

## Construcción de mapas de ligamiento basados en SNPs obtenidos a través de *Genotyping-by-sequencing* (GBS) para dos patrones *Prunus* de melocotonero

Verónica Guajardo<sup>1</sup>, Simón Solís<sup>1</sup>, Ksenija Gasic<sup>2</sup>, Carolina Font i Forcada<sup>3</sup> & María Ángeles Moreno<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudios Avanzados en Fruticultura (CEAF), Las Parcelas 882, Los Choabinos, Rengo, Región de O'Higgins, Chile, vguajardo@ceaf.cl, ssolis@ceaf.cl

<sup>2</sup>Clemson University, Department of Plant and Environmental Sciences, 105 Collins St., Clemson, SC 29634, USA, kgasic@clemson.edu

<sup>3</sup>Estación Experimental de Aula Dei - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEAD-CSIC), Avda. Montañana 1005, E-50059 Zaragoza, España, cfont@eead.csic.es, mmoreno@eead.csic.es

### Resumen

En los estudios genéticos y selección asistida por marcadores de los programas de mejora genética de variedades y patrones, es crucial la construcción de mapas de ligamiento. En el caso de las variedades de frutales de hueso (*Prunus* spp.), se han desarrollado mapas de ligamiento basados en SNPs para variedades de melocotonero, cerezo y almendro. Sin embargo, y pese a su importancia, no se ha realizado este tipo de análisis para patrones *Prunus*. En este estudio, se presentan resultados del uso de *Genotyping-by-sequencing* (GBS) para identificar y genotipar SNPs de manera simultánea a partir de dos patrones *Prunus* de melocotonero ('Adafuel' x 'Flordaguard') y su progenie. El material vegetal fue desarrollado por el programa de mejora genética de patrones *Prunus* de la EEAD-CSIC con el objetivo de establecer una población segregante para un rango de caracteres de importancia en la mejora de patrones (resistencia frente a nematodos, tolerancia a clorosis férrica y asfixia de raíces, vigor, productividad y calidad del fruto de la variedad injertada, entre otros). Se construyeron mapas de ligamiento de alta densidad a partir de una población de 118 individuos. Las secuencias obtenidas a través de GBS fueron alineadas al genoma de referencia de *Prunus* (*Peach* v2.1). Se identificaron 18.861 SNPs de alta calidad (MAF>0,05; *missing data* < 5%), distribuidos a lo largo de los ocho cromosomas de *Prunus*. El número de SNPs identificados varió desde 1.447 para el cromosoma 7 hasta 4.014 para el cromosoma 1. Para 'Adafuel' fue posible construir los ocho grupos de ligamiento esperados, mientras que para 'Flordaguard' sólo fue posible construir cuatro, dada la baja heterocigosidad de este genotipo. Los mapas de ligamiento de alta densidad obtenidos proporcionan información de gran importancia y servirán como base para la identificación de QTLs y genes relevantes para la mejora de patrones *Prunus*.

**Palabras clave:** marcadores moleculares, mejora genética, frutales de hueso, población segregante, cromosoma.

### Abstract

Linkage maps are crucial for genetic studies and marker-assisted selection in cultivars and rootstocks breeding programs. While several SNP-based linkage maps for cultivated *Prunus* species such as peach, cherries and almond are available, there are no SNP-based linkage maps for *Prunus* rootstocks. Here, we report on using Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach to simultaneously discover and genotype SNPs from two *Prunus* rootstocks ('Adafuel' x 'Flordaguard') for peach and their progeny. The plant

material was developed at the EEAD-CSIC *Prunus* rootstocks breeding program with the goal to establish segregating progeny for a range of characters of importance to rootstock breeding (resistance to nematodes, tolerance to iron-chlorosis and root-asphyxia, vigor and other effects on scion such as yield efficiency and fruit quality). High-density parental linkage maps were constructed by genotyping 118 siblings. Sequence reads obtained from GBS were aligned to the *P. persica* reference genome (Peach v2.1). A total of 18,861 high quality SNPs (MAF>0.05; missing data < 5%), evenly distributed over the eight 8 chromosomes, were identified. The number of identified SNPs ranged from 1,447 for the chromosome 7 to 4,014 for the chromosome 1. While eight linkage maps were constructed for ‘Adafuel’, only four were constructed for ‘Flordaguard’, given the low heterozygosity of this genotype. These new high density linkage maps provide valuable information and serve as the basis for identification of QTLs and genes relevant for the *Prunus* rootstocks breeding.

