

# EVALUACIÓN DEL POLIMORFISMO DE UN SET DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN LOS PROGENITORES DE UNA POBLACIÓN DE RILs DE MANÍ SEGREGANTE PARA ENFERMEDADES FÚNGICAS

de Blas, F<sup>1,2</sup>; Scheffler, B<sup>3</sup>; Arias, R<sup>3</sup>; Bressano, M<sup>2</sup>; Soave, S<sup>4</sup>; Pepermans, M<sup>2</sup>; Oddino, C<sup>4,5</sup>; Moresi, A<sup>5</sup>; Soave, J<sup>4</sup>; Buteler, M. I<sup>4</sup>; Seijo, G<sup>6</sup>  
1. IMBIV-CONICET-UNC 2. FCA-UNC 3. USDA-ARS MSA Genomics and Bioinformatics Research Unit 4. Criadero El Carmen 5. UNRC  
6. IBONNE-CONICET-UNNE  
frandebias@gmail.com

## Introducción

El cultivo de maní (*Arachis hypogaea*) en la Provincia de Córdoba se enfrenta a variaciones en los rendimientos de grano causadas principalmente por enfermedades fúngicas foliares y del suelo. El género *Arachis* posee en su conjunto de especies silvestres una fuente rica en genes de resistencia a factores bióticos y abióticos siendo un recurso genético de especial valor para ser vinculados con los programas de mejoramiento del cultivo. La vía más exitosa probada hasta el momento para esta vinculación es la obtención de anfidiploides sintéticos a partir de especies silvestres compatibles genómica y cromosómicamente con *A. hypogaea*. En el año 2006 en un esfuerzo conjunto del Criadero El Carmen y el Laboratorio de Biotecnología - FCA - UNC, obtuvieron un híbrido interespecífico producto del cruzamiento entre *A. correntina* (Burkart) Krapov. & W.C. Gregory, (K 11905), genoma A y *A. cardenasii* Krapov. & W.C. Gregory (Manfredi PI 475994), genoma A y *A. batizocoi* Krapov. & W.C. Gregory, genoma B; que luego por técnica de duplicación de cromosomas con colchicina in vitro se obtuvo un anfidiploide sintético. En la campaña 2009-10 se empleó el anfidiploide sintético -JS1806- como progenitor masculino en un cruzamiento con una línea Alto Oleico de *A. hypogaea* [17304-7-B (AO)] del programa de mejoramiento genético de maní del Criadero El Carmen obteniéndose una población segregante de 93 líneas endocriadas (RILs, por sus siglas en inglés) que se encuentran hoy en estudio para la búsqueda de marcadores moleculares asociados a resistencia de enfermedades fúngicas del suelo y foliares: -*Thecaphora frezii*, *Cercospora arachidicola*, *Cercosporidium personatum*, *Sclerotium* sp. y *Sclerotinia* sp.-

El mapeo de genes de resistencia a enfermedades y de los marcadores moleculares asociados a los mismos, es una herramienta genómica para mejorar la eficiencia del proceso de mejoramiento genético y la comprensión de la base molecular de la resistencia. Para la realización del mapeo genético son necesarias una confiable evaluación fenotípica de la población de RILs y por otro lado la prueba de un gran número de marcadores moleculares capaces de diferenciar los individuos resistentes de los susceptibles mediante el análisis genotípico (marcadores polimórficos). En este trabajo se propone analizar un set de 384 marcadores moleculares microsatélites (SSRs, por sus siglas en inglés) que se probaron sobre el ADN de los progenitores de la población de RILs, ensayos que se realizaron en el USDA-ARS-National Peanut Research Laboratory como resultado de un convenio firmado entre el Criadero el Carmen y la institución mencionada; determinado su capacidad de diferenciar entre el progenitor cultivado que se comporta de forma susceptible frente a las enfermedades en estudio y el progenitor anfidiploide sintético que se comporta de manera resistente.

## Materiales y métodos

El ADN de los individuos progenitores -JS1806 y 17304\_7B (AO)- se extrajo mediante el método CTAB con control de cantidad y calidad mediante visualización del ADN en gel de Agarosa 1% con tinción con Bromuro de Etidio y luz UV. Los 384 cebadores para marcadores microsatélites fueron seleccionados de bibliografía precedente que en algunos casos determina regiones candidatas a resistencia a enfermedades y para otros se han probado como marcadores filogenéticos y de expresión génica para diferentes caracteres agronómicos y fitopatológicos. Los cebadores Forward fueron adicionados con la secuencia 5'-CAGTTTCCAGTCACGAC-3' para permitir el marcado con fluoróforos del producto amplificado, y los cebadores reversos fueron adicionados en el extremo 5' con la secuencia 5'-GTTT-3' para promover la adenilación sin molde. Los cebadores forward fueron marcados con 6-carboxi-fluoresceína (FAM) (IDT-Technologies). Se utilizaron 10ng de ADN para realizar las reacciones de PCR con la Polimerasa Titanium Taq DNA (Clontech) en 5 µL de volumen de reacción llevadas luego a termociclado en M&J thermal cycler (BioRad) at 95°C por 1 min, 60°C por 1 min (2 ciclos), 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 68°C por 30 s (27 ciclos) y extensión final a 68°C por 4 min. Los fragmentos amplificados marcados con fluoróforos fueron analizados con el analizador ABI 3730XL DNA y los datos obtenidos procesados con PeakScanner v. 1.0 (ambos de Applied Biosystems). El procesamiento de los datos obtenidos por electroforesis capilar consistió en seleccionar los picos de mejor definición y mayor rfu (fluorescencia relativa), descartando todos los que estuviesen por debajo de 1/4 (un cuarto) de la altura del pico de máxima rfu. Los datos de los alelos amplificados fueron ordenadas en una matriz Excel donde se determinaron cuatro condiciones para agrupar el comportamiento de los marcadores sobre los progenitores de las RILs: Sin Amplificación, amplificación diferente entre individuos del mismo genotipo, monómorficos, polimórficos

## Resultados

A partir del análisis de los datos obtenidos se agruparon los marcadores de la siguiente manera: De los 384 marcadores analizados 236 resultaron polimórficos lo que significa que han podido diferenciar genotípicamente al progenitor 17304\_7B (AO) -*A. hypogaea*- del progenitor JS1806 -Anfidiploide sintético-.

