

EVALUACIÓN DEL GERMOPLASMA DE *ILEX PARAGUARIENSIS* E *ILEX DUMOSA* (AQUIFOLIACEAE)

ALEXANDRA MARINA GOTTLIEB^{1,3}, GUSTAVO CARLOS GIBERTI^{2,3} y LIDIA POGGIO^{1,3}

Resumen: *Ilex paraguariensis* e *I. dumosa* constituyen dos especies de gran relevancia económica para nuestro país. Estas comparten muchas características de su biología, aunque se diferencian en composición fitoquímica y resistencia a factores bióticos y abióticos. El objetivo del presente trabajo es evaluar la estructura de la diversidad genética de plantas mantenidas en el Banco de Germoplasma de Yerba Mate y Té de la Estación Experimental del INTA en Cerro Azul (Misiones) y de materiales comerciales de yerba mate, mediante el re-análisis de datos AFLP, así como caracterizar las secuencias nucleotídicas de bandas potencialmente diagnósticas de especie. En *I. dumosa* se detectó, respecto de *I. paraguariensis*, un nivel de variación molecular dos veces mayor, aunque una menor proporción de bandas privadas. Las secuencias caracterizadas con herramientas bioinformáticas resultan ser nuevas regiones genómicas descritas para *Ilex*. Los resultados indican que los materiales estudiados de *I. dumosa* constituyen un reservorio de variabilidad genética apropiado para el fitomejoramiento de materiales de yerba mate potencialmente comerciales. Asimismo, nuestros resultados apoyan la renovación de estrategias de conservación tendientes a ampliar el acervo genético almacenado, particularmente de yerba mate.

Palabras clave: AFLP, yerba mate, yerba señorita, germoplasma, diferenciación genética.

Summary: *Ilex paraguariensis* and *Ilex dumosa* (Aquifoliaceae) germplasm evaluation. *Ilex paraguariensis* and *I. dumosa* are species with great economic relevance in Argentina. Both species share several features of their biology, though they differ in phytochemical composition and in their resistance to biotic and abiotic factors. The aim of the present work is to evaluate the structure of the genetic diversity of the plants kept at the Germplasm Bank of Yerba Mate (EEINTACA) and also of commercial materials of yerba mate, through a re-analysis of AFLP data and a characterization of the nucleotide sequences of selected AFLP bands. For *I. dumosa* we have detected a molecular variation level two times higher than the value obtained for *I. paraguariensis* and a lower number of diagnostic bands in respect to the latter species. Reported nucleotide sequences, characterized using bioinformatic tools, are new sequences for the genus *Ilex*. Our results suggest that specimens of *I. dumosa* studied herein represent an interesting reservoir of genetic variability, highly adequate for improvement of yerba mate lines. Moreover, our results support the reinforcement of conservation strategies aiming at the expansion of the *I. paraguariensis* genetic pool deposited in the Germplasm Bank.

Key words: AFLP, germplasm, *Ilex paraguariensis*, *Ilex dumosa*, genetic differentiation.

¹ Laboratorio de Citogenética y Evolución (LaCyE), Departamento de Ecología, Genética y Evolución. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes y Costanera Norte s/n, 4to. Piso, Pabellón II, Ciudad Universitaria. C1428EHA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. gottlieb@ege.fcen.uba.ar

² IQIMEFA y Museo de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Avenida Rivadavia 1917. C1033AAJ. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN

El género *Ilex* L. (Aquifoliaceae) comprende ca. 600 especies de las cuales se encuentran en Sudamérica alrededor de 250 (Loizeau, 1994; Giberti, 1995, 1998). Hasta el presente han sido citadas para la Argentina seis especies nativas (Giberti, 1979, 1994, 1998; Prat Kricun & Belingheri, 1995) distribuidas en las provincias fitogeográficas de las Yungas y Paranaense (Cabrera, 1971). La importancia del género para la Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, radica en la utilización de ciertas especies en la elaboración de infusiones estimulantes, destacándose *I. paraguariensis* St. Hil., la yerba mate. Desde épocas coloniales se conocen diversos adulterantes y sucedáneos de la yerba mate (Giberti, 1989). Uno de éstos involucra a la especie *Ilex dumosa* Reissek y a sus variedades botánicas (*I. dumosa* var. *dumosa* Reissek e *I. dumosa* var. *guaranina* Loes.; Loesener, 1901; Giberti, 1994) vulgarmente denominadas “yerba señorita”, “caá-berá”, “caá-chiri”, “congonilla”, “erva piriquita”, etc. No obstante, el Código Alimentario Argentino ha aceptado recientemente el uso de *I. dumosa* para la elaboración de infusiones equivalentes a la yerba mate, aunque sin cafeína (Prat Kricun, 2009). Las especies mencionadas comparten ciertas características biológicas como la de ser árboles dioicos con polinización mediada por insectos y la de poseer el mismo número cromosómico diploide ($2n=40$; Barral *et al.*, 1995; Greizerstein *et al.*, 2004). Por otra parte, los estudios sobre la composición fitoquímica en ambas especies hallaron diferencias significativas en cuanto al contenido, entre otros compuestos, de cafeína, teobromina, y teofilinas (Filip *et al.*, 1999, 2001; Reginatto *et al.*, 1999; Heck & Mejia, 2007). A estas diferencias se le suma como interés adicional, el hecho de que las plantas de *I. dumosa* exhiben una mayor resistencia al frío y al insecto *Gyropsylla spegazziana* Lizer & Trelles (Hemiptera, Psyllidae) que constituye la principal plaga del cultivo de yerba mate (Prat Kricun, 2009).

