

# EMPLEO DE MICROSATÉLITES (SSRs) PARA IDENTIFICAR GERMOPLASMA SILVESTRE DEL GÉNERO *ARACHIS* EN EL DESARROLLO DE VARIEDADES DE MANÍ

Costero, B.<sup>1</sup>; Torres, L.<sup>1</sup>; Taborda, R.J.<sup>1</sup>; Soave, S.<sup>2</sup>; Buteler, M.I.<sup>2</sup>; Soave, J.H.<sup>2</sup>

1- Laboratorio de Calidad Genética y Sanitaria, Fac. de Cs. Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba

2- Criadero El Carmen  
ltorres@agro.unc.edu.ar

## Introducción

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es un cultivo de marcada importancia económica, que se produce y comercializa principalmente como materia prima de la industria aceitera, confitera y para consumo humano directo. Nuestro país, primer exportador de maní confitería del mundo, obtiene más del 90% del volumen producido en la región sur-centro de la provincia de Córdoba, donde se concentra el cultivo, su procesamiento, industrialización y comercialización.

El centro de origen y de diversidad del género *Arachis* se encuentran en América del Sur. Este género comprende 69 especies, la mayoría de las cuales son silvestres y genéticamente diploides, aunque también incluye a una especie silvestre alotetraploide, *A. monticola* y a otra alotetraploide cultivada, *A. hypogaea* ( $2n=4x=40$  cromosomas), la cual reúne a los genomas A y B, presentes en algunas de las especies silvestres del género. *A. hypogaea* fue originado por hibridización de dos especies silvestres diploides, *A. duranensis* donante del genoma A y *A. ipaensis* aportante del genoma B, seguida de una duplicación espontánea de cromosomas. El raro evento de cruzamiento interespecífico y posterior poliploidización, sumado a la naturaleza autógena de esta especie bloquea el intercambio genético entre las especies, tanto cultivadas como silvestres, lo que conforma un estrecho cuello de botella para la diversidad genética presente en el maní cultivado. Debido a esto y a las condiciones de cultivo, el maní cultivado es vulnerable a estrés biótico, plagas y enfermedades y abióticos, e.g. sequía. Para abordar su mejoramiento genético se propone la introgresión de genes que condicionan tolerancia y/o resistencia, acumulados por las especies silvestres durante su adaptación a diferentes ambientes.

Tradicionalmente el mejoramiento se ha basado exclusivamente en el análisis de fenotipos, sin embargo la selección asistida por marcadores a nivel del ADN permite incrementar la eficiencia del proceso y la predictibilidad de los resultados.

Existen varios tipos de marcadores moleculares, aunque últimamente los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs) se han convertido en uno de los más empleados debido a su alto contenido de información, alto nivel de polimorfismo, su herencia codominante, y además son analíticamente simples y transferibles entre especies. El objetivo del trabajo es obtener la caracterización genética de especies silvestres del género *Arachis* mediante marcadores de tipo SSRs, así como del híbrido interespecífico obtenido ((*A. correntina* x *A. cardenasii*) x (*A. batizocoi*)) en el marco de un programa de mejoramiento conducido por el criadero El Carmen de la localidad de General Cabrera, (Pcia de Córdoba). El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Calidad Genética y Sanitaria de la F.C.A.- U.N.C. que mantiene una vinculación científico - tecnológica con dicho criadero.

## Métodos

Los marcadores tipo microsatélites se basan en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite la amplificación de fragmentos de ADN mediante el uso de cebadores específicos diseñados para tal fin. La calidad y cantidad del ADN obtenido a partir de los materiales a analizar condiciona, en parte, el éxito de la PCR. Mediante el método de CTAB se realizó la extracción de ADN de siete especies silvestres del género *Arachis* (*A. magna*, *A. duranensis*, *A. monticola*, *A. ipaensis*, *A. cardenasii*, *A. correntina*, *A. batizocoi*), y un híbrido (anfidiplóide sintético) proveniente del cruzamiento de tres vías ((*A. correntina* x *A. cardenasii*) x (*A. batizocoi*)). Se realizó un doble pasaje por cloroformo-alcohol-isoamílico a fin de hacer más exhaustiva la eliminación de restos orgánicos que pudieran interferir en la reacción de PCR.

