30 últimos años se han realizado trabajos de investigación sobre evaluación agronómica, tecnológica y calidad del fruto a fin de seleccionar las variedades de mayor interés, así como trabajos de caracterización morfológica. Sin embargo han sido escasos los trabajos de caracterización molecular.

Este trabajo se ha orientado a abordar la caracterización molecular de 247 accesiones del Banco de Germoplasma de Manzano de diversas procedencias y tipos de aprovechamiento mediante la utilización de 14 microsatélites, elegidos a nivel europeo para llevar a cabo el análisis molecular de los recursos fitogenéticos en las colecciones europeas con unas herramientas comunes.

A partir de la comparación de los perfiles alélicos obtenidos de las 247 entradas se encontraron 222 genotipos diferentes y 25 duplicidades o sinonimias.

Se ha podido constatar que los microsatélites utilizados fueron suficientemente polimórficos, resultando algo menor el nivel de polimorfismo del microsatélite Hi02c07 seguido del CH04e05. El número total de alelos determinados en el total de genotipos analizados fue de 215. Los resultados muestran una elevada variabilidad genética de las variedades estudiadas

Mediante el programa informático STRUCTURE ver.2.3.4. y un análisis de componentes principales se han podido diferenciar varias poblaciones de variedades. Se ha podido establecer una clara diferenciación de la mayor parte de las variedades

asturianas de sidra, incluidas las acogidas a la Denominación de Origen Sidra de Asturias, de las de otras procedencias como las extranjeras de mesa.

Por tanto, cabe destacar el elevado interés del análisis molecular mediante microsatélites para lograr un mejor conocimiento de la identidad de variedades, el análisis de la diversidad genética y una mejor gestión de los recursos fitogenéticos del Banco de Germoplasma de Manzano.

ABSTRACT

In Asturias, as consequence of the long tradition of apple growing, especially cider apple has been generated a great varietal diversity of apple, and it could be considered a secondary center of genetic variation. In SERIDA, has been established an Apple Germplasm Bank where an important and representative number of local cultivars are preserved, as a result of the surveys that have been carried out in the Region, and complementary is available a large representation of cider and eat apple cultivars from different origins.

Along the latest 28 years have been made research on agronomical and technological evaluation, and on the fruit quality with the purpose of select the most interesting varieties. Also morphological characterization works were performed. However, few studies of molecular characterization have been made.

This work has been oriented to the molecular characterization of 247 accessions from diverse origins of the Apple Germplasm Bank using 14 microsatellites, selected at European level to carry out the molecular analysis of genetic resources of European collections with common SSRs.

Comparison of the allelic profiles revealed 222 different genotypes and 25 duplicates or synonyms.

The used SSRs were polymorphic, resulting with lower polymorphism level the microsatellite Hi02c07 followed by CH04e05. The total number of alleles was 215 in total of genotypes analysed. The results showed a high genetic variability of the studied varieties.

With the analysis with the STRUCTURE ver.2.3.4. software and the principal component analysis was able to differentiate several populations of varieties. There has

been established a clear differentiation of most Asturian cider apple cultivars, including those that belongs to Protected Designation Origin “Cider of Asturias”, from other backgrounds like foreign table varieties.

Therefore, it can be highlighted the great interest of molecular analysis with microsatellites for the purpose of a better knowledge of varietal identity, of genetic diversity and a better management of plant genetic resources of the Apple Germplasm Bank.

LISTA DE TABLAS

Número	Título	Página
1	Listado de las variedades analizadas	22-23
2	Características de los microsatélites utilizados	25
2	Relación de sinonimias	28
4	Análisis de la diversidad de los microsatélites en 222 variedades	30

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Asignación de 102 accesiones a seis grupos usando el programa STRUCTURE	32
2	Gráfica del análisis de componentes principales (APC) de los dos principales componentes	33

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE MANZANO, LA RIQUEZA VARIETAL Y SU CARACTERIZACIÓN

El manzano y su origen

El manzano (*Malus Domestica*) pertenece a la familia de las *Rosaceae*. Esta familia se divide a su vez en cuatro subfamilias: las *Rosoideae* (con $2n=14$ cromosomas), las *Spiraeoideae* ($2n=18$ cromosomas), las *Prunoideae* ($2n=18$ cromosomas) y las *Maloideae* (con mayor número cromosómico: $2n=34$). El principal ancestro del manzano (*Malus Sieversii*) proviene de regiones de Asia central (Janick et al. 1996; Harris et al. 2002).

El cultivo de la especie se ha ido extendiendo a lo largo de los siglos por Europa, Asia, América y Oceanía, siendo en la actualidad los principales productores Rusia, China, Estados Unidos, Francia, Alemania e Italia.

Debido a su origen y amplia distribución, el manzano presenta una adaptación a distintos climas y suelos, lo que favoreció su cultivo a gran escala y un considerable incremento en su producción, consagrándose como una de las especies frutales de mayor difusión y más importante económicamente a nivel mundial.

Según la información publicada por FAOSTAT, la producción mundial de manzanas entre los años 2008 y 2010 osciló alrededor de 70 millones de toneladas, incrementándose a 76 millones en 2012. En España, la mayor parte de la producción de manzana de mesa se concentra principalmente en Cataluña y Aragón (el 65% de la producción total) siendo Galicia la que ocupa el tercer lugar. A su vez, la producción de manzana de sidra se centra en Asturias y otras regiones de la Cornisa Cantábrica y el norte de Navarra.

En el noroeste de España la especie *Malus sylvestris* es espontánea, mientras que *Malus domestica* debió ser introducida desde muy antiguo, por lo que estas especies se hibridaron pronto y originaron nuevas variedades de manzana de tipo ácido, amargo, etc. y árboles más robustos que los que se cultivaban para obtener frutos de mesa. Sin

embargo, el manzano de sidra, aunque presenta influencias de *Malus sylvestris*, pertenecen como los manzanos de mesa, a la especie *Malus domestica* (Chevallier, 1920 y 1921; Dapena, 1996). Existe gran cantidad de cultivares disponibles como resultado del cultivo de plantas obtenidas mediante polinización abierta, cruces controlados en programas de mejora y aprovechamiento de mutaciones somáticas naturales o inducidas (Guarino et al., 2006).

Producción de sidra

La manzana tiene un gran valor alimenticio y terapéutico, además de la calidad y diversidad de productos que se pueden obtener en la industria transformadora.

En Asturias, la manzana y la sidra son productos de gran tradición, con una Denominación de Origen Protegida “Sidra de Asturias” desde el año 2002 y con una creciente diversificación de productos transformados y mejora de la calidad. Como consecuencia de todo ello muchas variedades de manzana están enfocadas a la producción de manzana de sidra.

Asturias es la principal región española productora de manzana de sidra, con una considerable importancia tanto económica al ser el principal cultivo agrícola, como sociocultural, al constituir la materia prima de un producto emblemático. Además, es la región donde existe una mayor diversidad varietal de manzano, de tal modo que, por sus características, se podría considerar un centro secundario de variación genética (Dapena, 1996; Dapena, et al, 2006).

Desde el Programa de Fruticultura del SERIDA se han realizado investigaciones orientadas a conservar y aprovechar la diversidad varietal existente, así como optimizar el cultivo de manzano en Asturias.

Con el fin de relanzar y mejorar el cultivo de manzano en Asturias, se han puesto en marcha varias iniciativas para poner en valor las pomaradas tradicionales y afrontar la renovación del cultivo, mediante el establecimiento de nuevas plantaciones semi-extensivas en eje, el desarrollo de técnicas sostenibles y de producción ecológica

con variedades seleccionadas de elevada resistencia (Dapena y Blazquez, 1996; Dapena et al., 2002; Dapena et al., 2005;; Dapena et al., 2008).

EL BANCO DE GERMOPLASMA DE MANZANO DEL SERIDA

En los años 50 se abordó desde la Estación Pomológica de la Diputación Provincial de Oviedo una prospección de variedades locales y se estableció una primera colección de variedades, que se enriqueció con variedades procedentes de Logroño, Zaragoza, USA, Dinamarca, Rusia...En 1983 se disponía de 245 entradas.

Posteriormente, en el marco del actual SERIDA, se fueron incorporando más variedades de diversas procedencias, de tal modo que en 1996 el número de entradas que constituía el Banco de Germoplasma de Manzano (establecido como tal a finales de los años 80) era de 373 (Plantación colección BGV).

