

ANALISIS DE LA DIVERSIDAD GENETICA EN GERMOPLASMA DE *MELILOTUS ALBUS* MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES MICROSATELITES.

RIVERO, Martín.

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Bv. Pellegrini 2750- (CP 3000). Santa Fe, Argentina.

Área Temática: Ciencias Biológicas **Sub-área:** Biotecnología

INTRODUCCION:

Los efectos del cambio climático y la expansión de cultivos extensivos han ocasionado que la producción ganadera se vea expulsada hacia zonas marginales de menor aptitud. Las especies que constituyen la base del sistema forrajero tradicional están en general poco adaptadas a las áreas marginales donde se desarrollará la ganadería según las predicciones descriptas, por lo que se genera entonces la necesidad de utilizar nuevas especies más tolerantes a estrés abiótico como salinidad, sequía, etc.

Entre los materiales promisorios se destaca *Melilotus albus* Medik., una especie alógama, diploide ($2n=16$) (Fernandes & Santos, 1971), perteneciente a la familia de las leguminosas y originaria de Eurasia (Clarke, 1945) y naturalizada en la Argentina. Esta especie tolera niveles moderados de salinidad y produce forraje de calidad, además de ser conocida por los ganaderos de ambientes marginales. El manejo y selección de la diversidad genética en el germoplasma disponible sería esencial para facilitar y direccionar la obtención de materiales superiores. La diversidad genética puede interpretarse como la variedad de genotipos y alelos presentes en una población. Para su análisis se cuenta con numerosas técnicas, una de ellas es la de marcadores moleculares. Los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeat*) son regiones genómicas hipervariables, constituidas por repeticiones en tándem de secuencias de ADN, compuestas por dos a seis pares de bases (Smith *et al.*, 1997). Estas repeticiones se encuentran flanqueadas por secuencias conservadas que se ubican en loci específicos ampliamente distribuidos en el genoma de la mayoría de las especies eucariotas. El polimorfismo entre individuos, es detectado a través de las diferencias en los fragmentos amplificados debido a la variación en el número de secuencias repetidas.

OBJETIVO:

Caracterizar la diversidad genética existente en germoplasma local de *Melilotus albus* Medik. a ser utilizado como fuente de variabilidad en programas de mejoramiento genético mediante marcadores moleculares SSR.

MATERIALES Y METODOS:

Cientibeca UNL-INTA: “Variabilidad molecular entre y dentro de poblaciones de *Melilotus albus* con fines de mejoramiento genético”. Dirección: **Tomás M. Andrea; Tomas Pablo A.**

Se caracterizaron 10 ecotipos diferentes de *Melilotus albus*, nueve de ellos (1-LL, 2- SE, 3- LA, 4- GU, 5- SA, 6-PE, 7-BA, 8- LO y 9- LS) provenientes de INTA Rafaela y el restante (10- FU) del banco de germoplasma de la Facultad de Cs. Agrarias de la U.N.L.

Se extrajo el ADN a diez genotipos de cada ecotipo según la técnica de Doyle & Doyle (1990). Se utilizaron 9 pares de cebadores microsatélites que fueron seleccionados por presentar amplificación en *M. albus* según Winton *et al.* (2007). Los fragmentos generados fueron separados en geles de agarosa al 2% y en geles de poliacrilamida en condiciones nativas al 6%, y luego de su revelado y observación se tomaron fotografías para su análisis digital. Con las bandas registradas se generó una matriz de presencia-ausencia para cada genotipo, se calculó el contenido de información polimórfica (PIC) para cada uno de los ensayos, se estimó la distancia genética entre materiales mediante el índice de Dice, elaboró el correspondiente dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA y el Análisis de Coordenadas Principales (ACoP), por último se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA). Para todos los análisis se utilizó el software estadístico Infogen (Balzarini & Di Rienzo, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSION:

El empleo de marcadores moleculares SSRs resultó de gran utilidad para la caracterización de germoplasma de *Melilotus albus*. Al ser cebadores especie-específicos, se utilizaron las secuencias reportadas en bibliografía que permitían amplificar los loci SSR en la especie, aunque fue necesario hacer un test previo de los mismos con algunos genotipos al azar, para observar la calidad de amplificación y los polimorfismos generados.

Variabilidad por cebador:

Los nueve pares de cebadores microsatélites generaron amplificación, pero en un ensayo preliminar, el loci MaMS09 produjo un 75% de alelos nulos, por lo que no se lo consideró para la caracterización de todos los individuos.

Los ocho pares de cebadores restantes generaron productos de amplificación en los 100 genotipos estudiados, identificándose 30 alelos con un promedio de 3,8 alelos por locus (Tabla 1).

Tabla 1: Número de alelos presentes y Rango de Pesos Moleculares en los que se encuentran las bandas amplificadas por cebador SSR.