Los 102 marcadores monomórficos no fueron capaces de discriminar un individuo del otro mostrando un electrofenograma idéntico para ambos progenitores. Y el resto se descartan por no poseer un comportamiento consistente o bien no amplificaron fragmento alguno.

### Conclusiones

Considerando el resultado de este trabajo los marcadores moleculares microsatélite han resultado útiles para diferenciar a los progenitores de la población de RILs en estudio y se procederá a probar el set de 236 marcadores polimórficos sobre la totalidad de la progenie para comenzar con el proceso de asociación entre el comportamiento genotípico y el comportamiento fenotípico que lleva dos años de evaluación a campo desde la campaña 2014/2015 más los datos que se obtendrán en la próxima campaña. Y finalmente determinar cuáles marcadores resultan apropiados para identificar atributos genéticos de resistencia en el proceso de mejoramiento genético.

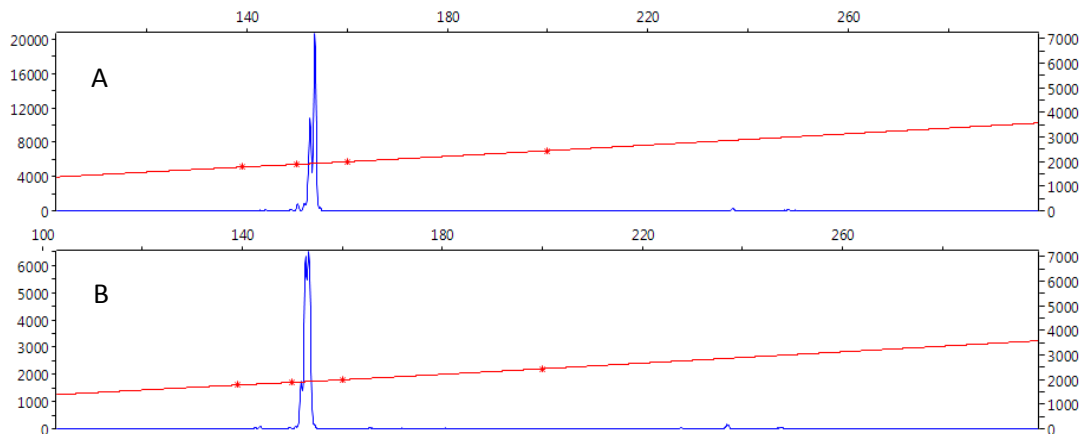


Figura 1: Electrofenogramas correspondientes a un marcador monomórfico. **A** corresponde al progenitor 17304\_7B (AO) y **B** progenitor JS1806. El eje vertical corresponde a los valores de rfu y el horizontal al tamaño en pares de bases (pb) del fragmento amplificado.

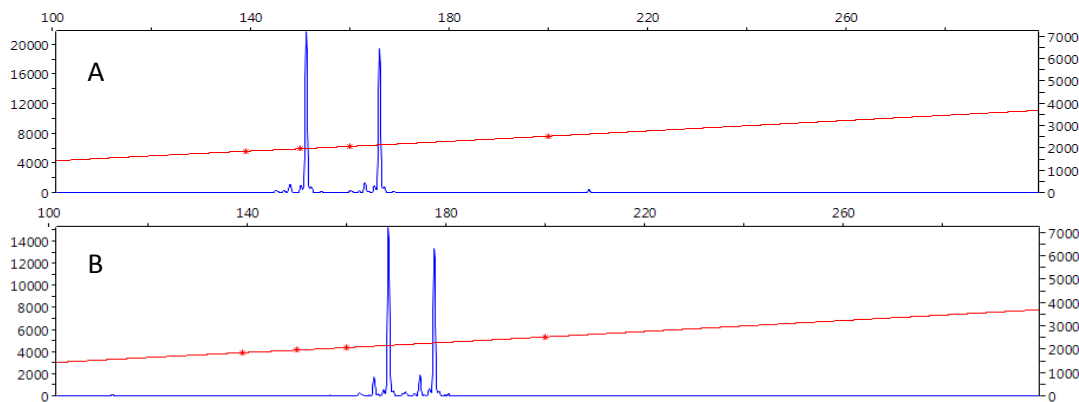


Figura 2: Electrofenogramas correspondientes a un marcador polimórfico. **A** corresponde al progenitor 17304\_7B (AO) y **B** progenitor JS1806. El eje vertical corresponde a los valores de rfu y el horizontal al tamaño en pares de bases (pb) del fragmento amplificado.

### 384 Total marcadores analizados

3 Sin Amplificación

43 Amplificación inconsistente.

102 Monomórficos

236 Polimórficos

Tabla 1: Agrupamiento de los marcadores evaluados por su comportamiento.

Financiación: USDA-ARS MSA, Criadero El Carmen con aportes de Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica a través del FONTAR, Fundación Maní Argentino, IMBIV-CONICET-UNC, IBONNE-CONICET-UNNE, UNC.