**Keywords:** molecular markers, breeding, Stone fruits, segregant population, chromosome

### Introducción

El género *Prunus* pertenece a la subfamilia *Prunoideae* de la familia *Rosaceae* (Rehder, 1940). Muchas especies de este género, conocidas como frutales de hueso, son económicamente importantes (por ejemplo, melocotoneros, ciruelos, cerezos y almendros). Para la producción de fruta, la mayoría de los árboles frutales son injertados sobre un patrón, lo que significa que el árbol está compuesto de dos individuos genéticamente diferentes. Uno de ellos es el injerto o variedad, que está formado por la mayor parte del tronco, ramas, hojas y frutos. La otra parte, que corresponde al patrón, determina ciertas características del árbol como el tamaño, vigor y tolerancia a estreses bióticos y abióticos relacionados con características del suelo (Cummins y Aldwinckle, 1983; Layne, 1987). Mientras numerosos programas de mejora genética están dirigidos al desarrollo de nuevas variedades de frutales de hueso, sólo unos pocos trabajan en la selección de nuevos patrones *Prunus*.

Durante los últimos años, el uso de marcadores moleculares de tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ha permitido que los investigadores de programas de mejora genética puedan construir mapas de ligamiento altamente saturados. En *Prunus*, se han utilizado SNPs que son parte de chips de SNPs (Verde et al., 2012; Peace et al., 2012) para construir mapas de ligamiento en melocotonero (Eduardo et al., 2013; Pirona et al., 2013; Yang et al., 2013; Frett et al., 2014; Romeu et al., 2014; da Silva et al., 2015; Núñez-Lillo et al., 2015; Fresnedo et al., 2016) y cerezo (Klagges et al., 2013). Además, se han utilizado SNPs que son identificados a través de *Genotyping-by-sequencing* (GBS; Elshire et al., 2011) en melocotonero (Bielenberg et al., 2015) y cerezo (Guajardo et al., 2015). Esta metodología de secuenciación de última generación proporciona una representación del genoma de los individuos estudiados, tras digestión del ADN con enzimas de restricción y posterior secuenciación para la identificación de un gran número de marcadores de tipo SNP.

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de mapas de ligamiento para una población derivada del cruzamiento de dos patrones de melocotonero (‘Adafuel’ x ‘Flordaguard’, n = 118) utilizando SNPs identificados a través de GBS.

## Materiales y métodos

La población de mapeo (n=118) fue desarrollada a partir del cruzamiento de los portainjertos de melocotonero ‘Adafuel’ (*P. dulcis* x *P. persica*; 2n=2x=16; Cambra, 1990) x ‘Flordaguard’ (*P. persica* x *P. davidiana*; 2n=2x=16; Sherman et al., 1991). Esta población se encuentra establecida en un suelo pesado y calizo de la finca experimental de la EEAD-CSIC en Zaragoza, España. ‘Adafuel’ es un patrón tolerante a clorosis férrica y susceptible a la asfixia de raíces (Mestre et al., 2015), mientras que ‘Flordaguard’ es muy sensible a clorosis y más tolerante a la asfixia de raíces que ‘Adafuel’.

Extracción de ADN y cuantificación: El ADN genómico de los individuos de la población y de los parentales fue extraído a partir de hojas jóvenes utilizando el kit de extracción NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración de cada muestra de ADN utilizando espectrofotometría (Tecan Trading AG, Suiza) y se determinó su calidad a través de electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Genotyping-by-sequencing (GBS): Se preparó una librería para GBS a través de la digestión del ADN con las enzimas de restricción *PstI* y *MspI*, para cada individuo de la población y ambos parentales. Las librerías fueron secuenciadas utilizando el equipo Illumina HiSeq 2500 en el Laboratorio de Genómica Computacional de la Universidad de Clemson (*Clemson University Genomics Computational Laboratory*, CUGCL) en Carolina del Sur (Estados Unidos) siguiendo el protocolo descrito por Poland et al. (2012). Las secuencias obtenidas fueron alineadas al genoma de referencia de *Prunus* (Peach v2.1; Verde et al., 2107). Los SNPs fueron identificados según el cromosoma al que pertenecen (Chr1 a Chr8), seguidos por la posición física en pares de bases (pb).

