

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN GERMOPLASMA DE *MELILOTUS ALBUS* MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ISSR Y SSR

CHARACTERIZATION OF GENETIC VARIABILITY IN *MELILOTUS ALBUS* GERMPLASM BY ISSR AND SSR MOLECULAR MARKERS

Tomas P.A.¹, Rivero M.N.², Tomás M.A.^{3*}

¹ Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional del Litoral (UNL). Kreder 2805, Esperanza, Santa Fe.

² Becario estudiantil Científica INTA-UNL.

³ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Rafaela. Ruta 34 km 227, Rafaela.

* corresponding author: tomas.maria@inta.gob.ar

ABSTRACT

Melilotus albus is a legume plant naturalized in Argentina with a great potential to be used as a forage resource in restricted environments. Our objective was to characterize 10 accessions of *M. albus* belonging to a collection from INTA and from the FCA-UNL by using molecular markers. Five ISSR primers producing 52 bands, 90% of them polymorphic, were found to be equally informative. Eight SSR loci were amplified generating 30 alleles, averaging 3.8 alleles per locus, almost all of them highly informative. In numerical analysis, separation among accessions was unclear; genotypes congregate in complex intermixed groups. The greatest proportion of the variation was registered within accessions, in accordance with the allogamous reproductive nature of the species. Since neutral markers were used, the high variability encountered within accessions could be related to gene flow among them and/or a similar origin of the introduced materials. Results from this study support the fact that ISSR and SSR markers provide complementary information and that they are valuable and effective tools to be used to characterize the available germplasm of the species, although other markers such as the functional ones are recommended to better understand the variability in the species and its use in breeding programs.

Key words: *Melilotus*, genetic diversity, microsatellite, forage

RESUMEN

Melilotus albus es una leguminosa naturalizada en Argentina con gran potencial como recurso forrajero para ser utilizado en ambientes marginales. El objetivo de este trabajo fue caracterizar 10 introducciones de la colección de INTA y de la FCA-UNL mediante marcadores moleculares. Cinco *primers* ISSR produjeron 52 bandas, 90% de ellas fueron polimórficas, resultando todos los *primers* igualmente informativos. Los 8 *loci* SSR amplificados generaron 30 alelos, con un promedio de 3,8 alelos por *locus*, siendo altamente informativos la gran mayoría de ellos. En los análisis mediante técnicas numéricas la separación entre grupos no fue clara; los genotipos se congregan en grupos entremezclados. La mayor proporción de la variación se observó dentro de las introducciones, correspondiendo con el modo de reproducción alógama de la especie. Por tratarse de marcadores moleculares neutrales, la elevada variabilidad común entre introducciones podría explicarse por la existencia de considerable flujo génico entre ellas y/o por un origen similar de los materiales introducidos. Los resultados de este estudio demostraron que los marcadores moleculares ISSR y SSR brindan información complementaria y son herramientas valiosas y eficaces para caracterizar el germoplasma disponible de esta especie, pero se precisa incluir a otros marcadores como los funcionales con el fin de tener una mejor comprensión de la variabilidad disponible y su aprovechamiento en programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: *Melilotus*, diversidad genética, microsatélite, forraje

Fecha de recepción: 6/09/2016
Fecha de aceptación de versión final: 10/05/2017

INTRODUCCIÓN

La producción ganadera en Argentina se ha visto progresivamente desplazada en las últimas décadas hacia zonas marginales de menor aptitud como ocasión de la expansión de cultivos extensivos y los efectos del cambio climático (Stritzler *et al.*, 2007; Easdale y Aguiar, 2012). Las especies que constituyen la base del sistema forrajero tradicional están en general poco adaptadas a las áreas marginales, lo que genera la necesidad de utilizar especies más tolerantes a estreses bióticos y abióticos como salinidad, sequía, etc. Entre los materiales promisorios se destaca *Melilotus albus* Medik., una especie alógama perteneciente a la familia de las leguminosas con formas anuales o bienales, originaria de Eurasia y naturalizada en Argentina (Clarke, 1935; Turkington *et al.*, 1978). Entre sus ventajas se citan alta producción de biomasa forrajera y semillas, tolerancia a temperaturas extremas, rusticidad, calidad y altas tasas de fijación de nitrógeno, características por las cuales la forma anual es valorada como recurso forrajero en diversos tipos de suelo y clima (Bruno *et al.*, 1982; Maddaloni, 1986; Evans y Kearney, 2003; Evans *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2008; López *et al.*, 2016). Actualmente esta especie está incluida en diversos programas de mejoramiento genético, pero son escasas las referencias respecto a la diversidad genética representada en colecciones de germoplasma en Argentina.

