

ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN *SALIX HUMBERTIANA* MEDIANTE EL USO DE SSRs

GENETIC DIVERSITY STUDIES IN SALIX HUMBERTIANA USING SSR MARKERS

Investigadores USAL:

López, Micaela^{1,2} (micaela.lopez@usal.edu.ar); Pomponio, María Florencia^{1,2}

Investigadores Externos:

Torales, Susana¹; Cerrillo, Teresa³

Alumnos practicantes USAL:

Mirra, Fabiana; Vázquez, Camila

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Instituto de Recursos Biológicos, Argentina

² Universidad del Salvador, Argentina

³ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria Delta del Paraná, Argentina

Palabras clave: *Salix*; Diversidad genética; Marcadores moleculares.

Keywords: *Salix*; Genetic diversity; Molecular markers

Resumen

Salix humboldtiana Willd., vulgarmente conocido como “sauce criollo”, es la única especie de sauce nativa de América del Sur. Su distribución en Argentina abarca desde Salta, Jujuy y Formosa hasta la Patagonia (Ragonese, 1966). Esta especie presenta diversos usos: maderero, medicinal, ornamental, forrajera para ganado, melífera y para restauración de zonas ribereñas erosionadas. La presencia de especies exóticas de sauces introducidas en su área de distribución natural (riberas e islas de los ríos Paraná, Paraguay y tributarios) y la fácil hibridación con estas amenazan la persistencia de la información genética del sauce nativo.

El objetivo de este proyecto fue estudiar la diversidad genética de *Salix humboldtiana* a través de marcadores moleculares microsatélites conocidos como SSRs, para rescatar individuos puros útiles para los programas de conservación y mejora, contribuyendo de esta manera al conocimiento y a la preservación de la especie nativa. El programa de mejoramiento de esta especie, desarrollado en la EEA del Delta del Paraná, se encuentra en una etapa inicial que consiste en introducciones de estacas, propagación y análisis genético de los individuos.

En el marco de este proyecto, se tomaron muestras de 32 individuos de *Salix humboldtiana*. De estos, 23 provienen de la EEA del Delta del Paraná, cuyo origen corresponde a la zona de Victoria, Entre Ríos. Los restantes pertenecen a Formosa y Río Neuquén. Además, se muestrearon 3 especies

exóticas del género *Salix* que corresponden a *Salix alba*, *Salix babylonica* y *Salix nigra*. Estos tres sauces alóctonos son de naturaleza tetraploide, mientras que *Salix humboldtiana* es diploide, por lo cual se incluyen en el estudio, para poder así distinguir la variabilidad de la especie nativa.

Con el fin de conocer la variabilidad existente en estos materiales y la presencia de híbridos, se analizaron los ADN provenientes de hojas de la especie mediante marcadores moleculares microsatélites. Estos marcadores consisten en repeticiones de 1, 2, 3 o 4 nucleótidos de ADN presentes en el genoma, y las diferencias entre estas repeticiones permiten distinguir individuos y así caracterizar poblaciones. A través de la reacción en cadena de la enzima polimerasa, conocida como PCR, podemos obtener un alto número de copias de un fragmento de ADN que contenga los SSRs, con el propósito de visualizarlas mediante una técnica que permite separarlos fragmentos de ADN por tamaño, conocida como electroforesis en geles de poliacrilamida.

Finalmente, de los 22 marcadores analizados 13 mostraron resultados, de los cuales 10 no mostraron diferencias (monomórficos) y 3 mostraron diferencias (polimórficos). Estos marcadores polimórficos son los que nos permiten evaluar la variabilidad de las diferencias y características genéticas de esta especie. Además, la aplicación de marcadores previamente descritos por Bozzi (Bozzi *et al.*, 2012), útiles para la detección de híbridos, nos permitió corroborar que las muestras analizadas corresponderían a individuos de *Salix humboldtiana* puros y diploides. Es decir, no se encontraron híbridos en el material analizado.

