Bioagro 29(3): 219-224. 2017

# VARIABILIDAD GENÉTICA EN DURAZNEROS CULTIVADOS EN EL PEÑÓN DE GABANTE, ESTADO ARAGUA, VENEZUELA[1,2]

Jesús Sangronis[3], Alexander Hernández[3], Jesús Aular[4], Jhonathan Torres[3] y María Cásares[3]

## RESUMEN

En este estudio se planteó la identificación molecular de durazneros cultivados en Venezuela, información que podría ser empleada como base para programas de mejoramiento genético. Hasta hoy sólo ha sido usada la clasificación visual, la cual puede ser subjetiva. El presente trabajo se realizó para caracterizar la variabilidad genética en *Prunus persica* (L.) Batsch cultivado en una de las principales zonas de producción venezolana. Se colectaron hojas jóvenes completamente desarrolladas de diferentes cultivares en huertos comerciales del Peñón de Gabante, estado Aragua. Se utilizaron 10 pares de iniciadores moleculares microsatélites (SSR). La evaluación del perfil electroforético se realizó por medio del índice de similaridad. Se realizaron análisis de clasificación y ordenación de las muestras. El dendrograma se construyó usando el método de grupos-pares no ponderados con promedios aritméticos (UPGMA). Se confirmó la estrecha base genética que existe dentro de la especie muestreada. Fue posible discriminar molecularmente los cultivares y esa discriminación correspondió a la realizada por los productores.
**Palabras claves adicionales**: Cultivares, mejoramiento genético, *Prunus persica*, SSR

## ABSTRACT

**Genetic variability of peaches cultivated in 'El Peñón de Gabante', Aragua State, Venezuela**

In this study the molecular identification of peaches cultivated in Venezuela was proposed, information that could be used as a basis for breeding programs. To date, only visual classification has been used, which can be subjective. The present work was carried out to characterize genetic variability in *Prunus persica* (L.) Batsch cultivated in one of the main Venezuelan production zones. Fully-developed young leaves of different cultivars were collected in commercial orchards. Ten pairs of primers (SSR) were used. Evaluations of the electrophoretic profiles were performed using the similarity index, along with classification and ordering analyzes of the samples. Dendrogram was constructed using the unweighted paired-arithmetic average (UPGMA) method. A close genetic basis within the peaches cultivars was confirmed, and it was possible to discriminate molecularly cultivars, which fairly corresponded to those identified by the producers.
**Additional key words**: Cultivars, plant breeding, *Prunus persica*, SSR

## INTRODUCCIÓN

El género *Prunus*, de la familia Rosaceae, representa un cultivo muy importante dentro de la fruticultura mundial, y son sus especies las que posiblemente han sido mejor caracterizadas genéticamente entre los frutales caducifolios (Hummer y Janick, 2009; Verde et al., 2013). El género abarca especies como duraznero o melocotón (*Prunus persica* (L.) Batsch); albaricoque (*P. armeniaca*); cerezo (*P. avium* y *P. cerassus*); ciruelo (*P. domestica* L.) y almendro (*P. amygdalus*) (Aranzana et al., 2003). Los principales cultivares de duraznero se obtuvieron en los Estados Unidos a finales del siglo XIX, con un número muy limitado de genotipos. Debido a esto y al alto grado de auto-polinización natural, existe una estrecha base genética en esta especie (Rojas et al., 2008).

La selección tradicional considera la evaluación morfo-fenológica de las plantas y frutos. Sin embargo, existen factores que limitan

Recibido: Noviembre 18, 2016 Aceptado: Junio 26, 2017
[1] Proyecto UCLA-LOCTI 563-AG-2008
[2] Parte del trabajo de grado de Magister Scientarum en Horticultura, Posgrado de Agronomía, UCLA, del primer autor
[3] Posgrado de Agronomía. Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: ahernandez@ucla.edu.ve; jhonathantorres@ucla.edu.ve; mariacasares@ucla.edu.ve; jesusaular@ucla.edu.ve (autor de correspondencia)

este análisis, ya que muchas características son interpretadas subjetivamente, y debido a la influencia del ambiente, es difícil identificar correctamente los genotipos. Además, muchas características sólo se detectan cuando la planta es adulta (Altube et al., 2001; Martínez et al., 2005).

Para lograr mayor precisión, rapidez y eficiencia en este campo, la biología molecular ha incorporado el uso de marcadores moleculares, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como método de identificación de cultivares, y ésta ha sido la elección más frecuente en estudios genéticos de plantas (Bianchi et al., 2004).

