

UTILIZACIÓN DE MARCADORES SNP PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL GEN AhFAD2 EN ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO ARACHIS Y VARIEDADES COMERCIALES

Costero, B. P.¹; De Blas, F. J.^{1,2}; Pepermans, M.¹; Grosso, N. R.^{1,2}; Torres L.¹

¹Universidad Nacional de Córdoba- Facultad de Ciencias Agropecuarias- Laboratorio de Calidad genética y Sanitaria. Córdoba. Argentina

²CONICET. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV). Córdoba. Argentina

RESUMEN

En el aceite de maní los ácidos grasos oleicos aportan al grano y a sus derivados mejor calidad nutricional y mayor estabilidad, dado que este tipo de ácido graso es menos propenso a la oxidación, a diferencia de los ácidos Linoleico y Palmítico. En maní, el alelo que determina el fenotipo Alto Oleico es de carácter recesivo y para que se exprese de forma significativa se requiere la presencia de una mutación en cada uno de los genes homeólogos del genoma A y B que codifican enzimas desaturadas de ácidos grasos, que convierten el ácido oleico (C18: 1) a ácido linoleico (C18: 2). En programas de mejoramiento para el carácter alto oleico, es fundamental determinar la base genética presente en los materiales usados en los cruzamientos, para garantizar la estabilidad del atributo en la variedad obtenida. Las especies silvestres del género *Arachis* se convierten en buenas candidatas para ser utilizadas como material base de los cruzamientos, por ser una fuente valiosa de genes de resistencia a enfermedades foliares y de suelo de origen fúngico, entre otras. El objetivo del presente trabajo fue utilizar marcadores moleculares del tipo SNP, para revelar mutaciones en los genes de la enzima desaturasa, en plantas silvestres del género *Arachis*, utilizadas en el programa de mejoramiento que lleva adelante el Criadero “El Carmen”, y en variedades comerciales que podrían ser incorporadas en otros programas de mejoramiento con el objetivo de ampliar el pool génico del maní cultivado y de esa manera constituir una valiosa herramienta para asistir al mejorador, aumentar la eficiencia y la predictibilidad de los resultados.

Palabras clave: *Arachis*, Marcadores SNP, gen, ácido graso desaturasa.

INTRODUCCIÓN

En el cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) las preferencias en cuanto a la calidad de sus granos y a su composición de ácidos grasos son diversas según las necesidades del consumidor y los requerimientos de la industria.

En el aceite de maní los ácidos grasos oleico (O), linoleico (L) y palmítico (P) constituyen el 90% de su composición y las proporciones entre ellos son determinantes para la calidad final y el destino posterior. Altos niveles de O aportan al grano y a sus derivados mejor calidad nutricional y mayor estabilidad, dado que este tipo de ácido graso es menos propenso a la oxidación. Las fuentes genéticas del carácter alto oleico (AO) en maní se originan tanto a partir de un mutante natural denominado F435 (80% O/2% L), como de líneas derivadas de mutagénesis inducida (Gobelli, *et al* 2017).

En programas de mejoramiento para el carácter alto oleico, es fundamental determinar la base genética presente en los materiales usados en los cruzamientos, para garantizar la estabilidad del atributo en la variedad obtenida. Las especies silvestres del género *Arachis*, por ser una fuente valiosa de genes de resistencia, entre

otros, a enfermedades foliares y de suelo de origen fúngico, se convierten en buenas candidatas para ser utilizadas como material base de los cruzamientos. Sin embargo, todas las especies silvestres genómicamente afines al maní son diploides ($2n=2x=20$), a excepción de la tetraploide *A. monticola*. En cuanto a enfermedades del suelo, Odino *et al.* (2006) evaluaron distintas especies silvestres frente a la podredumbre parda de la raíz del maní causada por *Fusarium solani* y no observaron ninguna especie inmune a la enfermedad, aunque *A. correntina*, *A. cardenasii* y *A. duranensis* presentaron valores de incidencia y severidad significativamente inferiores a *A. hypogaea*.