La detección de diferencias a nivel molecular entre *Ilex paraguariensis* e *I. dumosa* adquiere gran relevancia en este contexto. El objetivo del presente trabajo es aportar al conocimiento de la variación molecular entre las especies mencionadas. La

aplicación de la técnica de AFLP (“amplified fragment length polymorphism”; Vos *et al.*, 1995) permite la detección en forma rutinaria y consistente de variaciones genético- moleculares en un amplio rango de niveles taxonómicos. En plantas ha sido utilizada con éxito en la estimación de la diferenciación genética entre individuos, entre poblaciones naturales y entre diversas especies (Gimenes *et al.*, 2002; Sede *et al.*, 2008; Abraham-Juárez *et al.*, 2009, entre otros). Particularmente en el género *Ilex*, los marcadores AFLP se emplearon junto a secuencias ribosomales para el estudio de las relaciones filogenéticas entre las especies sudamericanas que se desarrollan en la Argentina (Gottlieb *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se reevalúan datos de AFLP obtenidos previamente (Gottlieb *et al.*, 2005) con el fin de analizar la variabilidad existente exclusivamente en un conjunto de materiales de *I. paraguariensis* e *I. dumosa* mantenidos en un Banco de Germoplasma, y caracterizar bandas potencialmente diagnósticas de especie, que posibiliten la distinción en estadios tempranos del desarrollo. Disponer de una metodología que permita estimar la variabilidad genética y la discriminación precoz de las especies y variedades de manera confiable, resulta de gran relevancia para el manejo adecuado de los recursos genéticos y los programas de fitomejoramiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

En la Tabla 1 se listan los 65 accesos, o entradas, de ambas especies y el origen geográfico de las colecciones. Los materiales fueron obtenidos del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental INTA Cerro Azul (EEINTACA; Misiones, Argentina), y del Herbario del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO) (a la fecha, las entradas BACP se encuentran en el Museo de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires). Los materiales comerciales de yerba mate fueron gentilmente cedidos por el Establecimiento Las Marias (Gdor. Virasoro, Corrientes, Argentina); estos materiales no constituyen líneas endocriadas,

Tabla 1. Materiales estudiados de *I. dumosa* e *I. paraguariensis*.

Especie	Origen geográfico	Accesos*
<i>I. dumosa</i>		
	Argentina, Misiones, L. N. Alem	SN6fr**
	Argentina, Misiones, Iguazú	EEINTACA: 222♂(2); 222(3); 222(4)
	Argentina, Misiones, Campo Ramón	BACP: 610; 611
	Argentina, Misiones, Campo Viera	EEINTACA: 49♀; 49♂; BACP: 605; 606; 607
	Argentina, Misiones, Oberá	EEINTACA: 8♂; 8♀; 7♂(1); 7♂(2); 44
	Brasil, Paraná	EEINTACA: 9; 55; 66; 76; 86; 90; 93
	Brasil, Rio Grande do Sul	EEINTACA: 166; 168
	Brasil, Santa Catarina	EEINTACA: 13; 10
	Paraguay, Alto Paraná	EEINTACA: 227♀; 235♀; 235; 243
<i>I. paraguariensis</i>		
	Argentina, Misiones	SN8fr**; EEINTACA: 1-74♀; CA1-74; CA4-74
	Argentina, Misiones, Candelaria	EEINTACA 195
	Argentina, Misiones, Guaraní	EEINTACA: 1♂; 1♀; 34♀; 34♂; 35; 37♂
	Argentina, Misiones, Gral. Belgrano	EEINTACA 47
	Argentina, Misiones, Iguazú	EEINTACA 220
	Argentina, Misiones, Oberá	EEINTACA 51
	Argentina, Misiones, San Ignacio	EEINTACA 50
	Argentina, Misiones, San Pedro	EEINTACA 39
	Brasil, Paraná	EEINTACA 92; 217; 100♀
	Brasil, Rio Grande do Sul	EEINTACA 138♀
	Brasil, Santa Catarina	EEINTACA 28♀; 28♂; 27♀; 30
	Paraguay, Alto Paraná	EEINTACA 224
	Paraguay, Caaguazú	EEINTACA 252; 254
	Paraguay, Canendiyú	EEINTACA 228
Materiales comerciales		
	Establecimiento Las Marías (Corrientes, Gdor. Virasoro)	SI-16♂; SI-19♀; SI-49♂; SI-67♀; G-18♀; Y-383♂

* Los números entre paréntesis indican distintas plantas del mismo acceso; para los casos disponibles se incluye además la determinación a campo del sexo de las plantas. En negrita se indican los individuos representantes de *I. dumosa* var. *guaranina*. ** Plantines sin número formal.

no poseen relación de parentesco, y son de supuesto origen misionero (Ing. M Rolón, comunicación personal).

Extracción del ADN genómico total

Se empleó el “DNeasy Plant Kit” (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Metodología AFLP

La aplicación de esta técnica se realizó como

se indica en Gottlieb *et al.* (2005). Se utilizaron cuatro combinaciones de cebadores selectivos (Tabla 2). Los productos de amplificación por PCR fueron separados mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (6% p/v; urea 5M) en solución tamponada TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8). Las amplificaciones por PCR se realizaron bajo las condiciones que se detallan en Gottlieb *et al.* (2005). Los geles fueron teñidos con nitrato de plata según se indica en Gottlieb *et al.* (2005) y finalmente digitalizados para su posterior análisis.

Tabla 2. Número de bandas AFLP obtenidos para cada combinación de cebadores selectivos ensayados en *Ilex paraguariensis* e *I. dumosa*.

