



Grandón N. G.¹, Alarcón Y. ¹, Moreno M.V. ¹, Arolfo V. ², Odorizzi A. ², Bruno C. ³, Basigalup D. H. ², Gieco, J. O. ¹

¹Grupo de biotecnología en cultivos, INTA-EEA Manfredi, Córdoba, Argentina. ²Grupo de mejoramiento genético de alfalfa, INTA-EEA Manfredi, Córdoba, Argentina. ³Cátedra de Estadística y Biometría, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Email 1: nggrandon@manfredi.inta.gov.ar

INTRODUCCIÓN

La alfalfa es una leguminosa, perenne y autotetraploide ($2n=4x=32$). Los cultivares son poblaciones sintéticas obtenidas por tres o cuatro generaciones de panmixia a partir de un conjunto de varios parentales (Flajoulot *et al.*, 2005). Su importancia como cultivo forrajero radica en su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales, y en que actúa como fuente fijadora de nitrógeno, mediante la simbiosis que establece con *Sinorhizobium melliloti* (Barnes *et al.*, 1988). En la Argentina se cultivan alrededor de 4 millones de hectáreas, de las cuales el 90% se localiza en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y La Pampa (Basigalup y Rossanigo, 2007).

Al establecer programas de mejoramiento, la caracterización molecular de la diversidad genética en el germoplasma puede aportar datos útiles para auxiliar al mejorador en la selección de los parentales de poblaciones básicas. La Estación Experimental Agropecuaria Manfredi del INTA cuenta con un banco activo de germoplasma de alfalfa, el cual aún no ha sido caracterizado a nivel molecular. Debido a esto, se busca aportar nueva información que, sumado a la correcta caracterización agronómica de aquel, servirá como una herramienta auxiliar para el mejoramiento y el desarrollo de nuevos cultivares con una base genética más amplia.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la diversidad genética en genotipos de alfalfa a través de la caracterización agronómica y el uso de marcadores microsatélites.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con 40 genotipos de diferentes cultivares pertenecientes al germoplasma implantado en el ensayo Nursery 2006 del programa de mejoramiento de alfalfa del INTA - EEA Manfredi. Cada genotipo incluyó tres clones obtenidos por esquejes (Figura 1) a partir de una planta individual elegida al azar.

El trasplante a campo se realizó después de un período de rusticación a la intemperie (Figura 2). Para el ensayo se utilizó un diseño en parcelas subdivididas con tres repeticiones (Figura 3).



Figura 1: Clonado de plantas individuales.



Figura 2: Trasplante a campo.



Figura 3: Ensayo.

La producción de materia seca (MS) se registró al 10% de floración de tres cortes. La velocidad de rebrote (VR) se midió a los 10 días posteriores a cada corte registrando la altura modal (altura a la que llegan la mayoría de los brotes). El comportamiento frente a tres enfermedades foliares: tallo negro de primavera (TNP), mancha ocular (MO) y roya de la alfalfa (R), se evaluó en los meses de mayor incidencia. Para ello se utilizó una escala de severidad visual de 6 grados, donde 0 representó la ausencia de enfermedad y 5 más del 50% del área foliar afectada.

El genotipado se realizó con 18 *loci* SSR (*Simple Sequence Repets*) unilocus (Diwan *et al.*, 1997 y Julier *et al.*, 2003) y los fragmentos amplificados se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida 6% (p/v) (Figura 4).