La caracterización genotípica de las colecciones de germoplasma es de gran utilidad para iniciar programas de mejoramiento eficientes basados en la recombinación de variabilidad. Los marcadores moleculares de ADN son ampliamente utilizados para el análisis de diversidad genética en colecciones vegetales (Powell *et al.*, 1996; Rallo *et al.*, 2000; Bolaric *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2012). En particular para *M. albus*, estudios previos han utilizado con éxito las técnicas de marcadores ISSR (*inter simple sequence repeats*) y SSR (*simple sequence repeats*) en germoplasma de diverso origen (Winton *et al.*, 2007; Aboel-Atta, 2009; Wu *et al.*, 2016).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la diversidad genética de una colección de germoplasma de *M. albus* de Argentina, con el fin de generar información de utilidad para programas de conservación y manejo productivo de la variabilidad disponible en la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se analizaron 10 introducciones de *Melilotus albus* (Tabla 1), nueve de ellas pertenecientes a una colección de trabajo del INTA, a partir de la cual se inició un programa de mejoramiento en la especie, que fuera oportunamente facilitada por el Ing. Agr. José Pedro de Battista (INTA – EEA Concepción del Uruguay). Esta colección abarca tanto introducciones cuya selección y multiplicación ha sido realizada de manera controlada (materiales comerciales y de semilla identificada), como así también colectas de poblaciones naturalizadas luego de más de tres décadas de polinización libre y resiembra natural en el ambiente local, denominadas ecotipos. La restante introducción aquí analizada corresponde a un material pre-comercial que integra el Banco de Germoplasma de la Facultad de Cs. Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral, cedido por el Dr. Juan M. Zabala (ProDoCoVa, UNL).

Se germinaron muestras de semillas de las diferentes introducciones en placas de Petri, sobre papel de filtro humedecido con agua destilada y se incubaron en estufa a 30 °C durante dos semanas. Las plántulas se colocaron en macetas hasta el momento de la extracción de ADN. Cada introducción estuvo representada por 10 genotipos.

Extracción de ADN

El ADN total fue extraído a partir de 300-500 mg de hojas jóvenes frescas según Doyle y Doyle (1990). La calidad y concentración de cada muestra fue verificada por espectrofotometría (Nanodrop, Rad® SmartSpec Plus) y se estandarizó la concentración de ADN final en 250 ng/μL previo a su almacenamiento a -20 °C hasta su uso.

Marcadores ISSR

A partir de una evaluación previa de 38 *primers* ISSR en 10 genotipos, en función de los patrones de bandas generados y su repetibilidad, se seleccionaron los siguientes cinco *primers* para el análisis completo: UBC809 [(AG)₈G]; UBC815 [(CT)₈G]; UBC836 [(AG)₈YA]; UBC841 [(GA)₈YC] y UBC848 [(CA)₈RG]. Las reacciones de amplificación se desarrollaron en un termociclador Techne TC-312 para un volumen final de 20 μL con las siguientes concentraciones: 50 ng de ADN genómico, 2 mM MgCl₂,

Tabla 1. Identificación, tipo y origen de las introducciones de *Melilotus albus* analizadas.

| Introducción | Id. | Tipo y procedencia del material* | Banco de Germoplasma |
|---------------------|-----|--|----------------------|
| Baralbo | BA | Comercial - Barenbrug-Palaversich | INTA |
| Guasch | GU | Comercial – Guasch semillas | INTA |
| Lazzero | LA | Semilla identificada – Procedencia campo de productor | INTA |
| Laguna Larga | LL | Ecotipo – Población colectada en centro de Córdoba | INTA |
| Logroño | LO | Ecotipo – Población colectada en noroeste de Santa Fe | INTA |
| La Sarita | LS | Ecotipo – Población colectada en noreste de Santa Fe | INTA |
| Peuser | PE | Semilla identificada – Procedencia campo de productor | INTA |
| Sampacho | SA | Ecotipo – Población colectada en sur de Córdoba | INTA |
| Santiago del Estero | SE | Ecotipo – Población colectada en centro de Sgo. del Estero | INTA |
| Esperanza | ES | Material precomercial – UNL – O. Peman & Asoc. | FCA-UNL |

* Origen de las introducciones conservadas en INTA según López et al. (2016).

0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de *primer* y 1U Taq ADN polimerasa (Embiotec, Arg.), en 1X *buffer* de PCR provisto con la polimerasa. El programa de amplificación consistió de 1,5 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a la *Tm* del respectivo *primer* y 1,5 min a 72 °C, con una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación generados fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1,2% en *buffer* 1X TAE, durante tres horas a 75 V constantes. En cada ensayo se incluyó un estándar de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Fermentas). Los fragmentos de ADN fueron visualizados mediante tinción fluorescente (GelRed, Genbiotech) en transiluminador UV y registrados mediante fotografía digital para su posterior análisis.

Marcadores SSR

Se analizaron ocho *loci* SSR descritos por Winton *et al.* (2007) para la especie: MaMS03, MaMS04, MaMS06, MaMS08, MaMS10, MaMS12, MaMS13 y MaMS15. Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador antes mencionado, en un volumen final de 20 µL y con las siguientes concentraciones: 12,5 ng de ADN genómico, 4 mM MgCl₂, 0,15 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer* y 1U de GoTaq DNA polimerasa (PROMEGA) en 1X *buffer* de PCR provisto con la polimerasa. El programa de amplificación consistió de una primera etapa de 11 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 55 °C (decreciendo 0,5 °C por ciclo) y 35 s a 68 °C; seguida de una segunda etapa de 26 ciclos de 20 s a 94 °C, 30 s a 50 °C y 35 s a 68 °C,

con una extensión final de 15 min a 60 °C. La separación de los fragmentos generados se realizó mediante electroforesis vertical en geles nativos de poli(acrilamida) al 6 % (19:1 acrilamida: bis-acrilamida) en *buffer* 1X TBE a 45 W constantes. Los patrones de bandas fueron visualizados mediante tinción con nitrato de plata (Benbouza *et al.*, 2006) y registrados en transiluminador de luz blanca.