Bibliografía

- Bozzi, J, Leyer I, Mengel C, Marchelli P, Ziegenhagen Birgit, Thomas L, Gallo L. (2012). Assessment of hybridization and introgression between the native *Salix humboldtiana* and invasive *Salix* species at the Rio Negro, Patagonia. From Basic Ecology to the Challenges of Modern Society: 42nd annual meeting, Leuphana University Lüneburg, 10.-14. book of abstracts http://www.gfoe.org/sites/default/files/abstractband_lueneburg_2012.pdf
- Ragonese, A y F. Rial Alberti. 1966. Cultivo, utilización y fitotecnica de sauces en la República Argentina. IDIA- Suplemento Forestal 1966. p. 21-37

Abstract

Salix humboldtiana Willd., Commonly known as “Sauce criollo”, is the only willow species native to South America. In Argentina their distribution ranges from Salta, Jujuy and Formosa to Patagonia (Ragonese, 1966). The species has various uses: timber, medicinal, ornamental, honey, and restoration of eroded riparian areas. The presence of exotic species of willows introduced in their natural distribution area (banks and islands of the Paraná, Paraguay and tributary rivers) and the easy hybridization with them threaten the persistence of the genetic information of the native willow.

The objective of this project was to study the genetic diversity of *Salix humboldtiana* using microsatellite molecular markers known as SSRs, to rescue pure individuals for conservation and breeding programs, contributing to the knowledge and preservation of the native species. The breeding program developed in the EEA Delta del Paraná, is initiating and consists of introducing cuttings, propagation and genetic analysis of individuals.

Samples were taken from 32 individuals of *Salix humboldtiana*. Of these, 23 come from the EEA Delta del Paraná, whose origin corresponds to the area of Victoria, Entre Ríos. The rest belong to Formosa and Neuquén river. In addition, 3 exotic species of the genus *Salix* were sampled, corresponding to *Salix alba*, *Salix babylonica* and *Salix nigra*. These three allochthonous willows are tetraploid in nature, while *Salix humboldtiana* is diploid, which is why they are included in the study, to distinguish the variability of the native species.

In order to determine the existing variability in these materials and the presence of hybrids, DNA from leaves of the species were analyzed using microsatellite molecular markers. These markers consist of repetitions of 1, 2, 3 or 4 nucleotides of DNA present in the genome, and the differences between these repetitions make it possible to distinguish individuals and thus characterize populations. Through the chain reaction of the polymerase enzyme, known as PCR, we can obtain a high number of copies of a DNA fragment that contains the SSRs, in order to visualize them using a technique that allows the DNA fragments to be separated by size, known as polyacrylamide gel electrophoresis.

*Finally, of the 22 molecular markers analyzed, 13 showed positive results, of which 10 showed no differences (monomorphic) and 3 showed differences (polymorphic). These polymorphic markers allow us to evaluate the variability of the genetic differences and characteristics of this species. In addition, the application of markers previously described by Bozzi (Bozzi et al., 2012), useful for the detection of hybrids, enabled us to corroborate that the analyzed samples might correspond to pure and diploid *Salix humboldtiana* individuals. That is, no hybrids were found in the analyzed material.*

References

- Bozzi, J, Leyer I, Mengel C, Marchelli P, Ziegenhagen Birgit, Thomas L, Gallo L. (2012). Assessment of hybridization and introgression between the native *Salix humboldtiana* and invasive *Salix* species at the Rio Negro, Patagonia. From Basic Ecology to the Challenges of Modern Society: 42nd annual meeting, Leuphana University Lüneburg, 10.-14. book of abstracts http://www.gfoe.org/sites/default/files/abstractband_lueneburg_2012.pdf
- Ragonese, Ay F. Rial Alberti. 1966. Cultivo, utilización y fitotecnia de sauces en la República Argentina. IDIA- Suplemento Forestal 1966. p. 21-37