Los marcadores microsatélites constituyen una importante técnica molecular para estos estudios. Así, se ha evaluado el potencial de esta técnica en cultivares de duraznero (Sosinski et al., 2000) y cerezo (Wunsch y Hormaza, 2004), encontrándose un número de microsatélites que podían ser empleados en identificación de genotipos y otros análisis en estas especies.

Para evaluar la diversidad genética entre especies, Bianchi et al. (2004) caracterizaron molecularmente ocho cultivares de nectarina y 28 de melocotón y los marcadores estudiados fueron capaces de separar los materiales en grupos distintos, a la vez que mostraron un alto grado de concordancia con los datos genealógicos de los cultivares. De manera similar, Rojas et al. (2008) lograron en Chile la separación molecular entre duraznero y nectarina.

En la Estación Experimental Bajo Seco de la Universidad Central de Venezuela (UCV), ubicada en el estado Vargas, existen al menos 35 entradas de duraznero y actualmente el Fondo de Desarrollo Frutícola (FONDEFRU) señala el ingreso de aproximadamente 41 cultivares procedentes de Colombia y Estados Unidos. Asimismo, algunos productores han recibido cultivares procedentes de Chile y Estados Unidos, los cuales han sido utilizados para cruzamientos con fines experimentales. Los cultivares introducidos se han clasificado, principalmente, por poseer frutos pubescentes o lisos, y por tener la semilla adherida o no al mesocarpio (Soto y Gerig, 2011).

El nivel tecnológico de producción de duraznero en Venezuela se considera de medio a bajo (Aular y Rodríguez, 2012), y la selección ha sido realizada básicamente por los productores a través de la observación y seguimiento de características deseables y luego, a través de la injertación se ha generado un considerable número de materiales que necesitan ser evaluados y caracterizados con mayor rigor ya que la identificación de genotipos basada en características morfológicas y fenológicas genera dudas sobre la verdadera identidad de los cultivares (Bianchi, 2004). Debido a que la identificación molecular de materiales puede generar bases firmes para programas de mejoramiento genético (Bakht et al., 2013), se realizó el presente trabajo con el objetivo de caracterizar molecularmente la variabilidad genética de materiales de *Prunus persica* (L.) Batsch cultivados en una de las zonas de producción comercial de Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron hojas jóvenes completamente desarrolladas de plantas de diferentes cultivares en huertos comerciales de la localidad de El Peñón de Gabante (10° 39’ N, 67° 36’ W, 2145 msnm), en el estado Aragua. El muestreo se realizó en el segundo semestre del año 2011, fue hecho al azar, con el interés de captar alelos, comunes o no, localmente distribuidos. La identificación de los cultivares colectados se muestra en el Cuadro 1.

Se evaluaron tres materiales o recolecciones de cada uno de los cultivares (Amarillo, Amarillo Mejorado, Jarillazo, Bolivariano, General y Melocotón ½ kilo), los cuales fueron localizados con la ayuda de los productores de acuerdo a su experiencia y conocimiento de las unidades de producción. Para cada material, la muestra estuvo constituida por hojas de cinco árboles, a excepción del cultivar ‘General’, donde sólo se muestrearon tres árboles. Se recolectaron 10 hojas completamente desarrolladas en la zona distal de las ramas de cada planta, de los diferentes materiales, y fueron llevadas al Laboratorio de Biología Molecular del Postgrado de Agronomía de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto, donde fueron sometidas a medidas de asepsia; luego se procedió a pesar por duplicado 0,1 g de la muestra para ser conservadas a -20 ºC para su posterior análisis.

Se utilizaron 10 pares de iniciadores (directo y reverso), los cuales fueron seleccionados partir del trabajo realizado por Aranzana et al. (2003),

tomando como criterio el grado de polimorfismo. De éstos se seleccionaron los siete iniciadores donde se completaron todas las reacciones de amplificación para las muestras en estudio y las bandas mostraron una adecuada resolución (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Cultivares de *Prunus persica* (L.) Batsch muestreados en tres huertos comerciales de 'El Peñón de Gabante', estado Aragua, Venezuela

| Cultivar | Código |
|---|---|
| Amarillo Mejorado | ArDuAM1 |
| Amarillo Mejorado | ArDuAM3 |
| Amarillo Mejorado | ArDuAM4 |
| Amarillo | ArDuA1 |
| Amarillo | ArDuA2 |
| Amarillo | ArDuA3 |
| Jarillazo | ArDuJa1 |
| Jarillazo | ArDuJa2 |
| Jarillazo | ArDuJa3 |
| Bolivariano | ArDuBo1 |
| Bolivariano | ArDuBo2 |
| Bolivariano | ArDuBo3 |
| General | ArDuGe1 |
| General | ArDuGe2 |
| General | ArDuGe3 |
| Melocotón ½ kilo | ArMe3 |
| Melocotón ½ kilo | ArMe4 |
| Melocotón ½ kilo | ArMel5 |