Análisis de datos

Los fragmentos ISSR se registraron en una matriz binaria como presencia (1) y ausencia (0), mientras que para los marcadores SSR se registraron los alelos presentes correspondientes a cada *locus*, tomando una columna por *locus* y un carácter por alelo. Se estimó para cada ensayo la proporción de bandas polimórficas, el contenido de información polimórfica (PIC) (Powell *et al.*, 1996) y el número de bandas exclusivas de poblaciones. Para cada *primer* ISSR se determinó también el porcentaje de bandas con frecuencia contrastante (BFC) entre introducciones (bandas cuya frecuencia presentó una diferencia mayor a 0,5 entre al menos dos introducciones), mientras que para SSR se determinó además el número de alelos totales y efectivos para cada *locus*. La comparación entre poblaciones se realizó mediante los parámetros de diversidad genética y heterocigosidad insesgada de Nei (He) basada en los marcadores SSR (Nei, 1972), siendo los valores comparados estadísticamente mediante la prueba de Friedman.

La proporción de la variación dentro y entre las introducciones se determinó por análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992; Peakall *et al.*, 1995). Dado que las dos técnicas de marcadores moleculares empleadas podrían presentar diferencias al estimar la similitud, las matrices de distancia obtenidas a partir de cada tipo marcador fueron sometidas a un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) para determinar, a partir de los gráficos de dispersión, posibles configuraciones de la variabilidad en cada grupo de datos. Además, se halló una configuración común de consenso entre ambos tipos de marcadores para armonizar las configuraciones individuales a través de un Análisis de Procrustes Generalizado (Gower, 1975).

El análisis de agrupamiento se llevó a cabo combinando la información generada por ambos tipos de marcadores moleculares. Para ello se confeccionó una nueva matriz de datos, donde para cada genotipo se registraron a los *locus* ISSR en como presencia (1) y ausencia (0), mientras que cada alelo SSR se registró como homocigota (2), he-

terocigota (1) o ausente (0). De este modo, se minimizaron las diferencias entre genotipos debidas a falsos negativos en el cálculo de la distancia genética a partir de la matriz original, la cual es sensible al orden de los dígitos que representan a cada alelo. Se utilizó el coeficiente de Jaccard, estimando la distancia como $D = \sqrt{1-S}$, y se construyeron los respectivos dendrogramas mediante el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). Todos los parámetros se calcularon utilizando el *software* estadístico INFOGEN v2013p (Balzarini y Di Rienzo, 2013).

RESULTADOS

Los cinco *primers* ISSR utilizados generaron en total 52 fragmentos, 90% de los cuales resultaron polimórficos. La proporción de bandas polimórficas y valor de PIC fueron similares entre *primers* (Tabla 2). Aunque no se registraron bandas exclusivas de introducciones, todos los *primers* presentaron un porcentaje de BFC superior al 50%.

Los ocho SSR analizados generaron productos de amplificación en todos los genotipos de las 10 introducciones. El número de alelos por *locus* (N_A) varió entre dos y siete, mientras que el número de alelos efectivos (A_e) presentó un rango de 1,1 a 4,8. Los valores de PIC fueron similares entre *locus* SSR, con la excepción de MaMS03, el cual presentó menores niveles de polimorfismo y resultó el *locus* menos informativo (Tabla 3). Para las introducciones GU y LA se registró un alelo privado para los *loci* MaMS13 y MaMS15 respectivamente, estando los mismos en baja frecuencia, ya que fueron registrados para un único genotipo de la correspondiente introducción.

Todas las introducciones analizadas registraron similares proporciones de *loci* polimórficos en ambos sistemas de marcadores, sin presentar diferencias estadísticas significativas entre las mismas para los valores de heterocigosidad insesgada de Nei y diversidad genética (Tabla 4).

En el análisis de varianza molecular (AMOVA) se observó que la mayor proporción de la variabilidad se encontró dentro de las introducciones, tanto para cada tipo de marcador como para el conjunto de datos moleculares (Tabla 5).

En el ACoP basado en los marcadores ISSR, los dos primeros ejes explican el 51,7 % de la variabilidad total (Figura 1a). Los genotipos de SE, PE y cuatro de GU se agruparon en el cuadrante inferior derecho. El resto de los genotipos se presentó en una nube de puntos continua,

donde los genotipos de LO, BA y SA se ubicaron en los cuadrantes de la izquierda y los de ES y LS al centro del gráfico. Para el ACoP basado en los marcadores SSR, los dos primeros ejes explican el 42,82% de la variación (Figura 1b). Los genotipos mostraron una distribución más laxa que la obtenida con los ISSR y no fue posible diferenciar ningún nivel de agrupamiento relacionado a las introducciones. No obstante, en el Análisis de Procrustes Generalizado se encontró un 64,8% de consenso entre ambos tipos de marcadores. Esta configuración tampoco conglomeró a los genotipos de acuerdo a su origen en grupos definidos (datos no presentados), pero por el nivel de consenso se

considera a ambos tipos de marcadores como informativamente complementarios.

