

CARACTERIZACIÓN CON MARCADORES MOLECULARES DE GENOMAS SILVESTRES DEL GÉNERO *ARACHIS* E HÍBRIDOS DERIVADOS PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL MANÍ

Torres, L.¹; Costero, B.¹; Taborda, R.J.¹; Soave, S.²; Buteler, M.I.²; Soave, J.H.²
1- Laboratorio de Calidad Genética y Sanitaria, Fac. de Cs. Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
2- Criadero El Carmen General Cabrera; Córdoba
ltorres@agro.unc.edu.ar

Introducción

El género *Arachis*, está compuesto por 9 secciones que agrupan a aproximadamente 80 especies actualmente descritas, siendo la sección *Arachis* la de mayor importancia. A excepción de *A. hypogaea* (maní) y *A. monticola*, alotetraploides cultivado y silvestre respectivamente, esta sección agrupa a un gran número de especies silvestres diploides, que poseen en su mayoría el genoma A, y en menor número el genoma B y D.

El maní, genéticamente conformado por los genomas AA y BB, es uno de los cultivos más importantes del mundo dado que, sus semillas son ricas en proteínas y aceites que contribuyen, de manera substancial, a la nutrición humana.

Muchos de sus cultivares de alto rendimiento son susceptibles a enfermedades y estrés abiótico, debido principalmente, al estrechamiento de la base genética, como consecuencia del intenso proceso de selección artificial ejercido, para optimizar atributos de interés comercial. Una alternativa para superar los problemas agronómicos y de sanidad del cultivo, es aprovechar el pool génico de especies silvestres del género *Arachis*, mediante cruzamientos interespecíficos y posterior poliploidización.

También, resulta de interés la relación entre ácidos grasos oleico/linoleico, los mayores componentes de la materia grasa de la semilla, atributo determinante de su estabilidad autooxidativa. La condición de alto contenido de ácido oleico depende de los genes homólogos *ahFAD2A* y *ahFAD2B*, presentes en los genomas A y B, respectivamente, de los materiales tetraploides. Estos genes codifican para la enzima delta 12-desaturasa (FAD2) implicada en la conversión de ácido oleico —beneficioso para la salud humana y multiplicador de la estabilidad autooxidativa de la semilla— a ácido linoleico. La eliminación o reducción de la actividad de la enzima por mutación génica incrementa significativamente el contenido del ácido oleico a expensas del linoileico.

Para caracterizar la constitución genómica de materiales que participan en programas de mejoramiento, los marcadores moleculares basados en el ADN, constituyen una valiosa herramienta para asistir al mejorador, aumentar la eficiencia y predictibilidad de los resultados. Mediante la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con primers alelos específicos es posible detectar mutaciones en los genes *ahFAD2A* y *ahFAD2B*.

Estudios previos en maní, muestran que los marcadores de tipo microsatélites, podrían detectar más polimorfismo que otros marcadores similares (RFLP, AFLP y RAPDs.) y dentro de éstos, los microsatélites de secuencias expresadas, EST-SSRs, presentan un alto grado de transferibilidad entre especies relacionadas.

Como objetivo del presente trabajo se plantea la caracterización de los genomas A y B de especies silvestres del género *Arachis*, la identificación de los genomas parentales en el material híbrido y su poliploide obtenido químicamente, y la constitución génica para la enzima FAD2.

Materiales y métodos

En el presente trabajo se analizaron plantas registradas como *A. correntina* y *A. cardenasii* (genoma A), *A. batizocoi*, *A. magna* y *A. ipaënsis* (genoma B) y dos accesiones del poliploide natural *A. monticola* (AABB). También se analizó el genoma del híbrido a tres vías *Ah1* [(*A. correntina* x *A. cardenasii*) x (*A. batizocoi*)] y el anfiploide derivado *Ah2*, obtenido por tratamiento químico del híbrido *Ah1*, para la duplicación cromosómica *in vitro*. Estos materiales intervienen en el programa de mejoramiento de maní del criadero El Carmen, con el fin de introducir resistencia a enfermedades y estrés abióticos en sus variedades cultivadas.

El ADN se extrajo mediante el método de CTAB a partir de hojas jóvenes de plantas de las siete especies silvestres del género *Arachis*, del híbrido *Ah1* y el anfidiplode *Ah2*. Se realizó un doble pasaje por cloroformo-alcohol-isoamílico para eliminar posibles inhibidores de la PCR. La cuantificación y control de la calidad del ADN extraído, se realizó en geles de agarosa al 1% mediante tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV. Para caracterizar los genomas A y B mediante PCR, se utilizaron los cebadores EST-SSRs, PD59 y PD20, diseñados a partir del genoma de *A. hypogaea*. 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 parámetros tanto de la PCR como del sistema electroforético utilizado. Todas las reacciones se repitieron al menos dos veces. Para detectar mediante PCR alelo específico las mutaciones del gen FAD2 en la PCR se utilizaron los cebadores F435Fw, F435IC-Rv y F435Wt-Rv, F435Sub-Rv y F435Ins-Rv

desarrollados a partir de la línea F435 mutante natural con fenotipo alto oleico. Las condiciones de reacción y de ciclado fueron las propuestas por los autores.