Guo *et al.* (2010) mencionan que la naturaleza poliploide del maní cultivado y su sistema reproductivo autógamo bloquean el intercambio genético entre especies silvestres diploides—genéticamente diversas y con genes de resistencia—y las cultivadas. Como consecuencia de esto, es difícil obtener un híbrido fértil con valor agronómico superior (Simpson *et al.*, 1993; Staker, 1993 y Simpson y Starr, 2001) lo que conduce a la erosión de la diversidad genética en los genotipos cultivados. Por esta razón, desde hace algunos años se han comenzado a

desarrollar diversos métodos de introgresión de atributos silvestres al maní cultivado.

La vía más exitosa entre las alternativas para vincular recursos genéticos con los programas de mejoramiento del maní es el pre-mejoramiento (Simpson *et al*, 2001; Mallikarjuna, 2014). Esta metodología implica la obtención de anfidiploides sintéticos a partir de especies silvestres compatibles genómica y cromosómicamente con *A. hypogaea* (Simpson *et al*, 2001; Fávero, 2006) y su empleo como progenitores de nuevas variedades cultivadas. En particular, ensayos realizados en el Criadero El Carmen durante los períodos 2003/04 y 2004/05 permitieron identificar a *Arachis cardenasii* y *Arachis correntina* como especies altamente resistentes a enfermedades causadas por hongos del suelo y enfermedades foliares, particularmente viruelas (Rosso *et al.*, 2019; Oddino *et al.*, 2017; Oddino *et al.*, 2012). De este modo, el criadero se planteó como objetivo obtener un anfidiplode sintético que pudiese ser cruzado con cultivares de maní cultivado (*Arachis hypogaea* L.) para desarrollar poblaciones de progenitores superiores. Para ello se realizaron cruzamientos interespecíficos (Fig. 1) entre *A. cardenasii*, *A. correntina*, donantes del genoma A y *Arachis batizocoi*, donante del genoma B/k, y posterior duplicación de cromosomas. (Soave *et al*, 2011, Torres *et al*. 2012).

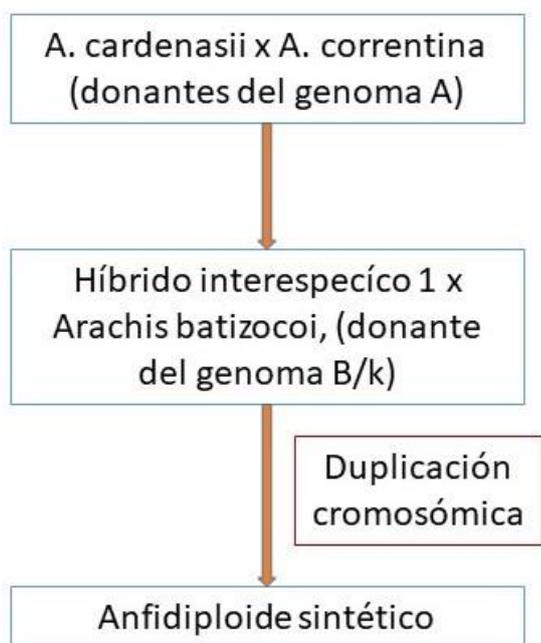


Figura 1: Cruzamientos realizados por criadero El Carmen para la obtención del anfidiplode sintético de maní.

El anfidiplode obtenido se cruzó con una variedad de maní cultivado de alto contenido de ácido oleico. Esta

MATERIALES Y MÉTODOS

práctica produce la ocurrencia de irregularidades meióticas en los materiales híbridos y duplicados que afectan la distribución ordenada de los genomas de las especies utilizadas como progenitores. Así, un sistema de marcadores resulta necesario para la identificación de los genomas presentes en los materiales sintéticos y para la posterior selección de individuos superiores portadores de los atributos deseados.