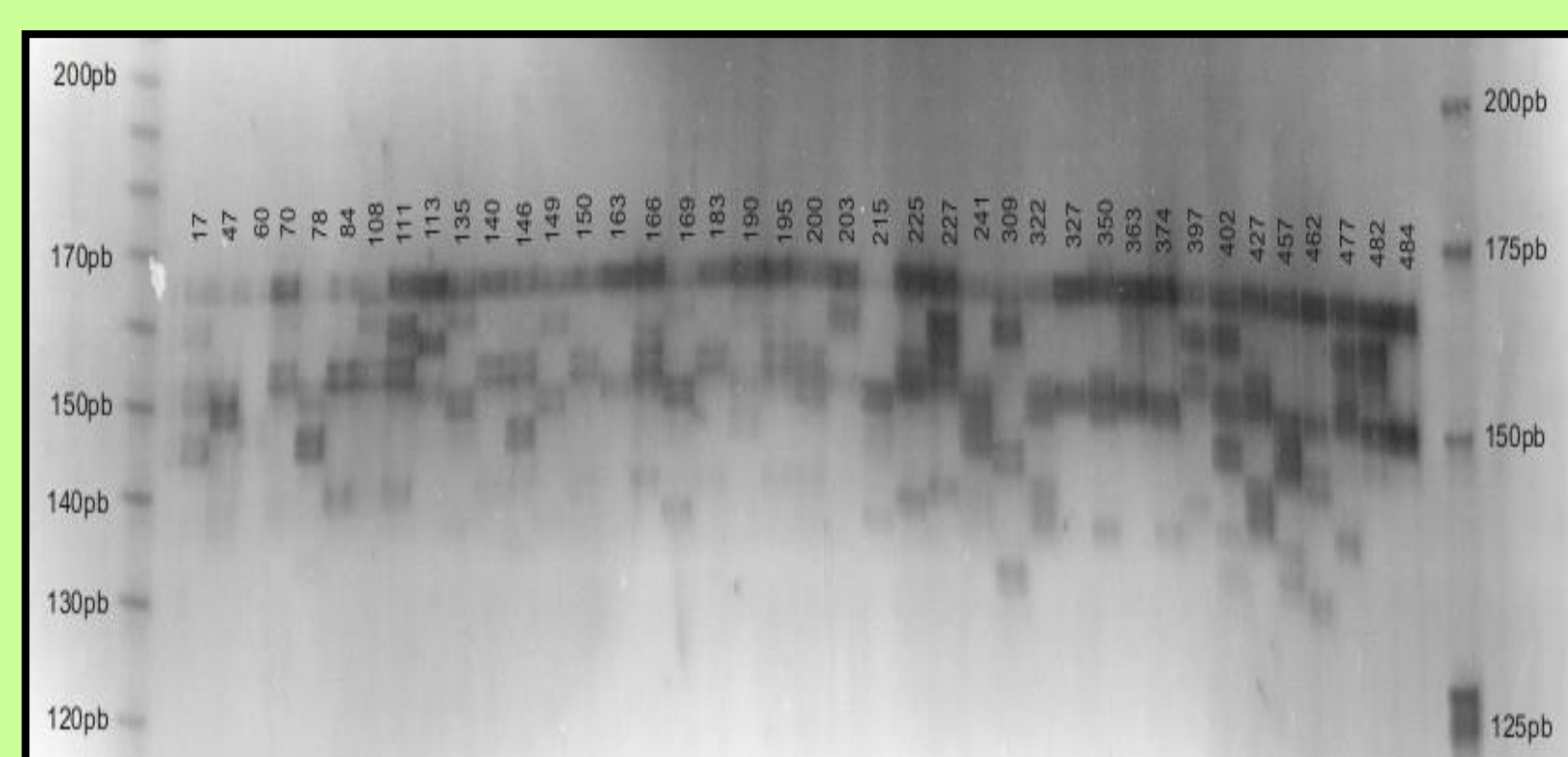


Figura 4: Individuos genotipados con el primer AFca1.

El análisis estadístico se realizó con el programa Info-Gen/P 2006p.1 Versión 1.0. Se codificó cada banda de cada locus con una letra del alfabeto. El análisis de componentes principales (ACP) se construyó a partir de los datos agronómicos estandarizados. Para el análisis de cluster (AC) agronómico se calculó las distancias a partir del índice de Gower. Para el AC molecular se calculó las distancias a partir del índice de Nei Standard. La diversidad genética se determinó calculando los índices: Diversidad (D), Heterocigosis (H), Heterocigosis esperada o insesgada de Nei (He) y el Contenido de Información Polimórfica (PIC). Por último, se realizó el análisis de procrustes (APG) para determinar la correlación entre las ordenaciones agronómica y molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 18 *loci* SSR genotipados, solo seis mostraron buena resolución en gel. Se identificaron un total de 84 alelos para los *loci* SSR analizados, con un promedio de 14 alelos por locus (Tabla 1). AFct32 fue el locus más polimórfico y el que presentó mayor número de alelos. Los genotipos presentaron de 1 a 4 alelos (Figura 4), con un promedio de 2,7 alelos por genotipo por locus. El valor D promedio fue de 0,843, indicando un alto grado de heterosis entre los genotipos evaluados. Esto también se vio reflejado en los demás índices de diversidad (Tabla 2). Una forma de cuantificar el polimorfismo presente en un locus determinado es a través del PIC. Es así que, el valor PIC promedio (PIC=0,826) indicó que los *loci* analizados son altamente polimórficos e informativos.