Para la extracción del ADN se aplicó la metodología modificada de Doyle y Doyle (1987). La amplificación del ADN a través de PCR para los microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeat) se llevaron a cabo en tres muestras de ADN por cada cultivar, para un total de 60 reacciones por cada iniciador. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador Termo PX2, bajo los siguientes perfiles de temperatura: un ciclo de desnaturalización inicial por 5 min a 94 ºC, seguido por 35 ciclos de amplificación comprendido por 94 °C de desnaturalización por 45 seg, alineamiento que depende de la temperatura de cada iniciador por 45 seg. y extensión por 45 seg a 72 ºC; por último, un ciclo de extensión final a 72 ºC por 8 min.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) 10 % a 100 V por una hora y media. Se usó un marcador de peso molecular de 50 bp para establecer el peso molecular de los diferentes alelos. La visualización de las bandas se realizó mediante tinción con $AgNO_3$ al 0,02 %.

**Cuadro 2.** Iniciadores moleculares y su secuencia utilizados para evaluar la diversidad de *Prunus persica* (L.) Batsch proveniente de 'El Peñón de Gabante', estado Aragua, Venezuela

| Marcador | Secuencia |
|---|---|
| UDP98-021 | AAGCAGCAATTGGCAGAATC<br>GAATATGAGACGGTCCAGAAGC |
| UDP98-022 | CTAGTTGTGCACACTCACGC<br>GTCGCAGGAACAGTAAGCCT |
| UDP98-024 | CCTTGATGCATAATCAAACAGC<br>GGACACACTGGCATGTGAAG |
| UDP97-403 | CTGGCTTACAACTCGCAAGC<br>CGTCGACCAACTGAGACTCA |
| UDP98-407 | AGCGGCAGGCTAAATATCAA<br>AATCGCCGATCAAAGCAAC |
| UDP98-412 | AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC<br>GCTGAAGACGACGATGATGA |
| UDP98-414 | AAAAGGCACGACGTTGAAGA<br>TTCAGATTGGGAATTTGCAG |

La evaluación del perfil electroforético se realizó por medio del índice de similaridad de Dice (GS = 2a/(2a +b +c)), donde a = número positivo de coincidencias, b es el número de bandas presentes en la muestra i pero ausentes en j, c es el número de bandas ausentes en i pero presentes en la muestra j. A través del patrón de bandas producido por cada iniciador, se contó como "uno" la presencia de banda y "cero" la ausencia de ésta, lo que permitió la elaboración de una matriz binaria. La similaridad fue transformada en coeficiente de distancia mediante la expresión (Dice 1-S).

Todos los datos fueron analizados por el programa Info-Gen (Universidad de Córdoba, Argentina). Se realizaron análisis de varianza molecular entre las poblaciones de la especie evaluada. El dendrograma se construyó usando el método de grupos-pares no ponderados con promedios aritméticos (UPGMA). Además, se realizaron análisis de clasificación y ordenamiento

de las muestras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rango de distancia genética obtenido mediante el coeficiente de distancia (Dice 1-S) en los materiales de duraznero evaluados estuvo entre 0 y 0,08; lo que indica de manera indirecta la variabilidad detectada en la especie *Prunus persica* (L.) Batsch (Figura 1). Debe destacarse que a menor distancia (Dice 1-S), los cultivares son más similares en su constitución genética y al contrario, mientras más distantes, son menos similares, para el número de alelos detectados con los iniciadores utilizados. Se puede apreciar que los cultivares con menor distancia genética presentaron un 100 % de similaridad y los más distantes un 99,92 %, que fue la separación entre los cultivares estudiados.