A diferencia de otras leguminosas, el alelo que determina el fenotipo AO en maní es de carácter recesivo y para que se exprese de forma significativa se requiere la presencia de una mutación en cada uno de los genes homeólogos del genoma A y B. (Gobelli *et al* 2017) que codifican desaturasas de ácidos grasos, enzimas que convierten el ácido oleico (C18: 1), beneficioso para la salud humana y multiplicador de la estabilidad autooxidativa de la semilla, a ácido linoleico (C18: 2). La actividad de ambas desaturasas en estos mutantes de alto contenido de ácido oleico era significativamente menor que en los genotipos de maní con contenidos de ácido oleico normales. Los marcadores denominados SNP, (Single Nucleotide Polymorphisms), son variaciones en nucleótidos únicos que no cambian la longitud total de la secuencia de ADN en la región y han demostrado su utilidad en la realización de diferentes estudios genéticos y de mejoramiento en un gran número de organismos, incluyendo varias plantas de cultivo. Los SNP existen en todo el genoma. La mayoría de ellos se localizan en las regiones no codificantes y no tienen un impacto directo en el fenotipo de un individuo. No obstante, algunos introducen mutaciones en secuencias expresadas o en regiones que influyen en la expresión génica (promotores, potenciadores) y pueden inducir cambios en la estructura o regulación de las proteínas. Dichos SNP tienen el potencial de detectar la variación genética. Chen *et al.* (2010), basándose en este tipo de marcador, desarrollaron un protocolo simple de PCR para detectar el genotipo exacto de FAD2A/FAD2B y discriminar el alelo silvestre de ambos genes (FAD2A 448 G> A y FAD2B 441_442insA).

El empleo de esta metodología serviría para determinar genotipos de las plantas silvestres del género *Arachis*, tanto para las que fueron utilizadas en el programa de mejoramiento que lleva adelante el Criadero "El Carmen" como las de aquellas que podrían ser incorporadas en otros programas de mejoramiento, con el objetivo de ampliar el pool génico del maní cultivado. Por lo tanto, utilizar marcadores moleculares basados en el ADN del tipo SNP para revelar las mutaciones en los genes de la enzima desaturasa, constituyen una valiosa herramienta para asistir al mejorador en el proceso de selección, aumentar la eficiencia y la predictibilidad de los resultados.

Materiales

Los materiales utilizados en el presente trabajo fueron seis especies silvestres del género *Arachis* (*A. batizocoi*, *A. cardenasi*, *A. correntina*, *A. duranensis*, *A. ipaënsis* y *A. monticola*¹) y tres variedades comerciales Alto oleico (AO): I11a, ptb y Sun oleic 95 [(primer cultivar AO derivado del cruzamiento entre F435 y Sun runner (Gobelli *et al* 2017)]. Las variedades AO poseen las mutaciones para los genes FADH en los dos genomas, razón por la cual se las utilizó en el presente trabajo como controles positivos.

Extracción de ADN total de plantas

Se tomaron hojas jóvenes de cada genotipo, el material fresco se conservó a 4°C hasta su procesamiento para la extracción de ADN, dentro de las 24 horas. El ADN genómico total se extrajo mediante el método de CTAB (Doyle and Doyle, 1990), se visualizó y cuantificó en geles de agarosa al 1% mediante tinción con bromuro de etidio.

Caracterización genotípica mediante marcadores moleculares de tipo SNP

Para detectar mediante la PCR el estado mutado o silvestre de los genes *ahFAD2A* y *ahFAD2B*, se utilizaron los cebadores alelo específico denominados F435Fw, F435IC-Rv, como control de reacción de amplificación, en combinación con los cebadores F435Wt-Rv, F435subs-Rv, F435ins-Rv, alternativamente. Las condiciones de ciclado

y mezcla de reacción fueron las descritas por Chen *et al.* 2010. Los productos amplificados se resolvieron en geles de agarosa al 2,5% y de poli(acrilamida) al 15%, estos últimos permitían confirmar los datos obtenidos, dado que con ellos se podía observar mejor las separaciones de bandas para determinar si existían o no mutaciones en los genes *ahFAD2A* y *ahFAD2B*. Los geles se visualizaron bajo luz UV previa tinción con bromuro de etidio y para documentar los geles con los patrones electroforéticos obtenidos, se utilizó el sistema de captura y análisis DigiDoc-It (UVP). El tamaño de las bandas en pares de bases (pb) se determinó mediante el programa PB2 de libre acceso

RESULTADOS

Los ADN obtenidos permitieron caracterizar la constitución génica de los materiales silvestres (**Fig. 2**) y de las variedades comerciales fenotipo alto oleico (**Fig. 3**). Los tamaños de bandas obtenidos de los patrones electroforéticos para el loci F435Wt-Rv, confirmaron la presencia del genotipo silvestre –OL₁OL₁ ó OL₂OL₂– en las especies silvestres diploides y OL1OL1/OL2OL2, en la tetraploide, (**Fig. 2**) y las variedades comerciales presentaron mutaciones por sustitución en el alelo *ahFAD2A* y por inserción en el alelo *ahFAD2B*; (**Fig. 3**).

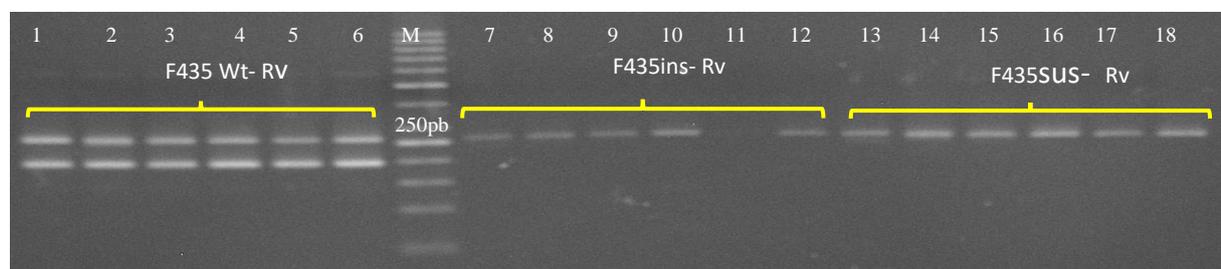


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 2,5% de productos de PCR con los cebadores específicos para mutaciones puntuales en los genes *ahFAD2A* y *ahFAD2B*. M: marcador de peso molecular, 50bp Fermentas. 1-7-13: *A. batizocoi*; 2-8-14: *A. cardenasi*; 3-9-15: *A. correntina*; 4-10-16: *A. duranensis*; 5-11-17: *A. ipaënsis*; 6-12-18: *A. monticola*¹.

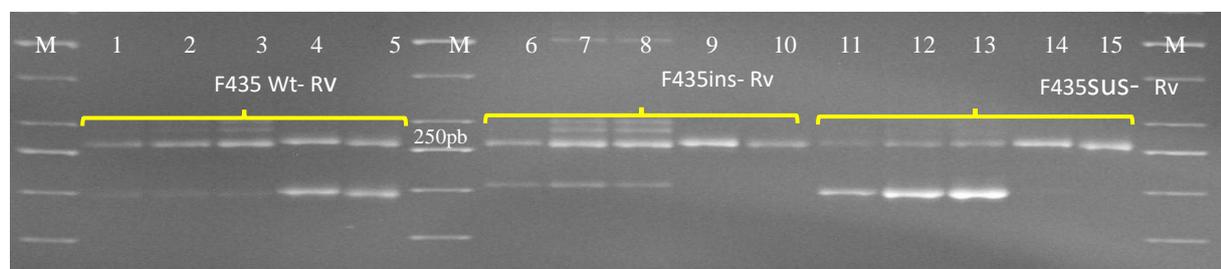


Figura 3. Electroforesis en gel de acrilamida-bisacrilamida al 15% de productos de PCR con los cebadores específicos para mutaciones puntuales en los genes *ahFAD2A* y *ahFAD2B*. M: marcador de peso molecular, 50bp Fermentas. 1-6-11: I11a; 2-7-12: ptb; 3-8-12: sun oleic 95^a; 4-9-13: *A. batizocoi*; 5-10-14: *A. monticola*¹