Cebadores selectivos	Bandas totales	<i>Ilex paraguariensis</i>		<i>Ilex dumosa</i>	
		Bandas variables (privadas) ^a	Bandas promedio/individuo ± DS*	Bandas variables (privadas)	Bandas promedio/individuo ± DS
<i>EcoR</i> I+AGG/ <i>Mse</i> I+CTT	146	98 (7)	33,4 ± 7,19	116 (3)	36,8 ± 10,2
<i>EcoR</i> I+ACT/ <i>Mse</i> I+CAC	131	80 (6)	33,8 ± 6,29	105 (6)	34,3 ± 10,2
<i>EcoR</i> I+AGC/ <i>Mse</i> I+CAT	100	60 (2)	19,8 ± 3,81	82 (7)	26,8 ± 6,07
<i>EcoR</i> I+ACC/ <i>Mse</i> I+CAG	136	94 (7)	36,2 ± 6,83	116 (2)	31,8 ± 8,54
totales	513	332 (22)	30,8 ± 8,92	419 (18)	32,4 ± 9,56

^a, entre paréntesis se indican las bandas privadas (ver texto); * desvío estándar.

Para establecer los tamaños de los fragmentos amplificados se utilizó como marcador de peso molecular el “30-330 bp AFLP DNA Ladder” (Invitrogen).

Análisis de datos

Los patrones de bandas AFLP fueron registrados mediante el programa “Gel-Pro 4 Analyser” (Media Cybernetics) y luego verificados manualmente. Sólo se analizaron los fragmentos de amplificación de 50 a 330 pares de bases de longitud. Dada la naturaleza dominante de los marcadores AFLP, cada banda fue considerada como un *locus*. Las bandas fueron codificadas como presentes, ausentes, o como dato faltante cuando la interpretación resultó ambigua. Las bandas registradas se discriminaron en constantes (es decir, bandas presentes en todos los individuos), variables y privadas. En el presente trabajo, se consideran bandas privadas aquellas bandas que siendo variables, están presentes en el conjunto de individuos de una misma especie con frecuencia $\geq 0,75$ y que están ausentes en los individuos representantes de la otra especie. La distancia genética fue estimada de acuerdo al valor complementario al coeficiente de similitud de Nei & Li (1979) implementado en el programa PAUP* (Swofford, 1998). De acuerdo a Triplett y col. (2010) este índice es apropiado para los marcadores dominantes como los AFLP, dado que otorga mayor peso a la presencia de datos y es menos sensible a las ausencias de bandas, las cuales pueden originarse por múltiples causas (es decir, ausencia debida a

distintas mutaciones). El agrupamiento se realizó mediante el algoritmo de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987). El retículo resultante fue visualizado con el programa TreeView (Page, 1998). El apoyo de los grupos fue obtenido en PAUP* a través de un análisis de remuestreo con reposición (*bootstrap*; Felsenstein, 1985) con 1000 pseudoréplicas. El ajuste de los datos de distancia genética al retículo de *Neighbor-Joining* se estimó mediante el valor R^2 usando el programa *TreeFit* (Kalinowski 2009).

Secuenciación nucleotídica

Las bandas seleccionadas fueron recuperadas directamente de los geles de poliacrilamida, mediante la ayuda de una punta plástica estéril (Stumm *et al.*, 1997), y colocadas en un microtubo estéril conteniendo 10 μ l de *buffer* Tris-HCl 10 mM. Las reacciones de PCR se realizaron con los 10 μ l de ADN; 2,5 μ l *buffer* 10X, 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM MgCl₂; 60 ng de cada cebador AFLP; 0,5 U de *Taq* polimerasa en un volumen final de 25 μ l. El programa de PCR empleado consiste en: 1 min a 94°C, seguido de 25 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 50°C, 1 min a 72°C, y 5 min a 72°C.

Los productos de re-amplificación fueron purificados con el *QIAquick Gel Extraction kit* (QIAGEN), a partir de bandas discretas cortadas de geles de agarosa. Se obtuvieron secuencias de productos de amplificación de dos individuos por banda seleccionada. Los cromatogramas fueron analizados y las secuencias editadas empleando el programa BioEdit (Hall, 1999).

Para la caracterización de las secuencias obtenidas, éstas fueron comparadas con secuencias almacenadas en el GenBank empleando los algoritmos de búsqueda BlastN, TblastX y BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). De estas comparaciones se registró el número de coincidencias significativas, el rango de valores-E, el porcentaje de identidad entre las secuencias incógnita y recuperada con la puntuación máxima, así como su descripción o anotación. Para investigar la existencia de regiones repetitivas, cada una de las secuencias se analizó con el programa *Repeat Masker* (versión open-3.1.9; Smit, Hubley & Green; <http://repeatmasker.org>). Además, se realizó una búsqueda adicional para indagar la identidad con regiones pertenecientes a retrotransposones, mediante la contrastación con secuencias de la base de datos *Gypsy DataBase* (GyDB; Lloréns *et al.*, 2008). En todos los casos se empleó como criterio para la aceptación de coincidencias entre secuencias aquellos valores-E (probabilidad de coincidencia debida al azar) $\leq 10^{-4}$.

RESULTADOS

Para los 65 individuos de *I. paraguariensis* y de ambas variedades de *I. dumosa*, se registraron 513 bandas AFLP legibles (Tabla 2). En estos materiales el nivel de variación molecular detectado fue considerable ya que el total de los individuos evidenció sólo dos bandas constantes compartidas, las cuales fueron excluidas del análisis. De las bandas variables registradas, aquellas consideradas como privadas (es decir, con frecuencias superiores al 75%) representan el 7,8% del total de bandas analizadas. Para *I. paraguariensis* el número de bandas privadas representa el 6,6% de las bandas variables registradas en ese taxón. En *I. dumosa* se registró un mayor número de bandas variables y una menor proporción de bandas privadas (4,3%).

