

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE UNA POBLACIÓN DE MAPEO POR ASOCIACIÓN BASADA EN GERMOPLASMA DE MANÍ

Moreno M.V.¹, Mamaní E.¹, Grandón N.¹, Baldessari J.¹, Funes F.², Etchart V.³ y Manifesto M.³

¹INTA-EEA Manfredi. ²Universidad Nacional de Villa María. ³INTA-Castelar.
moreno.maria@inta.gob.ar

Introducción

El carbón del maní es causado por el hongo *Thecaphora frezii*. En la actualidad, las mayores pérdidas económicas del sector son generadas por esta enfermedad. Por ello, el desafío actual es elaborar estrategias de manejo que minimicen la intensidad de esta patología o permitan su control reduciendo las pérdidas de producción. Una posibilidad es recurrir a herramientas tecnológicas como lo es el uso de la resistencia genética. Sus ventajas radican en que no requiere acciones especiales por parte del productor, no es perjudicial para el ambiente y es compatible con otras técnicas de manejo de enfermedades. Dentro del contexto de la asistencia a los programas de mejoramiento mediante el uso de marcadores moleculares, el primer paso es la localización de la/s regiones del genoma responsables de controlar el carácter. Para ello, una de las estrategias es la implementación de mapeo por asociación, basado en la utilización de una población genéticamente diversa en la cual se busca vincular marcadores a regiones del genoma asociadas a la característica en estudio. Actualmente se dispone de la Colección Núcleo de Maní (CNM) del INTA-EEA Manfredi, la cual fue construida sobre la base de datos fenotípicos colectados a lo largo del tiempo, representando la mayor variabilidad genética conservada en la Colección de Maní (CM) de INTA-EEA Manfredi. Basados en la estructura poblacional del cultivo, los objetivos del trabajo fueron identificar un individuo por entrada que sea representativo del genotipo mayoritario de la misma e iniciar el estudio de diversidad genética de la colección empleando marcadores microsátélites, el cual es un requisito previo para realizar mapeo por asociación.

Materiales y Métodos

Se seleccionaron 154 entradas pertenecientes a la CM para conformar la CNM, incluyendo razas locales, cultivares antiguos y líneas de cría. Se utilizó como base la caracterización fenotípica previa llevada adelante por el grupo de mejoramiento del cultivo en el INTA-EEA Manfredi. Se sembraron a campo dos surcos de cada entrada, para aumentar el número de semillas disponibles y poder establecer una colección de trabajo continua. Se realizó la extracción de ADN genómico de cuatro individuos de cada entrada de la CNM dando un total de 600 muestras, según el protocolo de Doyle y Doyle (1987) con modificaciones ajustadas en el laboratorio. Se realizó el control de la cantidad e integridad del ADN extraído en geles de agarosa al 0,8% y se cuantificó mediante el uso de un espectrofotómetro. Se realizó una caracterización genotípica preliminar empleando tres marcadores microsátélites (PM210, TC24C06 y TC24B05) seleccionados en base a trabajos previos del grupo. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador *GeneAmp System 9700*, mediante el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial 3 m a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 m a la temperatura de hibridación específica para cada marcador, 1 m a 72°C y extensión final 10 m a 72°C. Los fragmentos amplificados fueron resueltos por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida 6% (p/v) durante 1,20 h a 70 W. Los geles se colorearon con tinción de nitrato de plata. Para cada entrada se eligió un individuo representativo teniendo en cuenta a aquellos que presentaron la combinación de alelos con mayor frecuencia entre los cuatro individuos analizados por entrada. Se cosechó la totalidad de semillas de la planta elegida, verificando posteriormente la selección mediante caracteres fenotípicos del fruto. Para explorar de manera preliminar la diversidad genética presente en la CNM se calculó el número de alelos por locus, el número promedio de alelos, el número de alelos totales, el contenido de información polimórfica (PIC) y la diversidad genética por locus y promedio mediante el programa Infogen. La matriz de similitud se generó aplicando el coeficiente de distancias de Nei y se realizó un análisis de agrupamiento de Neighbor-Joining (NJ) usando el programa *Population 1.2.30*, el cual se visualizó gráficamente mediante un dendrograma generado con el programa *FigTree 1.4.2*.