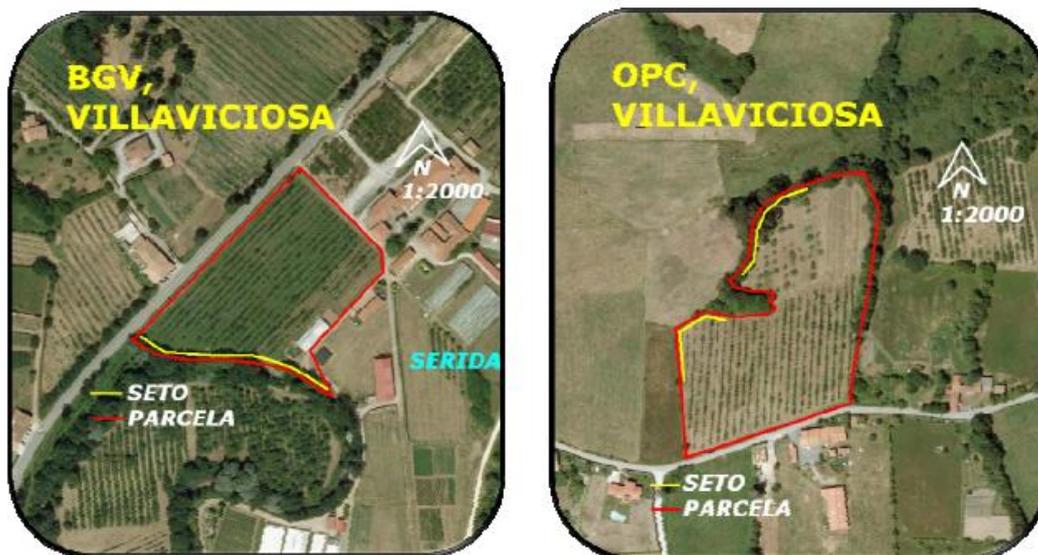


Figura 1: Plantaciones colección BGV y OPC

En el periodo 1995-97 se abordó una importante prospección de variedades, sobre todo en la zona centro oriental de Asturias, donde se puso énfasis en la búsqueda de variedades con elevado contenido en compuestos fenólicos, ya que este tipo de variedades se encontraban representadas insuficientemente en el Banco de Germoplasma. Esta prospección permitió la incorporación de 425 entradas, que se

plantaron en el SERIDA de Villaviciosa (1998-99) y posteriormente en Nava (2002) y Oles-Villaviciosa (2004. Plantación colección OPC) a fin evaluar las variedades en tres ubicaciones diferentes.

Evaluación, selección y mejora de variedades

Los caracteres de mayor interés funcional (agronómicos y tecnológicos) se han evaluado para seleccionar las variedades que presentan las mejores características para el cultivo y la elaboración de sidra y otros productos derivados y, además, para seleccionar variedades para el consumo de mesa (Dapena, 1996; Mangas et al., 1999; Dapena y Blázquez, 2004; Miñarro y Dapena, 2008; Dapena et al, 2009; Arias et al., 2010).

Se han seleccionado 16 variedades de elevado interés agronómico y tecnológico, que junto con otras 6 de interés tecnológico constituyen las 22 variedades utilizadas en la *Denominación de origen protegida (D. O. P) "Sidra de Asturias"*. Y más recientemente, se han preseleccionado 22 variedades y seleccionado tres variedades locales, a partir de las 425 variedades locales incorporadas en 1998-99.

En 1989 se comenzó un programa de mejora genética de las variedades de manzano asturianas de mayor interés, orientado a la obtención de nuevas variedades con elevada resistencia al moteado, pulgón ceniciento y fuego bacteriano. Otra línea de cruzamientos se orientó a la obtención de variedades de producción regular y una tercera a la obtención de variedades amargas de maduración relativamente tardía.

En la actualidad se encuentra en la fase final de selección las obtenciones de los cruzamientos efectuados en el periodo 1990-1994, disponiéndose de materiales de gran interés, tanto por su elevada resistencia, regularidad productiva como por su alto contenido en fenoles.

Caracterización morfológica y molecular

Especialmente, en los últimos 10 años también se ha realizado un importante esfuerzo en la caracterización morfológica de frutos, flores y hojas, así como la

digitalización fotográfica de las accesiones disponible en el Banco de Germoplasma de Manzano (Dapena y Blázquez, 2009).

Por otra parte, también se está trabajando en la caracterización molecular de todas las entradas del Banco de Germoplasma, mediante marcadores moleculares tipo microsatélites (Ruiz, 2002; Pereira-Lorenzo et. al., 2014). Estos trabajos permitirán optimizar el conocimiento y gestión de los recursos genéticos disponibles.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en el marco del programa de investigación de manzano que se lleva a cabo por el Programa de Fruticultura del SERIDA de Villaviciosa y tiene como objetivos fundamentales:

- Caracterizar molecularmente mediante microsatélites de variedades del Banco de Germoplasma de Manzano.
- Analizar la diversidad genética y la estructura poblacional de las variedades analizadas.

ANTECEDENTES SOBRE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

PRINCIPALES MÉTODOS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS MOLECULAR

Los primeros trabajos de caracterización molecular fueron realizados con marcadores isoenzimáticos y aparecen publicados a finales de los 80 (Chevreau & Laurens, 1987, Manganaris & Alston, 1988)

En los últimos 25 años, los trabajos se centran en la utilización de **marcadores moleculares de ADN**, ya que permite una identificación mucho más precisa, eficaz y rápida. Resultan de elevado interés para su utilización en la caracterización e identificación varietal porque no dependen de condiciones externas, ni del momento del ciclo biológico de la planta.

Existen un número ilimitado de marcadores (Ibáñez et al., 2005) y su utilización permite identificar sinonimias y homonimias entre las variedades (Baig et al., 2007), se utilizan en la cartografía genética de caracteres de interés y los avances logrados están permitiendo realizar una mejora genética asistida con marcadores y QTLs ligados a caracteres de interés.

Los primeros marcadores moleculares de ADN utilizados fueron los basados en la digestión del ADN genómico mediante enzimas de restricción, obteniendo así fragmentos de restricción de distintas longitudes, los cuales podemos detectar por hibridación con una sonda de ADN marcada. Dichos marcadores son los llamados **RFLPs** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Sin embargo, se trata de un método lento y laborioso que requiere gran cantidad de ADN de alta calidad y que, con frecuencia, necesita el uso de radioactividad, por lo que no es una técnica fácilmente automatizable (Crespan y Milani, 2000).

En los años 80, aparece una nueva técnica molecular: la **Reacción en Cadena de la Polimerasa**, más conocida por sus siglas en inglés PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Dicha técnica supone un gran avance en la identificación varietal ya que se

trata de un método *in vitro* de síntesis de ADN que permite, a partir de una pequeña cantidad de ADN, obtener en cuestión de horas un gran número de copias de un fragmento específico según un crecimiento exponencial (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

La técnica de la PCR permitió desarrollar nuevos métodos de análisis de marcadores moleculares como RAPDs, AFLPs, SCARs, microsátélites, STSs, etc,

Uno de los métodos es el análisis con **marcadores RAPDs** (*Random Amplified Polymorphic DNA*; Williams et al, 1990, Vidal et al., 1999a, b), los cuales se basan en una amplificación del ADN genómico por PCR usando un único cebador (o primer) aleatorio y corto de generalmente 10 pares de bases. Este cebador permite amplificar de forma aleatoria el genoma de un individuo en las zonas donde hibrida el cebador con el ADN molde en ambas cadenas y en direcciones opuestas. Los fragmentos de ADN generados se separan mediante electroforesis en geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio y se visualizan por exposición a luz ultravioleta.

Aunque es un método rápido y sencillo, el principal inconveniente que presenta esta técnica es la posible dificultad a la hora de interpretar las bases obtenidas, debido que los polimorfismos existentes entre dos muestras se detectan por la presencia/ausencia de bandas, y esto imposibilita la distinción entre individuos heterocigóticos y homocigóticos. Por tanto, esta técnica no se recomendada para la identificación de variedades de bancos internacionales.

El análisis de **AFLPs** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) es una técnica que emplea enzimas de restricción que cortan el ADN genómico. Posteriormente tiene lugar el ligamiento de unas secuencias de nucleótidos, denominadas adaptadores, a los extremos de los fragmentos de restricción generados, y a continuación la PCR usando cebadores que hibridan con los adaptadores. Los productos de la amplificación se separan por electroforesis y se visualizan utilizando un marcaje radioactivo o fluorescencia.

Estos marcadores presentan como ventaja su alta eficacia, por lo que se recomiendan para identificaciones intravarietales y son muy reproducibles entre laboratorios, sin embargo son laboriosos y complejos.

A partir de RFLPs o RAPDs subclonados y secuenciados, se pueden diseñar primers que amplifiquen bandas específicas llamadas **SCAR** (*Sequence-Characterized Amplified Region*; Paran y Michelmore, 1993).