En el análisis de agrupamiento, los genotipos no se agruparon por introducción en el dendrograma (Figura 2), mientras que las distancias entre genotipos de cada introducción concuerdan con los resultados del AMOVA. Los cuatro grandes grupos indicados en la representación gráfica no evidenciaron una diferenciación significativa entre sí en base al contraste entre la distancia genética inter e intra-grupo, y parecen estar conformados por múltiples introducciones y de procedencias geográficas muy distantes.

Tabla 2. Características de los *primers* ISSR utilizados e información generada con cada uno de ellos para *Melilotus albus*: proporción de bandas polimórficas, de bandas con frecuencia contrastante entre introducciones (BFC) y contenido de información polimórfica (PIC).

| <i>Primer</i> ISSR | Secuencia 5' - 3' | Tm (°C) | Bandas totales | Bandas polimórficas (%) | BFC (%) | PIC |
|-----------------------|----------------------|------------|-------------------|-------------------------------|------------|------|
| UBC809 | (AG) ₈ G | 42 | 11 | 100 | 64 | 0,25 |
| UBC815 | (CT) ₈ G | 40 | 10 | 90 | 70 | 0,3 |
| UBC836 | (AG) ₈ YA | 44 | 10 | 80 | 60 | 0,26 |
| UBC841 | (GA) ₈ YC | 43 | 9 | 100 | 89 | 0,3 |
| UBC848 | (CA) ₈ RG | 59 | 12 | 83,3 | 83 | 0,3 |
| Promedio | | - | 10,4 | 90,6 | 73 | 0,28 |

Tabla 3. Características de los SSR analizados e información generada: número de alelos por *locus* (N_A); número de alelos efectivos (A_e); heterocigosidad insesgada de Nei (H_e) y valor de PIC para las introducciones de *Melilotus albus*.

| <i>Locus</i> SSR* | Secuencia de <i>primers</i> 5' - 3'* | N_A | A_e | H_e | PIC |
|----------------------|---|-------|-------|-------|------|
| MaMS03 | F: TCGTGTTTGTTCATGTTTGTT R: ATACTCCCATGAGACTGTGG | 2 | 1,06 | 0,06 | 0,05 |
| MaMS04 | F: AGAAGAAATCGTCGCTGATA R: CTCCAGATCATAACCGTCAAT | 4 | 2,02 | 0,51 | 0,4 |
| MaMS06 | F: CTAGACCAAATGCTCCTCGAC R: TTAATAGACCCGGATTCAAA | 3 | 1,81 | 0,45 | 0,36 |
| MaMS08 | F: GATTAAGATTGCACGGATGT R:CGTTTAAGTCATCAGCATCA | 3 | 1,56 | 0,36 | 0,58 |
| MaMS10 | F: TCTATGCTCCTCTCATTCGT R: CCACTTCCTCACTTCATCAT | 4 | 2,8 | 0,65 | 0,28 |
| MaMS12 | F: AGTAGGATGTGGCATTGAAG R: CAAATTTGCAGTCACTTTGA | 4 | 2,81 | 0,65 | 0,58 |
| MaMS13 | F: CCACCTTGAATAATCACCAT R: GCGCTATAACGTAGCAGAAT | 3 | 2,01 | 0,51 | 0,39 |
| MaMS15 | F: CAACACCACTCTTCACTCAA R: AATGCGTTTCTACAGTCGTT | 7 | 4,78 | 0,79 | 0,76 |
| | Promedio | 3,8 | 2,35 | 0,5 | 0,22 |

* *Locus* SSR y secuencia de *primers* según Winton *et al.* (2007).

Tabla 4. Análisis comparativo entre introducciones de *Melilotus albus* para proporción de polimorfismos en cada tipo de marcadores moleculares, y los valores de heterocigosidad incesgada de Nei (He) y diversidad genética basados en los marcadores SSR.

| Introducción | Loci polimórficos (%) | | He | Diversidad genética |
|--------------|-----------------------|-----|------|---------------------|
| | ISSR | SSR | | |
| LL | 76,1 | 88 | 0,39 | 0,37 |
| SE | 69 | 75 | 0,39 | 0,37 |
| LA | 77,1 | 88 | 0,48 | 0,45 |
| GU | 78,9 | 88 | 0,50 | 0,47 |
| SA | 66,7 | 100 | 0,43 | 0,41 |
| PE | 76,2 | 100 | 0,50 | 0,48 |
| BA | 73,8 | 100 | 0,47 | 0,45 |
| LO | 68,2 | 100 | 0,54 | 0,51 |
| LS | 73,8 | 88 | 0,44 | 0,42 |
| ES | 73,2 | 100 | 0,48 | 0,46 |
| Promedio | 73,3 | 93 | 0,46 | 0,44 |

Tabla 5. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre y dentro de las introducciones de *Melilotus albus* analizadas para cada tipo de marcadores y para ambos marcadores.

| Fuente de variación | Variabilidad (%) | | |
|--------------------------|------------------|------|-------------|
| | ISSR | SSR | Combinación |
| Dentro de introducciones | 77,6 | 91,2 | 80,9 |
| Entre introducciones | 22,4 | 8,8 | 19,1 |
| Phi -ST | | | 0,19 |