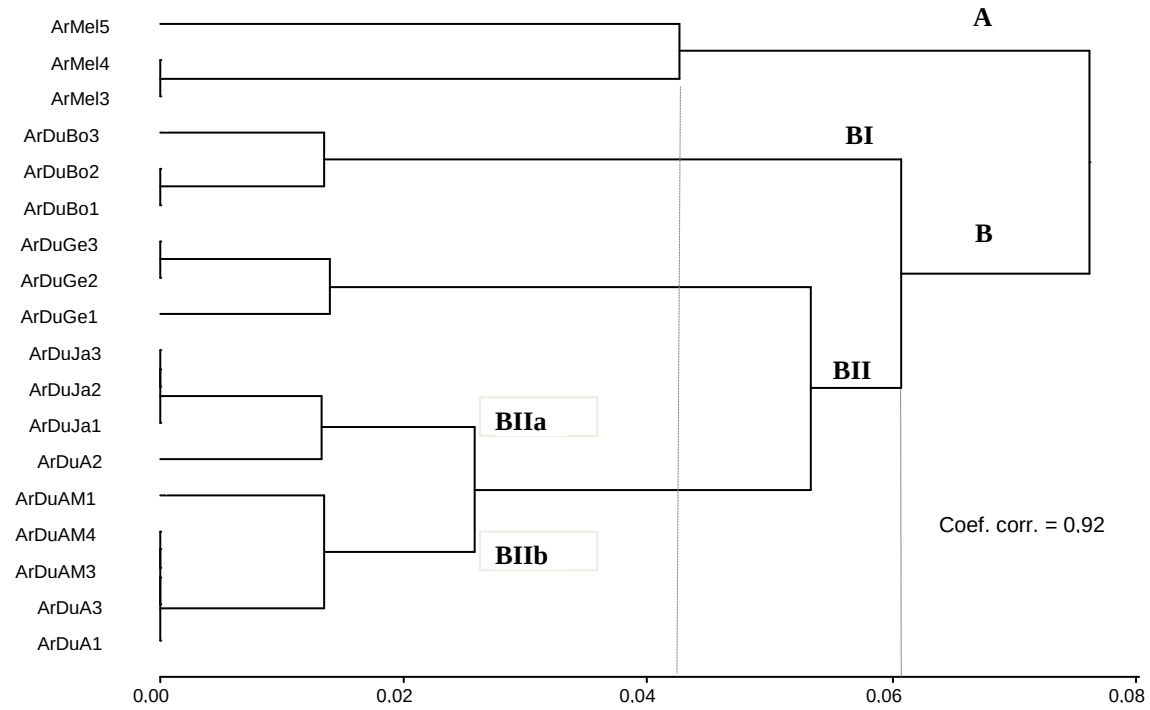


**Figura 1.** Dendrograma obtenido con siete iniciadores moleculares microsatélites (SSR) para agrupar 18 materiales de *Prunus persica* (L.) Batsch, provenientes de 'El Peñón de Gabante', estado Aragua, Venezuela, mediante el coeficiente de distancia (Dice 1-S)

La distancia genética obtenida puede considerarse baja, ya que los valores del coeficiente de distancia (Dice 1-S) oscilaron entre 0 y 0,08. Estos valores permiten confirmar la estrecha diversidad genética existente entre los cultivares utilizados en Venezuela. Alto grado de consanguinidad o estrecha relación genética al evaluar genotipos de durazneros también ha sido detectada por Quarta et al. (2001) al efectuar el análisis molecular de 39 genotipos a través de 28 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) en el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA) de Cabrils, España; también por Zimback et al. (2003), al caracterizar genéticamente los cultivares 'Tropical' y 'Douradão', producidos en Capão Bonito, Sao Paulo, Brasil; por Rojas et al. (2008) al realizar la separación molecular entre duraznero y nectarina en Chile; por De Paula et al. (2012) al usar marcadores RAPD para discriminar 14 materiales, usados principalmente como patrones, en Capão do Leão, Rio Grande del Sur, Brasil, y por Nagaty et al. (2011) al caracterizar morfológica y molecularmente nueve cultivares de durazneros producidos en Arabia Saudita, usando iniciadores RAPD. Sin embargo, De Rogatis et al. (2013), quienes emplearon marcadores SSR no lograron detectar una estructura clara de la variabilidad genética dentro de la zona de difusión del cerezo silvestre (*Prunus avium* L.) en Italia y

esto no les permitió delimitar las regiones de origen sobre la base de datos genéticos.