Construcción de mapas de ligamiento: Los mapas de ligamiento se construyeron siguiendo el protocolo descrito en Guajardo et al. (2015), con la única diferencia de que se utilizó JoinMap 4 (Kyazma B.V., Holanda) en lugar de JoinMap 4.1.

## Resultados y discusión

Los estudios genéticos y la mejora genética requieren herramientas genómicas básicas, como los marcadores moleculares y los mapas de ligamiento. Este trabajo, hasta donde los autores tienen conocimiento, presenta los primeros mapas de ligamiento para patrones *Prunus* obtenidos a través de *Genotyping-by-sequencing* (GBS). Además, se utilizó la nueva versión del genoma de referencia de *Prunus* (Peach v2.1; Verde et al., 2017) para identificar la posición física de cada SNP. La información generada proporciona recursos valiosos en el análisis genético de especies del género *Prunus*.

Se identificó un grupo de 18.861 SNPs de alta calidad (MAF>0,05; *missing data* < 5%), distribuidos a lo largo de los ocho cromosomas. El número de SNPs identificados varió desde 1.447 para el cromosoma 7 hasta 4.014 para el cromosoma 1. Del grupo de 18,861 SNPs, 17.486 (92,7%) presentan segregación de tipo materna <mxll>, 842 (4,5%) presentan segregación de tipo paterna <nnxnp> y 533 (2,8%) presentan segregación de tipo <hkxhk>, que son heterocigotos en ambos padres y no fueron utilizados en los análisis. El bajo número de SNPs que presentan segregación paterna se explica por el origen de ‘Flordaguard’, un híbrido de dos especies de melocotonero (*P. persica* y *P. davidiana*). Se ha descrito el bajo nivel de variabilidad genética en melocotonero (Byrne, 1990) como una consecuencia de su sistema de autocompatibilidad gametofítica (Miller et al., 1989), a diferencia de lo que sucede con la mayoría de las especies del género *Prunus*, que presentan autoincompatibilidad gametofítica (Scorza et al., 1985).

El mapa de ligamiento obtenido para ‘Adafuel’, un híbrido interespecífico proveniente del cruzamiento entre un almendro (*P. dulcis*) y un melocotonero (*P. persica*), está compuesto por 660 SNPs mapeados en posiciones únicas, divididos en ocho

grupos de ligamiento (Ad-LG desde 1 a 8, Fig.1), con una distancia total de 464 cM (Tabla 1). Como resultado del bajo número de marcadores polimórficos de ‘Flordaguard’, sólo fue posible construir cuatro grupos de ligamiento (Fg-LG3, Fg-LG4, Fg-LG5 y Fg-LG7 en Fig. 1), con 83 SNPs y cubriendo 143,7 cM (Tabla 1). El tamaño obtenido para el mapa de ‘Adafuel’ es similar al obtenido en trabajos previos en melocotonero (Núñez-Lillo et al., 2015; Martínez-García et al., 2013; Yang et al., 2013).

En general, la posición en los grupos de ligamiento coincide con la posición física de los SNPs a lo largo de los cromosomas de la nueva versión del genoma de referencia de *Prunus* (Peach v2.1). Debido a que no se han publicado otros trabajos de construcción de mapas de ligamiento en que se utilice esta nueva versión para dar la posición física a los marcadores, no es posible comparar los resultados obtenidos con otros trabajos. En los análisis que se realizarán próximamente, se identificará la distribución de los SNPs en regiones asociadas a genes e intergénicas, para determinar el número de SNPs que podrían encontrarse en genes candidatos y que podrían tener un uso potencial en selección asistida por marcadores.