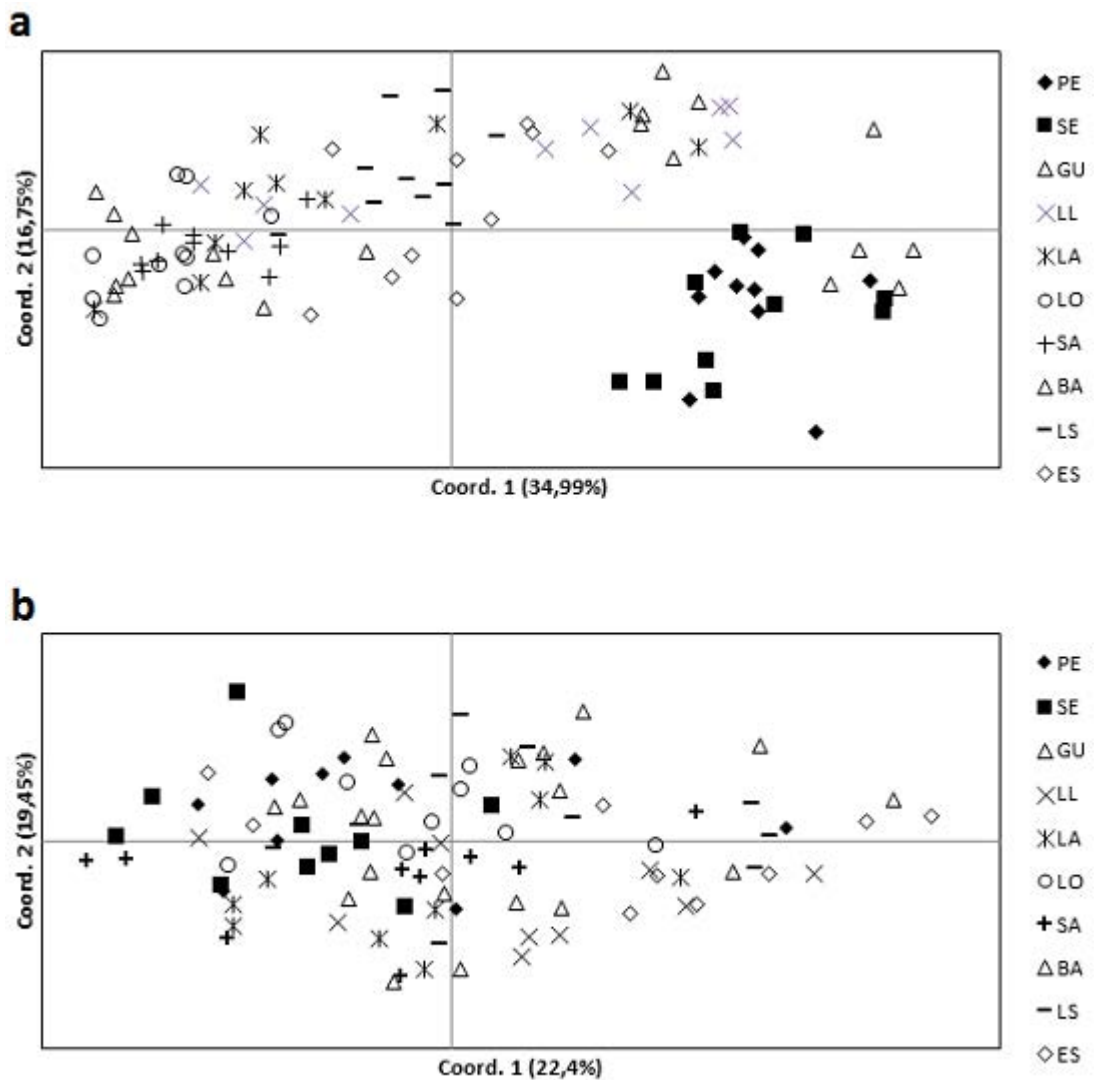


Figura 1. Análisis de Coordenadas Principales para cada tipo de marcadores moleculares empleados en el análisis de las introducciones de *Melilotus albus*. a) Análisis basado en datos de ISSR; b) Análisis basado en datos de SSR.