A finales de los 80 (Tautz, 1989) aparecen las primeras referencias a los **SSR** (*Simple Sequence Repeat*), también conocidos como **microsatélites**. Consisten en una pequeña unidad de repetición en tándem de secuencias simples, de 1 a 6 nucleótidos, distribuidas al azar en el genoma de organismos eucariotas, con una alta variación en el número de repeticiones y que están ampliamente distribuidas a través de todo el genoma (You-Chun et al., 2002).

El análisis de microsatélites se realiza mediante la amplificación por PCR de las secuencias microsatélite diana y la posterior lectura de los fragmentos generados en la reacción.

Los microsatélites permiten la identificación de un número elevado de alelos de un único locus. Se caracterizan por ser codominantes, es decir, es posible distinguir los individuos homocigóticos de los heterocigóticos y en algunos casos están conservados en especies afines. El polimorfismo se debe a diferencias en el número de repeticiones de la unidad repetida dentro del microsatélite, que permite obtener un gran número de variantes alélicas.

Otras ventajas son: el requerimiento de pequeñas cantidades de ADN para el análisis y que no es necesario usar el marcaje radiactivo, además de que son muy reproducibles entre laboratorios.

Debido a todas esas razones los **microsatélites** se han convertido en los marcadores genéticos más utilizados en la caracterización molecular de colecciones varietales (Guarino et al., 2006).

MARCADORES MOLECULARES EN MANZANO

A través del desarrollo de proyectos internacionales como el EAGMAP o *European Apple Genome Mapping Project*, iniciado en el año 1989, con el fin de profundizar en el estudio genético de la especie en Europa (King et al, 1991); el proyecto D.A.R.E. (*Durable Apple Resistance in Europe*; Lespinasse et al, 1999), iniciado en 1998 o el HYDRAS, se desarrollan diferentes tipos de marcadores (isoenzimas, RFLP, RAPD, SCAR, AFLP, microsatélites,...) a lo largo de los 17 grupos de ligamiento de la especie (Liebhard et al., 2002) y se elaboran mapas genéticos, donde se localizan genes o QTLs relacionados con mecanismos de resistencia y otros caracteres de interés, lo que también está facilitando la selección asistida con marcadores moleculares.

Se realizan a su vez, estudios basados en el empleo de marcadores de tipo RAPD y SSR para el análisis de variabilidad genética y de identificación de variedades en colecciones locales (Dunemann et al, 1994, Gianfranceschi et al, 1998, Oraguzie et al, 2001, Pereira-Lorenzo et al., 2007), con el fin de conocer la estructura poblacional de las colecciones y llegar a establecer colecciones nucleares.

EMPLEO DE MARCADORES EN EL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN DE MANZANO DEL SERIDA

A finales de 1999 se iniciaron los primeros trabajos relacionados con el uso de marcadores moleculares con objeto de disponer de una nueva herramienta tanto en el programa de mejora genética como en la utilización en la caracterización y gestión de los recursos fitogenéticos del banco de germoplasma de manzano, como complemento de los trabajos de caracterización morfológica, agronómica y tecnológica realizada (Ruiz, 2002; Pereira-Lorenzo et. al., 2014).

MATERIAL VEGETAL Y METODOLOGÍA

MATERIAL VEGETAL

Se procedió a la caracterización molecular de 247 entradas del Banco de Germoplasma de Manzano del SERIDA, anteriores a 1996, de diferentes orígenes y tipos de aprovechamiento que se recogen la Tabla 1.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Recogida de muestras

El material vegetal utilizado para la extracción de ADN son hojas tiernas de manzano (periodo de recolección de abril a junio).

De cada entrada se recogieron muestras de árboles ubicados en dos parcelas diferentes y de cada árbol se recogieron dos o tres muestras diferentes. Este modo de operar resultó factible, porque en el Banco de Germoplasma de Manzano todas las variedades están conservadas en dos parcelas establecidas en ubicaciones diferentes para asegurar mejor su conservación.

La recogida se llevó a cabo colocando tres hojas en la parte superior de un tubo eppendorf de 1,5 mL, de manera que al cerrar la tapa se consiguen cortar tres discos, consiguiendo así una cantidad aproximada de 50 mg de muestra en total.

Los tubos se etiquetan con un código de orden de entrada al que se asocian en un fichero de entrada de muestra todos los datos de identificación de la muestra.

Almacenamiento de muestras

Una vez recogidas las muestras, se almacenaron en congelador a -80°C hasta su posterior procesado o liofilizado en caso de hacer la extracción a partir de muestra liofilizada, o para un almacenado más cómodo ya que las muestras liofilizadas pueden almacenarse a temperatura ambiente, liberando así espacio en el congelador de -80°C .

Tabla 1. Listado de las variedades analizadas

Nombre de la entrada	Nº de pasaporte	Cod. Origen / uso	Nombre de la entrada	Nº de pasaporte	Cod. Origen / uso
Amandi	M0001	1 Asturiana de mesa	Mariñana	M0135	71 Asturiana de sidra
Carrió	M0002	2 Asturiana de mesa	Martina	M0136	72 Asturiana de sidra
Cristalina	M0003	3 Asturiana de sidra	Parda De Carreña	M0138	73 Asturiana de sidra
Chata Blanca	M0004	4 Asturiana de mesa	Pardina	M0139	74 Asturiana de sidra
Chata Encarnada	M0005	5 Asturiana de mesa	Tomate	M0143	75 Asturiana de sidra
Fresnosa	M0006	6 Asturiana de sidra	Arbeya (Mones)	M0144	76 Asturiana de sidra
Loroñesa	M0007	7 Asturiana de sidra	Baturra	M0145	77 Asturiana de sidra
Mingan	M0008	8 Asturiana de mesa	Meana	M0149	78 Asturiana de sidra
Panera	M0009	9 Asturiana de mesa	Obdulina	M0151	79 Asturiana de sidra
Paraguas	M0010	10 Asturiana de mesa	Pachín Torteru	M0152	80 Asturiana de sidra
Reineta Caravia	M0011	11 Asturiana de sidra	Parda Blanquera	M0153	81 Asturiana de sidra
Reineta Encarnada	M0012	12 Asturiana de mesa	Pardona	M0154	82 Asturiana de sidra
Reineta Panera	M0013	13 Asturiana de mesa	Peñaflor	M0155	83 Asturiana de sidra
Reineta Roja	M0014	14 Asturiana de mesa	Pepa	M0156	84 Asturiana de sidra
Carapanón	M0015	15 Asturiana de mesa	Perezosa	M0157	85 Asturiana de sidra
Sola fuente	M0017	16 Asturiana de mesa	Requejina	M0160	86 Asturiana de sidra
Verde Pereda	M0019	17 Asturiana de sidra	Revolvosa	M0161	87 Asturiana de sidra
Villaviciosa	M0020	18 Asturiana de sidra	Rosón	M0162	88 Asturiana de sidra
Arbeya	M0021	19 Asturiana de sidra	Rozona	M0163	89 Asturiana de sidra
Brava	M0025	20 Asturiana de sidra	Valsaina	M0165	90 Asturiana de sidra
Busín	M0026	21 Asturiana de sidra	Blanquina	M0168	91 Asturiana de sidra
Carne Doncella	M0032	22 Asturiana de sidra	Coloradona	M0169	92 Asturiana de sidra
Collaos	M0033	23 Asturiana de sidra	Reineta De San Tirso	M0171	93 Asturiana de sidra
Chapa	M0034	24 Asturiana de mesa	Clara	M0173	94 Asturiana de sidra
De La Pola	M0035	25 Asturiana de mesa	Raxao	M0174	95 Asturiana de sidra
Del Marqués	M0036	26 Asturiana de sidra	Chata Encarnada Mut.	M0195	96 Asturiana de mesa
Dulce Alba	M0037	27 Asturiana de sidra	De La Riega	M0214	97 Asturiana de sidra
Durón Arroes	M0038	28 Asturiana de sidra	Verdialona	M0215	98 Asturiana de sidra
Emiliano	M0039	29 Asturiana de sidra	Durona de Tresali	M0234	99 Asturiana de sidra
Fuentes	M0040	30 Asturiana de sidra	Ernestina	M0235	100 Asturiana de sidra
Loroñe	M0045	31 Asturiana de sidra	Limon Montes	M0236	101 Asturiana de sidra
Manuel Isla	M0046	32 Asturiana de mesa	Regona	M0239	102 Asturiana de sidra
Maria Elena	M0047	33 Asturiana de sidra	Solarina	M0240	103 Asturiana de sidra
Mariano	M0048	34 Asturiana de sidra	Transparente Amarilla	M0018	104 Extranjera de mesa
Miyeres	M0050	35 Asturiana de sidra	Astracan Blanca	M0022	105 Extranjera de mesa
Montes De Prau	M0052	36 Asturiana de sidra	Astracan Roja	M0023	106 Extranjera de mesa
Montoto	M0053	37 Asturiana de sidra	Bella De Pontoise	M0024	107 Extranjera de mesa
Panquerina	M0054	38 Asturiana de sidra	Carla	M0031	108 Extranjera de mesa
Perico	M0056	39 Asturiana de sidra	Golden Delicious	M0041	109 Extranjera de mesa
Pomaron De Benavides	M0057	40 Asturiana de sidra	Gravenstein	M0042	110 Extranjera de mesa
Prieta	M0058	41 Asturiana de sidra	Laxton's Superb	M0044	111 Extranjera de mesa
Prieta Antigua	M0059	42 Asturiana de sidra	Pearmain De Invierno	M0055	112 Extranjera de mesa
Princesa De Asturias	M0060	43 Asturiana de mesa	Reina De Reinetas A ??	M0062	113 Extranjera de mesa
Raxao Antigua	M0061	44 Asturiana de sidra	Reineta Bauman	M0063	114 Extranjera de mesa
Reineta De Pravia	M0066	45 Asturiana de mesa	R. Blanca del Canadá	M0064	115 Extranjera de mesa
Reineta Parraguesa	M0068	46 Asturiana de sidra	Winter Banana	M0083	116 Extranjera de mesa
Reineta Verde	M0069	47 Asturiana de mesa	Annurca	M0085	117 Extranjera de mesa
Repinaldo De Caravia	M0070	48 Asturiana de mesa	Black Ben	M0087	118 Extranjera de mesa
Repinaldo De Hueso	M0071	49 Asturiana de sidra	Calvilla De Dantzing	M0088	119 Extranjera de mesa
Repinaldo Picón	M0072	50 Asturiana de sidra	Calvilla Lesans	M0089	120 Extranjera de mesa
Repinaldo Picon B	M0073	51 Asturiana de sidra	Campanino	M0090	121 Extranjera de mesa
San Juan	M0074	52 Asturiana de mesa	Carpandola Real	M0095	122 Extranjera de mesa
San Roqueña	M0075	53 Asturiana de sidra	Cellini	M0096	123 Extranjera de mesa
Sombrerín	M0076	54 Asturiana de sidra	Del Comercio	M0098	124 Extranjera de mesa
Sucu	M0077	55 Asturiana de sidra	Eduardo Vii	M0099	125 Extranjera de mesa
Tartalla	M0078	56 Asturiana de mesa	Jonathan	M0104	126 Extranjera de mesa
Teórica	M0079	57 Asturiana de sidra	Korobovka	M0105	127 Extranjera de mesa
Vega	M0081	58 Asturiana de sidra	Lord Suffield	M0106	128 Extranjera de mesa
Verdosa	M0082	59 Asturiana de sidra	Mc'intosch	M0110	129 Extranjera de mesa
Xuanina	M0084	60 Asturiana de sidra	Peasgood Sans Parielle	M0114	130 Extranjera de mesa
Bedriñana	M0086	61 Asturiana de sidra	Red Victoria	M0116	131 Extranjera de mesa
Infiesto	M0103	62 Asturiana de mesa	Reineta Ananas	M0117	132 Extranjera de mesa
Manolo Rios	M0107	63 Asturiana de mesa	Reineta De Mans	M0121	133 Extranjera de mesa
Obispo	M0112	64 Asturiana de mesa	Reineta Gris De Canadá	M0122	134 Extranjera de mesa
Rayada	M0115	65 Asturiana de sidra	Northern Spy ?	M0137	135 Extranjera de mesa
Reineta Blanca	M0118	66 Asturiana de mesa	Belleza De Roma	M0146	136 Extranjera de mesa
Reineta Pinta	M0123	67 Asturiana de mesa	Galia Beauty	M0148	137 Extranjera de mesa
Repinaldo De Gozon	M0124	68 Asturiana de mesa	N.W.Greening	M0150	138 Extranjera de mesa
Campillo	M0129	69 Asturiana de sidra	Scarlet Staymanred	M0164	139 Extranjera de mesa
Durón Encarnado	M0132	70 Asturiana de sidra	Winesap	M0167	140 Extranjera de mesa