La combinación de cebadores *EcoRI*+AGC/*MseI*+CAT fue la que generó la menor cantidad de bandas totales y la menor cantidad de bandas promedio por individuo en *I. paraguariensis*. En *I. dumosa* no se detectaron diferencias destacables.

Al inspeccionar los patrones de bandas de las 26 entradas con sexo determinado a campo (12 plantas ♂ y 14 plantas ♀) no se detectó ninguna banda que

podiera asociarse al sexo de las plantas.

A partir de los valores de distancia genética calculados entre pares de entradas, en base al valor complementario del coeficiente de similitud de Nei & Li (1979), se obtuvo que el valor medio de distancia entre todos los individuos estudiados de *I. paraguariensis* fue 0,067 y de 0,059 al considerar sólo los especímenes provenientes del Banco de Germoplasma (es decir, con exclusión de los seis materiales comerciales), para ambos casos, el rango de valores fue: 0,154-0,019. Para los materiales comerciales se obtuvo un valor medio de distancia de 0,074 (rango: 0,114-0,028), mientras que la distancia media entre los individuos del Banco de Germoplasma y los comerciales fue de 0,083. La distancia media calculada entre los individuos de *I. dumosa* fue 0,119 (rango: 0,318-0,02), y el valor medio obtenido entre ambos taxones fue 0,227 (rango: 0,308-0,113). Entre los materiales estudiados no se detectaron accesiones duplicadas.

En el retículo de *Neighbor-joining* (Fig. 1) se observa que los individuos de *I. paraguariensis* forman un grupo coherente e independiente de su origen geográfico (*bootstrap*= 100%). El retículo muestra que cuatro de los materiales comerciales se agrupan de a pares (SI-16 - SI-19 y SI-67 - G-18) (*bootstrap*= 98-84) y que se relacionan con un material de yerba mate de origen paraguayo. Asimismo, el individuo SI-49 se agrupa con plantas de origen paraguayo (*bootstrap*=95). El material comercial Y-383 aparece en una posición central y aislada dentro del *cluster* de yerba mate. Los representantes paraguayos de yerba mate se disponen en tres subgrupos diferentes sin observarse relación con la localidad de colección. Por otro lado, se observa que los especímenes de *I. dumosa* forman un grupo comparativamente más heterogéneo, evidenciado por las longitudes dispares de las ramas terminales. Además, se observa cierta asociación con el origen geográfico de las muestras. Por ejemplo, se detectan dos subgrupos conformados únicamente por individuos de *I. dumosa* provenientes de Brasil (*bootstrap*= 99% y 88%) mientras que los materiales provenientes de la Argentina y Paraguay aparecen entremezclados (*bootstrap*= 99%). Dentro de este último conglomerado se ubican los materiales identificados como *I. dumosa* var. *guaranina* (*bootstrap*< 50%), genéticamente relacionados con