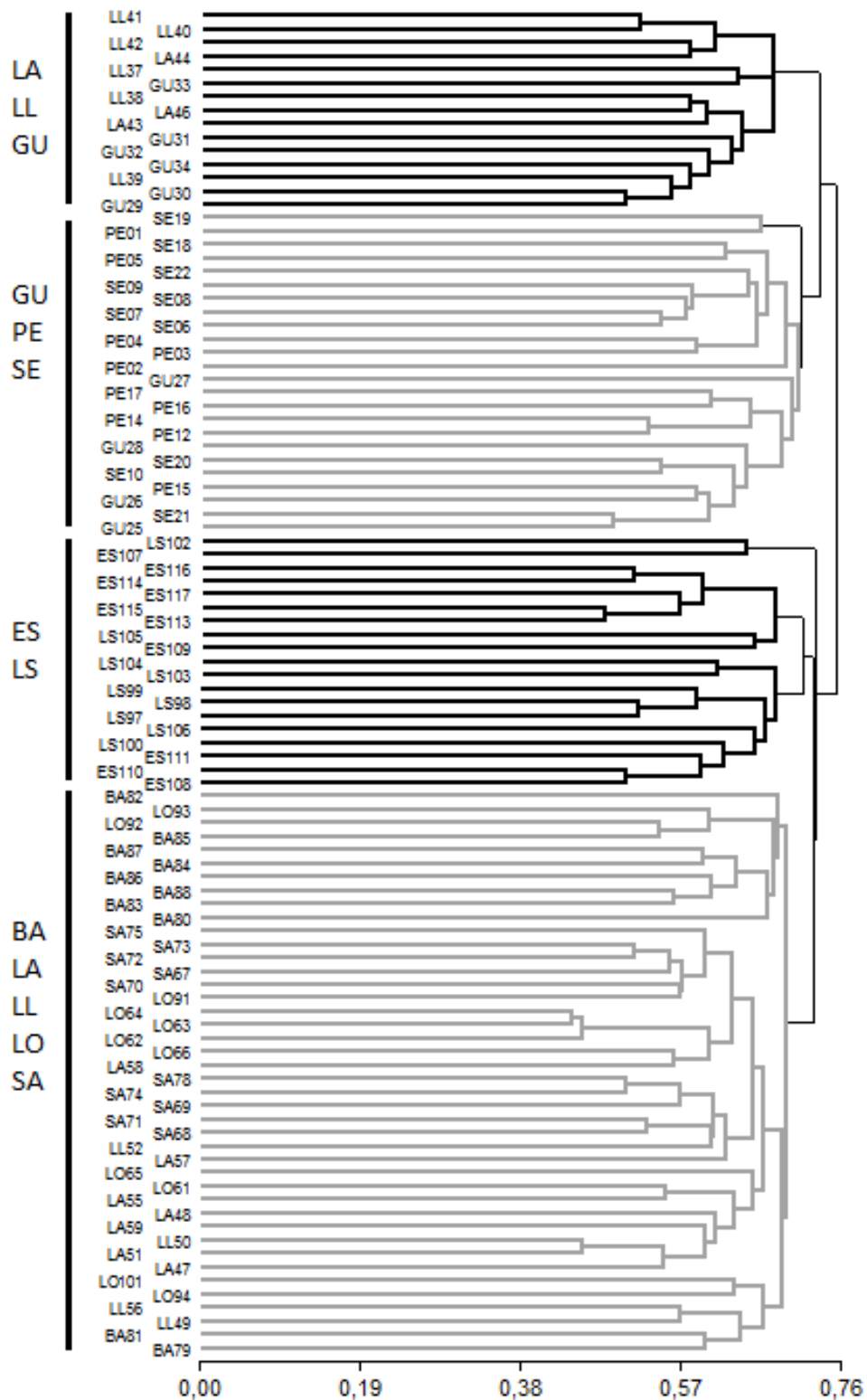


Figura 2. Análisis de agrupamiento de las introducciones de *Melilotus albus* basado en las distancias genéticas estimadas utilizando marcadores moleculares ISSR y SSR combinados. A la izquierda se indica mediante acrónimo, la introducción a la que pertenecen los genotipos de esa sección del dendrograma.

DISCUSIÓN

El empleo de marcadores moleculares ISSR y SSR resultó eficaz para la caracterización de la colección de germoplasma de *Melilotus albus* analizada. Ambos tipos de marcadores moleculares presentaron elevados niveles de polimorfismo y considerable cantidad de fragmentos generados por ensayo, lo que permitió el análisis genotípico del material bajo estudio.

Las proporciones de polimorfismos detectadas mediante ISSR en este trabajo fueron superiores a las reportadas en otro estudio en especies del mismo género (Aboel-Atta, 2009), aunque este tipo de diferencias suelen ser relativas a la diversidad genética propia de los materiales analizados en cada caso y a la elección de los *primers*. Por ello, al tratarse de una colección local sin datos de referencia acerca de la variabilidad existente, la prueba preliminar y posterior selección de los *primers* a utilizar en la totalidad del ensayo constituye un paso clave para obtener altos niveles de polimorfismo. Los *primers* utilizados resultaron igualmente informativos para la caracterización en función de sus valores de PIC, si se tiene en cuenta que el valor máximo de dicho parámetro para un marcador ISSR es de 0,5 (Henry, 1997). Sin embargo, para estudios de la diversidad genética en *M. albus* basados únicamente en esta técnica sería recomendable ampliar el número de genotipos por introducción y la cantidad de *primers* a utilizar por tratarse de una especie alógama y de marcadores de tipo dominante. Esto permitiría estimar mejor las frecuencias alélicas de los materiales y un mejor contraste entre los mismos.

La mayoría de los *loci* SSR analizados presentaron, en general, una cantidad de alelos totales y promedio por *locus* similares a los reportados por Winton *et al.* (2007) en esta especie. Las diferencias observadas respecto del número de alelos para algunos *loci* son atribuibles al diferente origen de los materiales analizados en cada caso. La capacidad potencial para la identificación de variaciones genéticas relacionadas con el origen del germoplasma analizado, resalta la utilidad de este tipo de marcadores para comparar la diversidad existente en diferentes colecciones vegetales (Powell *et al.*, 1996; Varshney *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016). Si bien el valor PIC promedio para los SSR analizados puede considerarse bajo comparados con otros estudios (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014), el 50 % de los *loci* microsatélite presentaron valores elevados de PIC. Estas diferencias entre los SSR utilizados permitiría seleccionar aquellos que resulten más informativos para futuros análisis del germoplasma.

