



XXVIII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CA-036 (ID: 2673)

Autor: Montenegro Iwanicki, Federico Gustavo Jesus

Título: Desarrollo de microsatélites como marcadores moleculares en Yerba Mate

Director: Acevedo, Raúl Maximiliano

Co-Director: Luna, Claudia Veronica

Palabras clave: Ilex paraguariensis, repeticiones cortas en tándem, diversidad genotípica

Área de Beca: Cs. Agropecuarias

Tipo Beca: Cyt - Pregrado

Periodo: 01/03/2022 al 28/02/2023

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Agrarias

Proyecto: (20A011) Análisis de secuencias genómicas de especies vegetales del NEA.

Resumen:

Los marcadores moleculares son herramientas poderosas para analizar la diversidad del genoma dentro de una especie y para evaluar las relaciones genéticas entre individuos y poblaciones. Los microsatélites, también conocidos como "repeticiones de secuencia simple" (simple sequence repeats, SSR) o "repeticiones cortas en tándem" (short tandem repeats, STR), se definen como secuencias repetidas de una a seis bases nucleotídicas que se encuentran en los genomas nucleares y plastídicos de eucariotas. Su análisis y clasificación es una de las técnicas más indicadas para estudiar el polimorfismo entre secuencias de ADN. Estos marcadores moleculares se basan en una reacción de PCR que detecta variaciones de loci de secuencias repetitivas. Presentan altos niveles de polimorfismo, herencia codominante, multiallelismo, patrón mendeliano y buena cobertura genómica. Los microsatélites requieren poca cantidad de ADN, pueden automatizarse fácilmente para un cribado de alto rendimiento, pueden intercambiarse entre laboratorios y son altamente transferibles entre poblaciones. El objetivo general de este trabajo es desarrollar un protocolo de amplificación de microsatélites para utilizarlos como marcadores moleculares en Yerba Mate. Para alcanzar este objetivo, se plantearon dos objetivos particulares: identificar y clasificar microsatélites en secuencias genómicas, y optimizar protocolos de amplificación de microsatélites. En cuanto a la identificación y clasificación de microsatélites, se descargaron las secuencias del genoma de Ilex paraguariensis del repositorio "Assembly" del NCBI y se utilizó el programa KRAIT v1.3.3 para buscar, analizar y clasificar las secuencias compatibles con las características de los microsatélites. Los SSRs seleccionados se investigaron mediante la herramienta BLASTn en la base de datos de la NCBI y se eliminaron las secuencias con similitud en microorganismos que podrían provenir de una contaminación del material vegetal con microorganismos. Para diseñar los primers específicos para los microsatélites seleccionados se utilizó la herramienta en línea PRIMER3 PLUS y se estableció la condición de producir un amplicón en el rango de 70 a 250 pb. La extracción del ADN genómico se realizó con el kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep (SIGMA) a partir de hojas de brotes de Yerba Mate. La integridad de las muestras de ADN "total" obtenido se evaluó por electroforesis en un gel de agarosa 0,8% y tinción con el colorante GelGreen® (Biotium®). El ADN presente en las muestras se cuantificó por absorción a 260 nm en un equipo NanoDrop (Thermo). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando los primers diseñados sobre la región adyacente a los microsatélites seleccionados. Cada mezcla de reacción contenía 0,5 µg de ADN, 300 nM del par de cebadores correspondiente, 1 µl de mezcla de nucleótidos (dNTPs 10 mM c/u), 1 Unidad de ADN polimerasa GoTaq®, 5 µL de buffer de reacción GoTaq® (Promega Corp.) y agua para un volumen final de 25 µl. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador IVEMA T18 con un programa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min y 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 55 °C durante 1 min y 72 °C por 1 min. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 1,5% y luego teñidos con GelGreen® (Biotium®) se visualizaron en un transiluminador de luz azul Safe Imager™ (Invitrogen). Se identificaron 353.088 SSRs y 1.704.005 iSSRs en las secuencias del genoma de Ilex paraguariensis. Entre los SSRs, los motivos repetitivos más abundantes en el genoma fueron: el mononucleótido A (40,54%), los dinucleótidos AG (19,30%), AT (12,47%), AC (8,32%), el mononucleótido C (3,72%), los trinucleótidos ACC (3,14%), AAG (2,27%), AAT (2,22%), AAC (0,55%) y el tetranucleótido AAAT (1,59%). Además, se observó que 33.398 SSRs, se encuentran próximos entre sí, y conforman 16.170 microsatélites compuestos (cSSRs). A partir de la identificación precisa del loci donde se encuentran estos SSRs, se desarrolló un protocolo de PCR, que permite la amplificación de manera individual de 9 microsatélites perfectos. El desarrollo de estos marcadores específicos para la Yerba Mate permitirá realizar estudios de polimorfismo genético y de diversidad en esta especie, lo que será de gran importancia para su conservación y para su uso en programas de mejoramiento genético. Además, la metodología utilizada en este trabajo podrá ser adaptada y aplicada en la búsqueda de microsatélites en otras especies cercanas de Ilex. La transferibilidad de microsatélites entre especies relacionadas está permitida por la naturaleza homóloga de la secuencia de ADN en las regiones flanqueantes de microsatélites.