

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Estudio **PERIODO** 01/06/2015 a 30/05/2016

1. APELLIDO: Palacios

NOMBRES: Natalia Soledad

Dirección Particular: Calle: *N°:*

Localidad: Pergamino *CP:* 2700 *Tel:*

Dirección electrónica (donde desea recibir información): natalia.spalacios@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

“Variación genética en germoplasma de festuca alta (*Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub) adaptado a ambientes restrictivos de la Provincia de Buenos Aires”

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/06/2015

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:*

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: UNNOBA

Facultad: Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales

Departamento:

Cátedra:

Otros: INTA

Dirección: Calle: Av.Pte. Dr. Arturo Frondizi *N°:* 2650

Localidad: Pergamino *CP:* 2700 *Tel:* 2477-409500

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Andrés, Adriana Noemi

Dirección Particular: Calle: *N°:*

Localidad: Pergamino *CP:* 2700 *Tel:*

Dirección electrónica: adrianaandres@unnoba.edu.ar

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

Durante el primer año de Beca se realizaron diversas tareas, agrupadas en :

1. Colecta de germoplasma de poblaciones festuca alta (*Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub) adaptadas a ambientes restrictivos de la Provincia de Buenos Aires
2. Caracterización molecular del germoplasma recolectado.
3. Caracterización morfológica del germoplasma a campo.

1. Colecta de germoplasma de poblaciones festuca alta (*Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub) adaptadas a ambientes restrictivos de la Provincia de Buenos Aires

A partir de la definición del nicho ecológico de festuca alta (*Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub) en la provincia de Buenos Aires (Scheneiter et al., 2015) se realizó la colecta de nueve poblaciones (período octubre-diciembre 2015). Dichas poblaciones fueron elegidas a partir de tres variables bio-climáticas: • Temperaturas medias mínimas del mes más frío (2,6 °C - 3,2 °C); • Lluvia en el trimestre más seco (100 mm); • 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 transeca 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.

Sitios de colecta:

	Sitio de colecta	Coordenadas
Población 1	Juncal	S 33° 43 - O 60° 56
Población 2	Firmat*	S 33° 24 - O 61° 37
Población 3	Melincué*	S 33° 41 - O 61° 21
Población 4	Pehuajó	S 35° 51 - O 62° 14
Población 5	General Villegas	S 35° 03 - O 63° 01
Población 6	Lima	S 34° 03 - O 59° 17
Población 7	Pigüé	S 37° 34 - O 62° 30
Población 8	Coronel Pringles	S 38° 17 - O 61° 32
Población 9	Pergamino	S 33° 56 - O 60° 33

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

2. Caracterización molecular del germoplasma recolectado.

2.1 Etapa laboratorio:

Una vez que los 40 genotipos (plantas) correspondientes a cada una de las nueve poblaciones (360 plantas/genotipos) se recuperaron del proceso de trasplante y acondicionamiento en macetas, se procedió a recolectar al menos 2 gramos de hojas frescas de cada genotipo; las mismas se colocaron en conservadoras con hielo, en sobres de red identificados y se liofilizaron durante 24 hs. Una vez liofilizadas, las muestras se colocaron en bolsas de nylon cerradas al vacío mediante calor de forma individual y correctamente identificados.

Al momento de realizar la extracción de ADN, las muestras fueron molidas mediante mortero manual con al agregado de nitrógeno líquido. Una vez molidas, se colocaron en tubos eppendorf de 2 ml rotulados y se procedió a seguir 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 mediante cuantificación en geles de agarosa 0,8%, visualmente con tinción de bromuro de etidio y posterior comparación con marcadores testigos conocidos.

Debido a que la cuantificación arrojó valores elevados de concentración de ADN, se procedió a llevar a las muestras a una dilución 1/10 para poder re-cuantificarlas. Una vez realizado esto, las muestras se volvieron a cuantificar en geles de agarosa 0,8% visualmente, mediante tinción con bromuro de etidio y posterior comparación con marcadores testigos conocidos en transiluminador UV.

