

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CONSTRUCCIÓN DEL PRIMER MAPA DE LIGAMIENTO DE LA
ESPECIE *Acca sellowiana* (Berg.) Burret EMPLEANDO
MARCADORES MOLECULARES**

por

Marianella Fernanda QUEZADA MACCHIAVELLO

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias opción
Ciencias Vegetales**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
diciembre 2011**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada con mención por el tribunal integrado por el Dr. Ariel Castro, el Dr. Pablo Speranza, el Dr. A. Augusto F. Garcia el 9 de diciembre 2011. Autor: Marianella Fernanda Quezada Macchiavello, Directora Dra. Clara Pritsch.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A mi orientadora Clara Pritsch, que me abrió las puertas de su laboratorio, enseñándome e impulsándome desde mis primeros trabajos de investigación.

A Pablo Speranza y Ariel Castro, el equipo académico que me apoyó y auxilió durante todas las etapas de las tesis, gracias por esas largas conversaciones y acertados consejos.

A Beatriz Vignale y todo el equipo de trabajo en Salto, los que siempre están al cuidado de las plantas, y ayudándonos a acercar el trabajo del laboratorio al campo y los productores

A Patricio Hinrichsen, Gonzalo Ravest y todo el equipo de INIA La Platina Chile que me dieron la oportunidad de pasar dos meses increíbles de trabajo junto a ellos.

A A. Augusto Garcia, Maria Marta Pastina, Guilherme, Adriana, Carina, Jones, Marcelo e todo o pessoal do Lab. de Estatística na ESALQ que me deu a oportunidade de conhecer o fascinante mundo da estatística.

Al todos los investigadores, estudiantes, productores, y fanáticos que conforman el grupo guayabo, con los que he compartido lindas jornadas y siempre han impulsado este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio que me han acompañado y apoyado durante todo este trabajo... Cynthia, Estela, Paulita, Susana, Alejandra, José.

A todos mis compañeros del departamento de Biología Vegetal, con los que he compartido trabajo de laboratorio, asados, fiestas y demás.

A los funcionarios de la Facultad de Agronomía, especialmente a Julio, Dora y Yolanda.

A mi familia que siempre me apoyó, y me dio fuerza para seguir adelante.

A Hugo, mi gran compañero y amor.

TABLA DE CONTENIDO

	páginas
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA.....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 <i>Acca sellowiana</i>	1
1.2 CITOGENÉTICA.....	2
1.3 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	3
1.4 USOS Y PRODUCCIÓN.....	5
1.5 MEJORAMIENTO GENÉTICO.....	7
1.6 MAPAS GENÉTICOS.....	9
1.7 JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO.....	12
1.8 OBJETIVOS.....	14
2. <u>PRIMER MAPA GENÉTICO DE <i>Acca sellowiana</i> EMPLEANDO MARCADORES MOLECULARES ISSR, AFLP Y SSR</u>	15
2.1 INTRODUCCIÓN.....	17
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.2.1. <u>Población de mapeo</u>	19
2.2.2. <u>Análisis de marcadores</u>	20
2.2.3. <u>Anotación de marcadores</u>	21
2.2.4. <u>Análisis de ligamiento y mapeo</u>	22

2.3	RESULTADOS.....	23
2.3.1.	<u>Marcadores moleculares</u>	23
2.3.2.	<u>Construcción de mapas monoparentales</u>	25
2.3.3.	<u>Construcción del mapa integrado</u>	26
2.4	DISCUSIÓN.....	30
2.5	BIBLIOGRAFÍA.....	35
3.	<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	42
4.	<u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u>	44
5.	<u>ANEXOS</u>	55
5.1	METODOLOGÍA DEL CRUZAMIENTO TCO x BR.....	55
5.2	MAPAS GENÉTICOS MONOPARENTALES TCO Y BR.....	57

RESUMEN

Acca sellowiana (Berg.) Burret, de la familia *Myrtaceae* es un frutal nativo originario del sur de Brasil y norte de Uruguay, con alto potencial agronómico dadas las elevadas cualidades nutricionales y organolépticas de su fruta y el alto valor industrial y/o biomédico de sus compuestos fitoquímicos. Es cultivado internacionalmente, mientras que en Uruguay el cultivo es limitado a la escala local. El Programa de Selección de Frutas Nativas (FA-UdelaR, INIA y la Dirección Forestal, MGAP) tiene como principal objetivo el desarrollo de cultivares que permiten alcanzar la producción comercial. Para ello se han realizado cruzamientos entre progenitores no endogámicos con destacadas diferencias en uno o más caracteres de interés agronómico. Se espera identificar genotipos superiores entre los individuos de la familia F_1 de hermanos enteros generados. Una de estas poblaciones se ha utilizado para la construcción del primer mapa de ligamiento genético de *A. sellowiana* ($2n=22$) empleando una progenie de 160 individuos y marcadores moleculares ISSR, AFLP y SSR. La estrategia de mapeo convencional doble cruzamiento prueba fue utilizada para la construcción de dos mapas parentales individuales. El mapa del progenitor femenino TCO está formado por 42 marcadores asignados a 10 grupos de ligamiento, cubriendo 827,6 cM y con una distancia promedio entre marcadores de 26,8 cM. El mapa del progenitor masculino BR está formado por 60 marcadores asignados a 17 grupos de ligamiento, cubriendo 1142,5 cM y una distancia promedio entre marcadores de 26,5 cM. Para la construcción del mapa integrado utilizamos un abordaje basado en el método máxima verosimilitud que permite la estimación simultánea de ligamiento y las fases de ligamiento, especialmente diseñado para especies alógamas. El mapa integrado comprende 224 marcadores, incluyendo 115 marcadores *testcross* y 109 *intercross*, que fueron asignados a 15 grupos de ligamiento mayores y 23 menores (tripletes y dobletes), representando un largo total de mapa de 2927,9 cM y una distancia promedio entre marcadores de 16 cM. El mapa presentado constituye una valiosa herramienta para el mejoramiento molecular en *A. sellowiana* y especies emparentadas.

Palabras clave: Feijoa, frutos nativos, mapa genético, F_1 pseudo-cruzamiento, máxima verosimilitud

DEVELOPMENT OF THE FIRST GENETIC LINKAGE MAP OF *Acca sellowiana* (Berg.) Burret BASED ON MOLECULAR MARKERS

SUMMARY

Acca sellowiana (Berg.) Burret, belonging to the *Myrtaceae* family, is a native fruit tree from southern Brazil and northern Uruguay that has documented commercial potential due to the appreciated nutritional and organoleptic properties of its fruits, and highly valued industrial and/or biomedical bioactive components. Commercial orchards are reported in New Zealand, Colombia, United States, Spain and Israel, but in Uruguay it is cultivated only on a small scale. The Programa de Selección de Frutas Nativas (FA-UdelaR, INIA, MGAP) is in charge to breed cultivars to scale up *A. sellowiana* commercial production in Uruguay. For this purpose, a number of segregating full-sib families, obtained from different biparental crosses, were made in order to identify elite genotypes. One of these families, TCO x BR of 160 progeny was selected to construct the first genetic linkage map of *A. sellowiana* (Berg.) Burret ($2n=22$) using ISSR, AFLP and SSR molecular markers. A traditional two way pseudo-testcross mapping strategy was used for the construction of two individual parental maps. For TCO female parent map, 10 linkage groups were mapped with 42 markers, covering 827,6 cM of the genome and an average distance between markers of 26,8 cM. For BR male parent map, 17 linkage groups were mapped with 60 markers, covering 1141,5 cM of the genome and an average distance between markers of 26,5 cM. To develop an integrated map we used a novel method, specially designed for outcrossing species, based on the maximum-likelihood approach that allowed the simultaneous estimation of linkage and linkage phases. The integrated map comprised 224 linked markers, including 115 testcross markers and 109 intercross markers that were assigned to 15 major and 23 minor (triplets and doublets) linkage groups, representing a total map length of 2927,9 cM and an average distance between markers of 16 cM. This map will provide reference information for future molecular breeding work on *A. sellowiana* and related species.

Keywords: Feijoa, native fruits, genetic linkage map, F1 pseudo-test cross, maximum-likelihood

INTRODUCCIÓN

1.1 *Acca sellowiana*

La especie *Acca sellowiana* (Berg.) Burret, es un árbol frutal conocido popularmente en nuestro país por el nombre del “guayabo” o “guayabo del país”. En Brasil es conocido como *goiabeira do mato*, *goiabeira da serra* o simplemente *feijoa*, mientras que internacionalmente es conocido como *feijoa* y *pineapple guava*.

Esta especie forma parte de la familia *Myrtaceae*, que comprende cerca de 3600 especies agrupadas en 250 géneros con amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales (Cronquist, 1981). Esta familia ha sido tradicionalmente subdividida en dos subfamilias: *Leptospermoideae*, con centro de diversidad en Oceanía y especies con hojas alternas y frutos secos; y la subfamilia *Myrtoideae* con especies de fruto carnoso y hojas opuestas o verticiladas, con centro de diversidad en la región Neotropical (Wilson *et al.*, 2001, Cronquist, 1981). Dentro de la subfamilia *Myrtoideae*, *Acca* se ubica en la tribu *Myrteae* que alberga un gran número de especies con alto valor como cultivos frutales: *Psidium guajava* (guayabo brasileiro), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Psidium cattleianum* (arazá) y *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba). Dentro del género *Acca*, además de *A. sellowiana* son encontradas otras dos especies *A. lanuginosa* (Ruiz y Pavon ex G. Don) McVaugh y *A. macrostema* (Ruiz y Pavon ex G. Don) McVaugh, ninguna con presencia de frutos comestibles (Thorp y Bielecki, 2002).

Acca sellowiana es un árbol pequeño de altura variable que puede alcanzar de 2 a 4 m, sin sobrepasar los 6 m. Presenta una corteza escamosa color rojizo con follaje y flores vistosas, la copa es muy ramificada con hojas persistentes (Mattos, 1969, Ducroquet *et al.*, 2000). Las hojas son pecioladas con una disposición opuesta en el tallo, las mismas presentan una lámina coriácea y ovada, pudiendo variar entre oval oblongas y obovadas. La cara abaxial presenta pilosidad otorgando un color blanquecino-grisáceo mientras que la cara adaxial es verde oscura, brillante y glabra con una nerviación poco visible.

La estructura floral se compone de un cáliz con cuatro sépalos desiguales y la corola conformada por cuatro pétalos carnosos, de forma ovada y profundamente recurvados, color rojizo por dentro y blanco-ceroso por fuera, muy vistosos y comestibles. Los estambres son erectos, color violeta, culminan en anteras ovadas, color amarillo, se encuentran presentes en un número de 60 a 90, el estilo es violeta, glabro y el estigma capitado. La distancia sobre el plano de las anteras es variable pudiendo llegar hasta los 15 mm. El ovario es ínfero y presenta un número elevado de óvulos. Numerosas semillas, abortivas en su mayoría, redondas u acorazonadas, presentan una cubierta. El embrión presenta dos cotiledones carnosos y radícula de igual largo (Ducroquet *et al.*, 2000, Landrum 1986, Mattos 1969, Legrand 1968, Popenoe 1912).

Acca sellowiana es una especie predominantemente alógama con flores hermafroditas que posee barreras para la autofecundación (Santos *et al.*, 2007a). Se ha reportado una tendencia a la dicogamia por protoginia, es decir que la receptividad del estigma se extiende desde veinticuatro horas antes y más de diez horas después de la dehiscencia de las anteras (Mattos, 1986). Adicionalmente, pueden encontrarse sistemas de auto-incompatibilidad en donde los tubos polínicos generados por el polen propio no logran exitosamente fecundar la oosfera (Thorp y Bielecki, 2002). Recientemente se detectó evidencia de la existencia de sistemas de auto-incompatibilidad tardía relacionados con una respuesta post-cigótica, estos son sugeridos debido a que tanto la germinación del grano de polen como el crecimiento del tubo polínico no se ven afectados y considerando que el aborto de los frutos ocurre de manera uniforme y en corto plazo entre 20 y 30 días después de la fertilización (Finatto *et al.*, 2011, Santos *et al.*, 2007a).

1.2 CITOGENÉTICA

El estudio del número cromosómico en 15 especies de la familia *Myrtaceae*, revelaron que el número diploide más común es $2n=2x=22$, con un número cromosómico básico para la familia de $x=11$ (Matsumoto *et al.*, 2000, Rye, 1979, Atchinson, 1947). Un estudio cariotípico para el género *Eucalyptus* (*Myrtaceae*) en siete especies indicó consistentemente un cariotipo de $2n=22$ cromosomas (Matsumoto *et al.*, 2000). Costa *et al.*, (2008) confirma la predominancia del número básico $x=11$, sobre la base de recuentos cromosómicos

efectuados en especies dentro de la tribu *Myrteae*. Las variaciones numéricas encontradas en algunas especies de la familia se limitaron al nivel de ploidía, encontrándose distintos citotipos en los géneros *Eugenia* ($2n=22, 33, 44, 66$) y *Psidium* ($2n=33, 55, 66, 88$) (Andrade y Forni-Martins, 1998).

El número cromosómico de *A. sellowiana* fue propuesto por Atchinson (1947) como $2n=22$ confirmando la naturaleza diploide de la especie. Estudios recientes en Brasil (Costa y Forni-Martins, 2007) y estudios iniciados en Uruguay (Cristina Mazzella, comunicación personal¹) confirman este número. El tamaño de los cromosomas varió de 0,74 a 2,46 μm (Cristina Mazzella, comunicación personal²), dentro del tamaño promedio pequeño reportado para la familia. El tamaño del genoma nuclear reportado para este género es de $2C=0,503$ pg (Costa *et al.*, 2008). En consecuencia, *A. sellowiana* es una especie diploide, de genoma muy pequeño (Leitch *et al.*, 1998), cuyo tamaño equivale a una vez y media el tamaño del genoma reportado para *Arabidopsis thaliana* (0,32 pg) (Galbraith *et al.*, 1991).

1.3 DIVERSIDAD GENÉTICA

Se considera la región austro-brasileña, distribuyéndose en un amplio cinturón subtropical que se extiende desde suroeste del Paraná hasta el sur de Río Grande del Sur y mitad norte de Uruguay como el centro de origen de *A. sellowiana* (Thorp y Bielecki, 2002). Otros autores amplían la extensión de la especie por haber sido reportada su ocurrencia en estado silvestre en regiones de Paraguay y Argentina (Popenoe, 1912). Se presupone que los pequeños núcleos encontrados fueron originados por injerencia antrópica, al igual de lo que ocurre en otras regiones de Brasil (Ducroquet *et al.*, 2000). Sin embargo, recientemente Keller y Tressens (2007) registraron la ocurrencia espontánea de la especie en Argentina, al sur de la provincia de Misiones.

Debido a la gran variabilidad morfológica detectada en el centro de origen, la especie puede ser dividida en dos poblaciones o tipos. El "Tipo Uruguay" presenta plantas con cara

¹ 28 de mayo de 2009

² 28 de junio de 2009

abaxial blanquecina, pubescentes y con semillas pequeñas (0,20 g cada 100 semillas), comparado con el "Tipo Brasil". Este presenta hojas con cara abaxial verde clara, de escasa pilosidad y frutos con semillas mayores (0,45 a 0,60 g para 100 semillas) (Thorp y Bieleski, 2002, Ducroquet *et al.*, 2000). El origen de la variación fenotípica entre estas poblaciones con diferente área de distribución no ha sido aún estudiado.

En el Uruguay, la primera evaluación del estudio de la variabilidad morfológica y fenológica de la especie, fue realizada por Mattos (1986), que reportó una gran diversidad entre materiales mejorados y cultivados en Montevideo y una gran diferencia entre éstos y los materiales silvestres del norte del país. Igualmente, estudios preliminares realizados por Tállice *et al.* (1996), detectaron diversidad en fecha de floración y fructificación, abundancia de frutos y flores, grosor, rugosidad y color de la cáscara y jugosidad de la pulpa en base a pocas accesiones relevadas en el norte del país.