### Conclusiones

En este trabajo se han construido los primeros mapas de ligamiento para patrones *Prunus* utilizando SNPs identificados a través de *Genotyping-by-sequencing*, a los que se dio su posición física en base al genoma de referencia de *Prunus* v2.1. El grupo de SNPs identificados en este trabajo representa un valioso set de marcadores que podrán ser utilizados como base en la identificación de QTLs y genes relevantes en la mejora genética de patrones *Prunus*.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2011-24576, AGL2014-52063-R e INIA RFP 2015-00019, con la cofinanciación FEDER, y el Gobierno de Aragón-A44. También ha sido financiado por CONICYT-REGIONAL/GORE O’HIGGINS/CEAF/R08I1001 y el proyecto R16F20006 de Chile. Carolina Font i Forcada es beneficiaria de un contrato Juan de la Cierva-Incorporación 2017. Se agradece a la Dra. A.M. Casas y Dra. M.P. Vallés por facilitar los equipos para realizar la extracción de ADN y a P. Mignard y B. Montero por su apoyo en el proceso de extracción de ADN.

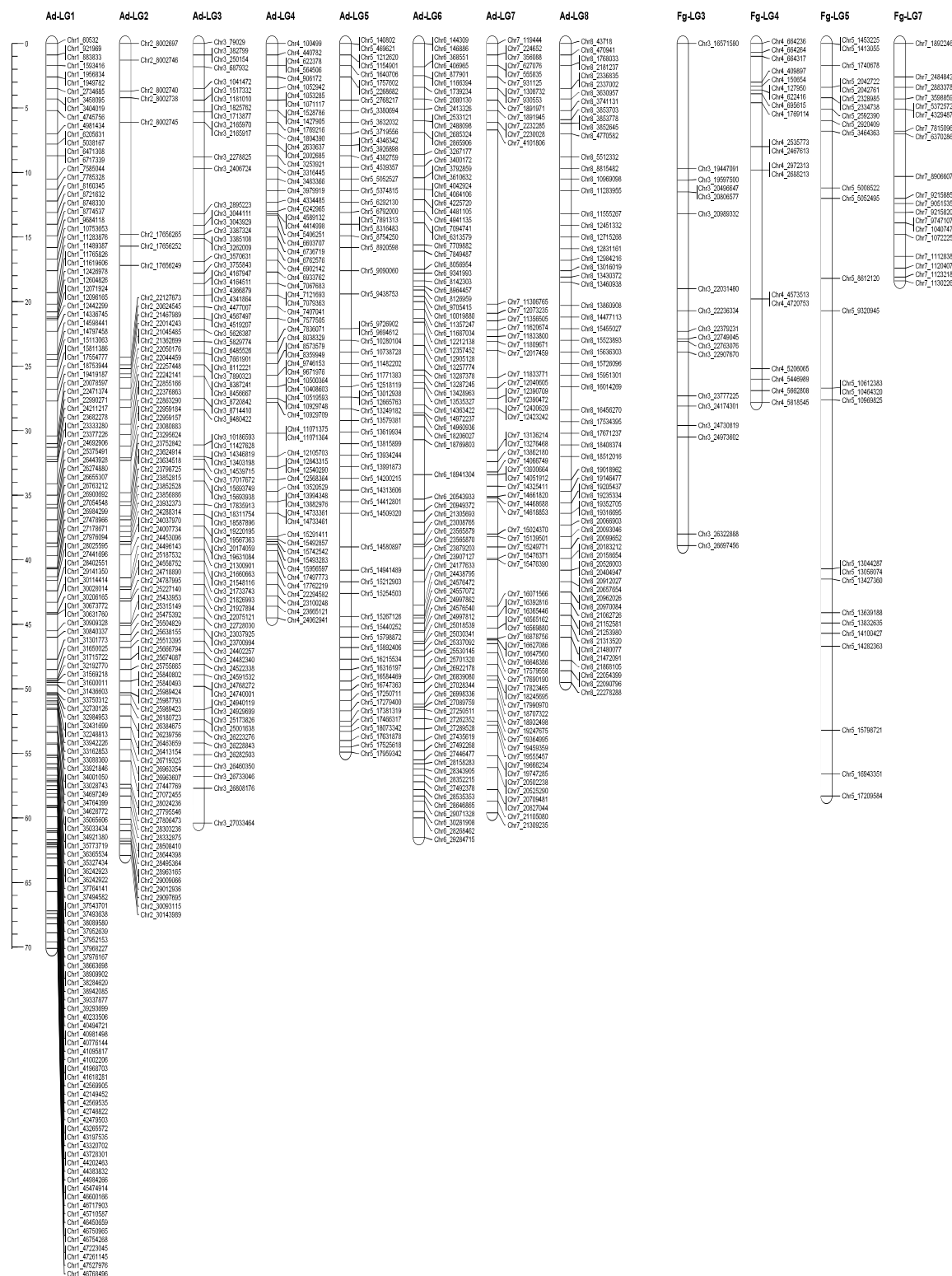
### Referencias

- Bielenberg, D.G., Rauh, B., Fan, S., Gasic, K., Abbott, A.G., Reighard, G.L., et al. 2015. Genotyping by sequencing for SNP-based linkage map construction and QTL analysis of chilling requirement and bloom date in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. PLoS ONE 10(10):e0139406.
- Byrne, D.H. 1990. Isozyme variability in four diploid stone fruits compared with other woody perennial plants. *Journal of Heredity* 81:68–71.
- Cambra, R. 1990. ‘Adafuel’, an almond×peach hybrid rootstock. *HortScience* 25(5):584-584.
- Cummins, J.N. & Aldwinckle, H.S. 1983. Rootstocks breeding. p. 294-327. In: J.N. Moore and J. Janick (eds.), *Methods in fruit breeding*. Purdue University Press, West Lafayette.
- da Silva, C., Bassi, D., Bianco, L., Pacheco, I., Pirona, R., & Rossini, L. 2015. Genetic dissection of fruit weight and size in an F2 peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) progeny. *Molecular Breeding* 35 (2):71.
- Eduardo, I., Chietera, G., Pirona, R., Pacheco, I., Troggio, M., Banchi, E., et al. 2013. Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach

- fruit: QTL analysis and identification of candidate genes using dense SNP maps. *Tree Genetics & Genomes* 9 (1):189-204.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., & Mitchell, S. E. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6(5):e19379.
- Fresnedo-Ramírez, J., Frett, T.J., Sandefur, P.J., Salgado-Rojas, A., Clark, J.R., Gasic, K., et al. 2016. QTL mapping and breeding value estimation through pedigree-based analysis of fruit size and weight in four diverse peach breeding programs. *Tree Genetics & Genomes* 12 (2):1-18.