Resultados y Discusión

El número de alelos totales obtenido fue de 31. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Medidas de diversidad genética por locus y promedio

Estadístico	PM210	TC24C06	TC24B05	Promedio
Diversidad genética	0,772	0,782	0,900	0,818

PIC	0,740	0,748	0,892	0,793
Número de alelos	9	7	15	10,333

Los valores obtenidos en los estadísticos de diversidad genética para PM210 y TC24B05 fueron mayores en el conjunto de materiales de la colección que el informado en la bibliografía, lo cual daría indicio de un alto grado de diversidad almacenada en ésta. En el caso del marcador TC24C06 los valores resultaron similares a lo reportado.

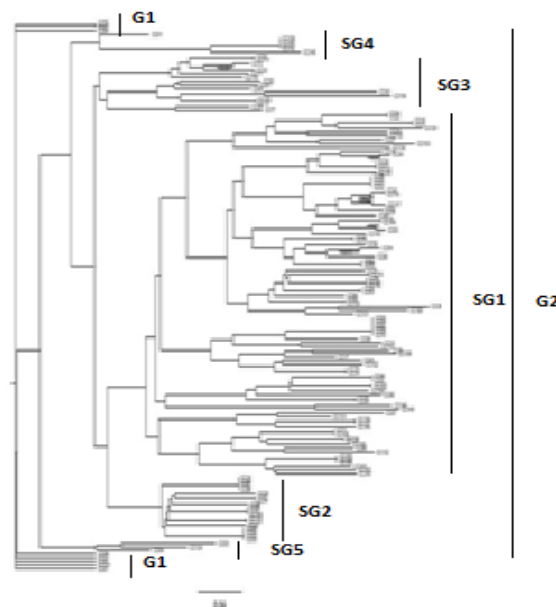


Figura 1: Dendrograma obtenido en base a las distancias de Nei con el método de agrupamiento NJ.

El dendrograma muestra 2 grupos, uno pequeño (G1) con sólo 8 entradas y el segundo (G2) que abarcó a 5 subgrupos y a las demás entradas pertenecientes a la colección (figura 1). El G1 incluyó principalmente entradas de la subespecie *fastigiata* con una entrada de *hypogaea*. De las primeras, el 57,1% correspondió a la variedad *vulgaris* (4), el 28,6% a la variedad *peruviana* (2) y el 14,3% a *fastigiata* (1) originarias de Paraguay principalmente. Para el caso del G2 que abarcó los 5 subgrupos (SG1-SG5), el SG1 no evidenció buena discriminación dado que se observa un gran número de entradas muy mezcladas en cuanto a su variedad botánica. En el SG2 se agruparon principalmente entradas de la subespecie *fastigiata* (15) con pocas de *hypogaea* (2). De las primeras, el 80% correspondió a la variedad *fastigiata* (12) originarias de Paraguay y el 20% a la variedad *peruviana* (3). El SG3 evidenció mezcla de subespecies y variedades botánicas, representando a subespecie *fastigiata* variedad *fastigiata*, subespecie *fastigiata* variedad *peruviana*, subespecie *fastigiata* variedad *aequatoriana*, subespecie *hypogaea* variedad *hirsuta* y subespecie *hypogaea* variedad *hypogaea*, de diversos orígenes geográficos como Bolivia, Brasil, Perú, Ecuador, México y Argentina. En el SG4 se observó consistencia dado que principalmente se agruparon las entradas provenientes de la India, mejoradas por ICRISAT que emplea el mismo grupo de padres para obtener todos sus materiales. Para el SG5 poco se puede decir de este pequeño grupo representado por 2 entradas de la subespecie *fastigiata* y 1 de la subespecie *hypogaea*. Por todo lo expuesto, los marcadores analizados reflejan una alta diversidad de los materiales elegidos para constituir la CNM, respaldando el criterio de selección utilizado. Se observó una tendencia de agrupamiento pero será necesario aumentar el número de marcadores utilizados para lograr la identificación unívoca de las entradas distinguiendo entre subespecies. Los resultados obtenidos muestran a los marcadores microsatélites como una herramienta adecuada para este tipo de estudios.

Financiación

El presente trabajo fue financiado por proyectos de INTA (PNIND-1108063 y PNBIO-1131042).