

MARCADORES SSR Y EST-SSR APLICADOS AL ANÁLISIS DEL GENOMA DE ESPECIES SILVESTRES DEL GENERO *ARACHIS*, Y EL ANFIPOIDE SINTÉTICO [(*A. CORRENTINA* X *A. CARDENASII*) X *A. BATIZOCOII*]^{4X}.

Torres L.¹, Costero B.¹, Teich I.², Taborda R. J.¹, Cisneros M.¹, Franceschini L.¹, De Blas, F.¹, Soave S. J.³, Buteler M. I.³, Faustinelli P. C.^{3,5}
ltorres@agro.unc.edu.ar

1- Fac. de Cs. Agropecuarias, UNC. 2- CONICET- Estadística y Biometría, Fac. de Cs. Agropecuarias, UNC. 3- Criadero El Carmen, Gral. Cabrera, Córdoba. 4- Fac. de Agronomía y Veterinaria- UNRC. 5- Universidad Católica de Córdoba.

Introducción

Numerosas especies vegetales cultivadas son, desde el punto de vista genético, poliploides naturales. Esta condición presenta tanto ventajas como desventajas, entre éstas, la ocurrencia del aislamiento reproductivo con respecto a los progenitores lo cual, sumado al proceso de domesticación y selección de genotipos superiores de interés productivo, repercute sobre la variabilidad genética. Tal es el caso de los cultivares de maní (*Arachis hypogaea* L.), que presentan entre otros problemas, alta susceptibilidad a enfermedades y plagas que afectan al rendimiento del cultivo. La sección *Arachis*, una de las nueve dentro del género *Arachis*, incluye al 40% de las especies silvestres, y constituyen un reservorio de genes de resistencia. En esta sección, las especies diploides silvestres ($2n=20$, $x=10$ y $2n=18$, $x=9$), presentan genomas diferentes denominados A, B, D, F y K, en tanto que, *A. hypogaea* y *A. monticola* son las únicas tetraploides, cultivada y silvestre respectivamente. Esta diferencia en los niveles de ploidía e incompatibilidad genómica, dificulta la transferencia de genes de resistencia al maní cultivado, siendo una estrategia posible, la obtención de un anfiplóide sintético con 40 cromosomas, a partir de un híbrido diploide. Mediante trabajos de hibridación y retrocruzamiento, junto a técnicas biotecnológicas, se pueden obtener variedades de maní con atributos deseables, en menor tiempo y costo.

Los marcadores moleculares de tipo microsatélites genómicos —SSRs— y de secuencias expresadas —EST-SSRs—, entre otros, permiten asistir la tarea del mejorador, mediante la caracterización genómica de los materiales sintéticos con respecto a sus progenitores, incrementando así la eficiencia y predictibilidad de los resultados. A partir de librerías genómicas tanto de *A. hypogaea* (genoma AA-BB) como de otras pertenecientes a tribus o secciones relacionadas a *Arachis*, se han desarrollado cientos de marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permiten identificar los genomas propuestos para las especies del género.

El objetivo del trabajo fue analizar mediante marcadores SSR y EST-SSR, el genoma de especies silvestres de maní y su permanencia en el híbrido [(*A. correntina* x *A. cardenasii*) x *A. batizocoii*] y en el anfiplóide derivado [(*A. correntina* x *A. cardenasii*) x *A. batizocoii*]^{4x}.

Materiales y métodos

Todos los materiales analizados pertenecen a la colección del criadero El Carmen y participan en el programa de mejoramiento de maní a fin de introducir resistencia a enfermedades y estrés abióticos en sus variedades cultivadas.

Mediante el método de CTAB, se extrajo el ADN a partir de hojas y pecíolos jóvenes de ejemplares pertenecientes a las especies silvestres del género *Arachis*: *A. cardenasii*, *A. correntina* -genoma AA-; *A. batizocoii*, *A. ipaënsis* y *A. magna* -genoma BB-, diploides, y dos introducciones tetraploides de *A. monticola* -genomas AABB-; un híbrido a tres vías [(*A. correntina* x *A. cardenasii*) x *A. batizocoii*] -Ah1- y el anfiplóide sintético [(*A. correntina* x *A. cardenasii*) x *A. batizocoii*]^{4x} (JS. S* 1806) -Ah2-. La calidad y cantidad de ADN fue evaluada por comparación con ADN de concentración conocida, en geles de agarosa al 1%. El ADN se visualizó bajo luz UV previa tinción con bromuro de etidio. Para la reacción de PCR, se utilizaron cebadores para los marcadores SSR genómicos -IPAHM 117, IPAHM109, Ah 041, Ah 193- y EST-SSRs -F13, PD20, PD59, EM31-, con alto grado de polimorfismo y capacidad discriminante entre especies y tipo de genoma. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las propuestas por la bibliografía y, en los casos de dudoso patrón electroforético, se probaron diferentes mezclas de reacción y condiciones de ciclado. Los productos de PCR se resolvieron en geles de bisacrilamida al 15 % y se visualizaron bajo luz UV, previa tinción con bromuro de etidio. Con el programa PB2 se determinó, en pares de bases (pb), el tamaño de las bandas obtenidas. Se calculó la distancia genética Euclídea entre las especies silvestres del género y los materiales sintéticos Ah1 y Ah2. Se generó el dendrograma correspondiente en el que se visualizan los agrupamientos según la similitud entre los materiales.