Una vez cuantificado, el ADN se llevó a una dilución de trabajo de 10 ng/μl.

Mediante la revisión de trabajos anteriores que utilizaron la técnica de microsatélites (SSR) en la especie, se determinó la utilización de 15 marcadores SSR propios de festuca diseñados por la Samuel Roberts Noble Foundation (Saha et al., 2006) o diseñados para raigrás (Jones, et al., 2001). Se eligieron los mismos por ser altamente polimórficos y por tener una muy buena amplificación. Para cada primer SSR se calculó la temperatura de amplificación y al promedio del par se le bajó 4°C para asegurar la amplificación (Tm ajustada).

SSR utilizados para caracterizar las poblaciones de festuca alta colectadas.

SSR	Secuencia forward	Secuencia reverse
NFA002	GCTCCAGCTTCTCCATCATC	ACCAAGTCGTCCAAGTCAGC
NFA015	GCGTCCACTAACAAACACCAA	AGCAAGGCCAGCAAAAATTA
NFA019	TGGATTTGCAATTAGCCTCA	GCTCGTGTATGGCCTTCAAT
NFA023	AGTCGGTGGTGAAGCTGAAG	TACAACTAGGGGGCTGGTCA
NFA024	TGCCACGAGGTCTATCTTC	AGCTTCCCCTTCATTCCACT
NFA031	ACGGTCTGTACCGTGGATGT	GCTGTAGACTCAGCCGAACC
NFA034	GCTGGGTGTAGGGCTGTAAA	CTCCTTTCCATCACCTCTGG
NFA041	TCCTGAGAGACATCGAGCAAG	TCAAAGCCAAACACTTCC
NFA048	CAGGCTGTTAACGGTGTCTCT	CCTTCTTCTTGGGAGGGAAA
NFA058	CAATCTACCGTCGCTTCACC	CAAACCAGGTGGCAGATTT
NFA064	TCATTTGACGCCACTTGAAC	GTCTTAGCGCCTTCCTTGGT
NFA066	CTCCCCGTCTTCCATCT	CAACCTCCTCCACCATCTTG
K03B03	GGGAATCTGGCAGAAGTATCACGT	GAAGATCTGGCCAAGTCTAATCCG
K10H05	AAGGAGACCTGGCAGCTTGGTGCT	CGACAAAGGTTCAATGGAGGAG
K02E08	TCTGAAAGCCCGAGTGAGCG	CGACTGTGGCAGGGCTGACG

Las reacciones de amplificación (PCR) se realizaron en un termociclador Veriti® Thermal Cycler de Applied Biosystems mediante el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial a 94°C, durante 1 minuto
- 40 ciclos:
 - Desnaturalización a 94°C, durante 30 segundos
 - Hibridación a Tm ajustada de cada primer, durante 1 minuto
 - Extensión a 72° C, durante 2 minutos
- Extensión final a 72°C, durante 5 minutos.

Una vez realizada la amplificación, se procedió a la separación de los productos de PCR mediante electroforesis vertical en geles desnaturizantes de poliacrilamida 6% de 0,4 mm de espesor, en cubas de secuenciación. Los geles y armado de la cuba se realizaron según especificaciones de BioRAD. En cada gel se sembró 1,5 μl de los productos de amplificación junto con marcadores de peso molecular conocidos (10 y 25 pb).

La corrida electroforética se realizó a 55 Watts el tiempo de duración de la corrida se adecuó al peso molecular (PM) estimado del SSR. Una vez finalizada la corrida se realizó el revelado de las bandas mediante tinción con plata siguiendo el Protocolo de Tinción con Plata para Secuenciación de Promega Corp. Efectuado el revelado se procedió a evaluar manualmente los tamaños de pares de bases de los alelos presentes, utilizando un

transiluminador de luz blanca considerando los diferentes tamaños de bandas amplificadas como diferentes alelos. Las imágenes se almacenaron mediante digitalización, utilizando Scanner Astra 2400slt.