Cebador SSR	Nº Alelos	Rango PM (pb)
MaMS03	2	(260-280)
MaMS04	4	(240-280)
MaMS06	3	(300-340)
MaMS08	3	(150-190)
MaMS10	4	(380-450)

MaMS12	4	(280-330)
MaMS13	3	(350-390)
MaMS15	7	(350-480)

Los valores PIC observados fueron importantes para la mayoría de los microsatélites, con excepción del loci MaMS03, donde se observó la menor variabilidad (Figura 1)

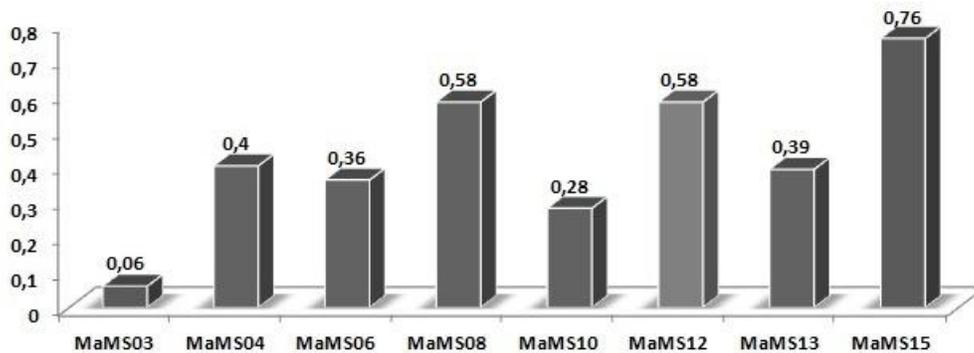


Figura 1: Valores del contenido de información polimórfica por cebador SSR utilizado.

Varianza molecular

Se realizó el Test de AMOVA y se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) tanto entre como dentro de los ecotipos, siendo la variación dentro (91,2 %) muy superior a la variación entre los mismos (8,8%). Xie *et al.* (2012) reportaron patrones similares de distribución de la variación genética en otras especies alógamas y Lai *et al.* (2001) en materiales silvestres.

Variabilidad entre ecotipos.

En la Fig. 2, el dendrograma muestra que todos los ecotipos se diferenciaron entre sí al 50% de la máxima distancia genética estimada (0,47). El valor 0,71 de distancia permite observar el agrupamiento de los ecotipos en 7 clusters:

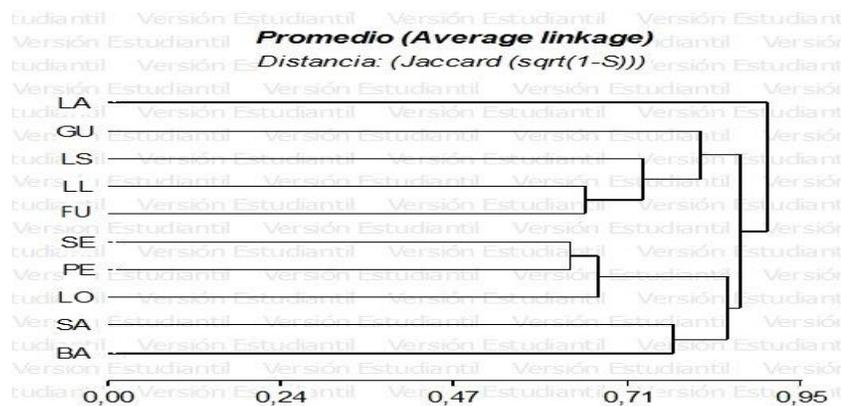


Figura 2: Dendrograma de la distancia genética de Dice entre ecotipos.

Grupo I: Formado por **LL** y **FU**. *Grupo II:* Ecotipos **SE, PE y LO**. Los restantes ecotipos estarían formando cada uno un grupo por separado.

En el Análisis de Coordenadas Principales se observaron resultados coincidentes con los agrupamientos del dendrograma.

CONCLUSIONES:

Los marcadores moleculares SSR resultaron útiles para caracterizar la diversidad genética en germoplasma de *Melilotus albus de las colecciones analizadas*.

La gran mayoría de los cebadores microsatélites empleados demostraron ser de gran utilidad para determinar variaciones genéticas intra e inter-poblacionales, observándose mayores diferencias dentro de los ecotipos que entre los mismos.

La variabilidad genética presente en estos ecotipos, podría ser de utilidad para la generación de nuevos programas de mejoramiento en la especie.

BIBLIOGRAFIA:

Balzarini M.G., Di Rienzo J.A. (2013). InfoGen v2013. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>.

Clarke, A. E. (1935). Inheritance of annual habit and mode of pollination in an annual white sweet clover. Journal of the American Society of Agronomy 27: 492 – 496.

Doyle, J. J.; Doyle J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Fernandes, A.; Santos, M. F. (1971). Contribution a la connaissance cytotoxonomique des spermatophyta du Portugal. IV. Leguminosae. Bol. Soc. Brot., ser. 2, 45:177-226.

Lai, J.; Yang, W.; Hsiao, J. (2001). An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. Botanical Bulletin of Academia Sinica 42(2):93-100.

Smith, J. S. C.; Chin, E. C. L.; Shu, H.; Smith, O. S.; Wall, S. J.; Senior, M. L.; Mitchell, S. E.; Kresovitch, S.; Ziegler J. (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree. Theor. Appl. Genet. 95: 163 -173.

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*). Molecular Ecology Notes.7, 1296–1298. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01860.x.

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. Genetics and Molecular Research 11 (1): 425-433.