SEMINARIO CIENTÍFICO-TÉCNICO: EL BANCO DE GERMOPLASMA DEL IMIDA (BAGERIM)

4 de abril de 2014, MIDA, Murcia

Identificación Genotípica de Recursos Fitogenéticos

Leonor Ruiz García

Equipo de Viticultura y Enología

Unidad de Mejora y Genética Molecular Plantas

Ana M. Fuentes Denia

Beatriz García de Rosa

Carlos V. Padilla Martínez

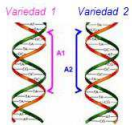
Eliseo Salmerón Gómez

Isidro Hita Gambín

MARCADOR GENÉTICO: Cualquier diferencia detectable controlada genéticamente

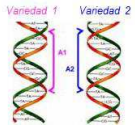
✓ **Morfológicos:** fenotipos de interpretación visual

✓ **ADN o moleculares:**



- estudian variabilidad del ADN: nº ilimitado
- insensibles al ambiente
- análisis en cualquier momento desarrollo planta
- herramienta rápida y eficaz:
  - Identificación varietal
  - Estudios variabilidad
  - Parentesco
  - Selección caracteres (Programas de Mejora)

Marcadores moleculares tipo microsatélite: SSRs (Simple Sequence Repeats)



ADN (ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO)

- Molécula hereditaria, unión de nucleótidos
- Adenina (A), Timina (T), Citosina (C), Guanina (G)

SSR

GACTACTACTACTACTACTGGTG...
5 repeats **(15)**

GACTACTACTACTACTACTACTGGTG...
6 repeats **(18)**

GACTACTACTACTACTACTACTACTGGTG...
7 repeats **(21)**

En función del número de repeticiones, tenemos un número diferente de pares de bases o nucleótidos (distintos tamaños o 'alelos')

Simple Sequence Repeats

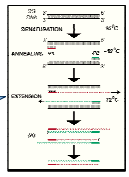
- Frecuencia alta
- Muy Polimórficos
- Co-dominantes
- Técnica reproducible

Técnicas de Biología Molecular: Análisis SSRs

Extracción de ADN

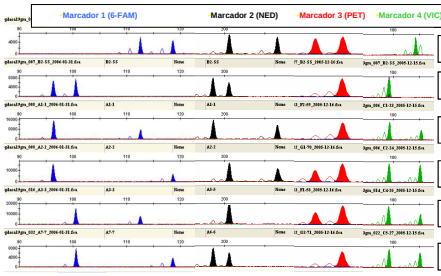
PCR (Polymerase Chain Reaction)

Termociclador



Visualización e interpretación
Electroforesis

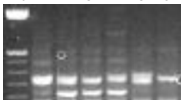
Gel acrilamida
Fluorescencia: GeneMapper



Tamaño amplificado

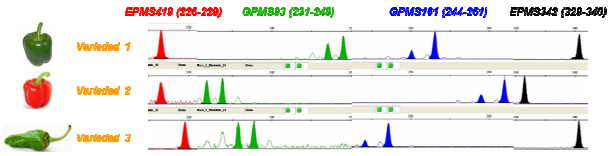
Tamaño en pares de bases (pb)				
Planta1	112/118	200/208	134/136	104/104
Planta2	96/102	198/200	136/136	98/98
Planta3	96/112	198/208	136/136	98/104
Planta4	96/118	200/208	134/136	98/104
Planta5	102/112	200/200	134/136	98/104
Planta6	102/118	198/200	136/136	98/104

Gel agarosa



Aplicaciones — Identificación de variedades mediante marcadores moleculares de plantas

• Perfil genético único para cada variedad (10-25 marcadores)



	EPMS419	GPMS93	GPMS161	EPMS342
Variedad 1	226 226	246 248	250 253	340 340
Variedad 2	226 226	231 233	258 261	329 329
Variedad 3	229 229	235 237	244 247	340 340

HERRAMIENTA:
- Viveros y Bancos germoplasma
- Protección nuevas variedades

Identificación de variedades mediante marcadores moleculares de plantas

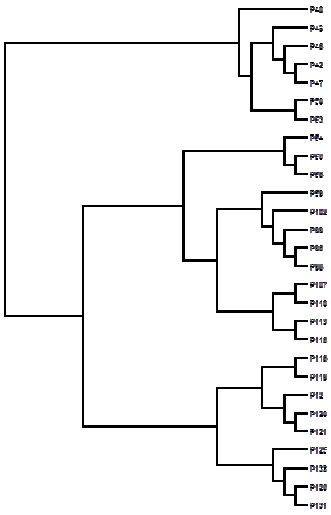
• Supuesto: todas la plantas son diferentes

ADN	Marcador1	Marcador2	Marcador3	Marcador4	Marcador5	Marcador6	Marcador7
1	100/202	96/104	115/118	130/130	127/127	204/208	304/306
2	204/208	96/110	115/118	130/130	127/139	204/ 204	310/314
3	100/204	96/96	115/115	130/130	127/139	204/208	308/316
4	100/208	96/110	118/118	130/130	127/139	204/204	304/314
5	202/204	96/104	115/118	130/130	127/127	204/ 204	308/310
6	202/208	104/110	115/118	130/130	127/139	204/ 204	306/314
7	202/202	104/104	115/115	130/130	127/127	208/208	304/304
8	100/100	104/104	118/118	130/130	127/127	204/ 204	306/306
9	108/220	100/118	113/127	130/130	127/142	210/218	300/302
10	202/208	104/110	115/118	130/130	127/139	204/ 204	306/314

