# IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES DE CEREZO

**A. Wünsch**
**J.I. Hormaza**
Unidad de Fruticultura. S.I.A.-D.G.A.
Apdo 727. 50080 Zaragoza

## Introducción

El correcto establecimiento de una plantación frutal requiere de la utilización de un material vegetal de partida que sea a la vez sano y esté perfectamente caracterizado. Durante los últimos años el proceso de renovación del material vegetal frutal en especies como el cerezo ha adquirido un ritmo creciente multiplicándose el número de nuevas obtenciones de variedades y patrones. Como consecuencia, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan acelerar y optimizar el proceso de identificación del material frutal, para su posterior transferencia al sector productivo. Este hecho es especialmente relevante en un contexto de mercado europeo único que urge al sector productivo a ser cada vez más competitivo, lo que pasa inexcusablemente por el establecimiento de sistemas más rápidos y fiables de caracterización del material vegetal para su posterior distribución en condiciones óptimas.

Tradicionalmente la identificación de variedades se ha basado en la observación de las características fenotípicas, tanto fenológicas como morfológicas, del árbol. Algunas de estas características, como las que definen el fruto, solo son apreciables en un estado avanzado de desarrollo y su expresión está influenciada por el ambiente, lo cual implica que el proceso sea largo y no completamente preciso. En los últimos años han aparecido nuevos métodos de caracterización de variedades basados en técnicas de biología molecular que permiten la identificación inequívoca de distintos genotipos en una gran diversidad de especies. Estos métodos se basan en el desarrollo de marcadores del genoma de la planta, por lo que la identificación no depende del estado de desarrollo, ni de las condiciones ambientales, lo que permite una precisa caracterización en cualquier momento del ciclo fenológico. El desarrollo de estos marcadores para su uso como "huellas dactilares" de los cultivares y patrones frutales más interesantes permite asegurar que las nuevas accesiones sean diferentes del material ya disponible, permitiendo autentificar la pureza tanto del material entregado a los viveristas como del material entregado por los viveristas al agricultor.

Los estudios de desarrollo de marcadores moleculares en especies frutales están poco avanzados comparados con la mayoría de las especies hortícolas de interés económico. Así, en el caso del cerezo, únicamente se han realizado estudios de caracterización varietal con isoenzimas (Granger et al., 1993) y marcadores tipo RAPD (Gerlach y Stosser, 1997). Debido a las ventajas que presenta la caracterización molecular mediante microsatélites (Lit y Luly, 1989) respecto a otros marcadores, fundamentalmente su mayor repetibilidad y su facilidad de aplicación, ésta es la tecnología que estamos utilizando para la identificación de material vegetal frutal tanto de variedades como de patrones en el Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón en Zaragoza (Hormaza, en prensa). Los microsatélites son repeticiones de 2, 3 ó 4 nucleótidos presentes en distintas regiones del genoma de todos los organismos. El número de repeticiones puede variar entre genotipos de una especie y se puede detectar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En el caso del cerezo se ha realizado la identificación molecular de las variedades de la colección del S.I.A. y se ha explorado la posibilidad de identificar las variedades en diferentes momentos del ciclo fenológico de un árbol frutal.

## Materiales y Métodos

Para la identificación del material vegetal se recogieron muestras de 86 variedades de la colección de cerezo (*Prunus avium L.*) existente en el Servicio de Investigación Agroalimentaria de la Diputación General de Aragón. Se procedió a la extracción de ADN siguiendo el protocolo ya descrito previamente (Hormaza, 1999). Posteriormente se procedió a su amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en un termociclador (Hormaza, 1999), utilizando como cebadores secuencias flanqueantes de ADN repetitivo, también llamados microsatélites, desarrolladas por diferentes laboratorios (Downey y Iezzoni, 2000; Cipriani et al., 1999; A. Abbott y R. Testolini, comunicaciones personales). El producto de la reacción fue separado mediante electroforesis en geles de agarosa de alta resolución y visualizado mediante tinción con Bromuro de Etidio e iluminación con luz UV. Se utilizaron un total de 38 pares de cebadores de los cuales 35 se habían desarrollado en melocotonero [*P. persica* L (Batsch.)], 2 en cerezo y 1 en guindo (*Prunus cerasus* L). De ellos, 15 pares de cebadores han producido polimorfismos repetibles en las variedades de cerezo incluidas en este estudio.

Para estudiar la posibilidad de identificar el material vegetal frutal en cualquier momento del estado fenológico del árbol se ha extraído ADN de hojas en primavera y de yemas en invierno en estado de reposo vegetativo.

## Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos permiten identificar, con un número relativamente bajo de pares de cebadores, la mayoría de los cultivares estudiados, con la excepción de aquellas variedades desarrolladas a partir de otras mediante mutaciones puntuales, lo que representa un avance significativo respecto a las técnicas tradicionales de identificación varietal en esta especie. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la Figura 1.

Por otra parte, los patrones de amplificación obtenidos con muestras de hojas recogidas en primavera y de yemas en invierno son exactamente iguales, lo que permite la caracterización molecular tanto durante la época de desarrollo vegetativo como en estado de reposo invernal. La identificación molecular de material vegetal frutal mediante marcadores de ADN, es por lo tanto independiente de la época del año, de la etapa del crecimiento y del ambiente.

Además se ha comprobado que los marcadores tipo microsatélites pueden ser utilizados en diferentes especies a partir de los mismos cebadores. En este caso, los cebadores utilizados fueron desarrollados inicialmente en melocotonero y son útiles para identificación varietal no solamente en cerezo sino también en albaricoquero (Hormaza, en prensa), lo que va a permitir el disponer de una batería mayor de pares de cebadores que pueden ser utilizados en diferentes especies frutales facilitando la incorporación de estas estrategias en los programas de certificación estableciéndose una serie de protocolos estandarizados que puedan ser repetibles en diferentes laboratorios.

El establecimiento de un sistema de identificación varietal en frutales basado en marcadores moleculares de ADN que además sea fácilmente reproducible presenta indudables ventajas. Por un lado, permite facilitar el control de identidad del material propagado tanto de una colección de plantas madres a los viveristas como de éstos al agricultor, particularmente cuando este movimiento se realiza mediante varetas en reposo de las cuales se utilizan las yemas para injertarlas. Por otro lado, va a facilitar la gestión de las colecciones de germoplasma al determinar la presencia de homonimias y sinonimias. Además, el beneficio para los mejoradores es indudable ya que no solamente se pueden proteger sus derechos de forma más eficiente al poderse comparar las nuevas variedades con las ya existentes sino que el estudio detallado de la similitud genética de las distintas variedades va a permitir una mayor eficiencia a la hora de diseñar cruzamientos en un programa de mejora.

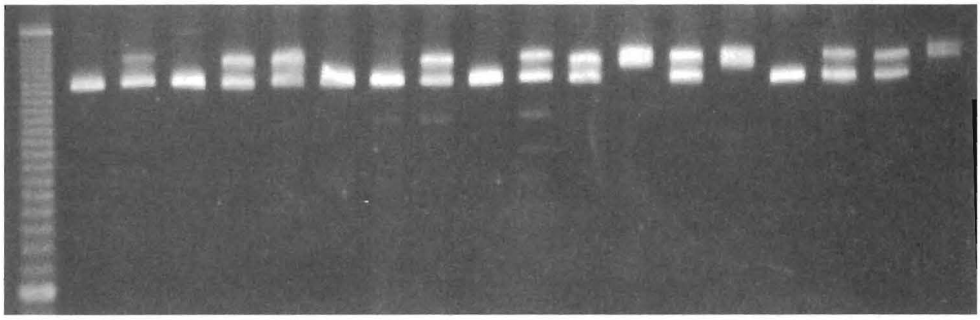


**Figura 1**: Microsatélites obtenidos con el cebador de melocotonero'pchcms5' (A. Abbot), con 18 variedades de cerezo. De izqda. a dcha.: Vega, Precoce Bernard, Larian, Summit, Marmotte, Gil Peck, Spalding, Ferrovia, Sommerset, Belge, Vittoria, Lapins, Corum, Ramon Oliva, Star, Taleguera Brillante, Lambert y Tigre.

## Bibliografía


Cipriani G., Lot G:, Huang W-G., Marrazo M.T., Peterlunger E., Testolin R. (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus pesica*(L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. Theoretical and Applied Genetics 99: 65-72.

Downey, S.L., Iezzoni, A.F. (2000) Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. Journal of the American Society for Horticultural Science 125: 76-80.

Gerlach H.K., Stösser R. (1997) Patterns of Random Amplified Polymorphic DNAs for Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivar Identification. Angew. Bot 71: 412-218.

Guilford P., Prakash S., Zhu J.M., Rikkerink E., Gardiner S., Bassett H., Foster R. (1997) Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. Theoretical and Applied Genetics 94: 249-54.

Granger, A.R., Clarke, G.R., Jackson, J.F. (1993) Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. Theoretical and Applied Genetics 86: 458-464.

Hormaza, J.I. (1999) Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. Scientia Horticulturae 79: 121-126.

Hormaza, J.I. (2000) Identification of apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using microsatellite and RAPD markers. Acta Horticulturae (en prensa).

Lit, M., Luly, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. American Journal of Human Genetics 44: 397-401.