Se pudo llegar a la puesta a punto de las técnicas utilizadas y así obtener amplificación para tres SSR.

3. Caracterización morfológica del germoplasma a campo.

3.1 Etapa en invernáculo:

La etapa en invernáculo comenzó con el clonado de individuos que se realizó el día 1 de marzo 2016. Del total de los 40 genotipos por población se tomaron al azar 30 genotipos. El proceso de clonación consistió en la división de cada genotipo en cuatro (4) propágulos (clones), los que fueron colocados en macetas de soplado negras de 500 gr. Las macetas se llenaron con una mezcla de tierra-arena (3:1) y se mantuvieron en invernáculo sin calefaccionar hasta el momento del trasplante a campo.

Este proceso permitió obtener cuatro clones de un mismo genotipo (120 propagulos/población). Por lo tanto en invernáculo se acondicionaron 1080 clones hasta la fecha del presente informe.

3.2 Etapa en campo:

Del total de 40 genotipos/población se tomaran al azar 30 genotipos para su trasplante al campo experimental de la EEA Pergamino, en un suelo argiudol típico. El trasplante se realizará a principios de mayo 2016, en condiciones de planta espaciada, aplicando un diseño experimental en bloques completos al azar con 3 repeticiones, utilizando la Técnica de Turesson (1922) de planta aislada. Esta técnica permite detectar diferencias entre genotipos dentro de poblaciones, y entre poblaciones.

A partir del mes de junio 2016 se comenzará a evaluar los caracteres asociados a la producción de forraje y de semilla (número de macollos, hábito de crecimiento, altura de planta, peso seco en diferentes momentos del ciclo productivo, diámetro de planta, inicio y 50% floración, peso total de semilla, peso de mil semillas).

Resultados preliminares a nivel molecular:

Se realizó el análisis molecular de la variancia –AMOVA- mediante el programa GenAlEx (Genetic Analysis in Excel) con el fin de detectar la presencia de diferencias entre o dentro de poblaciones. Posteriormente se realizaron los análisis de Coordenadas Principales –AcoorP- y Analisis de Conglomerados con el programa InfoGen para poder reducir la información generada a partir de los marcadores.

El AMOVA muestra que existió variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones. 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 ACoorP estimado mediante la distancia genética Euclídea, muestra 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 pueden detectar al menos tres grupos de poblaciones.

El Análisis de Clúster jerárquico obtenido a partir de la matriz de distancias genéticas Euclídea, mostró tres grupos si se toma como punto de corte el valor del 75% (7,71). El primer grupo lo conforma la Población 1, el segundo grupo la Población 2 y en el tercer grupo están las poblaciones restantes. Esta disposición obtuvo una correlación cofenética igual a 0,95.

El hecho de que los análisis multivariados no discriminen el total de las poblaciones indica que dichas poblaciones deben analizarse con un número mayor de marcadores moleculares. Ésta tarea se realizará hasta llegar al total de 15 marcadores moleculares.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

ACLARACION: la Lic Natalia Palacios fue adjudicataria de una Beca CIN durante su último año de carrera (Licenciatura en Genética UNNOBA), cuyo proyecto de investigación fue: "Estudio de la variabilidad genética en familias de medios hermanos de *Thinopyrum ponticum* tolerantes a salinidad". Por lo tanto se presentan las publicaciones de dicho período (9/2014 a 7/2015).

A partir de la adjudicación de la Beca CIC (julio 2015) la becaria ha presentado un poster al Segundo Congreso Internacional Científico y Tecnológico, organizado por la CIC en La Plata, durante el 1 de Octubre 2015. En la actualidad presentó un resumen para su evaluación en el 39 Congreso Argentino de Producción Animal, organizado por la Asociación Argentina de Producción Animal (AAPA) a realizarse en Tandil durante los días 19 a 21 de octubre 2016: Palacios, N.; Diaz Paleo, A; Andrés, A. 2016. Caracterización molecular de germoplasma de festuca alta (*Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub).