Más recientemente, Puppo (2008) realizó un trabajo de prospección de cuatro poblaciones silvestres en el noreste de Uruguay, encontrando como resultado una alta variabilidad, siendo la diversidad entre poblaciones menor o igual que la diversidad dentro de las poblaciones e identificando cinco grupos morfológicos que evidenciaron la estructura de interna de las poblaciones. Este análisis de diversidad se realizó utilizando una lista de descriptores cuantitativos (16) y cualitativos (10) propuestos para esta especie en el mismo trabajo. Estas mismas poblaciones fueron analizadas empleando marcadores moleculares RAPD, con el objetivo de evaluar la diversidad genética a nivel del ADN y exenta de la variación ambiental. Los resultados moleculares obtenidos mostraron una clara estructura genética en cuatro grupos correspondientes a las cuatro poblaciones silvestres; sin embargo, no se obtuvo evidencia que los grupos morfológicos reportados por Puppo (2008) fueran responsables de la estructura observada (Baccino, 2011).

Paralelamente, se han evaluados individuos promisorios provenientes de ambientes antrópicos (cascos de estancias, viveros), poblaciones silvestres y/o derivados a algún tipo de selección artificial (huertas productivas) que son considerados de mayor potencial productivo. Estos conforman el Jardín de Introducción de *A. sellowiana* ubicado en la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía de Salto (EFFAS) donde se han evaluado

caracteres morfológicos y agronómicos por varios años, detectándose una gran variabilidad en caracteres como tamaño y forma de las frutas, sabor, espesor de cáscara, época de maduración y productividad (Vignale *et al.*, 2006). Igualmente, marcadores moleculares RAPD fueron utilizados para evaluar el nivel de variabilidad genética entre los materiales (Quezada, 2008). El estudio de 33 genotipos destacados demostró una importante riqueza alélica, claramente diferenciada de materiales provenientes de Brasil y Nueva Zelanda. Este resultado, sumado a la muy buena performance agronómica de los materiales, los posiciona como un germoplasma valioso para la aplicación de esquemas de mejoramiento genético, y la generación de materiales novedosos. El uso de herramientas biotecnológicas que auxilien este programa de mejoramiento permitiría reducir en costos y tiempo la obtención de cultivares adaptados a las condiciones locales

1.4 USOS Y PRODUCCIÓN

El fruto de *A. sellowiana* presenta importantes concentraciones de yodo (3 mg/100g) y de vitamina C (35 mg/100g), comparable al presente en naranja (Ducroquet *et al.*, 2000). La alta acidez del fruto está determinada por el ácido cítrico 59,8 %, el ácido succínico con 29,7 % y el ácido málico 10,4 % (Cardona *et al.*, 2002). En la evaluación de los porcentajes totales de sólidos solubles (Degenhardt *et al.*, 2003), estos valores se registraron en un rango comprendido entre el 9,7 – 11%. Los azúcares presentes en los guayabos son mayormente sacarosa, fructuosa y glucosa (Harman, 1987). Martínez (2007), detectó la presencia de micronutrientes de importancia a nivel nutricional, entre ellos Ca, Mg, Na, K, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Co, Se y P, en proporciones que superan el nivel presente en otras frutas ampliamente consumidas (ananá, banana, frutilla, limón y mandarina entre otros). El estudio de los compuestos volátiles del fruto (Di Cesare, 1995) determinó que los principales responsables del intenso y característico aroma del fruto de *A. sellowiana* son benzoatos de metilo y etilo encontrados principalmente en la cáscara.

En otros estudios (Weston, 2010) se ha comprobado las propiedades farmacológicas de los frutos, destacándose las actividades antibacteriana y antioxidante, así como la presencia de flavonoides. Éstos participan en la actividad inmunológica, determinando repuestas en procesos inflamatorios y alérgicos. El trabajo de Bontempo *et al.* (2007) reveló la presencia de

flavonoides como componente activo en los extractos, con actividad anticancerígena en células sólidas y hematológicas que presentaban cáncer.

En virtud de las propiedades nutricionales y organolépticas, el fruto de *A. sellowiana* se destina esencialmente al consumo en fresco. Sin embargo, los frutos pueden ser procesados para la producción de jugos, mermeladas, helados, vinos y bebidas artesanales. En Nueva Zelanda se han reportado más de 13 productos derivados, entre estos se destacan los jugos y “vinos”, puros o mezclados con jugos de otros frutos, helados y otros dulces congelados y los chips de guayabo usados en mezclas de cereales (Thorp y Bielecki, 2002). En Colombia, además de los productos ya citados es interesante el mercado de piezas de fruto deshidratado (Nagle, 2004).

En concordancia con el desarrollo de la industria del procesamiento del fruto, actualmente los principales productores de *A. sellowiana* son Nueva Zelanda y Colombia. En el primero existen cerca de 230 productores, cultivando un área de 350 hectáreas con una producción media de 950 toneladas por zafra (Thorp y Bielecki, 2002). En Colombia, el área actual del cultivo abarca unas 220 hectáreas y con excelente perspectivas de expansión (Nagle, 2004). A menor escala, en Estados Unidos, España e Israel también se cultiva *A. sellowiana* comercialmente.

El comercio de fruta de *A. sellowiana* en Nueva Zelanda tiene un monto anual de U\$ 600 mil, de los cuales U\$ 150 mil provienen de la exportación de frutos. El valor medio de comercialización de frutos oscilaba en torno a los U\$ 4,00/Kg en el 2002 y se observaba una tendencia al aumento (Thorp y Bielecki, 2002). Dado la escasa información más actualizada sobre el mercado de la especie, en Brasil fueron realizados estudios adicionales en los cuales la estimativa de comercialización del fruto fue de U\$ 2,00/kg, demostrando el gran potencial para el desarrollo comercial del cultivo (Barni *et al.*, 2004).

En los países centro de origen de la especie, Brasil y Uruguay, la producción de *A. sellowiana* no ha alcanzado todavía una escala comercial. En Uruguay la comercialización puede definirse como de tipo informal ya que el volumen transado es reducido, con venta directa a comercios minoristas. Se ha detectado la presencia de granjas frutícolas con montes

establecidos de guayabo con destino comercial. Los productores a cargo de dichas granjas han señalado que la principal desventaja del cultivo es la gran variabilidad de genotipos en cultivo (plantas provenientes de semillas de plantas seleccionadas) que en consecuencia genera una gran desuniformidad en calidad (tamaño, sabor, apariencia) de frutas (Beatriz Vignale, comunicación personal³). Sumado a esto, un sondeo de mercado de la fruta realizado en la Facultad de Agronomía (Montevideo, Uruguay), reveló que un 43% de los encuestados no conocía la fruta (Rivas *et al.*, 2007).

1.5 MEJORAMIENTO GENÉTICO

El proceso de domesticación de *A. sellowiana*, fue iniciado fuera de su centro de origen, e incentivado por la primera importación de la especie fuera de sud América. En el año 1890 el botánico André introdujo la especie en Francia, que fue rápidamente diseminada dado el destacado potencial agronómico de los frutos, así como su valor como planta ornamental (Popenoe 1912). De acuerdo a Thorp y Bielecki (2002) los cultivares modernos procederían de manera directa o indirecta de las introducciones llevadas a cabo por André, por lo cual presentarían una base genética estrecha.

Los primeros cultivares modernos se obtuvieron en la década del 50 en Estados Unidos, representando las primeras plantaciones comerciales significativas. Los tres cultivares mas destacados Coolidge, Superba y Choiciana son probablemente derivados de la polinización abierta de plantas procedentes del material de André (Thorp y Bielecki, 2002). Posteriormente, el proceso de mejoramiento se extiende a Nueva Zelanda y para el año 1979 ya habían sido liberados los cultivares con mas amplia difusión hasta la actualidad: Apollo, Unique y Gemini. El éxito de los cultivares desarrollados incentivó el cultivo de la especie en otros países como Colombia, Israel, España y el desarrollo del cultivares adaptados a las condiciones locales, siempre a partir de la estrecha base genética disponible.

En el esfuerzo por incentivar el cultivo de un recurso genético nativo con potencial comercial comprobado en el exterior, Brasil y Uruguay han iniciado procesos de

³ 15 de julio de 2008

domesticación y mejoramiento de esta especie. Contrariamente a los procesos de mejoramiento en el exterior, éstos se han iniciado con el relevamiento de la variabilidad genética existente en la naturaleza al estar localizados en el centro de origen.

En el año 1985 Brasil inició un programa experimental que comenzó con la recuperación del material genético en su estado natural o de cultivo para su posterior evaluación y selección de clones aptos para el cultivo a gran escala. En este proceso fueron introducidos cultivares procedentes de Nueva Zelanda y Estados Unidos para acceder a nuevos atributos de interés agronómico. Dos estrategias principales se han implementado para el desarrollo de nuevos cultivares: prospección y evaluación del desempeño agronómico de los materiales; y la evaluación de poblaciones F_1 obtenidas del cruzamiento de progenitores previamente seleccionados. Cuatro cultivares desarrolladas en Brasil han sido liberados: Alcântara, Helena, Mattos y Nonante (Ducroquet *et al.*, 2007; Ducroquet *et al.*, 2008). Entre estos, Helena y Nonante son provenientes de cruzamientos, Alcântara de selección de plantas provenientes de colectas de semillas y Mattos de propagación vegetativa de un genotipo silvestre destacado en el Banco Activo de Germoplasma de EPAGRI (Santa Catarina, Brasil).

En Uruguay, el proceso de mejoramiento de *A. sellowiana* comenzó bajo el programa de Selección de Frutas Nativas con interés comercial realizado por Facultad de Agronomía (FA-UdelaR), el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y la Dirección Forestal (MGAP). El programa de mejoramiento y selección comenzó en el año 2000, con la instalación del Jardín de Introducción (EEFAS) el cual contiene colectas de variedades locales mayormente provenientes de cascotes de estancias y de pequeños cuadros en producción en quintas de productores; asimismo, también se incluyen algunas accesiones de poblaciones sub-espontáneas y materiales silvestres. En todos los casos, el criterio de colecta fue la observación de un buen nivel de calidad de fruta. La colección cuenta con más de 80 accesiones en evaluación agronómica y puede considerarse una de las más importantes colecciones de *A. sellowiana* "Tipo Uruguay" a nivel internacional. Entre los objetivos principales del programa de selección, se encuentra la liberación de cultivares comerciales adaptados a nuestras condiciones, lo que impulsaría el desarrollo comercial de este recurso nativo.

Frente a la amplia variabilidad genética disponible ya reportada, el programa de mejoramiento de guayabo FA-UdelaR – INIA – MGAP ha diseñado dos estrategias básicas para el desarrollo de nuevas variedades. La primera consiste en la selección de genotipos elegidos a campo, seguido de su propagación vegetativa y posterior evaluación en el Jardín de Introducción. La segunda estrategia implica generar progenies segregantes bajo dos modalidades; en un caso se evalúan plantas medias hermanas provenientes de semillas de individuos seleccionados; en el otro caso, se generan progenies de plantas hermanas enteras originadas de cruzamientos dirigidos entre padres seleccionados. Dentro del programa de mejoramiento, también se han realizado esfuerzos en el área de propagación vegetativa, con el objetivo de permitir la propagación de los futuros genotipos seleccionados. Las iniciativas se han centrado en la evaluación de métodos de la propagación vegetativa por estaquillado e injerto, así como por técnicas de micropropagación (Salvarrey, 2008, Pritsch *et al.*, 2007).

1.6 MAPAS GENÉTICOS

Entre los avances más importantes en la genómica y biología molecular de plantas cultivadas se distingue el desarrollo de mapas genéticos a partir de marcadores moleculares. Los mapas genéticos consisten en una representación lineal de los marcadores en grupos de ligamiento, en los cuales está representando el orden y las distancias entre los marcadores genéticos, en base a las estimaciones de recombinación. Los grupos de ligamiento se corresponden con el número haploide de cromosomas de una especie (Semagn *et al.*, 2006).

Los mapas genéticos pueden contribuir al mejoramiento genético mediante la selección asistida por marcadores, el descubrimiento de genes, la localización de regiones genómicas asociadas a la herencia de caracteres cuantitativos QTL (Quantitative Trait Loci) y estudios de sintenia (conservación de los genes y su orden en regiones cromosómicas). Sumadas a éstos, presentan importantes aplicaciones para el conocimiento básico de la organización y evolución del genoma de una especie, la identificación de genes ortólogos, estudios de mapeo comparativo entre especies emparentadas, y son referencia necesaria en los procesos de ensamblaje de la secuencia completa del genoma. El uso más importante de los mapas genéticos es la identificación de regiones cromosómicas conteniendo genes y QTLs

asociados con características agronómicas de interés (Collard *et al.*, 2005). En el caso de especies de interés frutícolas, se han desarrollado gran cantidad de mapas genéticos y en varios de ellos se han localizado QTLs asociados a calidad de fruta, productividad y resistencia a enfermedades (Sooriyapathirana *et al.*, 2010, Welter *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2000, Dirlwanger *et al.*, 1999)

En la construcción de un mapa genético, se deben considerar premisas importantes para cada uno de los pasos que involucran el proceso. En primer lugar, el establecimiento de la población de mapeo debe considerar el sistema reproductivo de la especie, las características de interés en los progenitores y el número de individuos analizados resultantes del cruzamiento. En la etapa de genotipado se debe considerar el tipo de marcador utilizado (dominante-codominante) y la cantidad de marcadores, así como la verificación individual del ajuste de los marcadores al patrón de segregación esperado. Finalmente, las metodologías de análisis genéticos y estadísticos deben ser adecuadas y robustas, de forma de optimizar el cálculo de la fracción de recombinación, las estimaciones de distancia y el orden de los marcadores dentro de los grupos de ligamiento (Semagn *et al.*, 2006, Carneiro y Carneiro, 2002).

Las tecnologías disponibles de manipulación del ADN posibilitan que un número casi ilimitado de marcadores puedan ser detectados en el genoma, a partir de varias metodologías que exploran el polimorfismo del ADN. Entre estas, el desarrollo de la tecnología de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permitió el surgimiento de una amplia gama de marcadores moleculares como ser los RAPDs (*Rapid Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) que consecuentemente fueron utilizados en la construcción de mapas genéticos. Éstos presentan como principal ventaja que para su aplicación no es necesario un conocimiento previo de las secuencias del genoma de la especie a estudiar (Semagn *et al.*, 2006). Son marcadores dominantes y de buen a muy buen nivel de informatividad (capacidad de detectar polimorfismos entre individuos por reacción). Otros marcadores derivados de la técnica de PCR son los SSR (*Simple Sequence Repeat*). Estos se destacan por ser mayoritariamente codominantes y multialélicos, por lo tanto muy informativos en el desarrollo de mapas genéticos. Sin embargo, la obtención de los mismos es muy laboriosa y costosa, aunque se

ha demostrado un nivel aceptable de transferibilidad de estos marcadores entre especies emparentadas (Barbará *et al.*, 2007).

Se utilizan varios tipos de poblaciones en la construcción de mapas genéticos en especies vegetales. Las poblaciones convencionales como F_2 o retrocruzamientos, son originadas directa o indirectamente a partir de líneas parentales endocriadas. Sin embargo, para algunas especies, la presencia de auto-incompatibilidad, la ocurrencia de depresión por endogamia o el largo ciclo reproductivo impiden la generación de líneas parentales endocriadas (Semagn *et al.*, 2006). En estas especies, está ampliamente difundida la estrategia de doble cruzamiento prueba, que implica el cruzamiento de progenitores no endocriados y el análisis de una población F_1 de hermanos enteros (Grattapaglia y Sederoff, 1994).

