



# COLECTA Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE POBLACIONES DE FESTUCA ALTA (SCHEDONORUS PHOENIX (SCOP.) HOLUB)

*Natalia S. Palacios\*<sup>1</sup>, Antonio Diaz Paleo<sup>1</sup>, Javier Lavandera<sup>1</sup>, Adriana Andrés<sup>1</sup>*

**Palabras clave:** nicho ecológico, variación genética, marcadores moleculares

En la región pampeana la ganadería fue relocalizada en ambientes restrictivos que provocaron la disminución del potencial productivo de las pasturas. Con el fin de desarrollar germoplasma de festuca alta se recolectaron nueve poblaciones en el borde del nicho ecológico y se caracterizaron molecularmente. Los resultados indicaron elevada variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones.

## INTRODUCCION

### El germoplasma y la variabilidad genética

El germoplasma naturalizado de diversas especies forrajeras contiene suficiente variabilidad genética, como consecuencia de procesos de selección y adaptación a condiciones específicas del ambiente. La recolección de germoplasma en áreas donde se presume que existe variabilidad ambiental extrema, como altas concentraciones salinas, estrés hídrico y/o térmico, y su posterior caracterización molecular y agronómica son de gran importancia para iniciar programas de mejoramiento genético que tengan por objetivo desarrollar cultivares para dichos mosaicos ambientales (Andrés, 2014).

En Argentina diversos estudios demostraron una elevada variabilidad genética y plasticidad fenotípica en festuca alta, especie de gran valor forrajero para sistemas ganaderos extensivos y componente frecuente de las pasturas del norte de la provincia de Buenos Aires (Maddaloni y Ferrari, 2001). En un estudio de prospección de la especie en un área de 400 km<sup>2</sup>, se definió cuál es su nicho ecológico (Scheneiter *et al.*, 2015), considerando variables bioclimáticas como temperaturas extremas y lluvias en el trimestre más seco (100 mm). A partir de dicho estudio se identificaron áreas geográficas que indicarían la existencia de genotipos adaptados a condiciones marginales al nicho. A partir de este concepto se realizó la colecta de nueve poblaciones que abarcaran los límites del nicho ecológico para someter a estu-

dios de caracterización molecular y morfo-fisiológica de dichas poblaciones. En el presente trabajo se presentan los resultados de la caracterización molecular.

### La caracterización con marcadores moleculares

Los marcadores moleculares permiten detectar la variabilidad genética y la eficiencia de selección en caracteres específicos. Tradicionalmente los materiales colectados se han caracterizado mediante marcadores morfológicos. Este método ha sido eficiente, pero altamente condicionado por el efecto ambiental (Tanksley y Mc Couch, 1997). En los últimos años los marcadores moleculares se han convertido en una herramienta valiosa para asistir al mejoramiento genético convencional en la detección de variabilidad y de genes asociados a la tolerancia a estreses. Entre las principales ventajas del uso de los marcadores moleculares se destacan, la precisión de detección de la variabilidad a nivel de ADN, su amplia presencia en el genoma, escasa influencia del ambiente y se pueden detectar en cualquier estado del desarrollo de la planta.

En el presente trabajo se utilizaron los marcadores denominados microsatélites (SSR) por ser abundantes y de amplia distribución en el genoma. Los mismos se caracterizan por su alto nivel de polimorfismo, ser multialélicos, somáticamente estables, altamente reproducibles y codominantes, lo que permite detectar genotipos homocigotos y heterocigotos. Por estas características los SSR son marcadores particularmente aptos para

1-EEA Pergamino UNNOBA, CIC. Av. Frondizi (Ruta 32) km 4.5 – (2700) Pergamino – Buenos Aires

\* [palacios.natalia@inta.gob.ar](mailto:palacios.natalia@inta.gob.ar)

**Tabla 1.** Sitios de colecta de las nueve poblaciones, coordenadas geograficas y tipo de suelo

Población	Sitio de colecta	Coordenadas	Tipo de suelo
1	Juncal*	S 33° 43 - O 60° 56	Argiudol, bajo ganadro con curso de agua
2	Firmat*	S 33° 24 - O 61° 37	Argiudol, agrícola
3	Melincué*	S 33° 41 - O 61° 21	Argiudol, ganadero
4	Pehuajó	S 35° 51 - O 62° 14	Argiudol, agrícola
5	General Villegas	S 35° 03 - O 63° 01	Argiudol, ganadero
6	Lima	S 34° 03 - O 59° 17	Argiudol, bajo ganadro con curso de agua
7	Pigüé	S 37° 34 - O 62° 30	Loma agricola con tosca, con curso de agua
8	Coronel Pringles	S 38° 17 - O 61° 32	Agricola con tosca, en la sierra
9	Pergamino	S 33° 56 - O 60° 33	Argiudol, agrícola

\*Nota: Juncal, Firmat y Melincué pertenecen al sur de la provincia de Santa Fe.

realizar la evaluación y comparación de la variación genética dentro y entre especies cercanas.