Al explorar el rango de variabilidad genética se pudieron separar los cultivares de duraznero en dos grupos: el grupo A que corresponde a los llamados melocotoneros (ArMe3; ArMe4; ArMe5) con rango de variación de 0 a 0,041, mientras que el grupo B, estuvo conformado por los otros cinco materiales. En este grupo se observa un subgrupo (BI) de los materiales de duraznero del cv. Bolivariano (ArDuBo1; ArDuBo2; ArDuBo3), material considerado por los productores como de poca importancia hortícola. Y un segundo subgrupo (BII) correspondiente al resto de los materiales, con tendencia a agruparlos por cultivar. En el sub-grupo BIIa se hallan los cultivares más comerciales de la zona (‘Jarillazo’, ‘Amarillo’ y ‘Amarillo Mejorado’) y en el subgrupo BIIa se observan las muestras del cv. General, considerado de poca importancia por los productores. La pequeña variación observada entre los materiales permite indicar que si bien existe diferencia entre ellos, los cultivares comparten gran parte del acervo de alelos producto de una estrecha base genética, la cual ha sido señalada por Quarta et al. (2001) y De Paula et al. (2012).

El análisis molecular fue eficiente para separar los cultivares y conformar grupos con menor distancia genética. Resultado similar fue obtenido al aplicar el análisis de agrupamiento a 12 poblaciones de durazneros producidos en Pakistán, ya que fue posible agruparlos en 5 grupos: Grupo I, II y V con un genotipo cada uno; Grupo III con 3 genotipos y Grupo IV con 6 genotipos (Bakht et al., 2013). En la Figura 2 se muestra la representación gráfica del análisis de Componentes Principales. Este análisis explica 64,4 % de la variabilidad, repartida entre el CP1 con 37,0 % y el CP2 con 27,4 %.

Es interesante señalar que el CP1, al explicar la mayor variación, permitió separar al cultivar Melocotón ½ kilo de los otros cultivares. Esto está en concordancia con la diferencia hortícola que existe entre ellos con relación a la adherencia o no de la semilla a la pulpa, ya que en los melocotoneros la semilla se desprende con facilidad. El análisis los ubicó en el I cuadrante (+ +) y al cv. General lo ubicó en lugar cercano a éstos. El CP2 discriminó la ubicación de los cultivares, separando a los materiales de ‘Bolivariano’, ‘Jarillazo’ y ‘Amarillo’ en grupos bien definidos del lado del IV cuadrante (- +). Esto debido al rango de variación genética que existe entre estos cultivares y a la diferencia fenotípica entre los cultivares dentro de la misma especie.

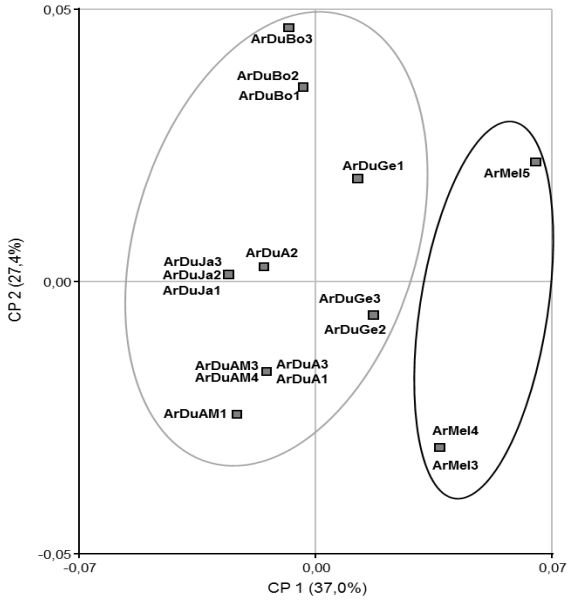


**Figura 2.** Representación gráfica del Análisis de Coordenadas Principales obtenido a partir de siete iniciadores moleculares microsatélites (SSR) para agrupar 18 materiales de *Prunus persica* (L.) Batsch., provenientes de ‘El Peñón de Gabante’, estado Aragua, Venezuela, mediante el coeficiente de distancia (Dice 1-S).

En el III cuadrante (- -) se visualizan dos de los cultivares de duraznero con mayor importancia hortícola y comercial de la zona (‘Amarillo’ y ‘Amarillo Mejorado’). Discriminación en un mismo grupo para los materiales de duraznero de importancia económica también fue obtenida por Morillo et al. (2014) al evaluar la diversidad genética de materiales de *Prunus* de la colección de caducifolios de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, utilizando iniciadores Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs). Estos autores lograron formar tres grupos, ubicando en el grupo 2 los materiales de importancia comercial.