- Frett, T.J., Reighard, G.L., Okie, W.R., & Gasic, K. 2014. Mapping quantitative trait loci associated with blush in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Tree Genetics & Genomes* 10 (2):367-381.
- Guajardo, V., Solís, S., Sagredo, B., Gainza, F., Muñoz, C., Gasic, K., et al. 2015. Construction of high density sweet cherry (*Prunus avium* L.) linkage maps using microsatellite markers and SNPs detected by genotyping-by-sequencing (GBS). *PLoS ONE* 10(5):e0127750.
- Klagges, C., Campoy, J.A., Quero-García, J., Guzmán, A., Mansur, L., Gratacós, E., et al. 2013. Construction and comparative analyses of highly dense linkage maps of two sweet cherry intra-specific progenies of commercial cultivars. *PLoS ONE* 8(1):e54743.
- Layne, E.E.C. 1987. Peach rootstocks. p. 185-216. In: R.C. Rom, R.F. Carlson (eds.). *Rootstocks for fruit crops*. John Wiley and sons, NY.
- Martínez-García P, Parfitt D, Ogundiwin E, Fass J, Chan H, Ahmad R, et al. 2013. High density SNP mapping and QTL analysis for fruit quality characteristics in peach (*Prunus persica* L.). *Tree Genetics & Genomes* 9:19-36.
- Mestre, L., Reig, G., Betrán, J.A., Pinochet, J., & Moreno, M.A. 2015. Influence of peach-almond hybrids and plum-based rootstocks on mineral nutrition and yield characteristics of 'Big Top' nectarine in replant and heavy-calcareous soil conditions. *Scientia Horticulturae* 192: 475-481.
- Miller, P.J., Parfitt, D.E., & Weinbaum, S.A. 1989. Outcrossing in peach. *HortScience* 24:359-360.
- Núñez-Lillo, G., Cifuentes-Esquivel, A., Troggio, M., Micheletti, D., Infante, R., Campos-Vargas, et al. 2015. Identification of candidate genes associated with mealiness and maturity date in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using QTL analysis and deep sequencing. *Tree Genetics & Genomes* 11(4):86.
- Peace, C., Bassil, N., Main, D., Ficklin, S., Rosyara, U.R., Stegmeir, T., et al. 2012. Development and evaluation of a genome-wide 6K SNP array for diploid sweet cherry and tetraploid sour cherry. *PLoS ONE* 7(12):e48305.
- Pirona, R., Eduardo, I., Pacheco, I., Linge, C.D.S., Miculan, M., Verde, I., et al. 2013. Fine mapping and identification of a candidate gene for a major locus controlling maturity date in peach. *BMC Plant Biology* 13(1):166.
- Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E., & Jannink, J. L. 2012. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE* 7(2):e32253.
- Rehder, A. 1940. *A manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America exclusive of the Subtropical and warmer temperate regions*. p. 162. 2<sup>nd</sup> ed. MacMillan, New York, USA.
- Romeu, J.F., Monforte, A.J., Sánchez, G., Granell, A., García-Brunton, J., Badenes, et al. 2014. Quantitative trait loci affecting reproductive phenology in peach. *BMC Plant Biology* 14 (1), 52.