Primer	Tamaño en pb.	Nº alelos
MTIC451	125-160	13
B14B03	130-190	13
MTIC432	160-220	12
AFca1	130-170	16
AFct11	170-210	8
AFct32	100-180	22

Tabla 1: Número y tamaño de alelos encontrados para los 6 *loci* SSR analizados.

Índices de Diversidad	Promedio
Diversidad	0,843
Heterocigosis	0,93
Heterocigosis esperada o insesgada de Nei	0,854
PIC	0,826
Nº alelos/individuo/locus	2,724

Tabla 2: Índices de diversidad genética promedio.

En el ACP (Figura 5) las dos primeras componentes explicaron el 63% de la varianza total, posiblemente debido a que los caracteres analizados no permitieron explorar la variabilidad total contenida en el material evaluado. Por lo tanto, indicaría que los materiales no son agronómicamente muy diferentes. Como se muestra en la figura las variables con mayor peso para la CP1 fueron TNP, MS y VR. Para la CP2 fueron R y MO.

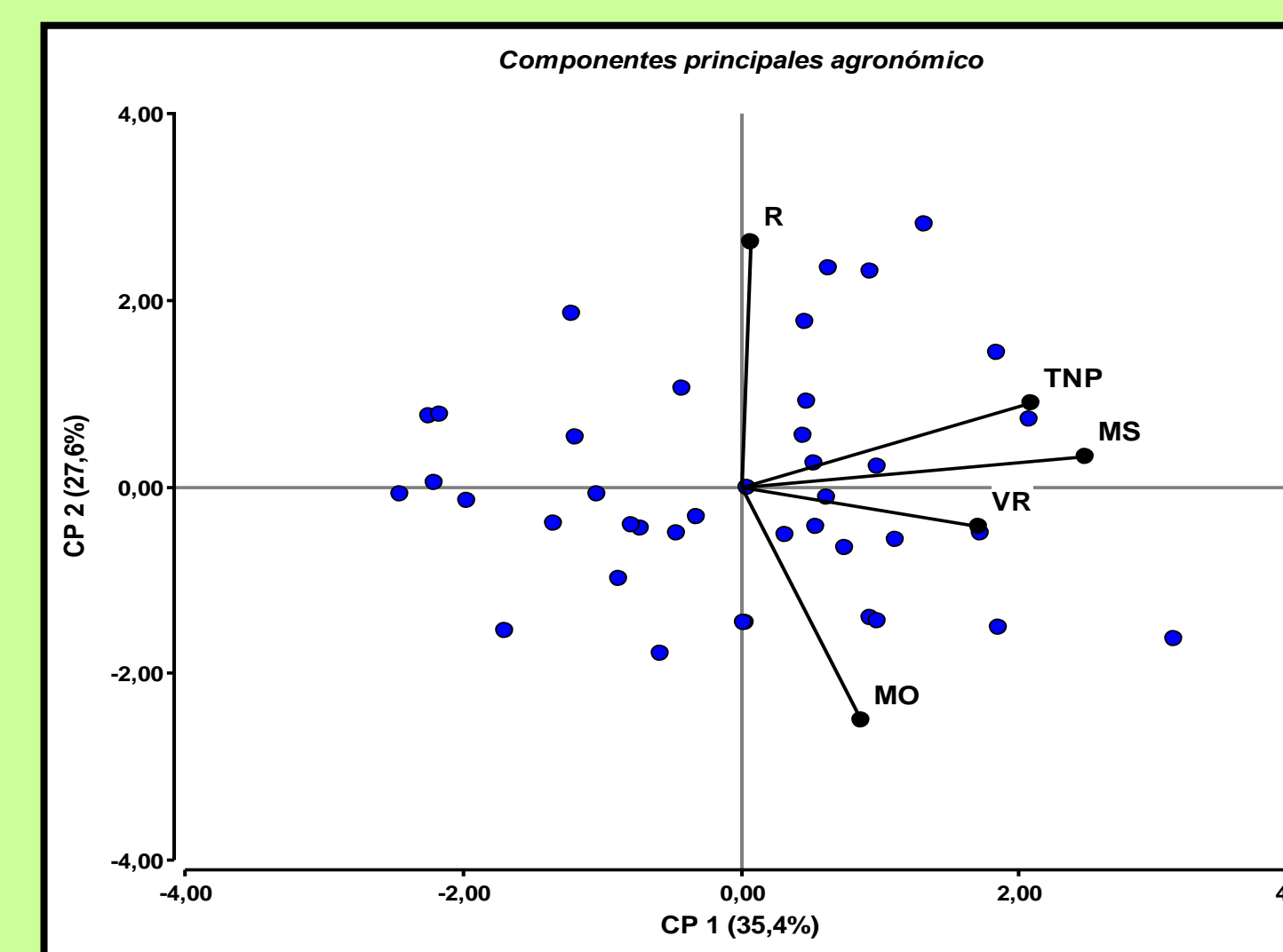


Figura 5: Biplot obtenido a partir del ACP. Ordenamiento producido por 5 caracteres agronómicos de la media de los individuos analizados.

En el análisis de clusters solo el AC agronómico (Figura 6) mostró formación de 5 grupos al 52% de la distancia total. No así el AC molecular (Figura 7) donde aparecen los genotipos mezclados, posiblemente debido a la alta variabilidad que presentan. Esto también se vio reflejado en los altos valores de He promedio que presentaron los genotipos evaluados. Si bien en el cluster agronómico se observó cierto agrupamiento de los individuos por cultivares, esto no se observó en el cluster molecular. Como tampoco se vio correlación entre los clusters definidos por las características agronómicas y el definido por los datos moleculares.