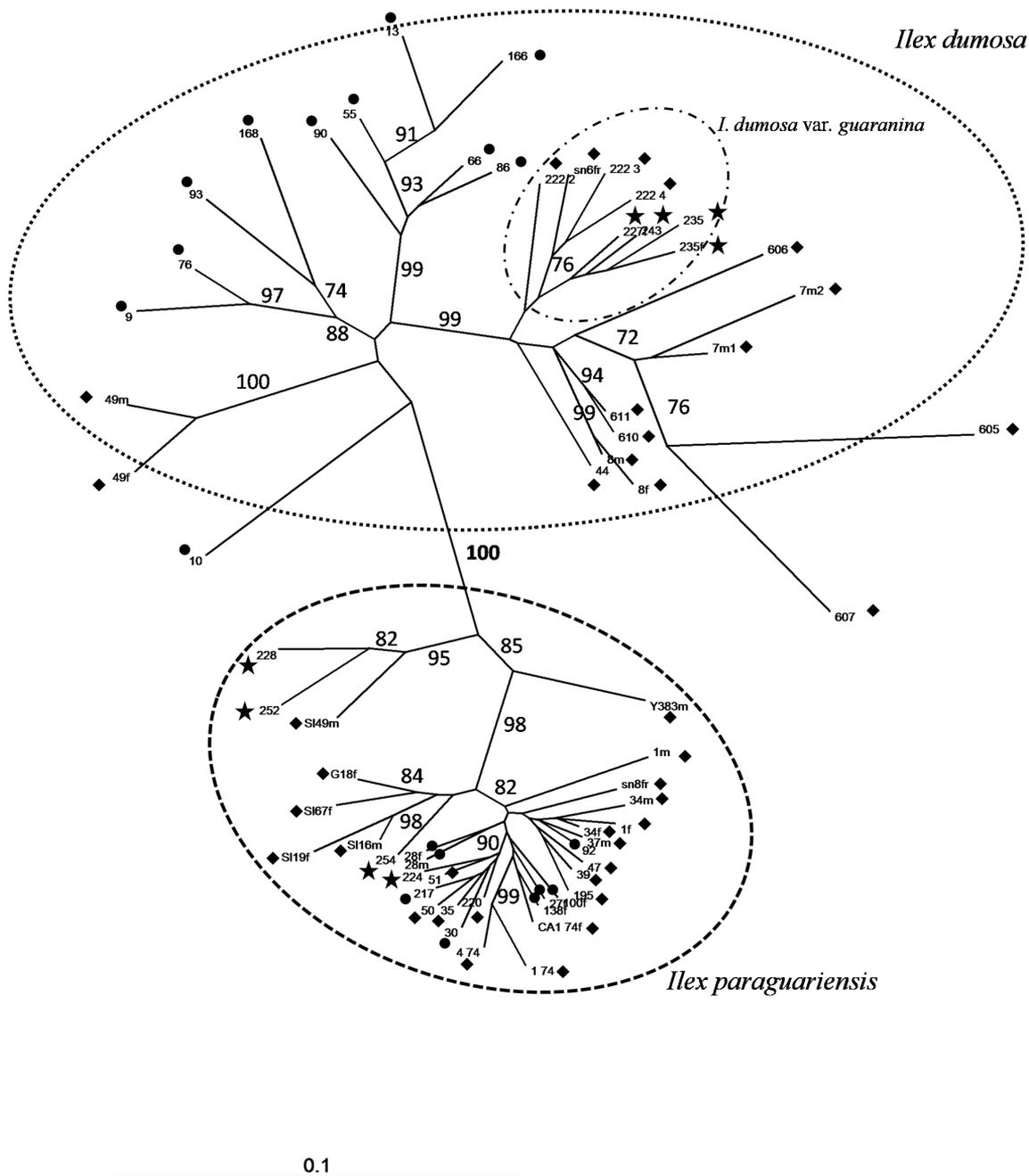


Fig. 1. Reticulo de *Neighbor-joining* basado en las distancias genéticas de Nei & Li (1979) obtenido del análisis de los patrones AFLP. Los números sobre las ramas indican los valores de *bootstrap*. Sólo se muestran los valores de apoyo de nodos mayores al 60%. F = femenino; m = masculino. El rombo indica origen argentino de la muestra, el punto negro indica origen brasilero y la estrella origen paraguayo. El largo de las ramas es proporcional a la distancia genética.

los materiales argentinos de *I. dumosa* var. *dumosa*. En el retículo también se observa que en general, los individuos de la misma entrada se encuentran agrupados en concordancia con los bajos valores de distancia obtenidos para dichos especímenes. Así, los individuos 8♂ y 8♀ (*I. dumosa*) que se ubican íntimamente relacionados en el retículo, sólo se diferencian en el 2% de sus patrones AFLP. Un caso similar está representado por las muestras 1-74 y 4-74 (*I. paraguariensis*) las cuales derivan de una única planta madre (CA1-74) y se diferencian en el 2,8% de sus patrones de bandas. Contrariamente los pares de accesiones 1♂ - 1♀ y 34♂ - 34♀, los cuales tienen respectivamente 5,7% y 2,4% de diferencias en sus patrones de bandas, no se ubican juntos en el retículo probablemente debido a que tanto 1♂ como 34♀ poseen un 28% de datos faltantes. El valor de ajuste de los datos al retículo de *Neighbor-joining* indica que éste resulta una representación gráfica adecuada de las distancias genéticas estimadas ($R^2 = 0,956$).

A partir del análisis anterior se seleccionaron, de cada una de las especies, dos bandas privadas y otras dos bandas con alta frecuencia en *I. dumosa* pero baja frecuencia en yerba mate, a fin de obtener su secuencia nucleotídica. Las secuencias nucleotídicas de las seis bandas AFLP fueron caracterizadas mediante programas bioinformáticos (Tabla 3). Sólo las bandas privadas de *I. dumosa*, 225-pb y 170-pb exhiben coincidencias significativas con secuencias genómicas de origen vegetal aunque sin identificación formal. Sin embargo, la búsqueda de identidad a nivel aminoacídico permitió detectar que la secuencia 225-pb sería similar a una enzima iniciadora de la ruta de la fijación del amonio, mientras que para la secuencia 170-pb no se obtuvo una identificación fehaciente por falta de anotación de las secuencias almacenadas.

La búsqueda específica de regiones afines a retrotransposones, empleando la base de datos GypsyDB, no redundó en identidades significativas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Ilex paraguariensis e *I. dumosa* constituyen dos especies de relevancia económica para la Argentina y la Cuenca del Plata. El empleo de la técnica de AFLP nos ha permitido evaluar la

estructura de la diversidad genética de las plantas mantenidas en el Banco de Germoplasma de Yerba Mate y Té, de la Estación Experimental del INTA en Cerro Azul (Misiones), así como en un grupo de materiales comerciales de yerba mate. Esta técnica de genotipado es ampliamente utilizada para la caracterización de diversos germoplasmas de interés comercial, como por ejemplo: olivo, avena, ajo, cártamo, y berenjena, entre otros (Furini & Wunder, 2004; Owen *et al.*, 2005; Jonhson *et al.*, 2007; Rosales-Longo & Molina-Monterroso, 2007; Fu & Williams, 2008). Para las dos especies estudiadas aquí, el empleo de cuatro pares de cebadores selectivos AFLP puso en evidencia una gran cantidad de *loci* variables. Los resultados obtenidos por una parte corroboran que ambas especies constituyen germoplasmas genéticamente diferentes. Por otra parte, indican que las entradas del Banco de Germoplasma correspondientes a *I. paraguariensis* exhiben una diferenciación genética dos veces menor respecto a lo observado para las entradas de *I. dumosa*. A grandes rasgos, este resultado concuerda con los de Gauer y Cavalli-Molina (2000), quienes trabajando con poblaciones naturales de yerba mate de Brasil, obtuvieron bajos niveles de divergencia medidos con marcadores RAPDs. Para dichos autores la ocurrencia de abundante flujo génico entre las poblaciones (mediado por aves frugívoras) y/o la fragmentación del hábitat causado por la deforestación, serían explicaciones posibles de tales resultados. En nuestro caso, la baja diferenciación genética entre las entradas de yerba mate de la Argentina, Brasil y Paraguay, sugiere la ocurrencia de un cuello de botella, relativamente reciente, en la región. No obstante, esta posibilidad debería ponerse a prueba analizando poblaciones naturales de dicha zona. Además, los resultados obtenidos aquí, sugieren que los materiales comerciales de yerba mate analizados (los cuales no representan líneas endocriadas) estarían 1,25 veces más diferenciados en cuanto al patrón de bandas AFLP, que los especímenes de yerba mate del Banco de Germoplasma. Es posible que la ocurrencia de variación somaclonal durante las sucesivas propagaciones vegetativas de los materiales comerciales haya contribuido a moldear los genotipos actuales (Kaepler *et al.*, 2000). La diferenciación detectada también puede deberse a una procedencia geográfica distinta de

Tabla 3. Caracterización de las secuencias nucleotídicas de las bandas AFLP mediante búsquedas Blast.