Tabla 1. Listado de las variedades analizadas (continuación)

Nombre de la entrada	Nº de pasaporte	Cod. ORIGEN / USO	Nombre de la entrada	Nº de pasaporte	Cod. Origen / uso
Filippa	M0177	141 Extranjera de mesa	Aranguren	M0268	195 Vasca de sidra
Hillevie	M0179	142 Extranjera de mesa	Azpuru Garratza	M0269	196 Vasca de sidra
Ingrid Marie	M0180	143 Extranjera de mesa	Azpuru Sagarra	M0270	197 Vasca de sidra
Taac Boord	M0181	144 Extranjera de mesa	Berandu Erreineta	M0271	198 Vasca de sidra
Antonovka	M0182	145 Extranjera de mesa	Billafrankie	M0272	199 Vasca de sidra
Osenñellé Polosatolle	M0185	146 Extranjera de mesa	Burgo Sagarra	M0273	200 Vasca de sidra
Pepin Shafrannyi	M0187	147 Extranjera de mesa	Dominixe	M0274	201 Vasca de sidra
Suislepcoe	M0188	148 Extranjera de mesa	Enpan Sagarra	M0275	202 Vasca de sidra
Brandley's Seedling	M0190	149 Extranjera de mesa	Gaza Zuri	M0276	203 Vasca de sidra
Rusa Oscura	M0192	150 Extranjera de mesa	Gazia	M0277	204 Vasca de sidra
Cortland	M0194	151 Extranjera de sidra	Gorri Txikia	M0278	205 Vasca de sidra
Empire	M0196	152 Extranjera de mesa	Ibarra Sagarra	M0279	206 Vasca de sidra
Granny Smith	M0198	153 Extranjera de mesa	Limoi	M0280	207 Vasca de sidra
Idared A ??	M0199	154 Extranjera de mesa	Santa Ana	M0284	208 Vasca de sidra
Melrose	M0200	155 Extranjera de mesa	Txarba	M0285	209 Vasca de sidra
Nacional	M0201	156 Extranjera de mesa	Txotixe Sagarra	M0287	210 Vasca de sidra
Brown Snout	M0204	157 Extranjera de sidra	Zuri Txixixe	M0289	211 Vasca de sidra
Chisel Jersey	M0205	158 Extranjera de sidra	Aia	M0290	212 Vasca de sidra
Guillevic	M0206	159 Extranjera de sidra	Aritza	M0291	213 Vasca de sidra
Harri Masters' Jersey	M0207	160 Extranjera de sidra	Berrondo	M0292	214 Vasca de sidra
Michelin	M0209	161 Extranjera de sidra	Bizkai	M0293	215 Vasca de sidra
Florina (Querina)	M0216	162 Extranjera de mesa	Bostkantoi	M0294	216 Vasca de sidra
Prima	M0217	163 Extranjera de mesa	Buztin	M0295	217 Vasca de sidra
Gala	M0220	164 Extranjera de mesa	Frances	M0296	218 Vasca de sidra
Jonagold	M0222	165 Extranjera de mesa	Gaziloka	M0297	219 Vasca de sidra
Mutsu	M0223	166 Extranjera de sidra	Geza Miña	M0298	220 Vasca de sidra
Spartan	M0224	167 Extranjera de mesa	Manntoni	M0299	221 Vasca de sidra
Bountiful	M0225	168 Extranjera de mesa	Maximela	M0300	222 Vasca de sidra
Fiesta	M0226	169 Extranjera de mesa	San Pedro	M0016	Asturiana de mesa
Greensleeves	M0227	170 Extranjera de mesa	Jacques Level? / Tartalla	M0043	Extranjera de mesa
Jester	M0228	171 Extranjera de mesa	R. Blanca del Canada (Reineta Francia)	M0065	Extranjera de mesa
Jupiter	M0229	172 Extranjera de mesa	Em42	M0067	Extranjera de mesa
Calvilla Blanca Invierno	M0028	173 Nordeste de mesa	Camuesa De Daroca	M0093	Nordeste de mesa
Calvilla Roja de Invierno	M0029	174 Nordeste de mesa	Cons Pender Plat	M0097	Extranjera de mesa
Camuesa Fina	M0030	175 Nordeste de mesa	Flamenche	M0100	Extranjera de mesa
Melera	M0049	176 Nordeste de mesa	Ontario	M0113	Extranjera de mesa
Moceta	M0051	177 Nordeste de mesa	Llagar	M0134	Asturiana de sidra
Triunfo De Exposicion	M0080	178 Nordeste de mesa	Reineta Panera (Fernal)	M0158	Asturiana de mesa
Camuesa Castellana	M0091	179 Nordeste de mesa	Nuestra Señora	M0170	Asturiana de mesa
Camuesa De Ademuz	M0092	180 Nordeste de mesa	Valiente El Nietu	M0172	Asturiana de mesa
Camuesa De Verano	M0094	181 Nordeste de mesa	Barnes	M0176	Extranjera de mesa
Helada De Jiloca	M0101	182 Nordeste de mesa	Guldborg	M0178	Extranjera de mesa
Helada De Los Abruzos	M0102	183 Nordeste de mesa	Belflor Quitaica Nº 201	M0183	Extranjera de mesa
Manyaga	M0109	184 Nordeste de mesa	Papirovca	M0186	Extranjera de mesa
Reineta De Madera	M0120	185 Nordeste de mesa	Espieriega	M0191	Nordeste de mesa
Romero Blanco	M0125	186 Nordeste de mesa	Vostok	M0193	Extranjera de mesa
La Paz	M0133	187 Nordeste de mesa	Golden Auvil Spur	M0197	Extranjera de mesa
Aurora	M0189	188 Nordeste de mesa	Marie Menard	M0208	Extranjera de sidra
Reineta Segarri	M0203	189 Vasca de sidra	Gloster 69	M0221	Extranjera de mesa
Goikoetxa	M0241	190 Vasca de sidra	Puntalina	M0238	Asturiana de sidra
Patzolua	M0242	191 Vasca de sidra	Oni Sarratua	M0281	Vasca de sidra
Ami Sagarra	M0265	192 Vasca de sidra	Sagar Gorria	M0283	Vasca de sidra
Andoain	M0266	193 Vasca de sidra	Txistu Sagarra	M0286	Vasca de sidra
Altza	M0267	194 Vasca de sidra			