Alelos o tamaños amplificados por PCR, expresados en pares de bases (pb), con cada marcador

6	5	4	1	3	4	8
100	96	113	130	127	204	300
108	100	115		139	208	302
202	104	118		142	210	304
204	110	127			218	306
208	118					308
220						310
						314
						316

Aplicaciones — *Evaluación de la diversidad genética de plantas*



marcadores comunes → semejanzas genéticas

marcadores no comunes → diferencias genéticas

Aplicaciones — *Relaciones de parentesco*

- Supuesto: variedades parentales e híbridos (cruzamientos dirigidos)

ADN	Marcador1	Marcador2	Marcador3	Marcador4	Marcador5	Marcador6
♀	100/202	96/104	115/118	127/127	204/208	304/306
♂	204/208	98/110	115/118	129/139	204/ 204	310/314
1	100/204	96/98	115/115	127/139	206/208	304/310
2	100/208	96/110	118/118	127/129	206/208	304/314
3	202/204	98/104	115/118	127/129	204/ 206	306/310
4	202/208	104/110	115/118	127/139	204/ 206	306/314
5	202/202	104/104	115/115	127/127	208/208	304/306
6	100/100	104/104	118/118	127/127	204/ 204	306/306
7	108/220	100/118	113/127	127/142	210/218	300/302
8	202/208	104/110	115/118	127/139	204/ 204	306/314

Trabajos de Identificación Genotípica dentro del Banco Germoplasma

Melocotonero (INIA-RF01-013)
Celia Martínez Mora
José Luis Cenis

Joaquín Rodríguez

Moreras (PO07-040 FEDER 80%)
Celia Martínez Mora
José Luis Cenis

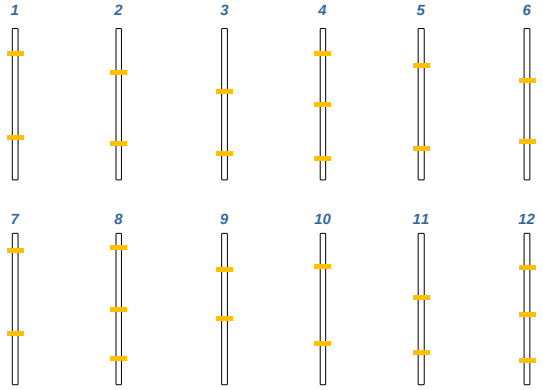
Ignacio Padial

Pimiento (PO07-032 FEDER 80%)
Ana Fuentes Denia
Leonor Ruiz García

Josefa Gomariz
Elena Sánchez

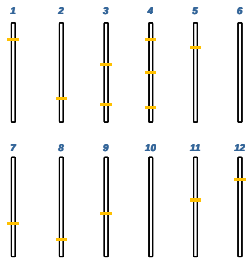
PO07-032 FEDER 80%: Identificación genotípica de una colección de Pimiento

- Material vegetal: 131 entradas de pimiento / 3 plantas por cada entrada
- Marcadores analizados inicialmente: 29
- Pimiento cuenta con un juego haploide de 12 cromosomas



PO07-032: Identificación genotípica de una colección de Pimiento

- Material vegetal: 131 entradas de pimiento / 3 plantas por cada entrada
- Marcadores analizados inicialmente: 29
- Marcadores útiles: polimórficos (19) y de lectura clara (16)



Referencia	GL	Marcador	Tamaño
Kong et al 2012		**CAK24-NED**	(146-158 pb)
Kong et al 2012		**CAK58-VIC**	(208-224 pb)
Kong et al 2012		**CAK6-FAM**	(128-148 pb)
Minamiyama et al 2006	5	**CAMS072-VIC (I y II)**	(142-269 pb)
Minura et al 2012	4	**CAMS228-VIC**	(241-239 pb)
Minura et al 2012	4	**CAMS406-2-PET**	(182-334 pb)
Minamiyama et al 2013	4	**CAMS644-NED**	(204-212 pb)
Nagy et al. 2007	8	**EPMS342-NED**	(323-343 pb)
Nagy et al. 2007	3	**EPMS386-VIC**	(122-170 pb)
Nagy et al. 2007	1	**EPMS397-NED**	(102-124 pb)
Nagy et al. 2007	9	**EPMS419-PET**	(224-248 pb)
Nagy et al. 2007	7	**EPMS426-FAM**	(96-118 pb)
Nagy et al. 2007	11	**GPMS101-VIC**	(193-196 pb)
Nagy et al. 2007	2	**GPMS169-NED**	(176-220 pb)
Nagy et al. 2007	12	**GPMS197-PET**	(302-330 pb)
Nagy et al. 2007	3	**GPMS93-VIC**	(202-268 pb)

- Resultados hasta el momento: 65 entradas analizadas

Gracias por vuestra atención

Instituciones

Región de Murcia
Consejería de Agricultura y Agua

Unión Europea
Fondo Europeo
de Desarrollo Regional

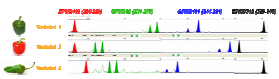
Crecemos con Europa

Horticultura
Josefa Gomariz
Elena Sánchez

Viticultura y Enología
Unidad Mejora y GMP
Ana M. Fuentes Denia
Beatriz García de Rosa

Estudiantes:
Carmen Codina
Araceli González
Azucena Prior
Mª José Álvarez

leonor.ruiz@carm.es
968368584



PO07-032 FEDER 80%: Mantenimiento y conservación de recursos fitogenéticos de interés agroalimentario y medioambiental.