Resultados

El método basado en el uso de CTAB, permitió obtener un ADN de buena calidad y cantidad a partir del cual se logró amplificar, mediante PCR, y para todos los cebadores utilizados, fragmentos que resultaron polimórficos e informativos. Las distancias genéticas obtenidas y visualizadas en el dendrograma de la Fig. 1, revelan, en función de la mayor similitud genética, tres grupos: el híbrido Ah1 y el anfiplóide derivado Ah2, conforman un grupo junto a *A. correntina* y *A. cardenasii*, progenitores femenino y dador de polen, respectivamente y con genoma tipo AA; otro grupo conformado por *A. ipaënsis* y *A. magna* —genoma tipo BB— más relacionados entre

sí que con *A. batizocoi*, y el tercer grupo corresponde a las dos introducciones del tetraploide natural *A. monticola*.

De los ocho marcadores analizados, EM31 e IPAHM109 presentaron mayor y menor polimorfismo, respectivamente.

El análisis de los patrones electroforéticos obtenidos, permitió definir aquellas bandas que resultan marcadoras de la retención del genoma de *A. correntina*, *A. cardenasii* y *A. batizocoi* en el material sintético. Considerando conjuntamente los marcadores PD59 y PD20, es posible identificar en el híbrido —Ah1—, los tres genomas parentales, no así en el anfiploide derivado —Ah2— (Tabla 1).

Discusión y conclusiones

La amplificación mediante PCR con los ocho juegos de cebadores SSRs y EST-SSRs, generó fragmentos de tamaño diferente al esperado según la bibliografía; sin embargo los mismos fueron consistentes en las repeticiones y permitieron detectar la variabilidad y calcular las distancias genéticas. En el dendrograma se observa que las distancias, resultaron consistentes con lo esperado considerando la composición genómica de tipo AA o BB propuesta para las especies silvestres. En el caso de *A. batizocoi*, resulta de interés el resultado obtenido ya que refuerza la propuesta de redefinir para esta especie, el genoma de tipo K y no BB como *A. ipaënsis* y *A. magna*.

Probablemente los eventos generados por la duplicación química de cromosomas, podría ocasionar la modificación o incluso pérdida de marcadores presentes en los progenitores y que no son detectados en el anfiploide sintético Ah2. Continuando con estudios basados en marcadores de tipo SSRs o EST-SSRs, es posible avanzar en la validación de éstos para su aplicación en la selección asistida (MAS).

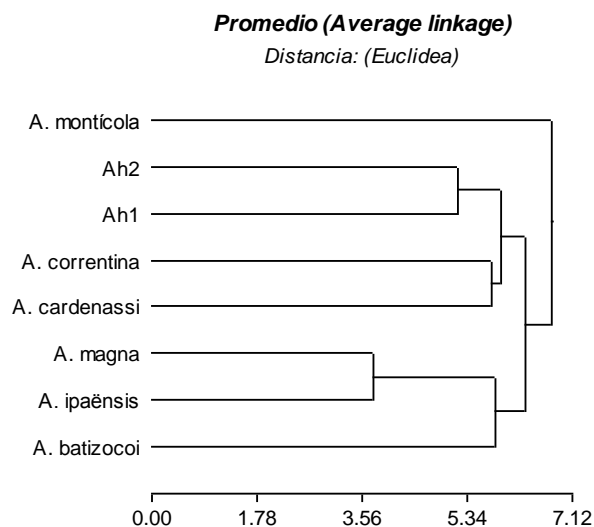


Figura 1. Dendrograma obtenido a partir de las distancias genéticas calculadas entre las especies silvestres: *A. correntina*, *A. cardenasii*, *A. batizocoi*, *A. magna*, *A. ipaënsis*, *A. monticola*; híbrido Ah1: [(*A. correntina* x *A. cardenasii*) x *A. batizocoi*] y anfiploide Ah2: [(*A. correntina* x *A. cardenasii*) x *A. batizocoi*]^{4x}.

Materiales	Marcadores EST-SSRs	
	PD59 (pb)	PD20 (pb)
<i>A. cardenasii</i>	136	306
<i>A. correntina</i>	136	304
<i>A. batizocoi</i>	134, 187, 233	311
<i>A. ipaënsis</i>	123, 172, 220	310, 440, 558
<i>A. magna</i>	123, 172, 220	320
<i>A. monticola1</i>	128, 142, 179, 228	310, 440, 558
<i>A. monticola2</i>	128, 142, 179, 228	310, 440, 558
Ah1: [(<i>A. correntina</i> x <i>A. cardenasii</i>) x <i>A. Batizocoi</i>]	136, 187, 233	298
Ah2: [(<i>A. correntina</i> x <i>A. cardenasii</i>) x <i>A. Batizocoi</i>] ^{4x}	136	304

Tabla 1. Patrón de bandas —en pares de bases (pb)—, correspondiente a los marcadores EST-SSRs PD59 y PD20.