Cod.: código obtenido en el análisis efectuado con el programa STRUCTURE ver. 2.3.4.

EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción se realizó según el método de extracción con CTAB (Doyle & Doyle, 1987), parcialmente modificado.

Una vez extraído el ADN, se almacenaron para su conservación en una cámara de congelación o congelador a -20°C.

CUANTIFICACIÓN DEL ADN

La cuantificación del ADN se hizo mediante electroforesis con geles de agarosa al 0.8%, usando un marcador λ -DNA con concentraciones de 150 y 250 μ l y más recientemente se cuantificaron con el equipo Nanodrop.

AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Una vez que tenemos el ADN en concentraciones deseadas, realizamos la amplificación de la secuencia mediante PCR en un termociclador MJ Research Inc. PTC-200 guiándonos en parte por el protocolo para PCR múltiple (Evans et al., 2009), modificado parcialmente.

Para la PCR, se utilizaron 14 pares de cebadores de microsatélites (CH01f03b, CH01h01, CH01h10, CH02c09, CH02c11, CH02d08, CH03d07, CH04c07, CH01f02, CH04e05, CH05f06, GD12, GD147 y Hi02c07) de secuencias conocidas (Liebhard *et al.*, 2002), que han sido propuestos y aceptados en el seno del ECP/GR Grupo *Malus - Pyrus* del IPGRI (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, más conocido por sus siglas en inglés, actualmente BIODIVERSITY), para su utilización de modo preferente en la caracterización de las colecciones de la red europea de recursos fitogenéticos de manzano (Evans et al., 2009) y poder comparar los resultados obtenidos en diferentes colecciones.

Se utilizaron cuatro PCR múltiples con los siguientes cebadores:

- PCR 1: CH01h01, CH04c07, CH01h10 y Hi02c07
- PCR 2: CH004e05, CH02c11, CH02d08 y CH02c09
- PCR 3: CH05f06, CH01f03b, CH01f02

- PCR 4: GD147, GD12, CH03d07

Para la detección de los fragmentos amplificados, a un cebador de cada pareja se le incorporó una molécula de fluorocromo de: 6-FAM, VIC, NED y PET, que fluorescen en azul, verde, amarillo y rojo, respectivamente. El marcaje de cada pareja de cebadores se hizo de tal manera que no se solapasen los rangos de tamaño de los fragmentos microsatélite amplificados que empleaban el mismo fluorocromo, con el fin de cargar los 14 microsatélites de cada muestra en un mismo capilar (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los microsatélites utilizados.

Marcador	GL	Secuencia	Fluorocromo
CH04c07	14	3' GGCCTTCCATGTCTCAGAAG* 5' CCTCATGCCCTCCACTAACA	6-FAM
CH01h10	8	3' TGCAAAGATAGGTAGATATATGCC A* 5' AGGAGGGATTGTTTGTGCAC	VIC
CH01h01	17	3' GAAAGACTTGCAGTGGGAGC* 5' GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	NED
Hi02c07	1	3' AGAGCTACGGGATCCAAAT* 5' GTTTAAGCATCCCGATTGAAAGG	PET
CH04e05	7	3' AGGCTAACAGAAATGTGGTTG * 5' ATGGCTCCTATTGCCATCAT	6-FAM
CH02d08	11	3' TCCAAAATGGCGTACCTCTC* 5' GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	VIC
CH02c11	10	3' TGAAGGCAATCACTCTGTGC* 5' TTCCGAGAATCCTCTTCGAC	NED
CH02c09	15	3' TTATGTACCAACTTTGCTAACCTC* 5' AGAAGCAGCAGAGGAGGATG	PET
CH05f06	5	3' TTAGATCCGGTCACTCTCCACT* 5' TGGAGGAAGACGAAGAAGAAAAG	NED
CH01f03b	9	3' GAGAAGCAAATGCAAAACCC* 5' CTCCCCGGCTCCTATTCTAC	VIC
CH01f02	12	3' ACCACATTAGAGCAGTTGAGG* 5' CTGGTTTGTTCCTCCAGC	PET
GD147	13	3' TCCCGCCATTTCTCTGC* 5' GTTTAAACCGCTGCTGCTGAAC	6-FAM
GD12	3	3' TTGAGGTGTTTCTCCCATTGGA* 5' CTAACGAAGCCGCATTTCTTT	NED
CH03d07	6	3' CAAATCAATGCAAAACTGTCA* 5' GGCTTCTGGCCATGATTTTA	PET

* indica el cebador marcado con fluorocromo; GL: Grupo de Ligamento

ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS CAPILAR

Una vez comprobado que la PCR fue satisfactoria, realizando una electroforesis con agarosa al 3%, diluimos el producto de amplificación de la PCR. Los productos de amplificación se analizaron en un equipo de electroforesis capilar ABI PRISM 3130XL en la Unidad de Secuenciación del ADN de los Servicios Externos de Investigación de la Universidad de Oviedo, y el patrón interno usado para asignar los tamaños de los distintos fragmentos de ADN fue el GENESCAN3130 LIZ.

Análisis de los electroforegramas

Los resultados del análisis se visualizaron con el programa informático GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems), a fin de determinar los alelos para cada microsatélite y cada entrada.

Todas las entradas fueron analizadas por duplicado, utilizando ADN extraído de muestras recogidas en las dos ubicaciones diferentes, por tanto, en aquellos casos en que la combinación alélica de las dos muestras analizadas de cada accesión no era coincidente, se volvieron a repetir los análisis a fin de verificar los resultados obtenidos y evitar posibles errores en el proceso de análisis.

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS DATOS

Análisis de diversidad

El número de alelos por locus, el número de alelos efectivo, la heterocigosidad observada y esperada, y el índice de información de Shannon fueron analizados con el programa informático GENALEX 6 (Peakall y Smouse, 2006).

Análisis de la estructura genética

Para conocer la estructura genética de las accesiones analizadas se utilizó el programa STRUCTURE ver. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). El análisis fue llevado a cabo usando un periodo burning de 10000 interacciones. Una serie continua de K fueron

testadas, desde 1 a 12, en 20 turnos independientes. Se calculó la K más informativa usando el test de Evanno (Evanno et al., 2005). La estructura de la población fue inferida para $K=6$ usando 100.000 interacciones.

Complementariamente, para efectuar un análisis de las relaciones genéticas entre las entradas caracterizadas, se efectuó un análisis de componentes principales (APC) con el programa informático GENALEX 6, a partir de los datos genéticos, previa obtención de una matriz de distancias genéticas.

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN DE VARIEDADES Y DETERMINACIÓN DE SINONIMIAS

Mediante la comparación de los perfiles alélicos obtenidos con los 14 microsatélites se detectaron 23 grupos de genotipos que presentaban el mismo perfil. El tamaño de estos grupos fue de dos genotipos, excepto en dos casos, en que fue de tres genotipos.

En la tabla 3 se muestran las sinonimias determinadas. Alguna de las duplicidades era ya conocida, en base a la información de caracterización morfológica disponible, pero también se encontraron algunas sinonimias no conocidas previamente.