En una familia de hermanos enteros derivada de dos progenitores no endocriados, uno o ambos progenitores pueden ser heterocigota en los marcadores dominantes o codominantes y las fases de ligamiento entre los progenitores no son conocidas *a priori* (Maliepaard *et al.*, 1997). En este tipo de poblaciones, hasta cuatro alelos, incluyendo alelos nulos pueden estar segregando en la población, además de que el número de alelos varía entre loci. Dependiendo de cómo se combinan los alelos en cada progenitor, y del carácter dominante/codominante del marcador existe un total de 18 tipos de configuraciones genéticas posibles, asociadas a cuatro tipos de segregaciones posibles en la población (1:1:1:1, 1:2:1, 3:1, 1:1) (Wu *et al.*, 2002). Frente a esta dificultad estadística, la primera estrategia establecida por Grattapaglia y Sederoff (1994) se basó en un análisis genético para cada progenitor separadamente, utilizando exclusivamente marcadores moleculares dominantes que segregaran 1:1, en la población F_1 siendo el alelo dominante aportado por uno u otro padre. Como resultado, con este método se construyen mapas de ligamiento individuales para cada progenitor, denominados mapas monoparentales. La integración de estos mapas puede ser realizada empleando marcadores dominantes, en este caso presentes en ambos padres con segregación 3:1. Sin embargo, Maliepaard *et al.* (1997) postularon que la inclusión de estos marcadores generaría estimaciones sesgadas afectando la precisión del orden y la distancia entre los marcadores en el mapa integrado. Frente a esta limitante, Wu *et al.* (2002) propusieron una nueva metodología dirigida a generar mapas integrados más

consistentes. Esta se basa en identificar las fases de ligamiento entre los pares de marcadores en base a la probabilidad *a posteriori* de cada fase de ligamiento simultáneamente determinando tanto las fases de ligamiento como las frecuencias de recombinación. Además, la inclusión en el análisis de marcadores codominantes, multialélicos SSR, permite la detección de la presencia de alelos nulos así como detectar todos (cuatro) tipos de segregación esperada (Wu *et al.*, 2002).

1.7 JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO

Con el objetivo de incentivar a nivel local el cultivo comercial de la especie *A. sellowiana*, el programa de mejoramiento de guayabo FA-UdelaR – INIA – MGAP postuló como objetivo principal el desarrollo de cultivares apropiados para nuestra región. Para el éxito del cultivo, los cultivares seleccionados deben reunir características superiores a las plantas en estado silvestre, en términos de productividad, estabilidad en la producción y calidad de fruta. Para la generación de dichos cultivares, resulta fundamental el conocimiento de las bases genéticas del germoplasma disponible. En este sentido, los trabajos de evaluación de caracteres morfológicos y el uso de marcadores moleculares han sido herramientas útiles en la caracterización del germoplasma de guayabo local, permitiendo estimar el nivel de diversidad genética, el grado de parentesco entre las accesiones, así como identificar genotipos con marcado potencial para la producción comercial.

Los procesos de mejoramiento genético en especies frutales resultan ser extremadamente largos y costosos, por lo que actualmente se han incorporado diversas herramientas biotecnológicas que permiten acelerar los procesos de mejora, facilitando el diseño e identificación de genotipos recombinantes y mejorando la utilización del acervo genético disponible mediante la caracterización de sus genomas. Entre estas metodologías se destacan la construcción de mapas genéticos y físicos, el análisis de QTLs, la selección asistida por marcadores, la generación de catálogos de EST, entre otras. Para las especies frutales de gran importancia económica como manzano, durazno, pera, vid, es posible acceder a una enorme cantidad de información estructural y funcional del genoma de estas especies (Velasco *et al.*, 2010, Vezzulli *et al.*, 2008, Dirlwanger *et al.*, 2004). Sin embargo, lo relevante del desarrollo tecnológico actual, es que permite aun para especies frutales

consideradas huérfanas *i.e.* de menor impacto internacional y con menor cantidad de conocimiento acumulado, realizar considerables avances en la descripción básica de la estructura de sus genomas. Es así que en especies sub utilizadas como el fruto de la pasión (*Passiflora edulis*) (Oliveira *et al.*, 2008), el pecan (*Carya illionensis* (Wangenh.) K. Koch) (Beedanagari *et al.*, 2005), el cajú (*Anacardium occidentale* L.) (Cavalcanti y Wilkinson, 2007) y la guayaba (*Psidium guajava*) (Lepitre *et al.*, 2010) se han desarrollado recientemente mapas genéticos, en apoyo a los programas de mejoramiento convencionales.

En este sentido, la especie *A. sellowiana* presenta destacadas ventajas para los análisis genéticos y la construcción de un mapa genético. Entre estos la simple estructura de su flor, que permite la realización de cruzamientos específicos; la alta producción de frutos y semillas, lo que permite generar un número grande de progenies; así como un periodo juvenil corto. Sumado a esto se encuentra en estado diploide, un número diploide conocido ($2n=22$) y genoma pequeño ($2C = 0,503$ pg). Finalmente debido a la potencial transferibilidad de los marcadores SSR, generados entre especies emparentadas y la sintenia observada generalmente entre mapas genéticos dentro de una misma familia, es razonable esperar que los avances de la comunidad científica ya logrados en otras especies Mirtáceas como la identificación de marcadores SSR (Lepitre *et al.*, 2010, Rojas *et al.*, 2008, Brondani *et al.*, 2006) y la elaboración de mapas genéticos tanto en *Psidium guajava* (Lepitre *et al.*, 2010, Ritter *et al.*, 2010) como en *Eucalyptus spp* (Brondani *et al.*, 2006) contribuyan con información relevante para el desarrollo del mapa genético de *A. sellowiana*, el cual hasta el momento no ha sido reportado.

1.8 OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar el primer mapa genético de *A. sellowiana*, a partir de una población F₁ de hermanos enteros obtenida del cruzamiento entre dos genotipos con fenotipos contrastantes para caracteres de interés agronómico, empleando marcadores moleculares.

Objetivos específicos:

- Generar un alto número de marcadores moleculares ISSR, AFLP y SSR para ser aplicados en la población de mapeo TCO x BR.
- Identificar marcadores adicionales, puentes de las especies *Eucalyptus grandis*, *Psidium guajava* y *Myrciaria dubia*, que puedan ser utilizados en estudios de mapeo comparativo.
- Construir un mapa genético integrado de *A. sellowiana* empleando una metodología que permite la estimación simultánea del ligamiento y las fases de ligamiento usando una metodología de máxima verosimilitud.

**Primer mapa genético integrado de *Acca sellowiana* empleando
marcadores ISSR, AFLP y SSR⁴**

Resumen

El primer mapa genético integrado de la especie *Acca sellowiana* (Berg.) Burret ($2n=22$) basado en marcadores moleculares ISSR, AFLP y SSR fue construido utilizando una progenie de 160 individuos F_1 de hermanos enteros. Primeramente, se utilizó la estrategia de mapeo convencional doble cruzamiento prueba para la construcción de dos mapas parentales individuales. El mapa del progenitor femenino TCO estuvo formado por 42 marcadores asignados a 10 grupos de ligamiento, cubriendo 827,6 cM y con una distancia promedio entre marcadores de 26,8 cM. El mapa del progenitor masculino BR estuvo formado por 60 marcadores asignados a 17 grupos de ligamiento, cubriendo 1142,5 cM y una distancia promedio entre marcadores de 26,5 cM. Seguidamente, para la construcción del mapa integrado utilizamos un novedoso abordaje, especialmente diseñado para especies alógamas, que permite la estimación simultánea de la intensidad y las fases de ligamiento entre marcadores, basado en el método máxima verosimilitud. El mapa integrado comprendió 224 marcadores, incluyendo 115 marcadores *testcross* y 109 *intercross*, que fueron asignados a 15 grupos de ligamiento mayores y 23 menores (tripletes y dobletes), representando un largo total de mapa de 2927,9 cM y una distancia promedio entre marcadores de 16 cM. El mapa desarrollado en este estudio representa el primer paso en el desarrollo de un mapa genético altamente saturado para *A. sellowiana*.

Palabras claves: Feijoa, mapa de ligamiento, F_1 pseudo-cruzamiento, máxima verosimilitud, especie huérfana.

⁴ Este trabajo fue preparado según normas de la revista *Agrociencia*

A First Integrated Genetic Map of *Acca sellowiana* Based on ISSR, AFLP and SSR Markers

Summary

A first integrated genetic linkage map of *Acca sellowiana* (Berg.) Burret ($2n=22$) based on ISSR, AFLP and SSR molecular markers was constructed using a 160 F₁ full-sib progeny. Firstly, a traditional two way pseudo-testcross mapping strategy was used for the construction of two individual parental maps. The female (TCO) parent map comprised 42 markers spread over 10 linkage groups and spanned a total map length of 827,6 cM with an average distance between markers of 26,8 cM. Correspondingly, the male (BR) parent map, comprised 60 markers spread over 17 linkage groups and spanned a total map length of 1141,5 cM with an average distance between markers of 26,5 cM. Secondly, to develop an integrated map, we used a novel statistical approach specially designed for outcrossing species which provided a simultaneous estimation of linkage and linkage phases based on maximum-likelihood analysis. The integrated map comprised 224 linked markers, including testcross (115) and intercross (109) markers that were assigned to 15 major and 23 minor (triplets and doublets) linkage groups, representing a total map length of 2927,9 cM and an average distance between markers of 16 cM. The map developed in this study provides a first step in producing a highly saturated linkage map of *Acca sellowiana*.

Keywords: feijoa, linkage map, F₁ pseudo-test cross, maximum-likelihood, orphan specie.

2.1 INTRODUCCIÓN

Acca sellowiana (Berg.) Burret, es un árbol frutal conocido internacionalmente como *feijoa* o *pineapple guava*. El aroma y sabor exótico de su fruta, lo sitúan como una atractiva alternativa en el mercado internacional. Además, la riqueza en componentes bioactivos con destacadas propiedades nutracéuticas y terapéuticas posiciona a esta especie dentro del mercado creciente de alimentos funcionales y étnicos, así como reservorio de productos activos de uso biomédico (Weston, 2010). El cultivo comercial se localiza principalmente en Nueva Zelanda, Colombia, Estados Unidos, España e Israel, países que han desarrollado sus propios cultivares. Recientemente, cuatro nuevos cultivares se han desarrollado y registrado en Brasil, ampliando la base genética y el rango de adaptación del cultivo (Ducroquet *et al.*, 2007, 2008).

Acca sellowiana es una especie diploide, con número cromosómico $2n = 22$ (Atchinson, 1947, Costa *et al.*, 2008), en acuerdo con el número básico para la familia *Myrtaceae* $x = 11$ (Atchinson, 1947). El tamaño del genoma nuclear $2C = 0,503$ pg, es considerado muy pequeño (Costa *et al.*, 2008, Leitch *et al.*, 1998). La especie es predominantemente alógama, presentando autoincompatibilidad tardía relacionado con una respuesta post-cigótica (Finatto *et al.*, 2011).

En el centro de origen, localizado en el sur de Brasil y norte de Uruguay, se ha reportado una gran variabilidad morfológica en forma, tamaño, color, sabor y aroma del fruto (Puppo 2008, Thorp y Bielecki, 2002, Ducroquet *et al.*, 2000), así como una amplia diversidad genética evaluada con marcadores moleculares (Baccino 2011, Quezada 2008, Santos *et al.*, 2007b). Estos resultados contrastan con la escasa variabilidad genética detectada entre los cultivares de mayor difusión, que presentan una estrecha base genética debido a que derivarían de un número reducido de accesiones silvestres colectadas en el centro de origen (Thorp y Bielecki, 2002, Dettori y Palombi, 2000). Por lo tanto, la alta variabilidad disponible en el centro de origen ofrecería un amplio rango de alternativas en caracteres de calidad de fruta, resistencia a enfermedades y adaptación local.

Los mapas de ligamiento genético son actualmente utilizados en el estudio global de la estructura y función del genoma. Particularmente, en especies frutales y forestales, representan una poderosa herramienta para aumentar la eficiencia de selección, especialmente para caracteres cuantitativos, y la selección de padres, acelerando los procesos de mejoramiento. Se han construido mapas genéticos para especies frutales de alto valor comercial tales como citrus (Sankar y Moore, 2001), durazno (Dirlewanger *et al.*, 1998), manzana (Liebhard *et al.*, 2003), kiwi (Testolin *et al.*, 2001) entre otros. Éstos han facilitado los procesos de selección asistida por marcadores en cítricos (Xu *et al.*, 2009); permitido identificar regiones genómicas asociadas a caracteres cuantitativos (*Quantitative Trait Loci*, QTLs) que controlan la calidad del fruto en durazno (Dirlewanger *et al.*, 1999), así como el aislamiento de genes de resistencia a hongos en manzana (Xu y Korban, 2000). Actualmente, el importante desarrollo de herramientas moleculares y la disponibilidad de metodologías de análisis de datos genéticos permite sustentar el desarrollo de mapas genéticos aún en especies sub-utilizadas con escaso conocimiento de su base genética, como *A. sellowiana*.

Como en la mayoría de las especies frutales y forestales, *A. sellowiana* presenta limitaciones para realizar poblaciones de mapeo convencionales F_2 o retrocruzamientos debido a su alogamia, altos niveles de carga genética y heterocigosis, y un largo intervalo generacional. En estas especies, poblaciones F_1 de hermanos enteros originadas del cruzamiento de progenitores altamente heterocigotos realizadas en los programas de mejoramiento, sirvieron de base para que Grattapaglia y Sederoff, (1994) desarrollaran la metodología doble cruzamiento prueba en la construcción de mapas genéticos individuales para cada progenitor. Estos mapas monoparentales son construidos con marcadores que presentan una configuración *testcross*, heterocigotos en uno de los padres, con una razón de segregación 1:1 en la progenie. Para la construcción de mapas integrados a partir de progenitores no endocriados se requiere la presencia de marcadores con configuración *intercross*, heterocigotos en ambos padres y segregantes en la progenie. Sin embargo, dado que el número de alelos por locus puede variar de uno a cuatro y no se conocen *a priori* las fases de ligamiento entre pares de marcadores en los progenitores, la estimación de las frecuencias de recombinación se ve dificultada (Maliepaard *et al.*, 1997). Wu *et al.*, (2002) reportaron un abordaje que permite la estimación simultánea del ligamiento y las fases de

ligamiento usando una metodología de máxima verosimilitud, exitosamente utilizada en la generación de mapa integrados en pasiflora (Oliveira *et al.*, 2008) y caña de azúcar (García *et al.*, 2006). Un mapa integrado ofrece ventajas tales como incrementar la intensidad de saturación del mapa y la extensión del genoma caracterizado, lo cual mejora la precisión de la localización de QTLs (Maliepaard *et al.*, 1997).

Como primer paso en la incorporación de estrategias moleculares que auxilien el mejoramiento genético de la especie *A. sellowiana*, hemos utilizado marcadores del tipo ISSR, AFLP y SSR en una población F₁ de hermanos enteros para construir el primer mapa genético integrado de la especie. Siguiendo una estrategia doble cruzamiento prueba fueron contruidos los mapas para cada progenitor y siguiendo la estrategia de Wu *et al.* (2002) se desarrolló un mapa integrado. Este mapa servirá como base para el desarrollo de mapas genéticos altamente saturados, lo cual facilitará el mapeo de QTLs de interés agronómico, proveerá marcadores para procesos de selección asistida por marcadores, así como para análisis comparativos con otras Mirtáceas.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Población de mapeo

La población de mapeo comprendió una progenie F1 de 160 hermanos enteros obtenidos del cruzamiento entre los genotipos no endocriados de *A. sellowiana*: TCO como parental femenino y BR como parental masculino. Ambos genotipos fueron identificados en Uruguay siendo seleccionados por presentar marcado contraste en varias características que definen la calidad de fruta. TCO, material silvestre, presenta fruta de tamaño pequeño, de cáscara lisa, fina y color verde claro; por el contrario BR, procedente de un huerto comercial, presenta fruto grande, de cáscara rugosa, gruesa y color verde oscuro (Beatriz Vignale, comunicación personal⁵). La población de mapeo está instalada en el Jardín de Introducción de la “Estación Experimental Salto”, de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República en Salto, Uruguay (Lat: 31° 19' S; 57° 41' O).

⁵ 23 de abril de 2009

2.2.2. Análisis de marcadores

Se extrajo ADN genómico a partir de hojas frescas de acuerdo a Doyle y Doyle (1987). La calidad y concentración del ADN fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% mediante comparación con concentraciones conocidas del fago λ (Fermentas) y mediante espectrofotometría con NanoDrop ND-1000 (NanoDrop *Technologies*, DE, USA).

Veinticuatro iniciadores ISSR fueron empleados para evaluar el nivel de polimorfismo entre los padres y seis individuos de la progenie. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen de 20 μ L conteniendo 15 ng de ADN genómico, 1,25 μ M de cada iniciador, 0,15 mM de dNTP, 0,8 U de polimerasa (DreamTaq Fermentas), 2,0 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de Buffer Tris-HCl. El programa de amplificación incluyó un paso de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 36 ciclos de 94 °C por 1 min, una temperatura de renaturalización ajustada a cada iniciador entre 50 a 58 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, más un paso de extensión de 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 2,0% y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Los loci fueron nombrados con la secuencia de repetidos del iniciador seguido de un número correlativo según el tamaño del fragmento.

Los marcadores AFLP fueron obtenidos siguiendo el protocolo de Vos *et al.* (1995) utilizando iniciadores marcados con fluorocromos VIC, NED, PET (*Applied Biosystem*) y FAM (*Integrated DNA technologies*). Un mg de ADN genómico fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *MseI* y los fragmentos de restricción ligados con adaptadores. Un ciclo de amplificación preselectiva fue realizado con iniciadores portadores de un nucleótido selectivo (iniciador *Eco* + A, iniciador *Mse* + C). Seguidamente, en la amplificación selectiva se evaluaron 60 combinaciones de iniciadores con tres nucleótidos selectivos. Los productos de amplificación fueron separados en geles de acrilamida desnaturalizante al 6% y visualizados con tinción con plata (Creste *et al.*, 2001). Las combinaciones de iniciadores más informativas se seleccionaron en base a la calidad de amplificación y el polimorfismo detectado entre los progenitores y dos individuos F₁. Los patrones de AFLP para toda la población fueron analizados en un secuenciador ABI 3130 *xl* (*Applied Biosystem*) separando cuatro combinaciones de iniciadores simultáneamente y usando el patrón de peso molecular

GeneScan-500 LIZ (*Applied Biosystems*). El programa *GeneMapper4.0* (*Applied Biosystem*) fue utilizado para analizar los electroferogramas obtenidos. Los loci fueron nombrados con las letras de los tres nucleótidos selectivos, seguido por el tamaño en pares de base de cada marcador.

En total, 37 marcadores SSR fueron evaluados por su polimorfismo en los dos progenitores y en 10 individuos de la F₁. Trece de ellos fueron previamente desarrollados en *A. sellowiana* (Santos *et al.*, 2008); y 10 desarrollados en *Eucalyptus grandis* (Brondani *et al.*, 2006) y transferidos a *A. sellowiana* (Santos *et al.*, 2007). Los restantes 14 SSR, seis SSR desarrollados en *P. guajava* (Leprite *et al.*, 2010) y ocho en *Myrciaria dubia* (Rojas *et al.*, 2008) fueron recientemente transferidos a *A. sellowiana* (Paula Silva, comunicación personal⁶). Como control positivo de las reacciones de amplificación se utilizó ADN genómico de la especie en la cual cada SSR fue originalmente desarrollado. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 µL conteniendo 25 ng de ADN genómico, 0,3 mM de iniciador, 0,4 mM de cada dNTP, 1 U de polimerasa (DreamTaq Fermentas), 0,4mM de MgCl₂, 10 mM de Buffer Tris-HCl y DMSO al 5%. El programa de amplificación incluyó un paso a 96 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y un paso final a 72 °C por 7 min. Para los marcadores propios de *A. sellowiana* fue seleccionada la mejor temperatura de renaturalización entre 48 °C a 59 °C. Los productos de amplificación fueron separados en geles de poliacrilamida nativa al 6 % y visualizados por tinción con bromuro de etidio (MEGA-GEL, CBS *Scientific*, CA, USA). Los marcadores SSR fueron nombrados de acuerdo al nombre de los iniciadores.

2.2.3 Anotación de marcadores

El patrón de segregación para cada marcador fue asignado siguiendo la notación de Wu *et al.* (2002). Esta notación asume la presencia de un máximo de cuatro alelos codominantes, (“a”, “b”, “c”, o “d”) en los progenitores, siendo todos los alelos dominantes sobre el alelo nulo (“o”) Dependiendo de cómo los diferentes alelos de cada par de loci estén combinados en ambos padres encontramos cuatro grupos de configuraciones (grupo A, B, C

⁶ 31 de agosto de 2010

y D). Los marcadores del grupo D, presentan una configuración *testcross*, siendo heterocigotos en solo uno de los progenitores y presentando una razón de segregación en la progenie 1:1. Pueden ser clasificados en marcadores D1 (monoparentales TCO), siendo TCO heterocigoto por presencia y BR homocigoto por ausencia (patrón “ao x oo”), y marcadores D2 (monoparentales BR) los que presentan la configuración genética inversa (patrón “oo x ao”). Los grupos A, B, y C presentan marcadores con configuración *intercross*, en la cual ambos loci son heterocigotos en ambos padres con una segregación en la progenie 1:1:1:1 para el grupo A, 1:2:1 para el grupo B y 3:1 para el grupo C (o C8).

2.2.4 Análisis de ligamiento y mapeo

En una primera etapa, se evaluó el ajuste de cada marcador a la segregación esperada mediante la prueba ji-cuadrado (X^2) a un $p < 0,05$, considerando la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples. Los marcadores que presentaron distorsión de segregación, fueron descartados para evitar detectar ligamientos espurios. Para la construcción de los mapas monoparentales femenino y masculino se utilizaron los marcadores del tipo D1 y D2, respectivamente, siguiendo la metodología propuesta por Grattapaglia y Sederoff (1994). Para la construcción del mapa integrado, se empleó el total de marcadores (grupos A, B, C y D). Los análisis de ligamiento se realizaron con el programa *OneMap* (Margarido *et al.*, 2007), que emplea los algoritmos propuestos por Wu *et al.* (2002) para la construcción de mapas, estimando simultáneamente la fracción de recombinación y las fases de ligamiento entre los marcadores. Los grupos de ligamiento fueron establecidos con un valor de LOD score $\geq 4,0$ y $\geq 5,0$, para los mapas monoparentales e integrado, respectivamente, con una fracción de recombinación máxima $\leq 0,32$. Las distancias genéticas fueron calculadas a partir de las frecuencias de recombinación usando la función de mapa Kosambi (1944). El ordenamiento de los marcadores dentro de cada grupo se realizó evaluando todos los ordenamientos posibles (comando “*compare*”), para aquellos grupos formados por hasta cinco marcadores, mientras que para los grupos de ligamiento mayores se creó un marco de marcadores informativos y se incorporaron los restantes marcadores consecutivamente (comando “*order.seq*”). El ordenamiento obtenido fue verificado con el algoritmo Ripple (Lander *et al.*, 1987). Los mapas genéticos fueron diseñados con el programa MapChart 2.2 (Voorrips, 2002).

2.3 RESULTADOS

2.3.1. Marcadores moleculares

De los 24 iniciadores ISSR evaluados se seleccionaron 12 (Tabla 1) por generar un mayor número de marcadores polimórficos entre los progenitores, variando entre 4 y 15, con un promedio de 8,3. De los 100 marcadores ISSR generados, 32 (32 %) fueron marcadores monoparentales TCO (D1), 32 (32 %) monoparentales BR (D2) y 36 (36 %) marcadores biparentales (C8). El análisis de las frecuencias fenotípicas mostró que solo 59 (59%) de los marcadores se ajustaron al patrón de segregación esperada y fueron empleados para la construcción de los mapas genéticos (Tabla 1). Los restantes 41 marcadores presentaron distorsiones de la segregación y fueron descartados.

Tabla 1. Número de marcadores ISSR generados a partir de 12 iniciadores. Se muestran los marcadores sin distorsión de segregación (prueba ji-cuadrado $p < 0,05$, corrección Bonferroni) usados para el análisis de ligamiento.

Secuencia Iniciador	Monoparental TCO D1 ^a	Monoparental BR D2 ^a	Biparental C8 ^b	Total
(GGAGA) ₃	1	2	1	4
(CT) ₈ AG	2	1	5	8
(AC) ₈ CT	2	2	-	4
(AG) ₈ T	-	1	2	3
(CT) ₈ GG	2	2	-	4
(AG) ₈ TA	2	3	2	7
(AG) ₈ CA	2	2	4	8
(CT) ₈ TG	1	3	2	6
(GACAC) ₃	2	2	2	6
(GA) ₈ C	1	1	2	4
(AG) ₈ C	2	-	1	3
(GACAC) ₃ T	1	-	1	2
Total	18	19	22	59

^a marcadores en configuración *testcross* segregando 1:1 en la progenie, ^b marcador en configuración *intercross* segregando 3:1 en la progenie.

De las 60 combinaciones de iniciadores AFLP evaluadas, se seleccionaron 21 (35 %) (Tabla 2) las cuales generaron 386 marcadores AFLP. De estos, 98 (25 %) se clasificaron como D1, 135 (35 %) como D2 y 153 (40 %) como C8. El número de marcadores AFLP

generado por combinación de iniciadores varió entre 6 (iniciador E_AAT/M_CTC) a 31 (iniciador E_ACA/M_CAC), con un promedio de 18,4. El análisis de la frecuencias fenotípicas mostró que 153 (40 %) marcadores presentaron distorsión de la segregación, por lo que se retuvieron 233 marcadores (60 %) para la construcción de los mapas genéticos (Tabla 2).

Tabla 2. Número de marcadores AFLP generados a partir de 21 combinaciones de iniciadores. Se muestran los marcadores sin distorsión de segregación (prueba ji-cuadrado $p < 0,05$, corrección Bonferroni) usados para el análisis de ligamiento.

Combinación de iniciadores		Monoparental	Monoparental BR	Biparental	Total
Iniciador Eco+3	Iniciador Mse+3	TCO D1 ^a	D2 ^a	C8 ^b	
E_AAC	M_CAA	-	2	3	5
	M_CTC	2	1	8	11
	M_CGA	4	3	8	15
	M_CTA	4	4	4	12
E_ACA	M_CAA	3	4	7	14
	M_CAC	4	7	6	17
E_ACG	M_CTC	3	4	6	13
	M_CGA	2	4	1	7
	M_CAC	2	5	2	9
	M_CCG	5	-	3	8
	M_CTA	2	5	2	9
E_AAT	M_CTC	-	2	2	4
	M_CGA	1	1	2	4
	M_CAC	2	4	11	17
	M_CAG	2	2	9	13
	M_CCG	1	5	5	11
	M_CTA	3	4	11	18
E_ATG	M_CTT	1	1	4	6
	M_CAC	3	2	12	17
	M_CAG	-	5	5	10
	M_CCG	2	5	6	13
Total		46	70	117	233

^a marcadores en configuración *testcross* segregando 1:1 en la progenie, ^b marcador en configuración *intercross* segregando 3:1 en la progenie.

De los 13 marcadores SSR desarrollados para *A. sellowiana*, 11 (85 %) produjeron amplificaciones en los progenitores dentro de los tamaños reportados, pero solo tres de ellos (23%) Ase04, Ase19 y Ase21 presentaron patrones polimórficos claramente identificables en los progenitores y la progenie (Tabla 3). De los 10 SSR de *E. grandis* evaluados en *A.*

sellowiana, cinco (50%) amplificaron en los progenitores pero únicamente dos (20 %) EMBRA72 y EMBRA81 fueron polimórficos. De los seis SSR de *P. guajava* (40%) y ocho SSR *M. dubia* (100%), transferidos, solo los marcadores mPgCIR11 (*P. guajava*) y MDI003 (*M. dubia*) presentaron claro polimorfismo entre los progenitores. En todos los casos, la presencia del motivo microsatélite en los fragmentos de amplificación fue confirmada mediante secuenciación (Paula Silva, comunicación personal⁷). Globalmente, de los 37 SSR evaluados, siete fueron polimórficos, mostrando un patrón de segregación sin distorsiones y en consecuencia fueron incluidos en la construcción de los mapas genéticos (Tabla 3).

Tabla 3. Características moleculares y genéticas de los marcadores microsatélites usados en el análisis de ligamiento.

Locus	Motivo de repetición	Secuencia iniciador	Alelos (pb)	Nº Accesión	Clasificación ^a
Ase04 ^b	(AG) ₁₄	F: AACTTGGTCTAACGCTCTG R: CCTTCACCACCATTCTCT	128-168	EU084498 ^f	A4
Ase19 ^b	(CT) ₈	F: GCCCTTGTTTTGTCCTTTTT R: CTGGCAGCTTCACTCGTTC	192-208	EU084500 ^f	D1
Ase21 ^b	(AT) ₇ (TG) ₇	F: TAGTTGAAAGTTTTAGCACCAC R: GTAAGTAGGGCAAATCAGAGTT	145-192	EU084501 ^f	D2
EMBRA72 ^c	(AG) _n	F: CTGGTCAACGTCCGAAAG R: ATGCTGCAGAGGGCATAA	124	n.d.	D1
EMBRA81 ^c	(CT) ₂₁	F: CATGAGTTACTGCAAGAAAAG R: ACAGCCAAAAACCAAATC	70	BV682057 ^f	D1
mPgCIR11 ^d	(CT) ₁₇	F: TGAAAGACAACAAACGAG R: TTACACCCACCTAATAAGA	298-314	AJ639761 ^g	D2
MDI003 ^e	(CTC) ₆ (AG) ₁₄	F: ATAAATAACCCCGGGTCTC R: GTACAGCTCCCAGCAGGAGT	n.d.	EX151484 ^f	D2

^a según Wu *et al.*, 2002, ^b Santos *et al.*, 2008; ^c Brondani *et al.*, 2006; ^d Lepitre *et al.*, 2010, ^e Rojas *et al.*, 2008, ^f GeneBank ^g EMBL Nucleotide Sequence Database.

2.3.2. Construcción de mapas monoparentales

Para la construcción del mapa monoparental del progenitor femenino TCO, se utilizaron 67 marcadores monoparentales D1 de los cuales 42 (63 %) fueron asignados a 10 grupos de ligamiento, restando 25 marcadores no ligados (Tabla 4). Estos 10 grupos de ligamiento incluyeron cuatro grupos mayores (formados por 4 o más marcadores), dos

⁷ 28 de mayo de 2011

tripletes (grupos de ligamiento formado por tres marcadores) y cuatro dobles. El mapa del progenitor TCO cubre una distancia total de 827,6 cM, con una distancia promedio entre marcadores adyacentes de 26,8 cM (Tabla 5).

Un total de 92 marcadores del tipo D2 se utilizaron para la construcción del mapa del progenitor masculino BR, de los cuales 60 (64 %) fueron asignados a 17 grupos de ligamiento y los restantes 32 permanecieron no ligados (Tabla 4). Los 17 grupos de ligamiento incluyeron tres grupos mayores, cinco tripletes y nueve dobles. El mapa BR cubre un total de 1141,5 cM, con una distancia promedio entre marcadores adyacentes de 26,5 cM (Tabla 5)

Tabla 4. Distribución de los diferentes tipos de marcadores que constituyen los mapas genéticos materno TCO, paterno BR y el mapa genético integrado TCO x BR de *A. sellowiana*.

Mapa genético	Tipo marcador	Clasificación ^a	Segregación progenie	Número marcadores			
				ISSR	AFLP	SSR	Total
Materno TCO	Monoparental TCO	D1	1:1	10	30	2	42
Paterno BR	Monoparental BR	D2	1:1	10	48	2	60
Integrado TCO x BR	Monoparental TCO	D1	1:1	10	33	2	45
	Monoparental BR	D2	1:1	12	48	2	62
	Biparental	C8	3:1	15	101		116
	Biparental	A4	1:1:1:1			1	1
	Total			37	182	5	224

^a según Wu *et al.*, 2002.

2.3.3. Construcción del mapa integrado

El mapa genético integrado fue construido en base a 299 marcadores (D1, D2, C8 y A4), de los cuales 224 marcadores (75 %) fueron incluidos en el mapa mientras que los 75 restantes permanecieron no ligados, generando 38 grupos de ligamiento (Figura 1, Tabla 4, Tabla 5). Los marcadores mapeados incluyeron 37 ISSR (17 %), 182 AFLP (81 %) y 5 SSR (2 %). De los grupos de ligamiento obtenidos, 15 están formados por cuatro o más marcadores (grupos mayores) y 23 son grupos menores (10 tripletes y 13 dobles). Los 15

grupos mayores albergan el 75 % (168) de los marcadores mapeados con una extensión total de 2372,35 cM (81 % del largo total del mapa), una distancia promedio entre marcadores adyacentes de 15,7 cM y densidad de cobertura de marcadores de 13,9 cM/marcador. Seis de los grupos de ligamientos mayores pueden considerarse grupos de integración, al presentar en un mismo grupo marcadores monoparentales D1 y D2 y biparentales C8 (grupos 1, 2, 4, 6, y 8) o el único marcador A4 (grupo 7). En particular, los grupos 4 y 8 claramente integran en cada caso, grupos de ligamiento previamente identificados en los mapas monoparentales TCO y BR, respectivamente (Figura 2). Otros cinco de los grupos de ligamiento (3, 5, 9, 10 y 11) se correspondieron con grupos de ligamiento del mapa monoparental TCO o BR. De esta manera, los grupos mayores 3 y 10 del mapa integrado, se alinearon respectivamente con los grupos 6 y 4 del mapa monoparental TCO, mientras que los grupos 5, 9 y 11 lo hicieron con los grupos 1 y 6, 3 y 7 del mapa monoparental BR, respectivamente.

Tabla 5. Comparación de la arquitectura de los mapas genéticos materno TCO, paterno BR e integrado TCO x BR de *A. sellowiana*.

Características	Mapa materno TCO	Mapa paterno BR	Mapa Integrado TCO x BR
Número de marcadores mapeados	42	60	224
Grupos de ligamiento	10	17	38
Largo total del mapa (cM)	827,6	1141,5	2927,9
Largo del grupo mayor (cM)	411,1	570,2	448,1
Largo del grupo menor (cM)	3,2	12,5	6,4
Largo promedio de grupos	82,8	67,2	77,1
Distancia promedio entre marcadores (cM)	26,8	26,5	16,0
Densidad de marcadores (cM/numero marcadores)	19,7	19,3	13,1

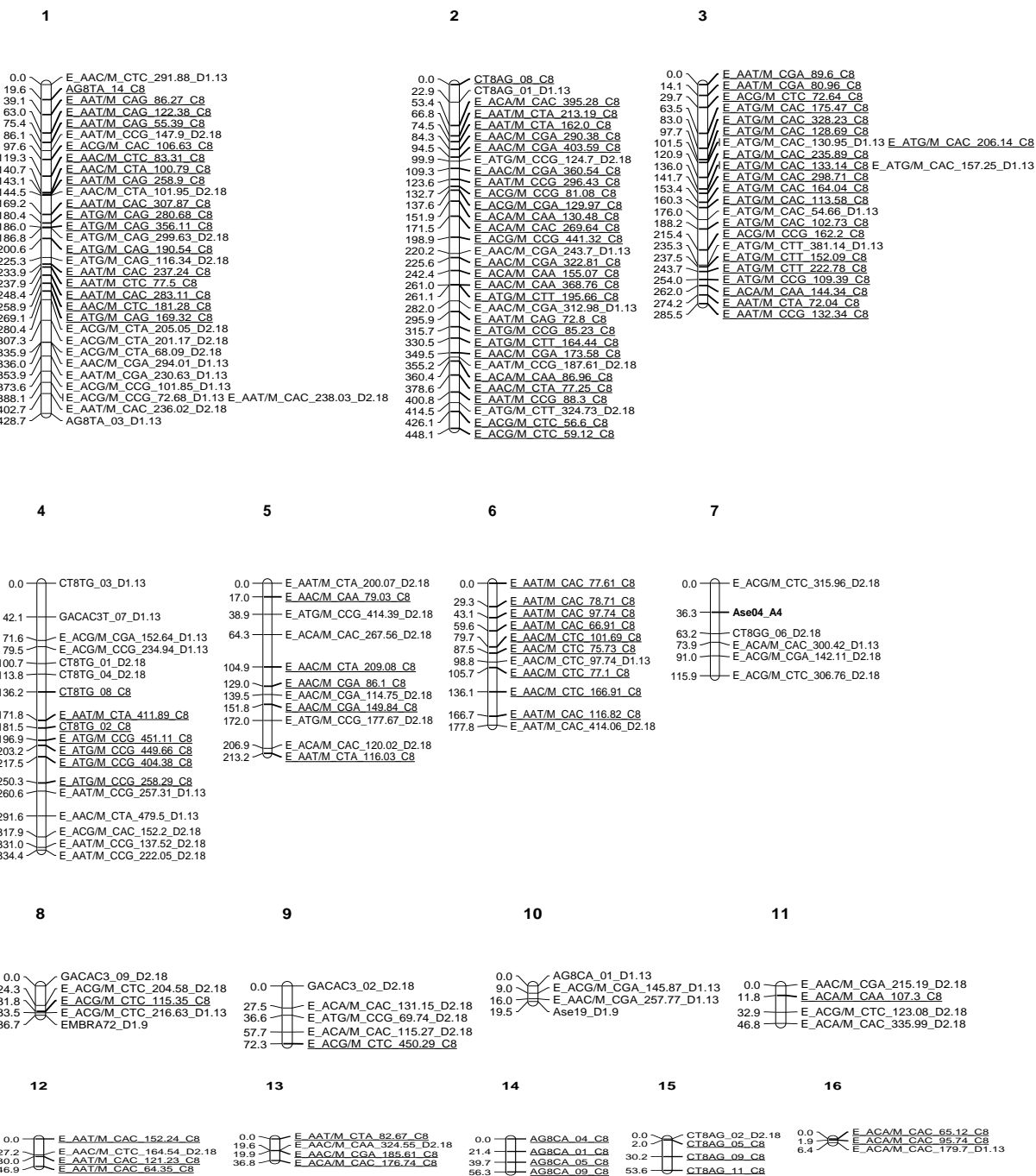


Figura 1. Mapa genético integrado TCO x BR de *A. sellowiana* comprendiendo 37 marcadores ISSR, 182 AFLP y cinco SSR. En cada grupo de ligamiento, los nombres de los marcadores se muestran a la derecha y las distancias genéticas expresadas en cM (Kosambi) a la izquierda. Marcadores biparentales de integración se presentan subrayados. Marcadores del tipo SSR se destacan en negrita.

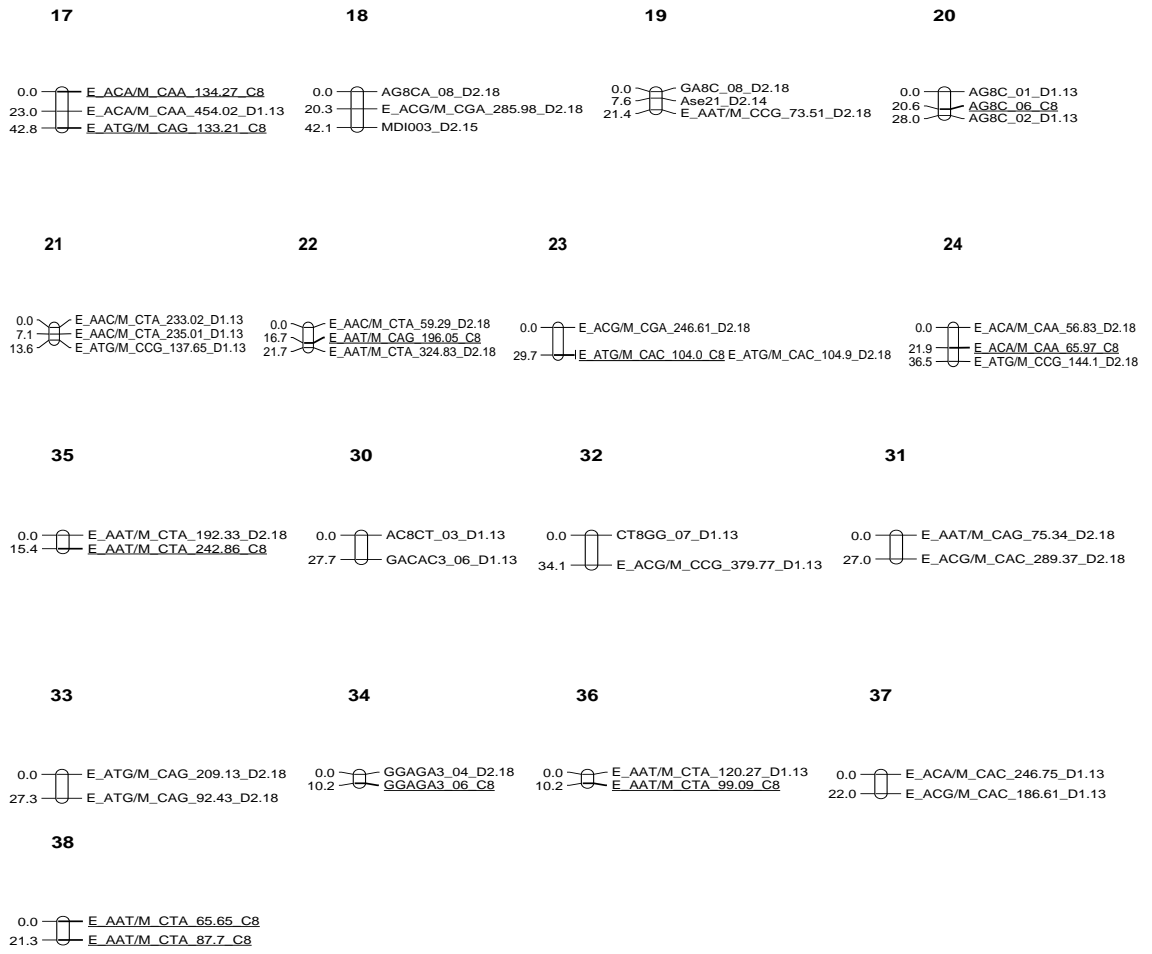


Figura 1 (Continuación).

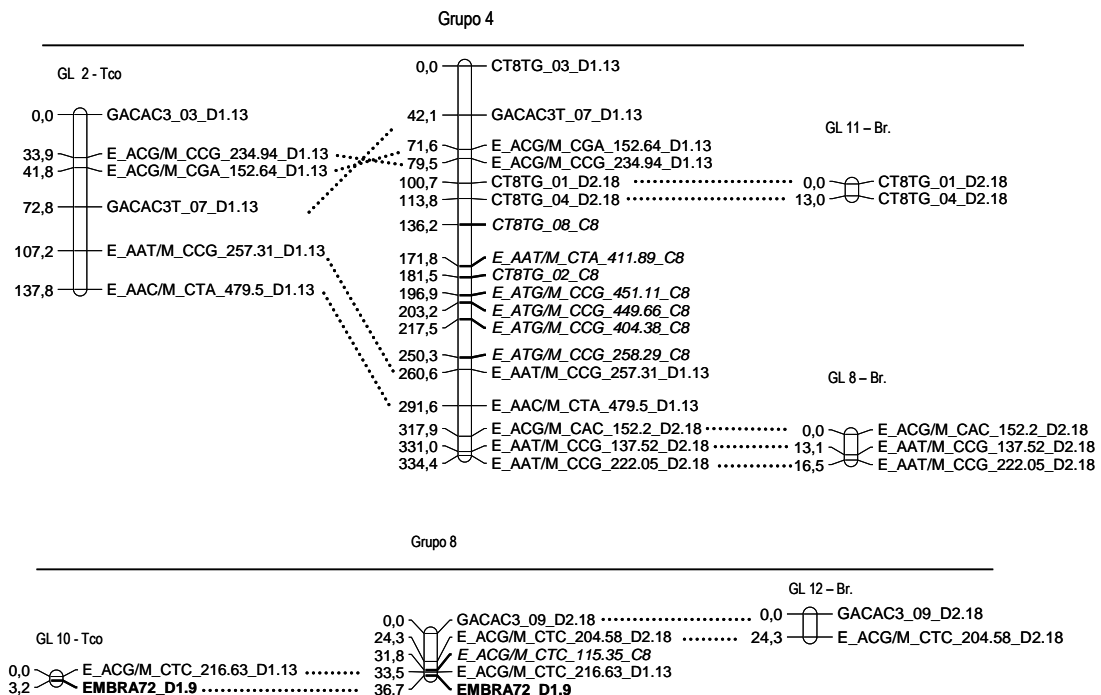


Figura 2. Alineamiento de grupos de ligamiento materno TCO (izquierda) y paternos BR (derecha) en los grupos de ligamiento 4 y 8 del mapa integrado TCO x BR de *A. sellowiana* (centro de la figura). En cada grupo de ligamiento, los nombres de los marcadores se muestran a la derecha y las distancias genéticas expresadas en cM (Kosambi) a la izquierda. Marcadores biparentales de integración son indicados en *italica*. Marcadores del tipo SSR se destacan en **negrita**.

2.4 DISCUSIÓN

Los marcadores dominantes basados en PCR tipo AFLP e ISSR han sido ampliamente utilizados en el mapeo de cultivos sub-utilizados, por la ventaja de poder ser implementados sin poseer conocimiento previo del genoma de la especie (Beedanagari *et al.*, 2005). A pesar de la complejidad de la técnica, los marcadores moleculares AFLP son uno de las herramientas más robustas y confiables utilizadas en la construcción de mapas genéticos dada la voluminosa información lograda por combinación de iniciadores (Marques *et al.*, 1998). Esta metodología nos permitió generar una gran cantidad de datos genotípicos de alta calidad, similar al reportado para otras mirtáceas y frutales sin la necesidad de desarrollar marcadores (Lepitre *et al.*, 2010, Beedanagari, *et al.*, 2005, Testolin *et al.*, 2001). Los marcadores ISSR suelen presentar alto nivel de polimorfismo y tendencia a estar

ampliamente distribuidos en el genoma, basada en la amplia distribución de marcadores SSR. Además, son detectados mediante una técnica simple, rápida, eficiente, y altamente reproducible. De esta manera, estos marcadores son considerados una herramienta muy útil para mapeo genético (Casasoli *et al.*, 2001).

Por otra parte, los marcadores moleculares SSR presentan un alto poder informativo dada su condición codominante y el alto número de alelos por locus, siendo de gran utilidad en la integración de grupos de ligamiento y proporcionando puntos de anclaje para el mapeo comparativo. De los 13 SSR de *A. sellowiana*, sólo tres pudieron ser mapeados, lo que podría atribuirse a limitantes en el poder de resolución del sistema de separación electroforética utilizado, evidenciado en la presencia de patrones complejos. El empleo de sistemas de electroforesis en acrilamida desnaturalizante y tinción con plata o el uso de sistemas de secuenciación podría aumentar el nivel de resolución y detección de polimorfismos de los marcadores. Los resultados de transferibilidad obtenidos, se suman a los estudios de transferibilidad realizado con éxito en la familia *Myrtaceae* (Valdés-Infante *et al.*, 2010, Santos *et al.*, 2007). En nuestro trabajo, solo cuatro de los 24 SSR evaluados fueron polimórficos entre los padres y pudieron ser mapeados. Es relevante considerar la reducción del nivel de polimorfismo en la transferencia de SSR, denominado *ascertainment bias*, por el cual un SSR elegido por su alto polimorfismo en la especie de origen, con el máximo tamaño posible, sea probablemente más corto en la nueva especie transferida, y por lo tanto revele menor polimorfismo (Ellegren *et al.*, 1995). Finalmente cinco de los siete SSR mapeados fueron incluidos en el mapa integrado y correspondieron a tres SSR de *A. sellowiana* (As04, As19, As21), un SSR de *E. grandis* (EMBRA72) y un SSR de *M. dubia* (MDI003).

La identificación de marcadores presentando distorsión de segregación es esperada en la construcción de mapas genéticos y se ha descrito previamente para un gran número de especies frutales y forestales (Grattapaglia y Sederoff, 1994, Marques *et al.*, 1998, Cervera *et al.*, 2001). En nuestro trabajo, el porcentaje de marcadores con distorsión de segregación (40 %) fue llamativamente alto comparado con los reportados para otras especies (Cavalcanti y Wilkinson, 2007, Rosa *et al.*, 2003, Marques *et al.*, 1998, Grattapaglia y Sederoff, 1994). No se observaron diferencias en el porcentaje de marcadores con distorsión de segregación entre el progenitor femenino y masculino. Este comportamiento puede ser atribuido a

diferentes factores biológicos como el ligamiento de los marcadores con alelos deletéreos que causen tanto la inviabilidad como la mortalidad de los gametos o la progenie, mecanismos de aislamiento genético y carga genética, deriva genética, rearrreglos cromosómicos entre los padres y loci duplicados (Bradshaw y Stettler, 1994). Otras causas a considerar son problemas técnicos que condujeran a errores de genotipado. En futuros trabajos, este grupo de marcadores puede ser incorporado en el mapeo, posibilitando la identificación de regiones cromosómicas con distorsión de segregación.

La implementación de la estrategia doble cruzamiento prueba nos permitió generar dos mapas de ligamientos independientes representando los progenitores masculinos y femeninos. En ninguno de estos mapas, el número de grupos de ligamiento obtenidos coincidió con el número cromosómico haploide de la especie ($n = 11$). El menor largo total del mapa materno TCO (411, 1 cM) comparado con el largo total de mapa paterno BR (570,2 cM) indicaría que un número de regiones del genoma materno están aún sub-representadas por los marcadores D1. Estos resultados sugieren que será necesaria la adición de nuevos marcadores que permitan mejorar la cobertura de cada mapa monoparental así como facilitar la fusión de grupos de ligamiento, mejorando la resolución de los mismos.

La identificación de marcadores con configuración *intercross* permite la construcción de mapas integrados. El alto porcentaje de este tipo de marcadores (47 %) encontrado en este trabajo fue similar al reportado en otros cruzamientos intraespecíficos de especies frutales (Lepitre *et al.*, 2010, Venkateswarlu *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 2003). Altas frecuencias de marcadores *intercross* de tipo 3:1 (C8) se han asociado a la presencia de ancestros comunes entre los progenitores (García *et al.*, 2006, Venkateswarlu *et al.*, 2006). En nuestro estudio, los progenitores presentaron niveles altos de divergencia fenotípica, pero es relevante considerar que ambos pertenecen al mismo tipo o población morfológica "Tipo Uruguay". Sería esperado encontrar una menor frecuencia de marcadores *intercross* C8 en cruzamientos intraespecíficos que involucre materiales "Tipo Uruguay" y "Tipo Brasil".

El mapa genético integrado de *A. sellowiana* comprendió 15 grupos de ligamiento mayores, cercano al número haploide de la especie ($n = 11$). No obstante, la presencia de un gran número de grupos menores, que probablemente representen regiones aun no

conectadas de los grupos mayores, indicaría que el mapa aún no está suficientemente saturado. La comparación del mapa integrado de *A. sellowiana* con los mapas monoparentales evidenció una gran robustez del mismo, estando todos los grupos de ligamiento de los mapas monoparentales representados en el mapa integrado (con una única excepción de un doblete del mapa del progenitor masculino BR). Sin embargo, el proceso de integración de marcadores en configuración *testcross* fue observado solamente en seis de los 15 grupos de ligamiento mayores. A pesar del alto número de marcadores *intercross* (C8) detectados, el bajo nivel de integración podría explicarse por el hecho de que estos marcadores proveen limitada información para la estimación precisa de las frecuencias de recombinación (Maliéppard *et al.*, 1997). En este sentido, los marcadores codominantes tipo SSR han demostrado una mayor confiabilidad e informatividad para la integración de mapas genéticos, además de que su secuencia conocida que puede ser utilizada con punto de anclaje, en el mapeo genético, mapeo comparativo y detección de QTLs (Cavalcanti y Wilkinson, 2007). La adición de nuevos marcadores codominantes altamente informativos del tipo SSR, permitiría mejorar la integración del mapa genético, reduciendo el número de grupos de ligamiento y la distancia promedio entre marcadores, permitiendo además un estudio comparativo con los mapas altamente desarrollados de las mirtáceas *Eucalyptus* y *P. guajava*.

Una característica destacable de nuestro mapa genético es la de carecer de sitios de agrupamiento de marcadores AFLP, lo cual ha sido reportado en diversos mapas genéticos de frutales (Hanley *et al.*, 2002, Cavalcanti y Wilkinson, 2007) causada por una distribución no uniforme de los sitios de restricción *EcoRI* o por supresión localizada de recombinación, especialmente alrededor de las regiones centroméricas. Sin embargo, en este trabajo, los marcadores AFLP que fueron amplificados por la misma combinación de iniciadores no resultaron distribuidos aleatoriamente en el mapa integrado, siendo frecuentemente mapeados en el mismo grupo de ligamiento. Este comportamiento también fue observado en algunos iniciadores de tipo ISSR y se ha reportado anteriormente en otros mapas genéticos (Wu *et al.*, 2000).

La identificación de marcadores moleculares uniformemente distribuidos en el genoma y correctamente ordenados es un requisito para la detección robusta de QTL. En comparación

con los mapas monoparentales, el mapa integrado presentó una mayor cobertura del genoma y una menor distancia promedio entre marcadores, siendo similar a las primeras versiones de mapas genéticos reportados en otras especies (Beedanagari *et al.*, 2005, Rosa *et al.*, 2003, Grattapaglia y Sederoff, 1994). Igualmente, el largo total del mapa (2927,9 cM) fue levemente superior al del *Psidium guajava*, la especie mas cercana que posee un mapa genético con un nivel de saturación aceptable (2179,0 cM) (Lepitre *et al.*, 2010). Finalmente, para la mayoría de los grupos de ligamiento del mapa integrado, el orden de los marcadores fue consistente con los obtenidos en los mapas monoparentales. Las variantes en el ordenamiento de los marcadores entre mapas pueden explicarse por diferencias en los resultados del cálculo de la fracción de recombinación entre los loci *intercross* (C8) (Maliéppard *et al.*, 1997).

Este trabajo representa el primer reporte de mapa genético de la especie *A. sellowiana*. El mapa presentado basado principalmente en marcadores tipo AFLP e ISSR constituye un marco sobre el cual nuevos marcadores codominantes tipo SSR, así como marcadores STS, secuencias génicas y marcadores morfológicos podrán ser mapeados progresivamente, para generar un mapa genético saturado. Este mapa representa un punto de partida en la caracterización estructural del genoma de *A. sellowiana*, la cual será eventualmente enriquecida con futuros estudios de mapeo comparativo y estudios filogenéticos dentro de la familia *Myrtaceae*. Igualmente, constituye una plataforma útil para estudiar la arquitectura genética de la diversidad fenotípica observada en la especie y con ello auxiliar a los programas de mejoramiento genético, mediante subsiguientes estudios de mapeo de caracteres de interés agronómico (mapeo de genes y QTLs) y esquemas de selección asistida por marcadores.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- Atchinson E. 1947. Chromosome numbers in the *Myrtaceae*. *American Journal of Botany*, 34(3): 159 - 164.
- Baccino ME. 2011. Estructura genética de cuatro poblaciones silvestres de *Acca sellowiana* (Berg) Burret situadas en el noreste de Uruguay. [Tesis de grado en Ciencias Biológicas]. Montevideo, Uruguay: Facultad de Ciencias. 72p.
- Barreneche T, Bodenes C, Lexer C, Trontin JF, Fluch S, Streiff R, Plomion C, Roussel G, Steinkellner H, Burg K, Favre JM, Glossl J, Kremer A. 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(7): 1090 - 1103.
- Beedanagari SR, Dove SK, Wood BW, Conner PJ. 2005. A first linkage map of pecan cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(6): 1127 - 1137.
- Bradshaw HDJr, Stettler RF. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II. Segregation distortion due to genetic load. *Theoretical and Applied Genetics*, 139(5): 963 – 973.
- Brondani RPV, Williams ER, Brondani C, Grattapaglia D. 2006. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. *BMC plant biology*, 6 (1): 20 - 36.
- Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, Villani F. 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(8): 1190 - 1199.
- Cavalcanti JJV, Wilkinson MJ. 2007. The first genetic maps of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Euphytica*, 157(1): 131 - 143.

- Cervera MT, Storme V, Ivens B, Gusmão J, Liu BH, Hostyn V, Van Slycken J, Van Montagu M, Boerjan W. 2001. Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics*, 158(2): 787 - 809.
- Costa IR, Carnier MD, Forni-Martins ER. 2008. Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical *Myrtaceae*. *Plant Systematics and Evolution*, 276(3): 209 – 217.
- Creste S, Tulmann NA, Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(4): 299 - 306.
- Dettori MT, Palombi MA. 2000. Identification of *Feijoa sellowiana* Berg. accessions by RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 86(4): 279 - 290.
- Dirlewanger E, Moing A, Rothan C, Svanella L, Pronier V, Guye A, Plomion C, Monet R. 1999. Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theoretical and Applied Genetics*, 98(1): 18 - 31.
- Dirlewanger E, Pronier V, Parvery C. 1998. Genetic linkage map of peach (*Prunus persica* L. Batsch) using morphological and molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(5): 888 - 895.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1): 11 - 15.
- Ducroquet JPHJ, Nunes EC, Guerra MP, Nodari RO. 2008. Novas cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 414-Mattos e SCS 415-Nonante. *Revista Agropecuária Catarinense*, 21(2): 77 - 80.
- Ducroquet JPHJ, Santos KL, Andrade ER, Boneti JIS, Bonin V, Nodari RO. 2007. As primeiras cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 411 Alcântara e SCS 412 Helena. *Revista Agropecuária Catarinense*, 20(2): 77 - 80.

- Ducroquet JPHJ, Hickel ER, Nodari RO. 2000. Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*). Jaboticabal: Ediciones Funep. 66p. (Série Frutas Nativas).
- Ellegren H, Primmer CR, Sheldon BC. 1995. Microsatellite evolution - directionally or bias. *Nature Genetics*, 11(1): 360 - 362.
- Finatto T, Santos KL, Steiner N, Bizzocchi L, Holderbaum DF, Ducroquet JPHJ, Guerra MP, Nodari RO. 2011. Late-acting self-incompatibility in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*, 59(1): 53 - 60.
- Garcia AAF, Kido EA, Meza AN, Souza HMB, Pinto LR, Pastina MM, Leite CS, da Silva JAG, Ulian EC, Figueira A, Souza AP. 2006. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(2): 298 - 314.
- Grattapaglia D, Sederoff R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137(4): 1121 - 1137.
- Hanley S, Barker JHA, Van Ooijen JW, Aldam C, Harris SL, Åhman IS, Larsson S, Karp A. 2002. A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on AFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(6): 1087 - 1096.
- Kosambi DD. 1944. The estimation of map distance from recombinations values. *Annuaire Eugenetic*, 12(1): 172 - 175.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln EE, Newburg L. 1987. MapMarker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1(1): 174 - 181.
- Leitch IJ, Chase MW, Bennett MD. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany*, 82(1): 85 - 94.

- Lepitre V, Nansot G, Grangeon R, Pomies V, Rivallan R, Risterucci AM, Valdés-Infante J, Rodríguez-Medina NN, Muth J, Boike J, Prüfer D, Becker D, Rohde W, Ritter E, Billotte N. 2010. The Microsatellite (SSR)/AFLP Reference Linkage Map of guava. *Acta Horticulturae*, 849(1): 183 - 192.
- Liebhart R, Koller B, Gianfranceschi L, Gessler C. 2003. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(8): 1497 - 1508.
- Maliepaard C, Jansen J, Van Ooijen JW. 1997. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. *Genetical Research*, 70(3): 237 – 250.
- Margarido GRA, Souza AP, Garcia AAF. 2007. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*, 144(3): 78 - 79.
- Marques CM, Araújo JA, Ferreira JG, Whetten R, O'Malley DM, Liu BH, Sederoff R. 1998. AFLP genetic maps and *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(6): 727 - 737.
- Oliveira EJ, Carneiro MLV, Garcia AAF, Munhoz CF, Margarido GRA, Consoli L, Matta FP, Moraes MC, Zucchi MI, Fungaro MHP. 2008. An integrated molecular map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(1): 35 - 41.
- Puppo M. 2008. Prospección y caracterización de poblaciones silvestres de *Acca sellowiana* (Guayabo del país) [Tesis de grado de Ing. Agr.] Montevideo, Uruguay: Facultad de Agronomía. 123p.
- Quezada M. 2008. Estudio de la diversidad genética de una colección de *Acca sellowiana* (Berg) Burret con alto potencial agronómico mediante el uso de marcadores

- moleculares RAPD [Tesis de grado en Ciencias Biológicas]. Montevideo, Uruguay: Facultad de Ciencias. 111p.
- Rojas SG, Rodrigues D, Lima M, Astolfi Philo S. 2008. Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites gênicos (EST-SSRs) de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.k] McVaugh). *Revista Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 9(1): 14 - 21.
- Rosa R, Angiolillo A, Guerrero C, Pellegrini M, Rallo L, Besnard G, Bervillé A, Martin A, Baldoni L. 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(7): 1273 - 1282.
- Sankar AA, Moore GA. 2001. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2): 206 - 214
- Santos KL, Santos MO, Laborda PR, Souza AP, Peroni N, Nodari RO. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Acca sellowiana* (Berg) Burret. *Molecular ecology resources*, 8(5): 998 - 1000.
- Santos KL, Welter LJ, Mesquita AC, Guerra MP, Ducroquet JPHJ, Nodari RO. 2007. Transference of microsatellite markers from Eucalyptus spp to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. *Genetics and Molecular Biology*, 30(1): 73 - 79.
- Testolin R, Huang WG, Lain O, Messina R, Vecchione A, Cirpiani G. 2001. A kiwifruit (*Actinidia spp.*) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(1): 30 - 36.
- Thorp G and Bielecki R. 2002. Feijoas: Origins, Cultivation and Uses. 1ª Edition. Auckland: Ed. David Bateman Ltd. 87p.
- Valdés-Infante HJ, Rodríguez MNN, Alor MB, Ortiz GMM, Quiroz MA, Sanchez TLF, Risterucci AM, Rohde W. 2010. Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium*

- guajava L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia *Myrtaceae*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1): 64 - 76.
- Venkateswarlu M, Raje SU, Surendra BN, Shashidhar HE, Maheswaran M, Veeraiah TM, Sabitha MG. 2006. A first genetic linkage map of mulberry (*Morus* spp.) using RAPD, ISSR, and SSR markers and pseudo testcross mapping strategy. *Tree Genetics and Genomes*, 3(1): 15 - 24.
- Voorrips RE. 2002. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1): 77 - 78.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407 – 4414.
- Weston JR. 2010. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, *Myrtaceae*): A review. *Food Chemistry*, 121(4): 923 - 926.
- Wu SB, Collins G, Sedgley M. 2003. A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. *Genome*, 47(1): 26 - 35.
- Wu RL, Ma CX, Painter I, Zeng ZB. 2002. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. *Theoretical Population Biology*, 61(3): 349 - 363.
- Wu RL, Han YF, Hu JJ, Fang JJ, Li L, Li ML, Zeng ZB. 2000. An integrated genetic map of *Populus deltoides* based on amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8): 1249 – 1256.
- Xu X, Zhan'ao D, Qifa Z, Cunxian C, Gmitter FGJr. 2009. Developing specific markers and improving genetic mapping for a major locus *tyr1* of citrus nematode resistance. *Molecular Plant Breeding*, 7(3): 497 - 504.

Xu ML, Korban SS. 2000. Saturation mapping of the apple scab resistance gene Vf using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(5-6): 844 - 851.