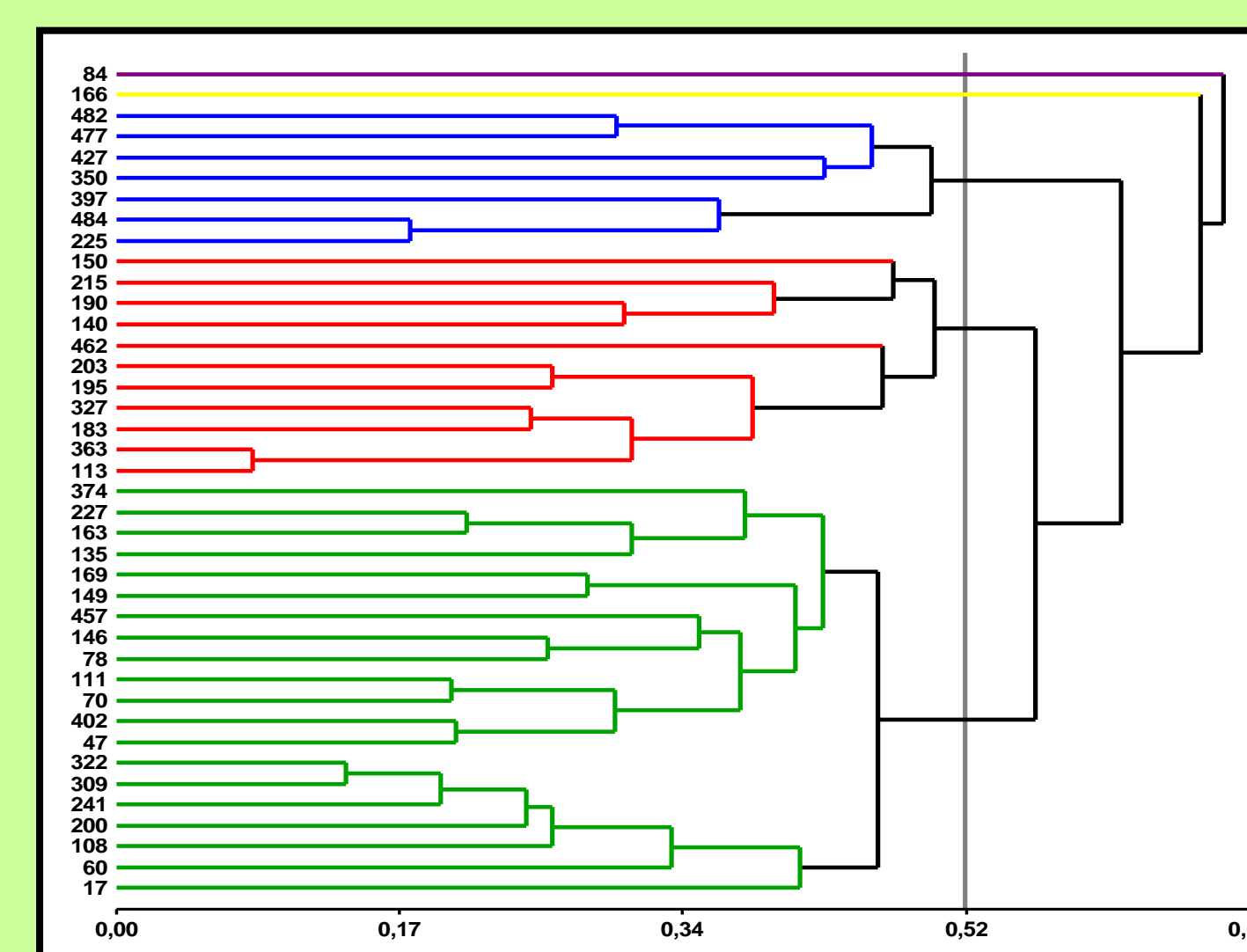


Figura 6: Dendrograma agronómico. Coef. Correlación Cofenético: 0,808.