Las posibles sinonimias detectadas se corroboraron con los datos de caracterización morfológica.

Tabla 3. Relación de sinonimias

Variedad	Sinonimias	
Antonovka	Belflor Quitaica nº201	
Astracán Blanca	Papirovca	
Astracán Roja	San Pedro	
Calvilla Lesans	Ontario	
Camuesa Castellana	Camuesa de Daroca	
Chisel Jersey	Marie Menard	
Cortland	Gloster 69	
Durona de Tresali	Puntalina	
Flippa	Guldborg	
Golden Delicious	Golden Auvil Spur	
Gorri Txikia	Oni Sarratua	
Manolo Ríos	Valiente el Nietu	
Princesa de Asturias	EM42	
Raxao Antigua	Llagar	
Reineta Blanca del Canadá	Reineta Blanca del Canada (Reineta Francia)	
Reineta de Madera	Nuestra Señora	
Reineta Gris de Canadá	Esperiega	
Reineta Panera	Fernal	
Revoltosa	Sagar Gorria	Txistu Sagarra
Scarlet Staymanred	Vostok	
Tartalla	Jacques Level	
Transparente Amarilla	Cons Pender Plat	Flamenche
Verdialona	Barnes	

El total de genotipos sin duplicidades fueron 199, se retiraron 25 de las entradas repetidas para el resto de análisis efectuados, de tal modo que se utilizaron 222 entradas con genotipo diferente, entre las cuales encontramos 27 genotipos triploides (12,2%).

Para el resto de análisis efectuados, en el caso de las variedades triploides, se han utilizado dos alelos para poder analizarlos conjuntamente con el resto de individuos diploides.

POLIMORFISMOS Y ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

Los 14 microsatélites utilizados presentaron polimorfismo con las 222 variedades analizadas. Solamente un microsatélite amplificó en dos loci diferentes, el microsatélite CH02c11, de los cuales, uno no mostró polimorfismo, mientras que el otro loci presentó un alto nivel de polimorfismo (CH02c11b), siendo el que se ha utilizado.

Según se puede observar en la tabla 4, el número total de alelos detectados para el conjunto de accesiones y microsatélites fue de 215, el número de alelos por loci varió de 9 (Hi02c07) a 25 (CH01f02); el índice de Shannon varió de 1,290 (Hi02c07) a 2,363 (CH01f02), con un valor promedio de 1,945; la heterocigosidad observada varió de 0,554 (Hi02c07) a 0,896 (CH02c11b), con un valor promedio de 0,796; la heterocigosidad esperada varió de 0,576 (Hi02c07) a 0,874 (CH01f02), con un valor promedio de 0,801. Todos los microsatélites estudiados resultaron suficientemente polimórficos, resultando el menos polimórfico el microsatélite Hi02c07, seguido del CH04e05.

Tabla 4. Análisis de la diversidad de los microsatélites analizados en 222 variedades

SSR	N	Rango de tamaño	Na	Ne	I	Ho	He
Ch01f02	222	159-217	25	7,935	2,363	0,802	0,874
Ch01f03b	222	138-183	14	5,104	1,819	0,851	0,804
Ch01h01	222	103-140	18	5,670	1,991	0,793	0,824
Ch01h10	222	90-133	12	4,035	1,628	0,829	0,752
Ch02c09	222	233-257	11	6,996	2,109	0,847	0,857
Ch02c11b	222	207-245	15	7,638	2,233	0,896	0,869
Ch02d08	222	207-257	18	6,256	2,055	0,856	0,840
Ch03d07	222	168-230	20	6,983	2,281	0,874	0,857
Ch04c07	222	95-140	17	7,521	2,199	0,869	0,867
Ch04e05	222	175-226	17	3,397	1,639	0,658	0,706
Ch05f06	222	164-190	12	6,436	2,042	0,788	0,845
GD12	222	138-190	12	3,812	1,638	0,730	0,738
GD147	222	125-158	15	5,305	1,938	0,793	0,812
Hi02c07	222	107-151	9	2,361	1,290	0,554	0,576
Promedio			15,36	5,675	1,945	0,796	0,801
Total alelos			215				

Na: número de alelos; Ne: número de alelos efectivo; I: índice de información de Shannon;

Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL

Mediante el programa informático STRUCTURE ver.2.3.4. se analizó la información genética obtenida con las 222 accesiones. Con la utilización del test de Evanno (Evanno et al, 2005) se determinó que el número más informativo de poblaciones (K) era 6. El programa informático Structure utiliza una aproximación “bayesiana” de agrupamiento para hacer una asignación de individuos a poblaciones en base a los datos genotípicos.

La inferida estructura de población para $K = 6$ y 100.000 interacciones se muestra en la figura 1. Un 81,1 % de las accesiones tienen un coeficiente de pertenencia (q_i) a una de las seis poblaciones superior a 0,8 ($q_i \leq 0,8$).

Según la procedencia de las entradas analizadas vemos que la mayor parte de las variedades extranjeras de mesa se agrupan en una de las poblaciones establecidas por el programa con predominio de la coloración verde (G1), este agrupamiento también incluye alguna variedad considerada inicialmente asturiana de mesa, como ‘Carapanón’.

La mayor parte de las variedades asturianas de sidra, incluidas las variedades acogidas a la Denominación de Origen Sidra de Asturias, se agrupan en la franja con predominio de coloración amarilla (G3). Una parte de las variedades vascas se localizan en el G4 con predominio de coloración amarilla, aunque también aparece en este grupo alguna variedad asturiana de sidra. En los grupos G2, G5 y G6 hay mezcla de variedades de diferentes procedencias.

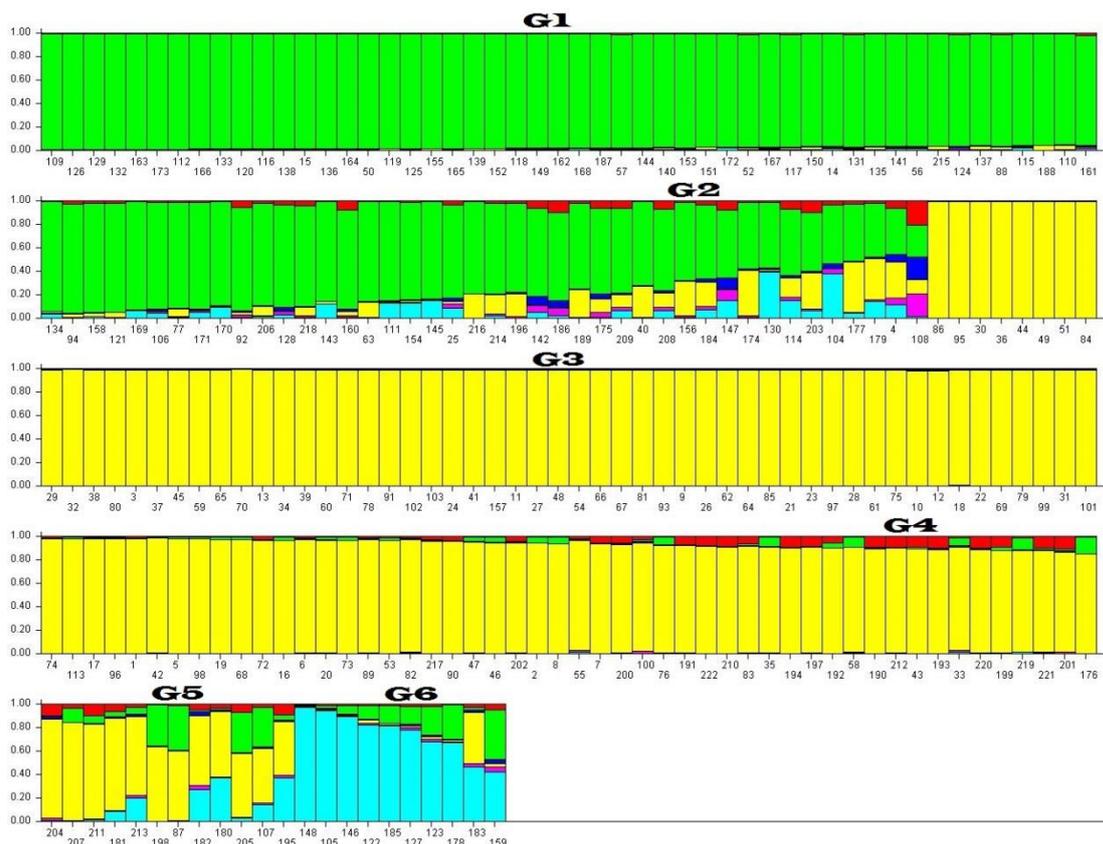


Figura 1. Asignación de 102 accesiones a seis grupos usando el programa STRUCTURE.ver.2.3.4. El eje Y muestra el coeficiente de pertenencia estimado (q_i) de cada individuo a un determinado grupo, los cuales están posicionados en segmentos coloreados (verde, Grupo 1 (G1) extranjeras; amarillo, Grupo 3 (G3) asturianas de sidra; azul, con presencia de variedades extranjeras provenientes de Rusia, variedades del nordeste de España y alguna variedad extranjera de sidra; amarillo y rojo, Grupo 4 (G4) con predominio de variedades vascas; mezcla de colores amarillo, verde y azul, Grupo 5 (G5) con variedades vascas; mezcla de colores verde, amarillo y azul, Grupo 2 (G2) incluye variedades del nordeste y vascas

De modo complementario, mediante el programa GENALEX 6 se ha realizado un análisis de componentes principales (APC) a partir de la matriz de distancias genéticas.