OTRAS PUBLICACIONES

1 - Comportamiento de familias de agropiro alargado en un suelo sódico. Palacios, N.S., Maciel, M.A., Andrés, A.N., Pistorale, S.M. 38° Congreso Argentino de Producción Animal. Septiembre 2015.

2 - Variación genética de festuca alta adaptado a ambientes restrictivos. Palacios, N.S. y Andrés, A.N. Segundo Congreso Internacional Científico y Tecnológico. CIC. La Plata. 1 de Octubre 2015.

3 - Molecular characterization of six populations of annual ryegrass diploid. Palacios N.S., Pistorale, S.M., Acuña, M.L. 5th International Symposium of Forage Breeding – Buenos Aires, Argentina. 19, 20 y 21 de octubre 2015.

4 - Variabilidad genética en raigrás anual diplóide para condiciones halomorficas. Palacios, N.S., Pistorale, S.M., Andrés, A.N., Acuña, M.L. RTA (Revista de Tecnología Agropecuaria) vol.10, n° 29, pp: 47-50. Buenos Aires, Argentina. Diciembre, 2015.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

1 - 2015. Variabilidad genética en familias de medios hermanos de *Thinopyrum ponticum* tolerantes a salinidad. Disertación en IV JORNADAS DE JOVENES INVESTIGADORES. UNNOBA.

2 - 2015. Variación genética en germoplasma de festuca alta adaptado a ambientes restrictivos de la Provincia de Buenos Aires. Disertación a campo para asistentes del 5th International Symposium of Forage Breeding – Buenos Aires, Argentina. EEA INTA Pergamino, 22 de octubre.

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

Caracterización molecular de germoplasma de festuca alta (*Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub).

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

2015, 20 y 21 de agosto. ¿Cómo escribir y publicar trabajos científicos? EEA INTA Pergamino, PhD Gustavo A. Slafer. Duración 15 hs.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

Curso de doctorado en ciencias gararias: "Epistemología". FCA-UNR. 2015. Carga horaria: 30 hs. Cursado y aprobado. Nota: 8

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

Auxiliar simple "ad honorem" en la asignatura Genética I de la Carrera Licenciatura en Genética - UNNOBA.

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

14. TÍTULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Durante el segundo año de Beca se realizarán los siguientes estudios

“Variación genética en germoplasma de festuca alta (*Schedonorus phoenix* (Scop.) Holub) adaptado a ambientes restrictivos de la Provincia de Buenos Aires”

1. Determinación de la variabilidad genética a nivel morfofisiológico de germoplasma de festuca alta en condiciones de campo. Aclaración: se finalizará con la evaluación a campo del germoplasma transplantado en 2016. Se obtendrán medidas fenotípicas y parámetros genéticos de las poblaciones recolectadas y caracterizadas molecularmente. A partir de los resultados moleculares y a campo se realizará un Análisis de Procrustes Generalizados (Gower, 1975) que permite obtener un dato consenso entre los datos moleculares y los agronómicos para cada población.

Apartir de estos resultados se continuará con:

1. Evaluación de la variabilidad genética de familias de medios hermanos (FMH) de festuca alta ante el efecto de estrés por salinidad en hidroponía:

Según los resultados obtenidos en el primer año de beca (caracterización molecular-morfológica de poblaciones), se formarán pools de acuerdo a la divergencia genética presente entre ellas. A partir de allí se seleccionarán los descendientes (familias de medios hermanos) y se continuará con el programa de mejoramiento genético. Este constará de las siguientes etapas:

1. Puesta a punto de la técnica de salinidad en hidroponía (concentraciones salinas, tiempos, etc.),
2. Instalación del ensayo de FMH en condiciones de salinidad en hidroponía,
3. Evaluación del comportamiento de las FMH ante el estrés por salinidad,
4. Selección de FMH tolerantes y susceptibles,
5. Determinación de la variabilidad genética a nivel molecular de las FMH tolerantes y susceptibles a la salinidad.

Condiciones de Presentación

A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe

- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario