

# ESTUDIO GENOTÍPICO DE DIEZ POBLACIONES BIPARENTALES SEGREGANTES PARA CARBÓN DE MANÍ

Moreno M.V., Mamaní E., Grandón N.G., Sipowicz P., De la Barrera G., Baldessari J.  
INTA-EEA Manfredi  
moreno.maria@inta.gob.ar

## Introducción

En Argentina, la principal problemática del cultivo de maní está dada por el hongo *Thecaphora frezzii* Carranza and Lindquist (*T. frezzii*) que produce el carbón del maní. Inicialmente se lo detectó en el norte de la zona manisera de la provincia de Córdoba y luego se estableció en la región central, donde se ubican las principales industrias procesadoras de grano. Actualmente, su prevalencia es del 100% de los lotes de la zona manisera, ocasionando importantes pérdidas económicas para el sector. Dado que el mejoramiento asistido por la genómica es un abordaje para el estudio de la resistencia a enfermedades, se propone implementar dicha estrategia para el desarrollo de variedades de maní con resistencia a esta enfermedad. En este contexto, el grupo de mejoramiento de maní del INTA - EEA Manfredi desarrolló una colección núcleo de germoplasma de maní (CNM) que conserva el 4% de la variabilidad almacenada en el banco activo del cultivo. Esta colección se multiplica anualmente para disponer de material suficiente para la exploración de diversos caracteres de interés y se ha evaluado frente a carbón durante tres campañas. A su vez, la CNM fue genotipificada con una plataforma de 48.000 marcadores polimórficos de nucleótido simple (SNP), lo cual posibilitará realizar un *análisis a genoma amplio* o GWAS para detectar regiones asociadas a la resistencia al carbón. Este enfoque tiene la ventaja de que en la CNM existirían distintas fuentes de resistencia, que podrían apilarse o concentrarse en una única variedad resistente, lo cual significaría un desafío evolutivo para el patógeno en términos de quebrar esas resistencias e infectar al huésped. Por otro lado, esta estrategia podría complementarse con el desarrollo de poblaciones biparentales segregantes. Es por ello que, se seleccionaron tres materiales resistentes (R) y tres susceptibles (S) de la CNM para generar nueve poblaciones biparentales del tipo RxS. Además, también se cuenta con otra población biparental generada a partir de dos cultivares contrastantes [(Granoleico (S) x Ascasubi (Tolerante))], la cual se avanzó hasta F<sub>2:3</sub>. Así, la utilización de múltiples poblaciones segregantes para la resistencia a la infección por *T. frezzii* permitirá estudiar el mecanismo genético subyacente en distintos fondos genéticos. Por lo tanto, los resultados expuestos en este trabajo corresponden a la primera etapa del proyecto que incluye el análisis genotípico de los parentales R y S pertenecientes a la CNM y el control de paternidad de la población Granoleico x Ascasubi. El objetivo general del proyecto es generar marcadores de diagnóstico para carbón que puedan emplearse masivamente, eficientes y de bajo costo como los KASP. Esta técnica se podrá utilizar como herramienta de diagnóstico en la implementación de la selección asistida por marcadores para la tolerancia al carbón en maní. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1- determinar el polimorfismo de poblaciones biparentales RxS, definiendo su potencial para el estudio de marcadores KASP y 2- confirmar la paternidad de una población biparental SxT dedicada al estudio de marcadores asociados a la resistencia a carbón.

## Materiales y Métodos

### 1-Análisis genotípico de parentales contrastantes de la CNM

Las nueve poblaciones (nominadas A hasta I) biparentales segregantes para carbón generadas a partir de tres parentales R y tres S actualmente se encuentran en F<sub>1</sub>. Para el análisis genotípico de aquellos se utilizaron los datos provenientes de una plataforma de 48.000 marcadores SNP (AXIOM array 48K). Del total se seleccionaron sólo aquellos que resultaron polimórficos entre las nueve combinaciones de parentales (4.218 SNP), considerando cada uno de los genomas por separado (genoma A: 1.899 SNP y genoma B: 2.319 SNP) y luego calculando un promedio entre ambos. Con base en estos resultados, se seleccionó la población con mayor diversidad como la más adecuada para realizar la validación de las regiones asociadas a la resistencia.

### 2-Control de paternidad en la población F<sub>2:3</sub> (Granoleico x Ascasubi)

Para la extracción de ADN se muestrearon hojas de 30 individuos de la población F<sub>2:3</sub> y se utilizó un protocolo tradicional con CTAB, que incluye lavado con sorbitol. El control de calidad de las muestras se efectuó mediante geles de agarosa al 0,8% p/v y la cuantificación utilizando un fluorómetro. Dado que se dispone de información genotípica para estos parentales con base en un estudio previo donde 45 marcadores microsátélites (SSR) fluorescentes fueron polimórficos entre ambos, se planteó el análisis usando 17 de ellos en los 30 individuos de la población. Se amplificaron hasta el momento 15 marcadores SSR fluorescentes mediante la conformación de 6 reacciones en multiplex, de los cuales se analizaron 10. Los fragmentos amplificados fueron genotipificados en la Unidad de Genómica del INTA Castelar y visualizados utilizando el programa GeneMapper 4.0.

## Resultados y discusión

De las nueve poblaciones estudiadas, la que evidenció mayor porcentaje de polimorfismo promedio incluyendo ambos genomas fue la C (37,8%), seguida por la A (36,6%) y luego la B (34,9%) (Tabla 1, Figura 1). Las tres poblaciones mencionadas se generaron usando el mismo parental S como masculino, mientras que los padres

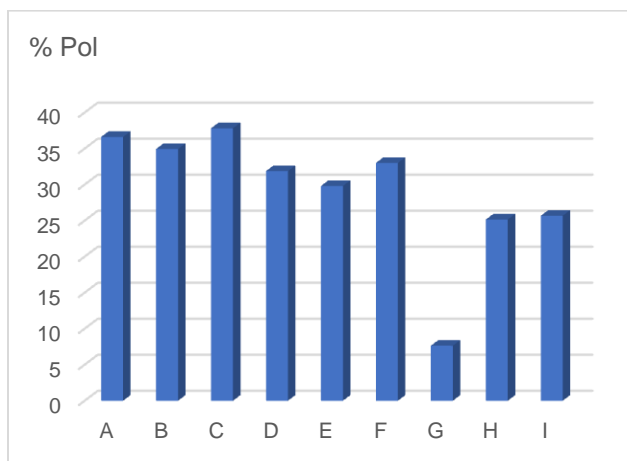
R (femeninos) fueron diferentes. En base a estos datos, la población C sería la más promisoría para avanzar en los estudios de validación de los marcadores KASP. Por otro lado, la población G sería la menos indicada para seleccionarse porque mostró el porcentaje más bajo de polimorfismo (7,6%, Tabla 1, Figura 1).

En cuanto al estudio de paternidad realizado en los individuos F<sub>2:3</sub> pertenecientes a la población Granoleico x Ascasubi, se observa que en todos los marcadores analizados hasta el momento se registran los mismos alelos en los individuos segregantes que en los parentales. Cabe destacar que el estudio se realizó en 29 genotipos porque a partir de uno de ellos no se obtuvo ADN de buena calidad. El total de alelos detectados fue de 24. En base a los resultados obtenidos hasta el momento se puede inferir que los individuos F<sub>2:3</sub> analizados corresponden al cruzamiento dirigido entre los parentales contrastantes para el carácter en estudio.

**Tabla 1.** Promedio del porcentaje de polimorfismo por población para ambos genomas

Población	A	B	C	D	E	F	G	H	I
% Pol genoma A	36,9	35,2	41,4	30,9	28,6	35,4	7,8	19,6	23,7
% Pol genoma B	36,3	34,7	34,2	32,9	31,1	30,6	7,4	30,7	27,6
<b>Total</b>	<b>36,6</b>	<b>34,9</b>	<b>37,8</b>	<b>31,9</b>	<b>29,8</b>	<b>33</b>	<b>7,6</b>	<b>25,1</b>	<b>25,6</b>

% Pol: Porcentaje de polimorfismo calculado en base a los marcadores SNP provenientes del *AXIOM array* 48K.



**Figura 1.** Promedio del porcentaje de polimorfismo por población para ambos genomas

Financiación. Proyecto financiado por la Fundación Maní Argentino. La base de datos generada con los marcadores SNP que se utilizó en el desarrollo de la actividad N° 1 fue financiada por un convenio existente entre INTA y USDA (EEUU).