3

CONCLUSIONES GENERALES

La población de mapeo de hermanos enteros F₁ originada del cruzamiento TCO x BR fue apropiada para la construcción del primer mapa genético de la especie *A. sellowiana* dado el nivel del polimorfismo detectado entre los progenitores y el alto número de individuos analizados de la progenie (160 genotipos).

El total de 299 marcadores obtenidos permitió el desarrollo de los mapas genéticos con un aceptable nivel de saturación. Los marcadores dominantes ISSR (59) y AFLP (233) constituyeron una metodología clave en la construcción del mapa genético, generando un alto número de marcadores de forma rápida y eficiente, logrando una amplia cobertura del genoma. Sumado a esto, resultó fundamental la inclusión de marcadores codominantes SSR (7), altamente informativos, y que brindan puntos de anclaje que permitirán futuras comparaciones con subsecuentes mapas de la especie.

La aplicación de la estrategia de mapeo doble cruzamiento prueba permitió exitosamente la construcción de mapas genéticos independientes para cada progenitor. El número de grupos de ligamiento obtenido, 10 y 17 en el mapa monoparental femenino TCO y masculino BR, respectivamente, son cercanos al número haploide de la especie ($n = 11$), lo que indicaría que los mapas generados son una buena representación de la estructura genética de los progenitores.

La metodología de estimación simultánea del ligamiento y las fases de ligamiento usando una metodología de máxima verosimilitud implementada en el software *OneMap* permitió la construcción del primer mapa integrado de *A. sellowiana*. El mapa integrado comprendió 224 marcadores, incluyendo 115 marcadores en configuración *testcross* y 109 *intercross* que fueron asignados a 15 grupos de ligamiento mayores y 23 menores (tripletes y dobletes). El largo total del mapa (2927,9 cM) y la distancia promedio entre marcadores (16 cM) es comparable con los de mapas genéticos de las especies mirtáceas más emparentadas. Con la inclusión de nuevos marcadores se espera lograr un nivel de saturación mayor, acercando el número de grupos de ligamiento al valor esperado del

número haploide de la especie ($n = 11$), y dentro de cada grupo disminuyendo la distancia promedio entre marcadores.

El 40% de los marcadores generados presentaron distorsión de segregación, y por lo tanto no que fueron considerados en la construcción del mapa. Dado el alto número de marcadores encontrados con este patrón, será recomendable estudiar las posibles causas de este fenómeno en la especie y la implicancia de su inclusión en los subsecuentes mapas genéticos de la especie.

Dos de los cinco SSR incluidos en el mapa integrado corresponden a SSR transferidos de otras mirtáceas *i.e.* *E. grandis* y *M. dubia*, constituyendo por el momento los únicos marcadores puentes localizados en una mapa de mirtáceas. Pese al alto nivel de transferibilidad observado (entre 40 y 100% según la especie de origen), resultó llamativamente baja la tasa de polimorfismo revelada con estos marcadores al comparar TCO y BR, de tal manera que solo el 20% de marcadores resulto polimórfico. En futuros estudios será necesidad de desarrollar y mapear un mayor número de marcadores codominantes, que permitan una completa integración y mejor ordenamiento de los grupos de ligamiento, así como iniciar los estudios de mapeo comparativo con especies emparentadas.

El mapa genético representado representa el primer reporte para la especie *A. sellowiana*, y el segundo mapa genético desarrollado para una especie mirtácea de la tribu *Myrteae*, de fruto carnoso con importancia frutícola. Este mapa resulta en un primer armazón, sobre el cual nuevos marcadores moleculares, así como marcadores STS, secuencias génicas y marcadores morfológicos serán incorporados contribuyendo a la saturación del mapa. El mapa presentado constituye el primer paso en el estudio de la arquitectura genética de la especie, y permitirá auxiliar los programas de mejoramiento genético, mediante subsiguientes estudios de mapeo de caracteres de interés agronómico (mapeo de genes y QTLs) y esquemas de selección asistida por marcadores. La construcción de nuevos mapas genéticos a partir de otras poblaciones de mapeo que comparten el progenitor femenino TCO permitirá el desarrollo de un mapa consenso para la especie *A. sellowiana*

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Andrade FG, Forni-Martins ER. 1998. Estudos cromossômicos em espécies de *Myrtaceae*. *Genetics and Molecular Biology*, 21(4): 166 - 176.
- Atchinson E. 1947. Chromosome numbers in the *Myrtaceae*. *American Journal of Botany*, 34(3): 159 - 164.
- Baccino ME. 2011. Estructura genética de cuatro poblaciones silvestres de *Acca sellowiana* (Berg) Burret situadas en el noreste de Uruguay. [Tesis de grado en Ciencias Biológicas] Montevideo, Uruguay: Facultad de Ciencias. 72p.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, 16(18): 3759 - 3767.
- Barni EJ, Ducroquet JP, Silva MC, Neto RB, Presser RF. 2004. Potencial de mercado para goiabeira-serrana catarinense. Florianópolis: Epagri. 48p (Documento nº 212).
- Barreneche T, Bodenes C, Lexer C, Trontin JF, Fluch S, Streiff R, Plomion C, Roussel G, Steinkellner H, Burg K, Favre JM, Glossl J, Kremer A. 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(7): 1090 - 1103.
- Beedanagari SR, Dove SK, Wood BW, Conner PJ. 2005. A first linkage map of pecan cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(6): 1127 - 1137.
- Bontempo P, Mita L, Miceli M, Doto A, Nebbioso A. 2007. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(10): 1902 - 1914.

- Bradshaw HDJr, Stettler RF. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II. Segregation distortion due to genetic load. *Theoretical and Applied Genetics*, 139(5): 963 – 973.
- Brondani RPV, Williams ER, Brondani C, Grattapaglia D. 2006. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. *BMC plant biology*, 6(1): 20 - 36.
- Cardona JP, Cardenas E, Herrera A, Quicazan M. 2002. Estudio de las propiedades físicas y químicas de la feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.) en manejo poscosecha. En: 5to Encuentro Iberoamericano sobre las Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias; 15-17 octubre; 2002; La Habana, Cuba. pp. 69 - 72 v.1.
- Carneiro MS, Carneiro VML. 2002. Mapas genéticos en plantas. *Bragantia*, 61(2): 89 - 100.
- Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, Villani F. 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(8): 1190 - 1199.
- Cavalcanti JJV, Wilkinson MJ. 2007. The first genetic maps of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Euphytica*, 157(1): 131 - 143.
- Cervera MT, Storme V, Ivens B, Gusmão J, Liu BH, Hostyn V, Van Slycken J, Van Montagu M, Boerjan W. 2001. Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics*, 158(2): 787 - 809.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142(1): 169 - 196.
- Costa IR, Carnier MD, Forni-Martins ER. 2008. Nuclear genome size variation in fleshy-fruited Neotropical *Myrtaceae*. *Plant Systematics and Evolution*, 276(3): 209 – 217.

- Costa IR, Forni-Martins ER. 2007. Karyotype analysis in South American species of *Myrtaceae*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155(4): 571 - 558.
- Creste S, Tulmann NA, Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(4): 299 - 306.
- Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press. 1262 p.
- Degenhardt J, Ducroquet JPHJ, Guerra MP, Nodari RO. 2003. Avaliação fenotípica de características de frutos em duas famílias de meios-irmãos de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* Berg.) de um pomar comercial em São Joaquim, SC. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(3): 475 - 479.
- Dettori MT, Palombi MA. 2000. Identification of *Feijoa sellowiana* Berg. accessions by RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 86(4): 279 - 290.
- Di Cesare LF, Nani R, D'Angelo V. 1995. Composizione e distribuzione dei componenti volatili in cultivar di *Feijoa sellowiana* coltivate in Italia. *Industrie Alimentari*, 337(34): 498 - 503.
- Dirlewanger E, Graziano E, Joobeur T, Garriga-Calderé F, Cosson P, Howad W, Arús P. 2004. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(26): 9891 - 9896.
- Dirlewanger E, Moing A, Rothan C, Svanella L, Pronier V, Guye A, Plomion C, Monet R. 1999 Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theoretical and Applied Genetics*, 98(1): 18 - 31.
- Dirlewanger E, Pronier V, Parvery C. 1998. Genetic linkage map of peach (*Prunus persica* L. Batsch) using morphological and molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(5): 888 - 895.

- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1): 11 - 15.
- Ducroquet JPHJ, Nunes EC, Guerra MP, Nodari RO. 2008. Novas cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 414-Mattos e SCS 415-Nonante. *Revista Agropecuária Catarinense*, 21(2): 77 - 80.
- Ducroquet JPHJ, Santos KL, Andrade ER, Boneti JIS, Bonin V, Nodari RO. 2007. As primeiras cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 411 Alcântara e SCS 412 Helena. *Revista Agropecuária Catarinense*, 20(2): 77 - 80.
- Ducroquet JPHJ, Hickel ER, Nodari RO. 2000. Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*). Jaboticabal: Ediciones Funep. 66p. (Série Frutas Nativas).
- Ellegren H, Primmer CR, Sheldon BC. 1995. Microsatellite evolution - directionally or bias. *Nature Genetics*, 11(1): 360 - 362.
- Finatto T, Santos KL, Steiner N, Bizzocchi L, Holderbaum DF, Ducroquet JPHJ, Guerra MP, Nodari RO. 2011. Late-acting self-incompatibility in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*, 59(1): 53 - 60.
- Galbraith DW, Harkins KR, Knapp S. 1991. Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 96(3): 985 - 989.
- Garcia AAF, Kido EA, Meza AN, Souza HMB, Pinto LR, Pastina MM, Leite CS, da Silva JAG, Ulian EC, Figueira A, Souza AP. 2006. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(2): 298 - 314.
- Grattapaglia D, Sederoff R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137(4): 1121 - 1137.

- Hanley S, Barker JHA, Van Ooijen JW, Aldam C, Harris SL, Åhman IS, Larsson S, Karp A. 2002. A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on AFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(6): 1087 - 1096.
- Harman JE. 1987. Feijoa Fruit: growth and chemical composition during development. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 15(2): 209 - 215.
- Keller HA, Tressens SG. 2007. Presencia en Argentina de dos especies de uso múltiple: *Acca sellowiana* (Myrtaceae) y *Casearia lasiophylla* (Flacourtiaceae). *Darwiniana*, 45(2): 204 - 212.
- Kosambi DD. 1944. The estimation of map distance from recombinations values. *Annuaire Eugenetic*, 12(1): 172 - 175.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln EE, Newburg L. 1987. MapMarker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1(1): 174 - 181.
- Landrum LR. 1986. *Campomanseia, Pimenta, Blepharocalix, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma* (Myrtaceae). *Flora Neotropica*, 45(1): 1 - 179.
- Legrand D. 1968. Las Mirtáceas del Uruguay III. Montevideo: Universidad de la República. 80p. (Boletín Facultad de Agronomía no.101).
- Leitch IJ, Chase MW, Bennett MD. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany*, 82(1): 85 - 94.
- Lepitre V, Nansot G, Grangeon R, Pomies V, Rivallan R, Risterucci AM, Valdés-Infante J, Rodríguez-Medina NN, Muth J, Boike J, Prüfer D, Becker D, Rohde W, Ritter E, Billotte N. 2010. The Microsatellite (SSR)/AFLP Reference Linkage Map of guava. *Acta Horticulturae*, 849(1): 183 - 192.

- Liebhart R, Koller B, Gianfranceschi L, Gessler C. 2003. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(8): 1497 - 1508.
- Maliepaard C, Jansen J, Van Ooijen JW. 1997. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. *Genetical Research*, 70(3): 237 – 250.
- Margarido GRA, Souza AP, Garcia AAF. 2007. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*, 144(3): 78 - 79.
- Marques CM, Araújo JA, Ferreira JG, Whetten R, O'Malley DM, Liu BH, Sederoff R. 1998. AFLP genetic maps and *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(6): 727 - 737.
- Martínez N, Fariña L, Lorenzo D, Montes F, Vignale B, Bisio L, Dellacasa E. 2007. Valoración química y sensorial de frutas nativas para su aprovechamiento comercial. En: 11º Congreso Nacional de la Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura y 3º Congreso panamericano Promoción del Consumo de Frutas y Hortalizas; 21 – 23 mayo; 2007; Montevideo, Uruguay. Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura.
- Matsumoto S, Marin-Morales M, Ruas C, Ruas P. 2000. Cytogenetic analysis of seven species of *Eucalyptus* L'Her. (*Myrtaceae*). *Caryologia* 53(3): 205 - 212.
- Mattos JR. 1986. A Goiabeira-Serrana. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis. 84p.
- Mattos JR. 1969. O gênero Feijoa Berg. São Paulo: Arquivo Botânico Estado de São Paulo. 267p.
- Nagle AR. 2004. El cultivo de la feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). [Tesis de grado] Caldas, Colombia: Facultad de Ciencias Agropecuarias. 48p.

- Oliveira EJ, Carneiro MLV, Garcia AAF, Munhoz CF, Margarido GRA, Consoli L, Matta FP, Moraes MC, Zucchi MI, Fungaro MHP. 2008. An integrated molecular map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(1): 35 - 41.
- Popenoe FW. 1912. *Feijoa sellowiana*; its history, culture and varieties. *Pomona College Journal of Economic Botany*, 2(1): 217 - 242.
- Pritsch C, Vignale B, Rivas M, Puppo M, Gándara J, Quezada M, Camussi G, Ross S, Krause M. 2007. Primer estudio sistemático de las poblaciones de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret como recurso genético. En: 11° Congreso Nacional de la Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura y 3° Congreso panamericano Promoción del Consumo de Frutas y Hortalizas; 21 – 23 mayo; 2007; Montevideo, Uruguay. Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura.
- Puppo M. 2008. Prospección y caracterización de poblaciones silvestres de *Acca sellowiana* (Guayabo del país) [Tesis de grado de Ing. Agr.] Montevideo, Uruguay: Facultad de Agronomía. 123p.
- Quezada M. 2008. Estudio de la diversidad genética de una colección de *Acca sellowiana* (Berg) Burret con alto potencial agronómico mediante el uso de marcadores moleculares RAPD [Tesis de grado en Ciencias Biológicas]. Montevideo, Uruguay: Facultad de Ciencias. 111p.
- Ritter E, Herran A, Valdés-Infante J, Rodríguez-Medina NN, Briceño A, Fermin G, Sanchez-Teyer F, O'Connor-Sanchez A, Muth J, Boike J, Pruffer D, Santos CA, Nunes dos Santos IC, Rodrigues MA, Risterucci AM, Billote N, Becker D, Rohde W. 2010. Comparative linkage mapping in three guava mapping populations and construction of an integrated reference map in guava. *Acta Horticulturae*, 849(1): 175 - 182.