Cebadores	Banda secuenciada ^a	Frecuencia en:		Búsquedas				
		<i>I. paraguariensis</i>	<i>I. dumosa</i>	L (pb) ^b	BlastN ^c	TBlastX ^d	BlastX ^d	BlastN GSS ^e
EcoRI +AGG/ Mse I+CTT	180-pb (HR616964)	85	0	157	0; 0,012 ; <i>Pinus taeda</i> secuencia genómica; FJ121592.1; (88%), (27%).	0; 0,12 ; Zebrafish secuencia genómica; CT027780.11; (47%), (64%), (86%).	NS	0; 0,083 ; <i>Zea mays</i> ADN genómico; ED509634.1; (89%), (22%).
	164-pb (HR616966)	6	84	131	0; 0,44 ; Zebrafish secuencia genómica; CT962511.5; (97%), (19%).	0; 1,4 ; secuencia genómica humana; AL359833.12; (50%), (68%), (64%).	NS	0; 0,02 ; <i>Glycine soja</i> ADN genómico; HN053271.1; (94%), (22%).
EcoRI +ACT/ Mse I+CAC	198-pb (HR616965)	88	0	166	0; 0,004 ; <i>Populus trichocarpa</i> ADN genómico; C209183.1; (75%), (50%).	0; 0,42 ; <i>Trichophyton verrucosum</i> ; XML_003023788.1; (48%), (72%), (63%).	NS	0; 0,027 ; <i>Solanum tuberosum</i> ; EI383540.1; (76%), (47%).
	128-pb (HR616967)	6	90	98	0; 1 ; <i>Neurospora crassa</i> acetyl-CoA acetyltransferase; XM_960609.2; (90%), (30%).	0; 2,7 ; <i>Schistosoma japonicum</i> ; FN326661.1; (56%), (62%), (55%).	NS	0; 2 ; <i>Glycine syndetika</i> ADN genómico; HN842316.1; (82%), (43%).
EcoRI +ACC/ Mse I+CAG	225-pb (HR616968)	0	87	204	23; 2e⁻³³ — 3e⁻⁰⁵ ; <i>Vitis vinifera</i> secuencia shotgun; AM427950.1; (89%), (59%).	32; 5e⁻¹⁴ — 2e⁻⁰⁴ ; <i>Vitis vinifera</i> secuencia shotgun; AM427950.1; (85%), (95%), (62%).	14; 3e⁻¹⁰ — 2e⁻⁰⁴ ; similar a glutamato-amonio ligasa [<i>Vitis vinifera</i>]; XP_002266164.1; (80%), (90%), (59%).	31; 5e⁻²⁵ — 5e⁻⁰⁶ ; <i>Mimulus guttatus</i> genómico; GS457085.1; (80%), (72%).
	170-pb (HR616969)	0	97	137	95; 5e⁻⁰⁷ — 3e⁻⁰⁴ ; <i>Vitis vinifera</i> , ADN genómico; AM487233.1; (86%), (39%).	+100; 7e⁻¹³ — 6e⁻¹¹ ; <i>Populus trichocarpa</i> ; AC212800.1; (72%), (86%), (99%).	100; 3e⁻⁰⁹ — 7e⁻⁰⁶ ; proteína hipotética [<i>Vitis vinifera</i>]; CAN73901.1; (60%), (71%), (98%).	71; 5e⁻¹⁰ — 5e⁻⁰⁴ ; <i>Prunus persica</i> genómico; F1947087.1; (79%), (61%).

^a, cada banda secuenciada fue nombrada de acuerdo al tamaño deducido por comparación con un estándar de peso molecular; entre paréntesis se incluye el número de acceso del Genbank. ^b, longitud en pares de bases de la secuencia nucleotídica, excluyendo la región correspondiente a los cebadores. ^c, número de aciertos significativos; rango de valor-E obtenido para los primeros 100 aciertos significativos (según corresponda), en negrita se indica el valor-E no significativo obtenido para el acierto recuperado con mayor puntuación; anotación del acceso recuperado; número de acceso de Genbank; entre paréntesis se indica el porcentaje de identidad entre la secuencia incógnita y la recuperada, seguido del porcentaje de cobertura de la secuencia incógnita por la secuencia recuperada. ^d, Comparación a nivel aminoácido; número de aciertos significativos; rango de valor-E obtenido para los aciertos significativos o para los primeros 100 aciertos significativos (según corresponda), en negrita se indica el valor-E no significativo obtenido para el acierto recuperado con mayor puntuación; anotación del porcentaje de residuos compartidos positivos y del porcentaje de cobertura de la secuencia incógnita por la secuencia recuperada. NS, no se hallaron resultados significativos con ninguna entrada de la base de datos. ^e, Base de datos GSS (*genomic sequence survey*); las restantes condiciones son idénticas al ítem "c".

la supuesta, más afín a un origen paraguayo. En contraposición a la baja diferenciación evidenciada por los especímenes de yerba mate del Banco de Germoplasma, los materiales de *I. dumosa* constituyen un reservorio de variabilidad genética muy interesante, aún cuando el número de ejemplares estudiado es limitado.