En nuestras condiciones de trabajo el tamaño de bandas obtenido en el patrón electroforético utilizado no fue

idéntico al obtenido por Chen *et al* 2010 con esta combinación de oligonucleótidos (**Tablas 1 y 2**). Esto

podría deberse a que se utilizaron geles de poliacrilamida al 15% para realizar las mediciones con el programa PB2 dado que estos geles permitían resolver mejor la

diferencia entre bandas para determinar si existían o no mutaciones en los genes ahFAD2A y ahFAD2B.

Tabla 1: Patrón de bandas esperado para los cebadores alelo específicos, según la constitución alélica para los genes ahFAD2A A y ahFAD2AB. Cebadores: nombre de las secuencias cebadoras utilizadas para la amplificación. En (pb) el tamaño esperado de los fragmentos esperados por PCR; s/a (sin amplificación).

Genotipos	Control PCR F435IC-Rv F435IC-Fw	F435 WT -Rv (pb)	F435 Sus-Rv (pb)	F435 Ins- Rv (pb)
OL1OL1 / OL2OL2 (silvestre)	250	195	s/a	s/a
ol1ol1 / ol2ol2 (mutado)	250	s/a	203	195

Tabla 2: Patrón de bandas obtenido con el sistema electroforético utilizado para los cebadores alelo específicos, según la constitución alélica para los genes ahFAD2A A y ahFAD2AB. Cebadores: nombre de las secuencias cebadoras utilizadas para la amplificación. En (pb) el tamaño esperado de los fragmentos esperados por PCR; s/a (sin amplificación).

Genotipos	Control PCR F435IC-Rv F435IC-Fw	F435 WT -Rv (pb)	F435 Sus-Rv (pb)	F435 Ins- Rv (pb)
OL1OL1 / OL2OL2 (silvestre)	264	198	s/a	s/a
ol1ol1 / ol2ol2 (mutado)	264	s/a	210	203

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo son novedosos con impacto en la práctica del mejoramiento del maní en Argentina. La detección del estado normal de los genes ahFAD2A y ahFAD2B en las especies silvestres del género *Arachis* permite utilizar las mismas como control negativo de la PCR cuando se necesita conocer el genotipo que confiere el fenotipo alto oleico; y como marcador de genomas parentales en los híbridos derivados de cruzamientos interespecíficos. Además, se confirma que estas variedades comerciales cultivadas actualmente en Argentina son genéticamente estables para el atributo alto oleico.

El estudio combinado de genotipo/fenotipo para este rasgo utilizado en la selección en siguientes ensayos podría ayudar a comprender como la introgresión de genes modificadores de caracteres como la resistencia a enfermedades puede influir sobre los rangos máximos en la proporción O/L.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló en el marco de la vinculación científico – tecnológica entre el Laboratorio de Calidad Genética y Sanitaria de la Facultad de Cs. Agropecuarias - U.N.C. y Criadero El Carmen de la localidad de General Cabrera (Pcia de Córdoba- Argentina). Agradecemos al Criadero por brindar el material para estudiar.