- Rivas M, Vignale B, Camussi G, Puppo M, Pritsch C. 2007. Los recursos genéticos de *Acca sellowiana* (Berg) Burret en Uruguay. *Avances de investigación en recursos genéticos en el Cono Sur*, 2(1) 103 - 112.
- Rojas SG, Rodrigues D, Lima M, Astolfi Philo S. 2008. Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites gênicos (EST-SSRs) de camu-camu (*Myrciaria dubia* [H.B.k] McVaugh). *Revista Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 9(1): 14 - 21.
- Rosa R, Angiolillo A, Guerrero C, Pellegrini M, Rallo L, Besnard G, Bervillé A, Martin A, Baldoni L. 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(7): 1273 - 1282.
- Rye BL. 1979. Chromosome number variation in the *Myrtaceae* and its taxonomic implications. *Australian Journal of Botany*, 27(5): 547 - 573.
- Salvarrey MJ. 2008. Evaluación de diferentes técnicas de propagación vegetativa en "Guayabo del País" (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret.). [Tesis de grado de Ing. Agr.] Montevideo, Uruguay: Facultad de Agronomía. 79p.
- Sankar AA, Moore GA. 2001. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2): 206 - 214
- Santos KL, Santos MO, Laborda PR, Souza AP, Peroni N, Nodari RO. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Acca sellowiana* (Berg) Burret. *Molecular ecology resources*, 8(5): 998 - 1000.
- Santos KL, Lenzi M, Capestrano CA, Mesquita AC, Ducroquet JPHJ, Nodari RO, Oth AI, Guerra MP. 2007a. Evidência da atuação do sistema de auto-incompatibilidade tardia em *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (*Myrtaceae*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29(1): 120 - 123.
- Santos KL, Welter LJ, Mesquita AC, Guerra MP, Ducroquet JPHJ, Nodari RO. 2007b. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp to *Acca sellowiana* and the

- successful use of this technique in genetic characterization. *Genetics and Molecular Biology*, 30(1): 73 - 79.
- Semagn K, Bjørnstad A, Ndjiondjop MN. 2006. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*, 25(5): 2569 - 2587.
- Sooriyapathirana SS, Khan A, Sebolt AM, Wang D, Bushakra JM, Lin-Wang K, Allan AC, Gardine SE, Chagné D, Iezzoni AF. 2010. QTL analysis and candidate gene mapping for skin and flesh color in sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.). *Tree Genetics and Genomes*, 6(6): 821 - 832.
- Tálice R, Castro J, Izaguirre P. 1996. Prospección de frutas autóctonas con énfasis en el guayabo del país y durazno. Montevideo: INIA-Proyecto FPTA Informe final 054. 55p
- Testolin R, Huang WG, Lain O, Messina R, Vecchione A, Cirpiani G. 2001. A kiwifruit (*Actinidia spp.*) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(1): 30 - 36.
- Thorp G and Bielecki R. 2002. Feijoas: Origins, Cultivation and Uses. 1^a Edition. Auckland: Ed. David Bateman Ltd. 87p.
- Valdés-Infante HJ, Rodríguez MNN, Alor MB, Ortiz GMM, Quiroz MA, Sanchez TLF, Risterucci AM, Rohde W. 2010. Microsatélites desarrollados en guayabo (*Psidium guajava* L.) y su utilidad para evaluar diversidad en la familia *Myrtaceae*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1): 64 - 76.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D. *et al.* 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42(8): 833 – 839.
- Venkateswarlu M, Raje SU, Surendra BN, Shashidhar HE, Maheswaran M, Veeraiah TM, Sabitha MG. 2006. A first genetic linkage map of mulberry (*Morus spp.*) using RAPD, ISSR, and SSR markers and pseudo testcross mapping strategy. *Tree Genetics and Genomes*, 3(1): 15 - 24.

- Vezzulli S, Troggio M, Coppola G, Jermakow A, Cartwright D, Zharkikh A, Stefanini M, Grando MS, Viola R, Adam-Blondon AF, Thomas M, This P, Velasco R. 2008. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(4): 499 - 511.
- Vignale B, Camussi G, Cabrera D, Nebel JP, Cunda N, Pritsch C. 2006. Avances en la selección del guayabo del país *Acca sellowiana* (Berg) Burret en Uruguay. En: III Simposio Nacional do Morango; II Encontro de Pequenas Frutas Nativas do MERCOSUR; 7 – 10 noviembre; 2006; Pelotas, Brasil. EMBRAPA Clima Temperado. Pp. 155-160
- Voorrips RE. 2002. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1): 77 - 78.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407 – 4414.
- Wang D, Karle R, Iezzoni AF. 2000. QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3-4): 535 - 544.
- Welter LJ, Göktürk-Baydar N, Akkurt M, Maul E, Eibach R, Töpfer R, Zyprian EM. 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L) *Molecular Breeding*, 20(4): 359 - 374.
- Weston JR. 2010. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, *Myrtaceae*): A review. *Food Chemistry*, 121(4): 923 - 926.
- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ. 2001. *Myrtaceae* revisited: a reassessment of intrafamilial groups. *American Journal of Botany*, 88(11): 2013 - 2025.

- Wu SB, Collins G, Sedgley M. 2003. A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. *Genome*, 47(1): 26 - 35.
- Wu RL, Ma CX, Painter I, Zeng ZB. 2002. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. *Theoretical Population Biology*, 61(3): 349 - 363.
- Wu RL, Han YF, Hu JJ, Fang JJ, Li L, Li ML, Zeng ZB. 2000. An integrated genetic map of *Populus deltoides* based on amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8): 1249 – 1256.
- Xu X, Zhan'ao D, Qifa Z, Cunxian C, Gmitter FGJr. 2009. Developing specific markers and improving genetic mapping for a major locus *tyr1* of citrus nematode resistance. *Molecular Plant Breeding*, 7(3): 497 - 504.
- Xu ML, Korban SS. 2000. Saturation mapping of the apple scab resistance gene Vf using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(5): 844 - 851.

5

ANEXOS**5.1 METODOLOGÍA DEL CRUZAMIENTO TCO x BR**

Dentro del programa de mejoramiento genético de *A. sellowiana* (FA-UdelaR, INIA y MGAP), fueron realizados cruzamientos entre progenitores heterocigotos seleccionados y complementarios con el objetivo de generar progenies F₁ segregantes dentro de las cuales seleccionar recombinantes que presenten buena calidad de fruta para la explotación comercial y buena producción. Uno de estos cruzamientos y la progenie resultante fue seleccionado para la construcción del mapa genético. Los progenitores utilizados fueron seleccionados buscando complementar las características de interés agronómico que se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Nombre, origen y caracteres de fruta y planta de los progenitores del cruzamiento de *A. sellowiana* utilizado para la construcción del mapa genético.

Progenitor	Origen	Caracteres de fruta			Caracteres de planta		
		Tamaño de fruta	Cáscara	Sabor	Pulpa	Desarrollo	Productividad
TCO	Zona silvestre, Cuchilla de Laureles, Tacuarembó.	pequeña	Lisa, Brillosa, amarilla, muy fina	Muy bueno (alto contenido de azúcar)	Fundente	Bueno	Muy buena
BR	Quinta frutícola, Melilla, Canelones.	grande	Rugosa, verde oscura, gruesa	Sin sabor	No fundente	Bueno	Muy buena

En octubre de 2008, se realizaron cruzamientos simples, para los cuales siete flores previamente emasculadas en el pie femenino TCO se fecundaron con polen y se cubrieron con tul. El progenitor masculino BR no forma parte de la Jardín de introducción de la EEFAS, por lo que fueron colectadas flores con polen en el lugar de origen y enviadas a la EEFAS. De las flores polinizadas, cuatro cuajaron (57 %), dentro del rango esperado para la especie. La cosecha de los frutos maduros generados conteniendo semilla F₁ se realizó en abril 2009, con un total de 357 semillas. Las mismas fueron obtenidas según: fruto 1: 108 semillas, fruto

2:90 semillas; fruto 3: 127 semillas; y fruto 4: 32 semillas. En mayo del 2009, 300 semillas fueron sembradas en almacigueras y se trasplantaron 181 plantines a macetas en setiembre, siempre mantenidas en invernáculo. El mismo no es calefaccionado y el sustrato que se utilizó es mantillo de monte de *Eucalyptus*. Finalmente, 181 plantas fueron llevadas a campo en agosto de 2010 y se mantienen en evaluación fenotípica. En la Tabla 7 se resume la eficiencia del cruzamiento TCO x BR y se compara con otros cruzamientos realizados dentro del programa de mejoramiento.

Tabla 7. Eficiencia de los cruzamientos entre genotipos seleccionados realizados dentro del programa de mejoramiento de *A. sellowiana*.

Cruzamiento	Flores polinizadas	Fruta cuajada	Total de semillas	Plántulas Trasplantadas
TCO (TcóEsc 85-04 VIII-3 cl) x BR	7	4	357	181
LL3 VIII-14 x TF1 IV-15	5	5	1063	186
LL3 VIII-16 x Ca 261 XII-15	5	5	738	224
TcóEsc 85-04 IV 12 x RN4 VIII-20	5	5	309	213
TCO (TcóEsc 85-04 VIII-3 cl) x Delpiano	6	5	308	250

5.2 MAPAS GENÉTICOS MONOPARENTALES TCO Y BR

Detalle de los mapas genéticos construidos para los progenitores femenino TCO y masculino BR, siguiendo una metodología doble cruzamiento prueba (Gratappaglia y Sederoff, 1994).

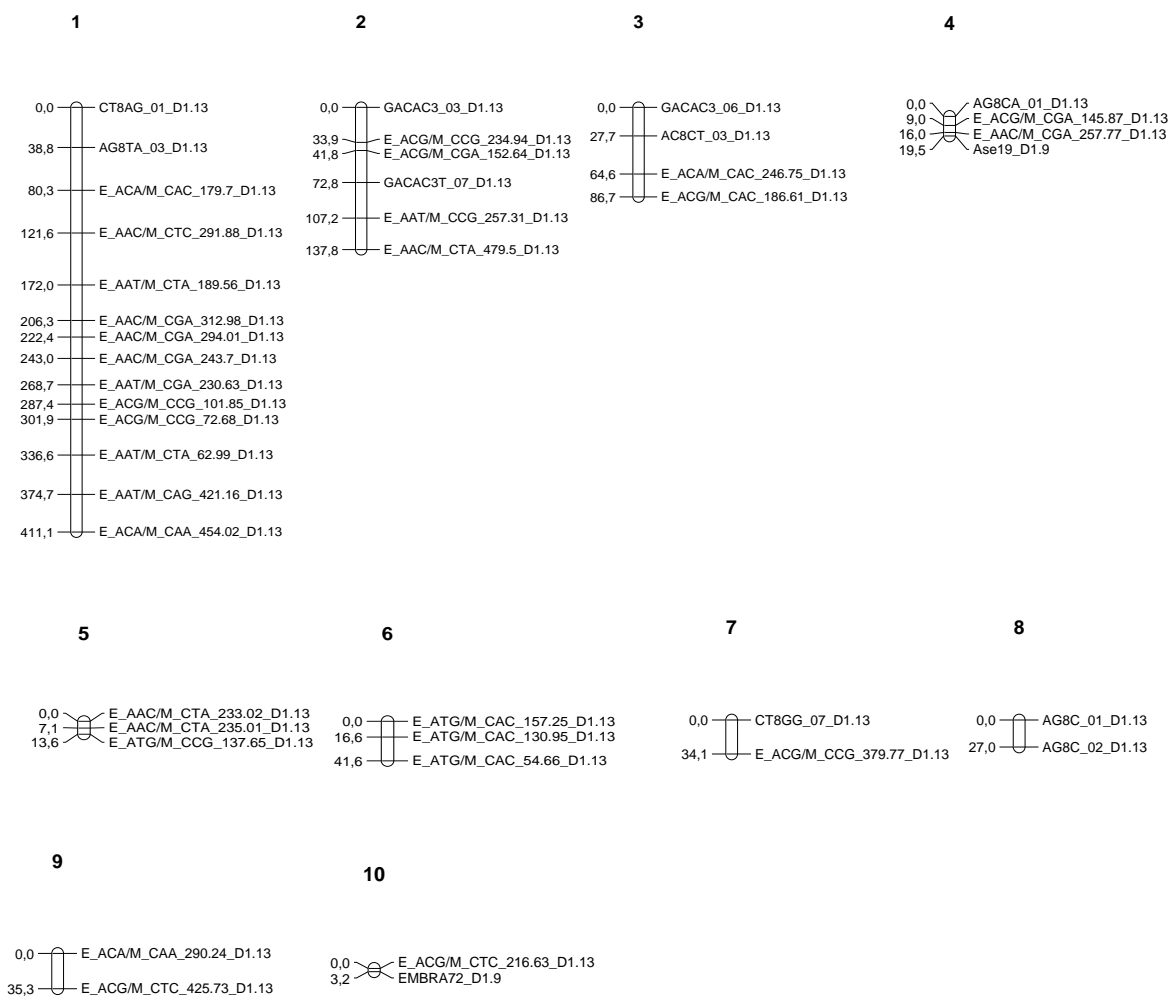


Figura 3. Mapa genético del progenitor femenino TCO, comprendiendo 10 marcadores ISSR, 30 AFLP y dos SSR. En cada grupo de ligamiento, los nombres de los marcadores se muestran a la derecha y las distancias genéticas expresadas en cM (Kosambi) a la izquierda.

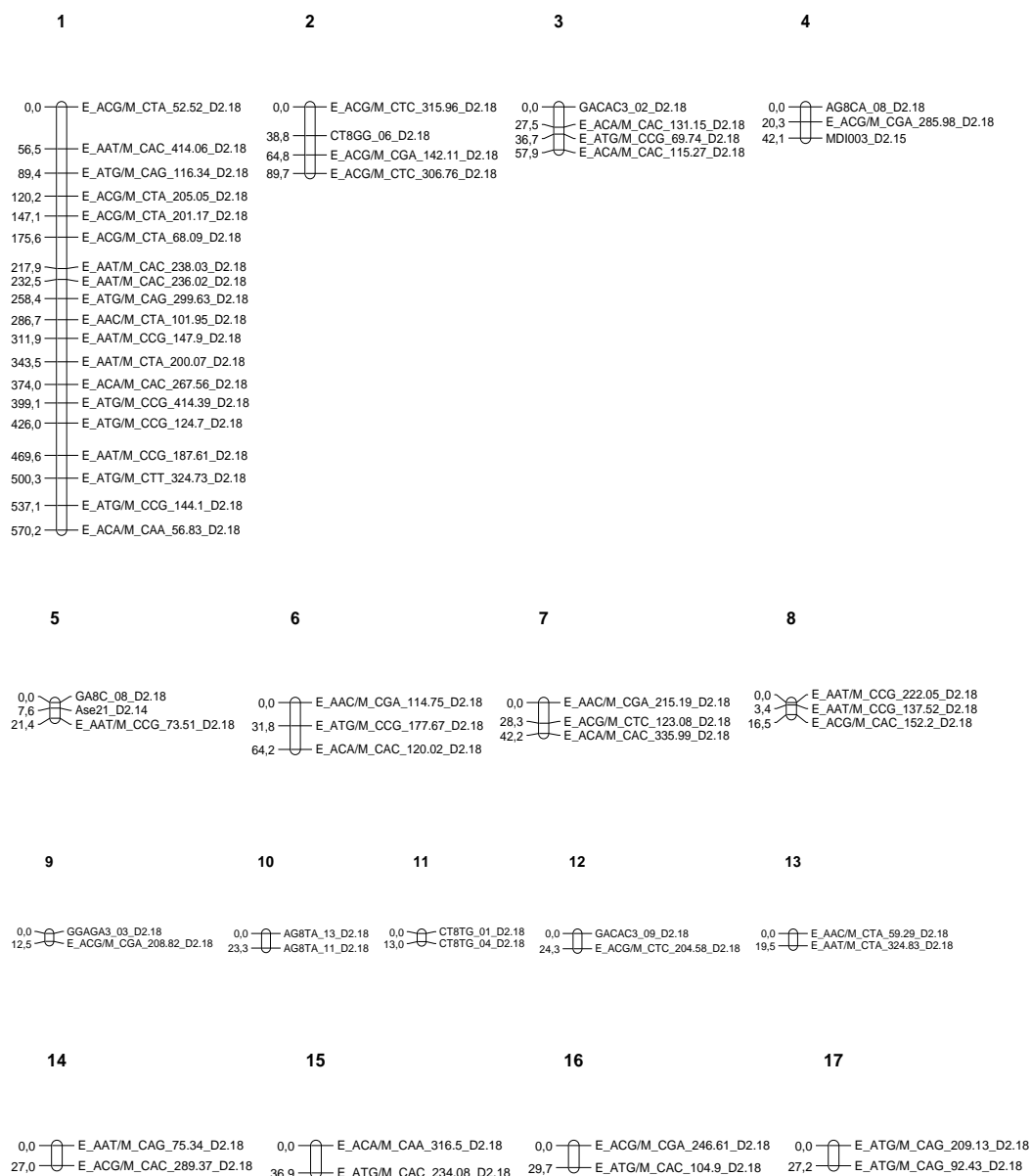


Figura 4. Mapa genético del progenitor masculino BR, comprendiendo 10 marcadores ISSR, 48 AFLP y dos SSR. En cada grupo de ligamiento, los nombres de los marcadores se muestran a la derecha y las distancias genéticas expresadas en cM (Kosambi) a la izquierda.