## DESARROLLO

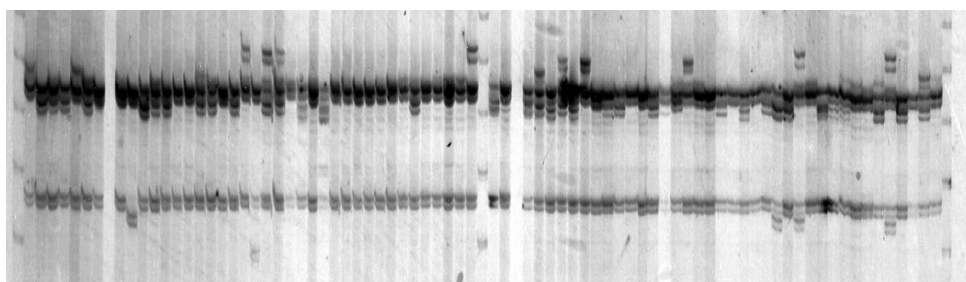
### Colecta del germoplasma

La colecta del germoplasma se realizó entre los meses de octubre y diciembre 2015. Las nueve poblaciones (Tabla 1) fueron seleccionadas a partir de tres variables bio-climáticas, la temperatura media mínima del mes más frío (2,6 °C - 3,2 °C), la lluvia en el trimestre más seco (100 mm) y la frecuencia de aparición de genotipos por población (intermedias). La estrategia de colecta fue de planta individual (1 planta= 1 genotipo), tomando 40 plantas por población. El aislamiento por población fue de al menos 30 kilómetros. La colecta dentro de cada sitio se realizó a lo largo de una transecta con mayor densidad de plantas de la especie y respetando una distancia mínima de 3 m entre plantas para evitar coleccionar el mismo individuo. Las 360 plantas (genotipos) fueron identificadas y trasladadas a la EEA Pergamino. Cada planta fue mantenida en macetas de soplado de 3 L conteniendo una mezcla de tierra y arena, al aire libre, hasta el momento de comenzar la etapa en invernáculo con el proceso de clonación.

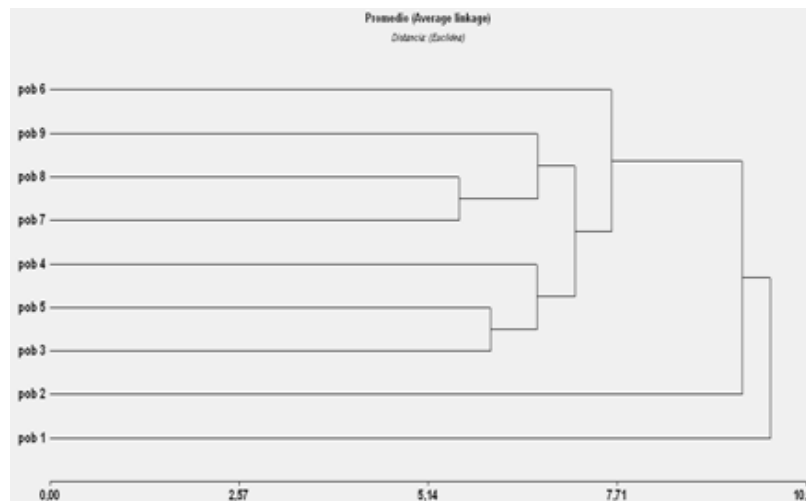
### Caracterización molecular

Se recolectó al menos 2 g de hojas frescas de los 40 genotipos de cada población. El material se conservó en frío para luego ser liofilizado durante 48 h. Una vez liofilizadas, se identificó individualmente y se colocó en bolsas de nylon cerradas al vacío. Al momento de realizar la extracción de ADN, las muestras se molieron manualmente. El material molido se colocó en tubos eppendorf de 2 ml rotulados y se aplicó el protocolo de extracción de ADN del Laboratorio de Biotecnología de la EEA INTA Pergamino. Una vez terminada la extracción se procedió a evaluar la cantidad e integridad del ADN de las muestras. Se utilizaron siete marcadores SSR propios de festuca diseñados por la Samuel Roberts Noble Foundation (Saha *et al.*, 2006).

Las reacciones de amplificación (PCR) se realizaron según la temperatura de cada SSR. Luego se procedió a la separación de los productos de PCR (electroforesis) junto con testigos de peso molecular conocidos. La duración de la corrida electroforética se adecuó al peso molecular (PM) estimado de cada SSR. Una vez finalizada la corrida se realizó el revelado de las bandas mediante



**Figura 1.** Patrón de bandas del SSR-NFA031 para una población evaluada. Las bandas de distintos pesos se consideraron distintos alelos. La primera y última columna corresponden al testigo de peso molecular de 25 pb.



**Figura 2.** Análisis de Cluster de las 9 poblaciones analizadas a partir de la matriz de distancias genéticas Euclídea.

tinción con plata. Efectuado el revelado se procedió a evaluar manualmente los tamaños de pares de bases de los alelos presentes considerando los diferentes tamaños de bandas amplificadas como diferentes alelos (Figura 1). Se estimó la variancia de los componentes intrapoblacionales e inter-poblacionales mediante el AMOVA y se aplicaron análisis multivariados (Análisis de Coordenadas Principales-ACoorP, Análisis de Cluster).

## RESULTADOS

Los resultados preliminares indicaron la existencia de variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones. A partir del análisis de la variancia molecular (AMOVA) se detectó que el 38% de la variancia genética molecular se encontró entre las poblaciones y el 62% dentro de las poblaciones o lo que es lo mismo la variación entre individuos.

El análisis de coordenadas principales (ACoorP) estimado mediante la distancia genética Euclídea mostró que las primeras dos coordenadas principales explicaron el 48% de la variación total. La primera coordenada explicó el 25% de la variabilidad encontrada, la segunda coordenada explicó el 23% restante. Se pudieron detectar al menos tres grupos de poblaciones. Por otro lado, el Análisis de Clúster jerárquico obtenido a partir de la matriz de distancias genéticas Euclídea, mostró también tres grupos si se toma como punto de corte el valor del 75% (7,71) con una correlación cofenética igual a 0,95 (Figura 2). El grupo 1 se formó con la población 1, el grupo 2 se formó con la población 2 y el grupo 3 se formó con las poblaciones restantes.

## CONSIDERACIONES FINALES

El presente estudio de caracterización molecular realizado en nueve poblaciones de festuca alta recolectadas en el borde del nicho ecológico de la especie, indicó la presencia de una elevada varia-

bilidad genética entre y dentro de las poblaciones. La amplia diversidad genética detectada entre los individuos indicaría la posibilidad de disponer de germoplasma para utilizar en futuros programas de mejoramiento genético de festuca alta.

En particular la variabilidad detectada en las poblaciones es producto de un proceso de adaptación a condiciones ambientales marginales al nicho ecológico, y por lo tanto con cierta tolerancia a sequías temporarias y temperaturas elevadas. Estos aspectos son de gran importancia cuando el objetivo de selección se focaliza en la obtención de cultivares de festuca alta tolerantes a dichos estreses y con capacidad de colonizar ambientes más extremos que los que normalmente ocupa.

## BIBLIOGRAFIA

- Andrés, A. 2014. El mejoramiento de especies forrajeras. Núcleos revista científica-CEDI-UNNO-BA. Pp50.
- Maddaloni, J. y Ferrari, L. 2001. Forrajes y Pasturas del Ecosistema Templado Humedo de la Argentina. INTA y Univ. Nacional de Lomas de Zamora. Pp165-181.
- Saha, M.C., Cooper, J.M., Rouf Mian, M.A., Chekhovskiy, K y May, G.D. 2006. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. *Theoretical and Applied Genetics*. 113:1449-1458.
- Scheneiter, J.O., Kaufmann, I., Ferreyra, A.R., Llorente, R.T. 2015. The herbage productivity of tall fescue in the Pampas region of Argentina is correlated to its ecological niche. *Grass and forage science*. doi: 10.1111/gfs.12184.
- Tanksley, S.D. y Mc. Couch, S.R. 1997. Seed Banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277:1630-1066. <<



**DECARGAR ARTÍCULO**