Con el fin de ahondar en el estudio de las diferencias genéticas entre ambas especies, se caracterizó la secuencia nucleotídica de seis bandas AFLP con herramientas bioinformáticas. Las bandas AFLP consideradas para su secuenciación, mantienen sus altas frecuencias aún en comparación con las restantes especies sudamericanas de *Ilex* según se pudo estimar de datos previos (Gottlieb *et al.*, 2005). Las secuencias nucleotídicas obtenidas correspondientes a las bandas AFLP no poseen identidad con las secuencias de yerba mate derivadas de un estudio comparativo a nivel genómico, entre plantas con flores pistiladas y plantas con flores estaminadas (Gottlieb & Poggio, 2010). Asimismo, las secuencias que se reportan aquí tampoco poseen similitud con secuencias generadas en el estudio de las diferencias genómicas entre la yerba mate y la yerba señorita mediante hibridación substractiva (Gottlieb & Poggio, ms). Por lo tanto, todas las secuencias obtenidas en el presente trabajo son nuevas regiones genómicas del género *Ilex*. Particularmente aquellas secuencias que no exhiben similitud significativa con otras secuencias almacenadas en bases de datos públicas, como las 180-pb y 198-pb, pueden considerarse propias de *Ilex paraguariensis*, siguiendo la propuesta de Nagarajan *et al.* (2008) para papaya. Sin embargo, esta potencial especificidad debe ser evaluada cuidadosamente. Por otro lado, las secuencias aisladas de *I. dumosa* 225-pb y 170-pb, exhiben identidad significativa con regiones genómicas de otras plantas; mientras que la secuencia 225-pb sería similar a una enzima fundamental de la ruta de la fijación del amonio, la secuencia 170-pb permanece sin identificación formal por falta de anotación de las secuencias almacenadas. Los estudios previos de diferenciación genómica comparativa hallaron en el genoma de *Ilex paraguariensis* e *I. dumosa* una proporción de elementos móviles considerable (Gottlieb & Poggio, ms); las secuencias obtenidas en este trabajo no exhiben similitud significativa con ningún elemento transponible.

Es importante considerar que actualmente, la producción comercial de yerba mate es sostenida mediante la propagación clonal intensiva de unos pocos genotipos. Esta metodología conlleva cierta restricción en la variabilidad genética de los cultivos y eventualmente, podría ocasionar una mayor susceptibilidad a plagas y enfermedades. El material estudiado es una representación de lo existente en el Banco de Germoplasma y por tanto, constituye material apropiado para la búsqueda, localización e introgresión de genes de *I. dumosa* en líneas de yerba mate tradicional potencialmente comerciales, a fin de otorgarles por ejemplo, mayor resistencia a condiciones de sequía y/o al psilido de la yerba. Estas características hacen de *I. dumosa* un interesante grupo para profundizar en el estudio de las bases genéticas de la resistencia, así como para futuros planes de mejoramiento de la yerba mate tradicional. Asimismo nuestros resultados apoyan la renovación de estrategias de conservación tendientes a ampliar el limitado acervo genético depositado en el Banco de Germoplasma, mediante la colección de plantas silvestres de yerba mate.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con subsidios otorgados por la Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la Universidad de Buenos Aires y el CONICET. Los autores agradecen a los Ings. Agrs. L. D. Belingheri, S. D. Prat Kricun, y R. M. Mayol de la EE INTA Cerro Azul, y al Ing. M. Rolón del Establecimiento Las Marías, quienes generosamente cedieron los materiales estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM-JUÁREZ, M. J., R. RAMÍREZ-MALAGÓN, K. C. GIL-VEGA & J. SIMPSON. 2009. Análisis AFLP de la variabilidad genética en tres formas de reproducción de *Agave tequilana*. *Rev. Fitotec. Mex.* 32: 171 – 175.
- BARRAL, G., L. POGGIO & G. C. GIBERTI. 1995. Chromosome numbers and DNA content from *Ilex argentina* (Aquifoliaceae). *Bol. Soc. Arg. Bot.* 30: 243–248.
- CABRERA, A. L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 14: 1-42.

- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FILIP, R., P. LÓPEZ, J. COUSSIO & G. FERRARO. 1999. Phytochemical study of *Ilex dumosa*. *Acta Horticult.* 501: 333-335.
- FILIP, R., P. LÓPEZ, G. C. GIBERTI, J. COUSSIO & G. FERRARO. 2001. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 72: 774-778.
- FU, Y. B. & D. J. WILLIAMS. 2008. AFLP variation in 25 *Avena* species. *Theor. Appl. Genet.* 117: 333-342.
- FURINI, A. & J. WUNDER. 2004. Analysis of eggplant (*Solanum melongena*)-related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretations and germplasm utilization. *Theor. Appl. Genet.* 108: 197-208.
- GAUER, L. & S. CAVALLI-MOLINA. 2000. Genetic variation in natural populations of mate' (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity* 84: 647-654.
- GIBERTI, G. C. 1979. Las especies argentinas del género *Ilex* L. (Aquifoliaceae). *Darwiniana* 22: 217-240.
- GIBERTI, G. C. 1989. Los parientes silvestres de la yerba mate y el problema de su adulteración. *Dominguezia* 7: 3-22.
- GIBERTI, G. C. 1994. Aquifoliaceae. En: Flora Fanerógamica de Argentina. Fascículo 1 (157). Programa PROFLOTA (CONICET), Museo Botánico, IMBIV, Córdoba, Argentina: 8 pp.
- GIBERTI, G. C. 1995. *Ilex* en Sudamérica, Florística, Sistemática y Potencialidades con relación a un Banco de Germoplasma para la Yerba Mate. :303-312. En: WINGE H. *et al.* (eds.) Erva-Mate: biología e cultura no Cone Sul. Editora da UFRGS, Porto Alegre, Brasil: 356 pp.
- GIBERTI, G. C. 1998. Hallazgo de *Ilex brasiliensis* (Aquifoliaceae) en la Argentina. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 33: 137-140.
- GIMENES, M. A., C. R. LOPES & J. F. M. VALLS. 2002. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. *Gen. Mol. Biol.* 25: 349-353.
- GOTTLIEB, A. M., E. FERRER & J. E. WRIGHT. 2000. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of the species of *Ganoderma*. *Mycol. Res.* 104: 1033-1045.
- GOTTLIEB, A. M., G. C. GIBERTI & L. POGGIO. 2005. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. *Amer. J. Bot.* 92: 352-369.
- GOTTLIEB, A. M. & L. POGGIO. 2010. Genomic screening in dioecious "Yerba Mate" tree (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) through Representational Difference Analysis. *Genetica* 138: 567-578.
- GREIZERSTEIN, E. J., G. C. GIBERTI & L. POGGIO. 2004. Cytogenetic studies of southern South American *Ilex* species. *Caryologia* 57:19-23.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc. Ac. Symp. Series* 41: 95-98.
- HECK, C. I. & E. G. DE MEJIA. 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *J. Food Sci.* 72: R138-151.
- JOHNSON, R. C., T. J. KISHA & M. A. EVANS. 2007. Characterizing Safflower germplasm with AFLP molecular markers. *Crop Sci.* 47: 1728-1736.
- KAEPPLER, S.M., H. F. KAEPPLER & Y. RHEE. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43: 179-188.
- KALINOWSKI, S. T. 2009. How well do evolutionary trees describe genetic relationships between populations? *Heredity* 102: 506-513.
- LLORENS, C., R. FUTAMI, D. BEZEMER & A. MOYA. 2008. The Gypsy Database (GyDB) of mobile genetic elements. *Nuc. Ac. Res.* 36: 38-46.
- LOESENER, T. 1901. Monographia aquifoliacearum. I. Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldina—Carolinae Germanicae Naturae Curiosorum 78.
- LOIZEAU, P. A. 1994. Les Aquifoliaceae péruviennes (Elements pour une révision des Aquifoliaceae néotropicales). *Boissiera* 48: 306 pp.
- NAGARAJAN, N., R. NAVAJAS-PÉREZ, M. POP, M. ALAM, R. MING, A. H. PATERSON & S. L. SALZBERG. 2008. Genome-wide analysis of repetitive elements in papaya. *Trop. Plant Biol.* 3-4: 191-201.
- NEI, M. & W-H. LI. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 76: S269-S273.
- OWEN, C.A., BITA E.C., BANILAS G., HAJJAR S.E., *et al.* (2005). AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern Mediterranean. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1169-1176.
- PAGE, R. D. M. 1998. TreeView 1.5.2. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>
- PRAT KRICUN, S. D. 2009. El registro nacional de propiedad de cultivares de la SAGPYA inscribió dos nuevas variedades de *Ilex dumosa* obtenidas por el INTA Cerro Azul- Misiones. <http://www.ife.gov.ar/articulo/716>
- PRAT KRICUN, S. D. & L. D. BELINGHERI. 1995. Recolección de especies silvestres y cultivadas del género *Ilex* en las provincias de Misiones y Tucumán (Argentina) y en los estados de Paraná,

- Santa Catarina y Rio Grande do Sul (Brasil). Período 1988-1992. Pp. 313-321. En: WINGE, H. *et al.* (eds.) *Erva Mate. Biologia e Cultura no Cone Sul*. Editora da Universidade, UFRGS, Porto Alegre: 356 pp.
- REGINATTO, F. H., M. L. ATHAYDE, G. GOSMANN & E. P. SCHENKEL. 1999. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species. *J. Braz. Chem. Soc.* 10: 443-446.
- ROSALES-LONGO, F. U. & L. G. MOLINA-MONTERROSO. 2007. Diversidad genética de poblaciones de ajo (*Allium sativum* L.) cultivadas en Guatemala, definida por marcadores de ADN. *Agronomía Mesoamericana* 18: 85-92.
- SAITOU, N. & M. NEI. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- SEDE, S. M., D. TOSTO, A. M. GOTTLIEB, L. POGGIO & R. H. FORTUNATO. 2008. Genetic relationships in the *Galactia* - *Camptosema* - *Collaea* complex (Leguminosae) inferred from AFLP markers. *Plant Syst. Evol.* 276: 261-270.
- STUMM, G. B., H. VEDDER & J. SCHLEGEL. 1997. A simple method for isolation of PCR fragments from silver-stained polyacrylamide gels by scratching with a fine needle. Elsevier *Trends Journals Technical Tips* T01115 (<http://tto.biomednet.com/cgi-bin/tto/pr>)
- SWOFFORD, D. L. 1998. "PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)". Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TRIPLETT, JIMMY K., OLTROGGE, KIMBERLY A., CLARK, LYNN G. 2010. Phylogenetic relationships and natural hybridization among the North American woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae: Arundinaria). *Am. J. Bot.* 97: 471-492
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRITJERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER & M. ZABEAU. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Ac. Res.* 23: 4407-4414.
- Recibido el 21 de diciembre de 2010, aceptado el 23 de mayo de 2011.