En el gráfico de la figura 2 se representan las accesiones distribuidas en función de los ejes 1 y 2, más informativos del análisis de componentes principales. Se han establecido tres agrupamientos de variedades, uno constituido por la mayor parte de las variedades asturianas de manzana de sidra, otro que incluye la mayor parte de las

variedades extranjeras de mesa y alguna variedad asturiana de mesa y del nordeste de España y un tercer grupo de variedades constituido principalmente por variedades vascas y algunas variedades del nordeste.

Estos resultados son altamente coincidentes con la estructuración de las poblaciones obtenida con el programa STRUCTURE ver.2.3.4.

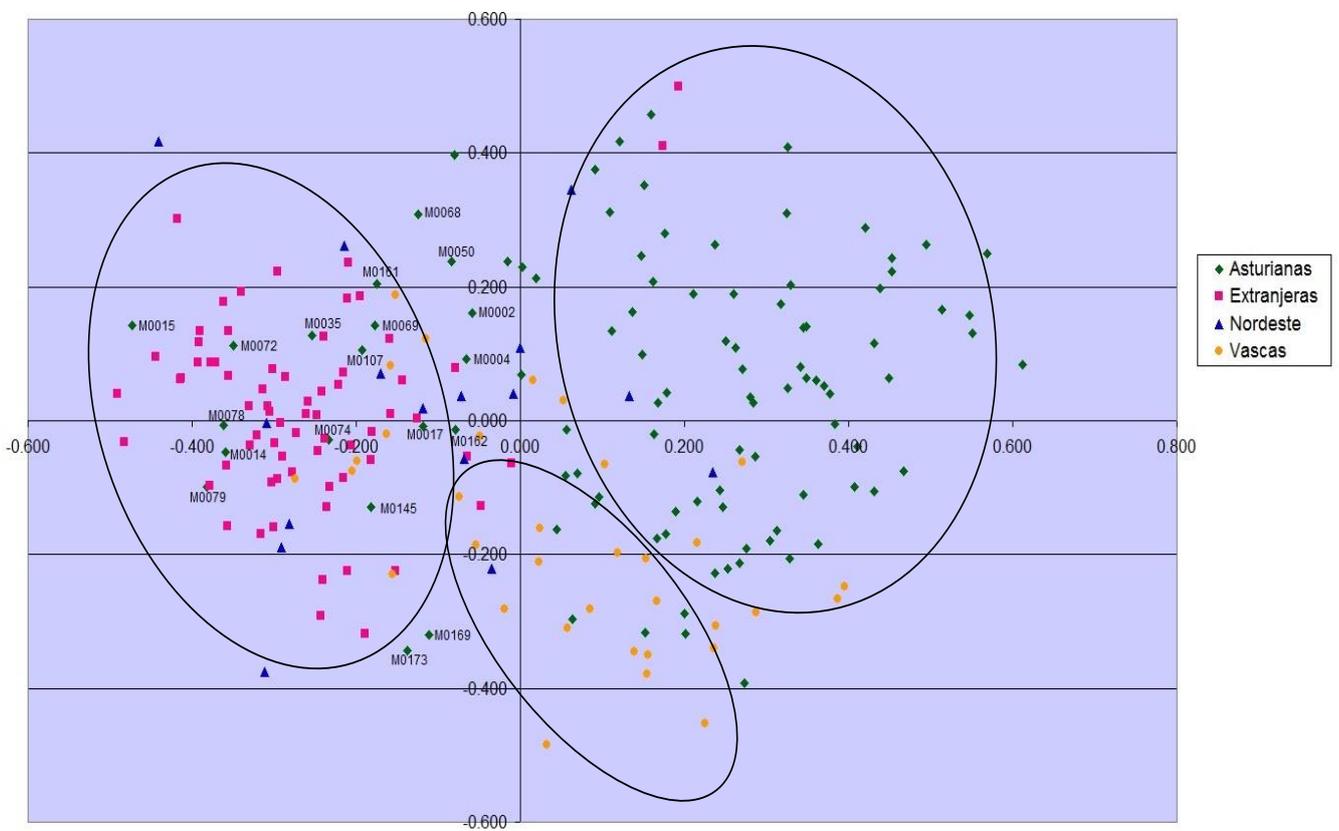


Figura 2. Gráfico del análisis de componentes principales (APC) de los dos principales componentes obtenidos

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En primer lugar, es necesario realizar algunas consideraciones respecto a las duplicidades o posibles sinonimias detectadas.

En algunos casos, estas duplicidades se deben a que algunas accesiones fueron incorporadas a las colecciones con dos nombres diferentes, por ejemplo las entradas ‘Durona de Tresali’ procedente del concejo de Nava y ‘Puntalina’ procedente del concejo de Villaviciosa; ‘Gorri Txikia’ y ‘Oni Sarratua’, provenientes de las Estación de Fruticultura de Zalla (Vizcaya).

En otros casos, podría deberse a errores producidos en el momento del injertado del material vegetal, al realizar la renovación de las parcelas de conservación. Sería el caso de ‘Chisel Jersey’ y ‘Marie Menard’ o ‘Reineta Gris de Canadá’ y ‘Esperiega’.

En otros casos habrá que contrastar con otros Bancos de Germoplasma de Manzano, que disponen también de algunas de las variedades extranjeras o del nordeste de España la identidad de dichas variedades y poder confirmar que son realmente sinonimias y no la consecuencia de errores en los procesos de multiplicación.

También hay que referirse a la idoneidad de los microsatélites utilizados, al estar presentes en 14 de los 17 grupos de ligamiento cromosómicos del manzano y presentar un elevado nivel de polimorfismo.

Por otra parte, los resultados obtenidos muestran la presencia de una elevada variabilidad genética en el conjunto de variedades analizadas.

Los análisis relacionados con la estructura poblacional nos han permitido diferenciar claramente la mayor parte de las variedades asturianas de manzana de sidra del resto de variedades estudiadas y una mayor proximidad de algunas de las variedades vascas con las variedades asturianas de sidra.

Se ha podido diferenciar y agrupar molecularmente la mayor parte de las variedades extranjeras de mesa. Se ha podido determinar que algunas variedades asturianas de manzana de mesa, como ‘Carapanón’ y ‘Mingán’, están muy emparentadas con las variedades extranjeras de mesa, así mismo ocurre con algunas de las variedades del nordeste de España.

Será necesario completar y profundizar en los análisis de datos realizados, considerando además el resto de la información alélica de las variedades de tipo triploide no utilizada en los análisis ahora efectuados.

El presente trabajo confirma la utilidad de los microsatélites en la determinación de la identidad varietal, en el análisis de la diversidad genética y en el conocimiento de la estructura poblacional de las variedades del Banco de Germoplasma de Manzano, lo que permitirá optimizar su gestión y aprovechamiento.

CONCLUSIONES

- Entre las 247 accesiones analizadas se han encontrado 222 genotipos diferentes y 25 duplicidades. Entre estas posibles sinonimias, algunas ya eran conocidas como consecuencia de los trabajos de caracterización morfológica, pero otras no habían sido previamente detectadas.
- Se ha podido constatar que la parte de los microsatélites utilizados resultaron muy polimórficos, si bien dos de ellos, los microsatélites Hi02c07 y CH04e05, presentaron un menor nivel de polimorfismo, en especial el primero.
- El número total de alelos determinados en el total de genotipos analizados fue de 215.
- Las variedades estudiadas presentaron una alta variabilidad genética.
- Se logró conocer la estructura poblacional de las variedades estudiadas mediante el análisis de la información genotípica con el programa STRUCTURE ver.2.3.4. La información obtenida se constató mediante la obtenida con la realización de un análisis de componentes principales, si bien será necesario profundizar en esta materia.
- Los resultados muestran una elevada variabilidad genética de las variedades asturianas y nos permitieron diferenciarlas claramente del resto de variedades analizadas, si bien se encontró una mayor proximidad con las variedades vascas, mientras que algunas variedades asturianas de mesa presentaron una mayor proximidad genética con variedades extranjeras y del nordeste de mesa.
- Cabe destacar la importancia de los resultados alcanzados en el mejor conocimiento de la identidad varietal, de la diversidad genética y la estructura poblacional del material vegetal, lo que resultará de utilidad en la gestión de la conservación de los recursos fitogenéticos del Banco de Germoplasma de Manzano del SERIDA.