La resolución de los productos amplificados por PCR se realizó mediante electroforesis vertical, en geles de poliacrilamida al 15%. La visualización del ADN se realizó bajo luz UV, previa tinción con bromuro de etidio. Mediante un sistema de captura de imágenes y el programa PB2 de libre circulación, se determinó el tamaño de banda, en pares de bases (pb), de los patrones electroforéticos obtenidos.

Resultados

En el presente trabajo, se probaron los marcadores PD20 y PD59 del tipo EST-SSR; sólo PD59, amplificó un fragmento del tamaño de banda esperado según la bibliografía, que resultó polimórfico para discriminar especies portadoras del genoma B –*A. batizocoi*, de *A. ipaënsis* y *A. magna*– y a su vez, *A. batizocoi* de aquellas con genoma A –*A. cardenasii* y *A. correntina*–. Respecto a las dos accesiones del tetraploide natural *A. monticola*, este marcador resultó monomórfico, presentando un patrón propio y diferente al de las especies silvestres analizadas. En el material híbrido *Ah1*, PD59 amplificó fragmentos de 136pb y 187pb correspondientes a los genomas A y B de los progenitores, respectivamente. En el material duplicado *Ah2*, sin embargo, se detectó la banda marcadora del genoma A que podría corresponder tanto a *A. cardenasii* como a *A. correntina* (Fig. 1).

En todos los materiales silvestres, analizados mediante PCR con el cebador PD20, se logró amplificar fragmentos que, aunque de mayor tamaño al esperado, conforman patrones característicos para cada uno de los mismos. Para este marcador, se observó polimorfismo entre materiales silvestres con genoma B (311pb) y genoma A, y entre éstos entre sí (306pb y 304pb). El fragmento de 304pb amplificado en *A. correntina*, también está presente en el híbrido duplicado *Ah2*. (Fig. 1).

Para el análisis de la presencia/ausencia de mutaciones del gen FAD2, en el material analizado en el presente trabajo, no se obtuvieron productos amplificados para los cebadores F435Sub y F435Ins diseñados para detectar las mutaciones puntuales en los alelos *ahFAD2A* y *ahFAD2B* respectivamente.

Conclusiones

Considerando la utilidad de los marcadores para asistir en el mejoramiento, los marcadores tipo EST-SSR, PD59 y PD20 probados en el presente trabajo, resultan de interés ya que en todos los materiales analizados en este trabajo, se obtuvieron patrones polimórficos, principal atributo de un buen marcador.

El cebador PD59 es promisorio para diferenciar especies con genoma B entre sí, y entre éstas con especies de genoma A, como así también como marcador del genoma parental A y B en el híbrido *Ah1* y sólo del genoma A en el material duplicado *Ah2*.

Los patrones de bandas obtenidos con el cebador PD20 muestran que éste es un buen marcador no sólo para discriminar genomas tipo A y B, sino para confirmar la presencia del genoma A del progenitor femenino *A. correntina*, en el híbrido duplicado *Ah2*. Además, le brinda sustento adicional a la hipótesis de que *A. ipaënsis* (genoma B) es uno de los progenitores del alotetraploide silvestre *A. monticola* (AABB).

El análisis de la presencia de mutaciones en el gen FAD2, responsables del carácter alto oleico en *A. hypogaea*; en las especies silvestres progenitoras del híbrido *Ah1* y su poliploide *Ah2*, muestra que estas introducciones presentan el genotipo silvestre en ambos loci de este gen. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por nuestro equipo de trabajo sobre la caracterización del genoma de especies silvestres del género *Arachis* y del germoplasma local de maní. Se continúa trabajando en la conformación de un sistema de marcadores para asistir a la selección en programas de mejoramiento del cultivo de maní.

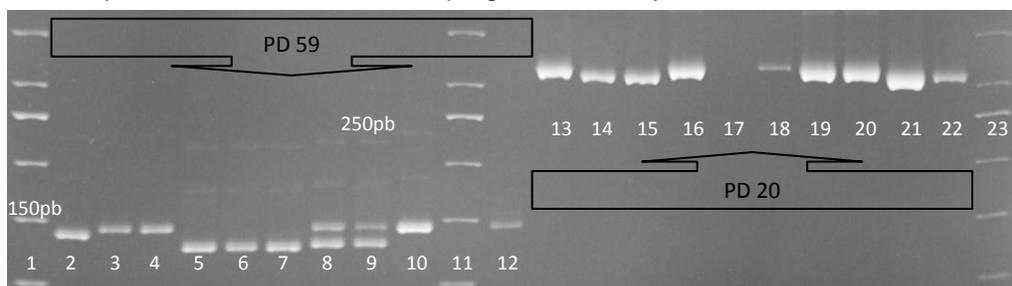


Figura 1: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% de productos de PCR con los cebadores PD59 y PD20. 1: MPM: (50 pb Fermentas); 2: *A. batizocoi*; 3: *A. cardenasii*; 4: *A. correntina*; 5: *A. ipaënsis*; 6: *A. magna*; 7: *A. magna*; 8: *A. monticola1*; 9: *A. monticola4*; 10: *Ah1*; 11: MPM; 12: *Ah2*; 13: *A. batizocoi*; 14: *A. cardenasii*; 15: *A. correntina*; 16: *A. ipaënsis*; 17: *A. magna*; 18: *A. magna*; 19: *A. monticola1*; 20: *A. monticola4*; 21: *Ah1*; 22: *Ah2*; 23: MPM: (50 pb Fermentas).