El control de la calidad y la cuantificación de la concentración de ADN obtenido se realizó en geles de agarosa al 1% mediante tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV.

Para la reacción de PCR, se utilizaron cebadores correspondientes a los microsatélites: 24 Lup1, Lup 34, 63 Stylo, IPAHM 117, IIPAHM 109 (Koppolu *et al.* 2010) y Ah193, Ah 041 (Moretzsohn *et al.* 2004) diseñados tanto a partir de género *A. hypogaea* como de especies relacionadas. Las condiciones de ciclado y de reacción fueron las propuestas por los autores y en aquellos casos donde los patrones electroforéticos resultaron confusos, se repitieron los análisis modificando alternativamente los diferentes componentes de la mezcla de reacción y condiciones de ciclado.

El análisis de los productos amplificados por PCR se realizó mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida bis acrilamida al 15% y posterior tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV.

Para la captura de imágenes de los geles se utilizó el software Camera Window Canon Power Shot S2IS. Los patrones electroforéticos se analizaron con el programa PB2 que permite determinar el tamaño de las bandas obtenidas.

### **Resultados**

El método de extracción de ADN mediante CTAB resultó adecuado para maní, obteniéndose ADN de buena calidad y cantidad óptima para la realización de la técnica de PCR.

Para los siete loci analizados, sólo el SSR Ah193 correspondiente al género *Arachis* amplificó con el tamaño de banda esperado según la bibliografía, permitiendo discriminar a las especies *A. cardenasi* y *A. batizocoi*. Un segundo loci correspondiente al cebador Ah 041 presentó patrones discriminantes entre los genomas A y B. Los restantes cinco loci analizados, presentaron, para todas las pruebas realizadas bajo diferentes condiciones de de reacción y termociclado, patrones electroforéticos que no fueron consistentes con los esperados según la bibliografía.

### **Conclusiones**

Para el análisis molecular de los genotipos correspondientes al género *Arachis* y al híbrido interespecífico, el método utilizado para la extracción de ADN genómico, resultó eficiente para ser utilizado en la PCR.

Los marcadores microsatélites resultan una herramienta de gran utilidad para asistir al mejoramiento genético, sin embargo el éxito de la técnica depende, entre otros factores, de la especificidad de los cebadores seleccionados, siendo más eficientes para la identificación inequívoca de un material aquellos diseñados a partir de secuencias muy conservadas; por ejemplo, secuencias de codificación, del genoma de la misma especie que se intenta mejorar o de algunas estrechamente emparentada. Así, dentro del género *Arachis*, se observó que, de acuerdo al grado de transferibilidad de los cebadores utilizados, aquellos diseñados a partir del genoma de *A. hypogaea*, produjeron patrones con el tamaño de banda esperado en el caso del cebador Ah 193 y patrones característicos que permiten diferenciar el genoma A del B para el cebador Ah 041; mientras que, con aquellos cebadores no específicos desarrollados a partir de librerías genómicas obtenidas de géneros pertenecientes a las tribus *Genisteae*, *Aeschynomeneae* y *Dalbergieae* (*Leguminosae*) no se obtuvieron resultados consistentes con los descritos por la bibliografía.

Además, dada la condición de alta variabilidad de los microsatélites, es esperable que, en especies que presentan una variabilidad genética muy marcada, tal el caso de las diferentes introducciones de especies silvestres, la transferibilidad de los cebadores utilizados sea relativamente baja entre introducciones o entre especies muy distintas.

Se continúa trabajando en la optimización del uso de microsatélites como marcadores que permitan caracterizar genéticamente los materiales utilizados en los cruzamientos y los híbridos interespecíficos derivados de los mismos.