Aunque se trata de una especie introducida y que los materiales analizados podrían haber sufrido procesos previos de selección y/o de deriva genética (López *et al.*, 2016), en el análisis de la diversidad genética todas las introducciones presentaron importantes niveles de polimorfismos y de heterocigosidad, principalmente dentro de las mismas. Estos resultados sugieren que esta colección constituye un recurso a conservar y evaluar como potencial fuente de variabilidad para programas de mejoramiento genético de la especie, principalmente, por tratarse en muchos casos de introducciones obtenidas a partir de ecotipos localmente adaptados.

Tanto en el análisis de agrupamiento como en el AMOVA, se evidenció que la mayor proporción de la variabilidad se presentó dentro de las introducciones. Aunque la mayoría de las bandas polimórficas registraron frecuencias contrastantes entre introducciones, dicho contraste no permitió agrupar a los materiales según su similitud genética, debido a que dichas diferencias de frecuencia no involucran las mismas introducciones en todos los casos, imposibilitando así establecer un patrón de diferenciación entre materiales. Además, son solamente dos las introducciones con alelos privados, los cuales se presentaron en un único genotipo, contribuyendo de manera escasa a la diferenciación entre materiales. En consecuencia, aunque algunos genotipos eventualmente se asocian en el dendrograma según la introducción de la cual provienen, lo hacen a una distancia mayor a la mitad de la distancia total estimada, por lo que no fue posible definir precisamente las introducciones. Sin embargo, dado que no hay un registro certero de los eventos de introducción en la Argentina, y que algunas de las poblaciones colectadas parecen estar naturalizadas en el lugar y se desconoce su material de origen, no es posible descartar que la variabilidad obtenida esté ligada al origen de los genotipos. Por ello, es posible que la asociación de grupos visualizada en la Figura 2 exprese la relación de los ecotipos con materiales comerciales antiguos que tengan un origen común con los materiales comerciales actuales. De esta forma, no es posible descartar, por ejemplo, que los genotipos de *Melilotus albus* del ecotipo LL, así como los genotipos de semilla identificada LA pudieran derivar o estar relacionados con algún material anterior a las semillas del proveedor comercial GU. En estudios que caracterizan la variabilidad de colecciones de plantas alógamas, la mayor proporción de variabilidad que se reporta dentro de las poblaciones es generalmente atribuida a la existencia de elevado flujo génico entre las mismas potenciado por su modo reproductivo, y en muchos casos una base genética

común (Lai *et al.*, 2001; Amel *et al.*, 2005; Bolaric *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2012). Estas consideraciones tendrían relevancia similar para *M. albus* por tratarse de una especie naturalizada en Argentina. Aun cuando no se conocen los orígenes y tipos de materiales inicialmente introducidos a la región, ni el número de eventos de introducción, un elevado flujo génico producto de la polinización cruzada podría haber reducido cualquier diferenciación entre los materiales originalmente introducidos, resultando en poblaciones con un acervo genético compartido, con escasa diferenciación entre ellas, pero con amplia variación genética intra-poblacional (Hamrick y Godt, 1989).

Nuestros resultados muestran que las introducciones procedentes de poblaciones naturalizadas presentan similares niveles de variabilidad genética respecto de aquellas introducciones que han sufrido un proceso de selección genética por tratarse de materiales mejorados (ES, GU y BA), en los cuales se esperaría observar menor diversidad genética. Además, las introducciones de poblaciones naturalizadas tampoco se diferencian significativamente entre sí, aun proviniendo de ambientes distantes que podrían haberlas sometido a presiones selectivas diferentes, las que ocasionarían cambios en su estructura genética. Resulta evidente entonces que los marcadores neutrales empleados en este estudio reflejan en mayor medida el acervo genético común de las introducciones analizadas, más allá de las variaciones producto de los procesos de adaptación y selección a los cuales cada material ha sido sometido.

En conclusión, dentro de la colección analizada de *M. albus* la diversidad genética se encuentra en mayor medida dentro de las introducciones, las cuales no pudieron ser diferenciadas genéticamente mediante los marcadores moleculares utilizados. Por otra parte, dada la escasa diferenciación entre las diversas procedencias analizadas, se estima que todo el material disponible en la colección comparte un mismo origen y se dificulta su identificación mediante marcadores moleculares de tipo neutral. No obstante, no se descarta la posibilidad de que puedan ser diferenciados por otro tipo de marcadores, como ser caracteres morfológicos, productivos o fisiológicos. Finalmente, se considera que para lograr incrementos significativos de la diversidad de la colección o para ampliar la variabilidad en programas de mejora que utilicen estas introducciones sería necesario recurrir a cruzamientos con materiales de la especie externos a la colección y con un acervo genético diferente.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboel-Atta A.I. (2009) Isozymes, RAPD and ISSR variation in *Melilotus indica* (L.) All. And *M. siculus* (Turra) BG Jacks. (Leguminosae). Int. J. Plant Sci. 2: 113-118.
- Amel S.H., Khaled C., Messaoud M., Mohamed M., Mokhtar T. (2005) Comparative analysis of genetic diversity in two Tunisian collections of fig cultivars based on random amplified polymorphic DNA and inter simple sequence repeats fingerprints. Genet. Resour. Crop Evol. 52: 563-573.
- Balzarini M.G., Di Rienzo J.A. (2013) InfoGen versión 2013. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>
- Benbouza H., Jacquemin J.M., Baudoin J.P., Margeai G. (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10: 77-81.
- Bolaric S., Barth S., Melchinger A.E., Posselt U.K. (2005) Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers. Plant Breed. 124: 161-166.
- Bruno O.A., Fossati J.L., Panigatti J., Gambudo S., Quaino O.R. (1982) Intersiembrado de trébol de olor de flor blanca sobre grama rhodes en los Bajos Submeridionales, Santa Fe. INTA, EEA Rafaela. Informe técnico N° 11, pp. 17.
- Clarke A.E. (1935) Inheritance of annual habit and mode of pollination in an annual white sweet clover. Jour. Amer. Soc. Agron. 27: 492-496.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Easdale M., Aguiar M. (2012) Regional forage production assessment in arid and semi-arid rangelands. A step towards social ecological analysis. J. Arid Environ. 83: 35-44.