- Scorza, R., Mehlenbacher, S.A. & Lightner, G.W. 1985. Inbreeding and coancestry of freestone peach cultivars of the eastern United States and implications for peach germplasm improvement. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110:547-552.
- Sherman, W.B., Lyrene, P.M., & Sharpe, R.H. 1991. Flordaguard peach rootstock. *HortScience* 26 (4):427-428.
- Verde, I., Bassil, N., Scalabrin, S., Gilmore, B., Lawley, C., Gasic, K. et al. 2012. Development and evaluation of a 9K SNP array for peach by internationally coordinated SNP detection and validation in breeding germoplasm. *PLoS One* 7(4):e35668.
- Verde, I., Jenkins, J., Dondini, L., Micali, S., Pagliarani, G., Vendramin, E., et al. 2017. The Peach v2. 0 release: high-resolution linkage mapping and deep resequencing improve chromosome-scale assembly and contiguity. *BMC Genomics* 18(1):225.
- Yang, N., Reighard, G., Ritchie, D., Okie, W., & Gasic, K. 2013. Mapping quantitative trait loci associated with resistance to bacterial spot (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) in peach. *Tree Genetics & Genomes* 9 (2):573-586.

Tablas y Figuras



**Figura 1** - Mapas de ligamiento obtenidos para ‘Adafuel’ (Ad) y ‘Flordaguard’ (Fg). Los marcadores redundantes han sido eliminados y sólo se presentan SNPs en posiciones únicas. La escala en centimorgan (cM) se presenta a la izquierda de la figura.

**Tabla 1** - Descripción de los mapas de ligamiento obtenidos para ‘Adafuel’ y ‘Flordaguard’.

GL	‘Adafuel’			‘Flordaguard’		
	Nº de SNPs	Largo (cM)	Dist. prom. entre SNPs (cM)	Nº de SNPs	Largo (cM)	Dist. prom. entre SNPs (cM)
1	145	70.1	0.5	nd	-	-
2	81	62.9	0.8	nd	-	-
3	81	60.4	0.7	18	38.9	2.2
4	66	44.5	0.7	19	27.8	1.5
5	64	55.0	0.9	27	58.3	2.2
6	90	61.5	0.7	nd	-	-
7	69	59.6	0.9	19	18.4	1.0
8	64	50.0	0.8	nd	-	-
<b>Total</b>	<b>660</b>	<b>464.0</b>	<b>0.7</b>	<b>83</b>	<b>143.4</b>	<b>1.7</b>