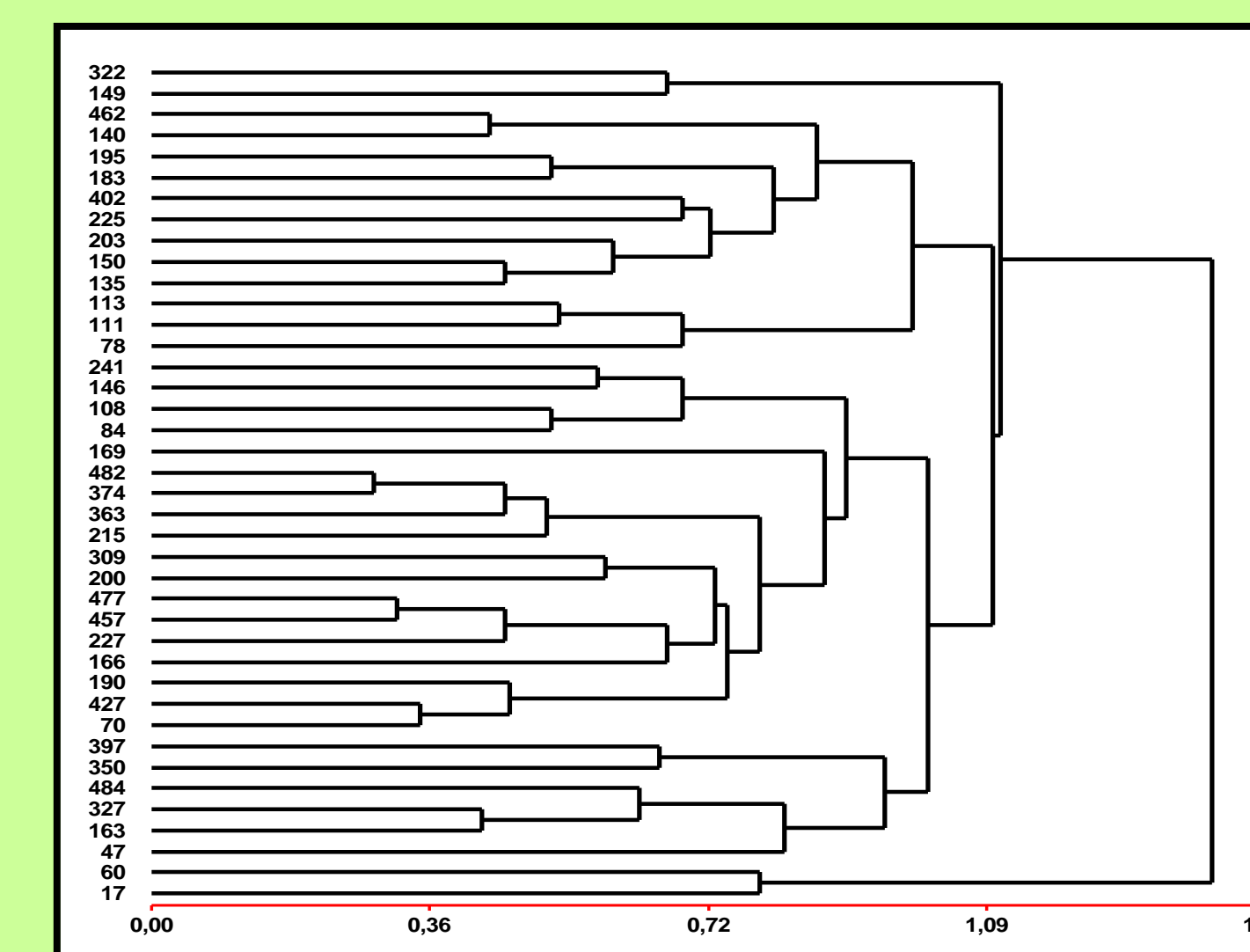


Figura 7: Dendrograma molecular. Coef. Correlación Cofenético: 0,554.

El APG (Figura 8) combina la información brindada por los caracteres agronómicos y los SSR. Es así, que existe un 65,4% de consenso entre el ordenamiento agronómico y el molecular; probablemente debido al escaso número de genotipos analizados y a la falta de asociación entre los SSR genotipados y los caracteres agronómicos evaluados. La dispersión de los puntos observada en el gráfico mostraron una alta variabilidad agronómica y molecular de los genotipos analizados. Como se puede ver aquí tampoco se agruparon por cultivares (referenciados por color).