BIBLIOGRAFÍA

- Chen ZB, Wang ML, Barkley NA, Pittman RN. 2010. A simple allele-specific PCR assay for detecting FAD2 alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection. *Plant Mol. Biol.* ep. 28, 542-548.
- Doyle, JJ Doyle JL. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus: 12: (1):13-15.*

- Fávero, A. P. 2006. Study of the Evolution of Cultivated Peanut through Crossability Studies among, and. *Crop Science*, 4(46), 1546-1552.
- Gobelli, D., Etchart V.J., Manifesto M.M., Moreno, M., Baldessari, J.J., Mamani, E. M.. (2017) Validación de marcadores CAPS de diagnóstico para el gen AHFAD2 en cultivares alto oleico locales. En: XXXII Jornada Nacional de Maní General Cabrera, Córdoba, Arg. 2pp.
- Guo Y, N. E. 2010. Comparative mapping in intraspecific populations uncovers high degree of macrosynteny between A- and B-genome diploid species of peanut. *Plant and Animal Genome XIX Conference*. San Diego, USA.
- Mallikarjuna, N., and R.K. Varshney. 2014. Genetics, genomics and breeding of peanuts. CRC Press, Boca Raton, FL. doi:10.1201/b16872
- Oddino, C.M., J.A. Soave, S.J. Soave, M.I. Buteler, A. Moresi, F.J. de Blas. 2017. Sources of smut resistance in peanut wild species and Bolivian landraces. In: *Advances in Arachis through genomics & biotechnology*. Córdoba, Argentina. 14–17 March 2017. p. 8. <https://peanutbase.org/files/AAGB-2017-Abstracts.docx>
- Oddino C., Soave J. H., Soave S., Moresi A., Bianco C., Buteler M., Torre D. y Faustinelli P. C. 2012. Comportamiento de maníes silvestres frente a viruela (*Cercosporidium personatum*) y mancha en V (*Leptosphaerulina crassiasca*)*. *Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales*, Año 1 N° 3 - 2012 277-288
- Oddino, C.; Soave, J.; Soave, S.; Moresi, A. y Buteler, M. 2006. Comportamiento de maníes silvestres frente a la podredumbre parda de la raíz del maní causada por *Fusarium solani*. IN: V Encuentro Internacional de Especialistas en Arachis. Río Cuarto (Cba.). Argentina. Resúmenes. Pags.21-26.
- Rosso, M.; Soave, S.; Soave, J.; DeBlas, F.; Bressano, M.; Giordano, F.; Giuggia, J.; Garnero, J.M.; Seijo, G.; Moresi, A.; Buteler, M.; Oddino, C. (2019) Caracterización del germoplasma de criadero el Carmen frente a tizón del Maní causado por *Sclerotinia minor*. En: XXXIV Jornada Nacional del Maní. 2 de octubre de 2019. General Cabrera, Córdoba, Arg. 2pp.
- Simpson C E, N. S. 1993. Registration of TxAG-6 and TxAG-7 Peanut Germplasm Lines. *Crop Science*, XXXIII(6), 1418-1418.
- Simpson, C., & Starr, J. 2001. Registration of 'COAN' Peanut. *Crop Science*, 41(3), 918-918. doi:10.2135/cropsci2001.413918x.
- Soave, J.H. ; Buteler, M.I. ; Soave, S. ; Bima, P. ; Faustinelli, P; Moresi, A.; Oddino, C.; Bianco, C. (2011) Población obtenida por cruzamiento de especies silvestres y duplicación de cromosomas para introgresión de genes en maní. En: XXVI Jornada Nacional del Maní. 15 de Setiembre 2011. General Cabrera, Córdoba, Arg. 2pp.
- Stalker, H.T. and Beaute, M.K. 1993. Registration of four leaf spot resistant peanut germplasm lines. *Crop Science* Vol.33:Pág. 1117.
- Torres, L., P. Bima, B. Costero, A. Ordoñez, C. Turina, C. Martino, et al. 2012. Synthetic amphidiploid developed to broaden genetic basis of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). (In Spanish.) *Cienc. Tecnol. Cultivos Ind. Mani*. 3:236–242.