BIBLIOGRAFÍA

Arias, P., Díaz, D., Junco, J., Dapena, E., Gutiérrez, M.D., Blanco, D. (2010). Characterization of Asturian cider apples on the basis of their aromatic profile by high-speed gas chromatography and solid phase microextraction. *Food Chemistry* 121: 1312-1318

Baig, C., Puig, T., Canals, J.M., Zamora, F. & Fort, M.F. (2007). Los microsátélites o SSR como técnica de biología molecular de *Vitis vinifera* L. *Viticultura/Enología Profesional* 109: 29-38

Chevalier, A. (1920). Sur l'origine des Pommiers à cidre cultivés en Normandie et en Bretagne. *Compte Rendue de la Académie des Sciences*, (13/9): 521-523

Chevalier, A. (1921). Histoire et amélioration des pommiers et spécialement des pommier à cidre. *Revue de Botanique appliquée et d'Agriculture coloniale*, 1 (fascicule III): 149-215

Chevreau, E. & Laurens, F. (1987). The pattern of inheritance in apple (*Malus X domestica* Borkh.): further results from leaf isozyme analysis. *Theor Appl Genet*, 75: 90-95

Crespan, M. & Milani, N. (2000). Application of various molecular methodologies to the characterization of Rootstocks and Table Grapevines. *Acta Horticulturae*. 528, 97-104

Dapena, E. (1996). Comportamiento agronómico y tecnológico de variedades de manzano asturianas. Tesis doctoral. Departamento de Organismos y Sistemas. Universidad de Oviedo

Dapena, E. & Blázquez, M.D. (1996). Guía de cultivo del manzano de sidra en eje vertical. *Consejería de Agricultura del Principado de Asturias. Serie Divulgación n°6/96*

Dapena, E., Blázquez, M.D. & Miñarro, M. (2002). El cultivo ecológico del manzano. En: J.Labrador, J.L.Porcuna, A.Bello (eds.), *Manual de Agricultura y Ganadería Ecológica*,

pp. 103-114, SEAE-EUMEDIA, Madrid.

Dapena, E., Blázquez, M.D. (2004). Improvement of the resistance to scab, rosy apple aphid and fireblight in a breeding programme of cider apple cultivars. *Acta Horticulturae* 663: 725-727

Dapena, E., Blázquez, M.D. & Miñarro, M. (2005). Organic cider-apple production in Asturias (NW Spain). *IOBC8wprs Bull.* 28 (7), 142-146

Dapena, E., Blázquez, M.D. & Fernández, M. (2006). Recursos fitogenéticos del Banco de Germoplasma de manzano del SERIDA. *Boletín informativo del SERIDA.* N°3

Dapena, E., Miñarro, M. & Blázquez, M.D. (2008). Producción frutal mediante la utilización de sistemas sostenibles y variedades locales: Un ejemplo en manzano. Ed. Red Andaluza de Semillas. Manual para la utilización y conservación de variedades locales de cultivo, frutales y leñosas. 111-128

Dapena, E. & Blázquez, M.D. (2009). Descripción de las variedades de manzana de la D.O.P Sidra de Asturias. 72 p.p. SERIDA. *Asturgraf* 5480/09

Dapena, E., Miñarro, M., Blázquez, M.D. (2009). Evaluation of the resistance to the rosy apple aphid using a genetic marker. *Acta Horticulturae* 814: 787-790

Doyle, J.L. & Doyle, J.J. (1990). Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12. 13-15

Dunemann, F., Kahnau, R. & Schmidt, H. (1994). Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD 'Finger-printing' of cultivars and wild species. *Plant Breeding.* 11: 150-159

FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. www.faostat.fao.org. Apple Production 2012

Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. & Gessler, C. (1998). Simple

sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 1069-1076

Guarino, C., Santoro, S., De Simone, L., Lain, O., Cipriani, G. & Testolin, R. (2006). Genetic Diversity in a collection of ancient cultivars of apple (*Malus X domestica* Borkh.) as revealed by SSR-based fingerprinting. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 81 (1) 39-44

Harris, S.A., Robinson, J.P. & Juniper, B.E. (2002). Genetic clues to the origin of the apple. *TRENDS in Genetics* 18(8): 426-430

Hokanson, S.C., Szewc-McFadden, A.K., Lamboy, W.F. & McFerson, J.R. (1998). Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in *Malus X domestica* Borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics*. 97: 671-683

Janick, J., James, N.C., Brown, S.K. & Hemmat, M. (1996). Apples. J. Janick and J.N. Moore. Ed. *Fruit breeding. Vol1: Tree and tropical fruits*. 1-77.

King, G.J., Alston, F.H., Batlle, I., Chevreau, E., Gessler, C., Janse, J., Lindhout, P., Manganaris, A.G., Sansavini, S., Schmidt, S. & Tobutt, K. (1991). The "European Apple Genome Mapping Project"-developing a strategy for mapping genes coding for agronomic characters in tree species. *Euphytica*, 56: 89-94

Lespinasse, Y., Bouvier, L., Djulbic, M. & Chevreau, E. (1999). Haploidy in apple and pear. *Acta Hort*. 484: 49-54

Liebhard, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C.D., Tarchini, R., Van de Weg, E. & Gessler, C. (2002). Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus pumila*). *Molecular breeding* 10: 217-241

Manganaris, A.G. & Alston, F.H. (1988). Inheritance and linkage relationships of glutamate oxaloacetate transaminase isoenzymes in apple. *Theor Appl Genet.*, 76: 449-454

Mangas, J.J.; Rodríguez, R.; Suárez, B.; Picinelli, A. & Dapena, E. (1999). Study of the

phenolic profile of cider apple cultivars at maturity by multivariate techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (10), 4046-4052

Miñarro, M. & Dapena, E. (2008). Tolerance of some scab-resistant apple cultivars to the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea*. *Crop Protection* 27: 391-395

Nuez, F. & Carrillo, J.M. (2000). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. F. Nuez y J.M. Carrillo. Sociedad Española de Genética. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Universidad Politécnica de Valencia

Oraguzie, C.N., Gardiner, S.E., Basset, H.C.M., Stefanati, M., Ball, R.D., Bus, V.G.M. & White, A.G. (2001). Genetic diversity and relationships in *Malus* sp. Germplasm collections as determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126(3): 318-328

Paran, I. & Michelmore, R.W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993

Peakall, R. & Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295

Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrer, A.M. & Diaz-Hernandez, M.B. (2007). Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus x domestica* Borkh.) from Spain using microsatellite markers. *Genet. Resour Crop Evol*, 54: 405-420

Pereira-Lorenzo, S., Miranda, C., Ramos-Cabrer, A.M., Urrestarazu, J., Pina, A., Diaz-Hernandez, M.B., Santesteban, L.G., Laquidain, M.J., Dapena, E., Llamero, N., Errea P., Sanzol, J., Urbina, V., Dalmases, J., Blanco, A., Moreno, M.A., Gogorcena, Y. & Royo, J. B. (2014). Genetic diversity of the Spanish apple genetic resources using SSRs.

Comunicación Congreso de Seattle, junio 2014

Picinelli, A., Dapena, E., Mangas, J.J. (1995). The polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance. A preliminary study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 2273-2278

Rodríguez-Sánchez & I.P., Barrera-Saldaña, H.A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 7 (3): 323-335

Ruiz, E. (2002). Utilización de marcadores moleculares en la conservación y mejora de variedades de manzano en Asturias. Seminario de Investigación, Universidad de Oviedo

Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17(16): 6463-6471

Urrestarazu, J., Miranda, C., Santesteban, L.G. & Royo, J.B. (2012). Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*. 8:1163-1180

Vidal, J.R., Coarer, M. & Defontaine, A. (1999a). Genetic relationships among grapevine varieties grown in different French and Spanish regions based on RAPD markers. *Euphytica* 109: 161-172

Vidal, J.R., Moreno, S., Gogorcena, Y., Masa, A. & Ortiz, J.M. (1999b). On the genetic relationships and origins of six grape cultivars of Galicia (Spain) using RAPD markers. *Am. J. Enol. Vitic.* 50:69-75

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, J.L., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.*, 18(22): 6531-6535

You-Chun, L., Kobol, A.B., Fahima, T., Beiles, A. & Nevo, E. (2002). Microsatellites: genome distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11: 2453-2465