## CONCLUSIONES

Se confirmó la estrecha base genética que

existe dentro de la especie *Prunus persica* cultivado en Venezuela.

Fue posible discriminar molecularmente los cultivares de esta especie y la discriminación se correspondió con la clasificación visual realizada por los productores de la zona.

## LITERATURA CITADA

1. Altube, H., M. Urquiza, R. Rivata y R. Taborda. 2001. Utilización de isoenzimas de extractos de hojas en la caracterización de cultivares de duraznero (*Prunus persica* (L) Batsch). Rev. Bras. de Frutic. 23 (2): 345-349.
2. Aranzana, M., A. Pineda, P. Cosson, E. Dirlewanger, J. Ascasibar, G. Cipriano, C. Ryder, R. Testolin, A. Abbott, G. King, A. Iezzoni y P. Arus. 2003. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. Theor Appl Genet. 106: 819-825.
3. Aular, J. y Y. Rodríguez. 2012. Horticultural practices of peach in Venezuela. Acta Hort. 962: 381-385.
4. Bakht, J., A. Jamshed y M. Shafi. 2013. Genetic diversity and phylogenetic relationship among different peach genotypes through rapid markers. Pak. J. Bot. 45(4): 1241-1245.
5. Bianchi, J., J. Fachinello, M. Schuch y S. Sansavini. 2004. Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites. Rev. Bras. Frutic. 26(3): 490-493.
6. De Rogatis, A., Ferrazzini, D, Ducci, F., Guerri, S., Carnevale, S. y Belletti, P. 2013. Genetic variation in Italian wild cherry (*Prunus avium* L.) as characterized by nSSR markers. Forestry 86: 391-400.
7. Morillo, A., Morillo, Y. Coronado y E. Pinzón. 2014. Caracterización con RAMs de la colección de durazno (*Prunus persica* L. Batsch) existente en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Acta Agronómica 63(4): 367-376.
8. Martínez, P., R. Sánchez, M. Rubio, F. Dicenta, T. Gradziel y G. Sozzi. 2005. Application of recent biotechnologies to *Prunus* tree crop genetic improvement. Cien. Inv. Agr. 32(2): 73-96.
9. Nagaty, A., S. El-Assal y M. Rifaat. 2011. Characterization of the genetic diversity of peach cultivars in Taif by RAPD-PCR**.** Am. J. App. Sci. 8(7): 708-715.
10. De Paula, L., L. Arantes, V. Bianchi y J. Fachinello. 2012. Caracterização molecular e variabilidade genética entre porta-enxertos de pessegueiro com base em marcadores codominantes. Pesq. Agropec. Bras. 47(2): 193-199.
11. Hummer, K. y J. Janick. 2009. Rosaceae: Taxonomy, economic impact, importance, genomics. *In*: K. Folta y S. Gardiner (eds.). Genetics and Genomics of Rosaceae. Springer, New York. pp. 1-17.
12. Quarta, R., M. Dettori, I. Verde, U. M. Marchesi y Palombi. 2001. Characterization and evaluation of genetic diversity in peach germplasm using RAPD and RFLP markers. Acta Hort. 546: 489-496.
13. Rojas, G., M. Méndez, C. Muñoz, G., Lemus y P. Hinrichsen, 2008. Identification of a minimal microsatellite marker panel for the fingerprinting of peach and nectarine cultivars. J. Biotech (special issue) 11: 1–12.
14. Soto, E. y L. Gerig. 2011. Variedades del duraznero. *In.* INIA. El Duraznero en Venezuela. Serie B-4. Maracay, Venezuela. 123 p.
15. Sosinski, B., M. Gannavarapu, L.D. Hager, L.E. Beck, G.J. King, C.D. Ryder et al. 2000. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. Theor. Appl. Genet. 101: 421-428.
16. Verde, I., A. Abbott, S. Scalabrin, S. Jung y S. Shu. 2013. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. Nature Genetics 45(5): 487-494.
17. Wunsch, A. y J. Hormaza. 2004. Molecular evaluation of genetic diversity and *s*-allele composition of local spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. Genetic Resources and Crop Evolution 51: 635-641.
18. Zimback, L., W. Barbosa, E. Mori y R. Veiga. 2003. Caracterização e identificação das cultivares de pessegueiro Tropical e Douradão através de marcadores RAPD. Rev. Bras. Frutic. 25(2): 352-354.