- Evans P.M., Kearney G.A. (2003) *Melilotus albus* Medic is productive and regenerates well on saline soils neutral to alkaline reaction in the high rainfall zone of south-western Victoria. *Aust. J. Exp. Agric.* 43: 349-355.
- Evans P.M., Trigg P.J., Kearney G.A., Byron A.H. (2005) Effect of cutting regime on the agronomic performance of two contrasting lines of *Melilotus albus*. *Animal Prod. Sci.* 44: 1177-1183.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Gower J.C. (1975) Generalized procrustes analysis. *Psychometrika* 40: 33-51.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W. (1989) Allozyme diversity in plant species. In: Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. (Eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, pp. 43-63.
- Henry R.J. (1997) Estimation of genetic variation in plants using molecular techniques. In: Henry R.J. (Ed.) *Practical applications of plant molecular biology*. Chapman & Hall, London, pp. 57-98.
- Lai J.A., Yang W.C., Hsiao J.Y. (2001) An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. *Bot. Bull. Acad. Sc.* 42: 93-100.
- Liu Z.P., Liu G.S., Yang Q.C. (2007) A novel statistical method for assessing SSR variation in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genetics and Molecular Biology* 30: 385-391.
- López C., Odorizzi A., Basigalup D., Arolfo V., Martínez M.J. (2016) El trébol de olor blanco y su uso en la provincia de Córdoba. *Publicación Técnica, Colección Recursos*. EEA Manfredi, Ediciones INTA, Buenos Aires pp. 35.
- Maddaloni J. (1986) Forage production on saline and alkaline soils in the humid region of Argentina. *Reclam. Reveg. Res.* 5: 11-16.
- Nei M. (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Peakall R., Smouse P.E., Huff D.R. (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalo grass *Buchloe dactyloides*. *Mol. Ecol.* 4: 135-147.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238.
- Rallo P., Dorado G., Martín A. (2000) Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. App. Genet.* 101: 984-989.
- Rogers M.E., Colmer T.D., Frost K., Henry D., Cornwall D., Hulm E., Deretic J., Hughes S.R., Craig A.D. (2008) Diversity in the genus *Melilotus* for tolerance to salinity and waterlogging. *Pl. Soil* 304: 89-101.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R. (1973) *Numerical Taxonomy – The Principles and Practice of Numerical Classification*. Freeman W.H. & Co., San Francisco, pp. 573.
- Stritzler N.P., Petrucci H.J., Frasinelli C.A., Veneciano J.H., Ferri C.M., Viglizzo E.F. (2007) Climatic variability in the Argentine central semiarid Region. Technological adaptation in extensive systems of animal production. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 27: 111-123.
- Turkington R.A., Cavers P.B., Rempel E. (1978) The biology of Canadian weeds. 29. *Melilotus alba* Dear and *M. officinalis* (L.) Lam. *Can. J. Pl. Sci.* 49: 1-20.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23: 48-55.

Wang Z., Yu G., Shi B., Wang X., Qiang H., Gao, H. (2014) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers based on RNA-sequencing of *Medicago sativa* and in silico mapping onto the *M. truncatula* genome. PLoS One 9: e92029.

Winton L.M., Krohn A.L, Conn J.S. (2007) Microsatellite markers for the invasive plant species white sweetclover (*Melilotus alba*) and yellow sweetclover (*Melilotus officinalis*). Mol. Ecol. Notes 7: 1296-1298.

Wu F, Zhang D., Ma J., Luo K., Di H., Liu Z., Zhang J., Wang Y. (2016) Analysis of genetic diversity and population structure in accessions of the genus *Melilotus*. Ind. Crops Prod. 85: 84-92.

Xie W.G., Lu X.F, Zhang X.Q., Huang L.K., Cheng L. (2012) Genetic variation and comparison of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars and wild accessions as revealed by SSR markers. Genet. Mol. Res. 11: 425-433.

Zhou Q., Chen T.L., Wang Y.R., Liu Z.P. (2014) The development of 204 novel EST-SSRs and their use for genetic diversity analyses in cultivated alfalfa. Biochem. Syst. Ecol. 57: 227-230.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al Ing. José Pedro de Battista por su guía en etapas iniciales del proyecto, al Ing. Juan Marcelo Zabala por el material procedente de FCA-UNL y a los revisores anónimos que enriquecieron el manuscrito con sus apreciaciones y sugerencias. Agradecemos el financiamiento del INTA (proyecto PNPA 1126072) y el CAI+D UNL 2011 N°501201101-00090LI.