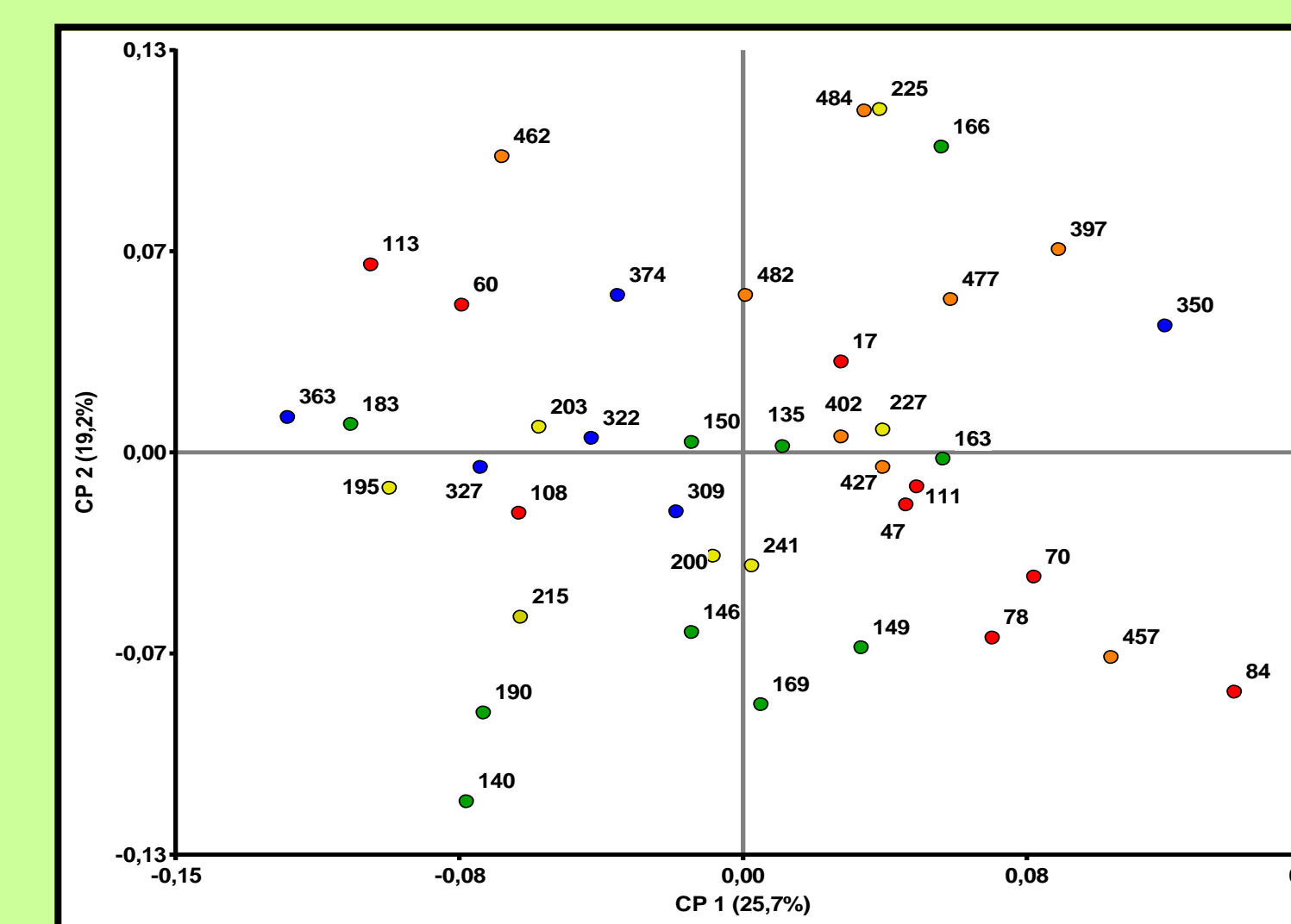


Figura 8: Configuración consenso entre las ordenaciones agronómicas y moleculares.

CONCLUSIONES

✓ Los resultados del presente trabajo indicarían que para análisis de diversidad molecular se requiere evaluar un mayor número de individuos.

✓ Se confirma la posibilidad de analizar la diversidad genética presente en el germoplasma de alfalfa a través del uso conjunto de marcadores microsatélites y un software estadístico adecuado.

✓ Estos resultados servirían como herramienta para asistir al mejoramiento tradicional a través de la formación de grupos heteróticos constituidos por individuos genéticamente distantes, con alta producción de forraje y tolerancia a las enfermedades foliares evaluadas en este trabajo.

Referencias:

Barnes, D.K.; Goplen, B.P.; Baylor, J.E. 1988. *Highlights in the USA and Canada*. In: Hanson A.A. *et al.* (Eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Madison, Wisconsin, USA. American Society of Agronomy. Agronomy Monograph N° 29. Cap. 1, p. 1 – 24. Basigalup, D.H. y Rossanigo, R. 2007. *Panorama actual de la alfalfa en la Argentina*. En: Basigalup D.H. (Ed.). *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*. Córdoba (AR): Ediciones INTA. Cap. 1, p. 13 – 25. Diwan, N.; Bhagwat, A.A.; Baughan, G.R.; Cregan, P.B. 1997. *Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual Medicago species*. Genome, 40: 887 – 895. Flajoulot, S.; Ronfort, J.; Baudouin, P.; Barre, P.; Huguet, T.; Huyghe, C.; Julier, B. 2005. *Genetic diversity among alfalfa (Medicago sativa) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers*. Theor. Appl. Genet., 111: 1420 – 1429. Julier, B.; Flajoulot, S.; Barre, P.; Cardinet, G.; Santoni, S.; Huguet, T.; Huyghe, C. 2003. *Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (Medicago sativa) using microsatellite and AFLP markers*. BMC Plant Biology. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/9>