

# Informe final publicable de proyecto

## Nuestro maní nativo: diversidad genética y estado de conservación de *Arachis hypogea* y *Arachis villosa* en Uruguay

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2019\_1\_156158

03/08/2023

**VAIO SCVORTZOFF, Magdalena** (Responsable Técnico - Científico)

**DA LUZ GRAÑA, Claudia** (Investigador)

**AZZIZ DE LOS SANTOS, Julio Gastón** (Investigador)

**CASTRO CARLI, María Ximena** (Investigador)

**CONDÓN PRIANO, Federico** (Investigador)

**DE ALMEIDA, Natalia** (Investigador)

**GAIERO GUADAGNA, Paola** (Investigador)

**MONTENEGRO VALLS, José Francisco** (Investigador)

**NAYA RODRIGUEZ, Ignacio** (Investigador)

**RIVAS LATORRE, Mercedes María** (Investigador)

**SAMOLUK, Sebastián** (Investigador)

**SEIJO, Guillermo** (Investigador)

**SPERANZA GASTALDI, Pablo Rafael** (Investigador)

**VIDAL ANDRÉ, Rafael** (Co-Responsable Técnico-Científico)

**VILARÓ PAREJA, Francisco** (Investigador)

**VILARÓ VARELA, Mariana** (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA (Institución Proponente) \\

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DEL URUGUAY ITR CENTRO SUR \\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIONAL ESTE \\

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA \\

MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN GENERAL DE DESARROLLO RURAL \\

FACULTAD DE AGRONOMÍA. FUNDACIÓN DR. EDUARDO ACEVEDO

## Resumen del proyecto

El maní, *Arachis hypogaea*, es una leguminosa, fuente alimenticia para humanos y animales. El proyecto “Nuestro maní nativo: diversidad genética y estado de conservación de *Arachis hypogaea* y *Arachis villosa* en Uruguay” tuvo como objetivo estudiar la diversidad de recursos genéticos de maní conservados por los productores y su pariente silvestre (*A. villosa*). Para ello se realizaron colectas y caracterizaciones: etnobotánicas, fenotípicas y moleculares. Se detectó una disminución en el número de productores, se colectaron 38 variedades criollas en 8 departamentos. Se pueden identificar tres grandes áreas de mayor producción: Paysandú, Cerro Largo, Tacuarembó y Rivera. Toda la producción es con variedades criollas en sistemas familiares, el acceso a la tierra es una de las principales limitantes. Los datos morfológicos y genéticos mostraron que todas pertenecen a la subespecie *fastigiata*, presentaron diversidad morfológica para color de grano, número de granos por vaina, estrangulamiento, tamaño de vaina, entre otros. Estas características se asocian a dos tipos de la subespecie *fastigiata* en Uruguay, Valencia y Español. El primero ampliamente distribuido y el segundo restringido a Artigas, Paysandú, Tacuarembó y Rivera. La predominancia de Valencia puede estar relacionada al cambio en el uso, para consumo directo. El tipo Español (aceitero) se cultiva para manufacturas de venta local y forraje. La diversidad genética de ambos tipos es alta lo que está de acuerdo con la postulación de Uruguay como centro de diversidad. Los resultados mostraron una estructura espacial de la diversidad y cambios temporales. Las variedades criollas cultivadas en Uruguay se distinguen genéticamente de los materiales de otras colecciones resaltando la importancia y valor del estudio de variedades criollas. *Arachis villosa* continúa teniendo una distribución extensa en Uruguay. Sin embargo, algunas poblaciones previamente registradas no fueron encontradas, resaltando la importancia de la conservación de las accesiones en Bancos de Germoplasma y su caracterización genética y fenotípica.

**Ciencias Agrícolas / Otras Ciencias Agrícolas / No Corresponde / Recursos Fitogenéticos**

**Palabras clave: Germoplasma / parientes silvestres / variedades criollas /**

## Introducción

El maní cultivado, *Arachis hypogaea* perteneciente a la familia de las leguminosas es fuente alimenticia para humanos y animales, por sus altos contenidos en aceites, proteínas, vitaminas y minerales (FAO 2016). Es una especie alotetraploide ( $2n=4x=40$ ) y fórmula genómica AABB (Valls y Simpson 2005). Análisis citogenéticos y genómicos mostraron que sus especies parentales serían *A. ipaensis* (genomio B) y *A. duranensis* (genomio A) (Seijo et al 2007; Bertoli et al 2019). Recientemente fueron publicados sus genomas y junto con análisis cromosómicos sugieren un origen único (Bertoli et al 2019; Du et al 2018). El maní se clasifica en dos subespecies *hypogaea* y *fastigiata* que son divididas en variedades botánicas: *hypogaea* e *hirsuta* dentro de la primera y *fastigiata*, *vulgaris*, *aequatoriana* y *peruviana* en la segunda (Krapovickas y Gregory 1994). La primera subespecie se caracteriza por la ausencia de flores en el eje central y un ciclo de vida largo. La subespecie *fastigiata* está caracterizada por la presencia de flores en el eje principal y ciclo de vida más corto y su centro de distribución es la cuenca del Río Uruguay, incluyendo a nuestro país. Las variedades botánicas se clasifican según las características de las vainas y granos (Krapovickas 1994; Nogueira y Távora 2005). Comercialmente las variedades se clasifican en cuatro tipos: Valencia; Español; Virginia y Runner. Valencia con tres o cuatro granos por vaina (var. *fastigiata*), Español con dos (var. *vulgaris*), Virginia (var. *hypogaea*) con granos grandes y Runner (var. *hypogaea*) con granos pequeños (Nogueira y Távora 2005). Los cultivares modernos muestran un alto grado de parentesco, por lo que es común que deriven de más de una variedad o subespecie (Valls 2005). A pesar de la variabilidad fenotípica existente, la variabilidad genotípica es escasa sobre todo en relación a la variabilidad presente en los parientes silvestres (Halward et al. 1991). Debido a ser el resultado de un único evento de hibridación y al hecho de no haber existido intercambio de alelos posterior con especies silvestres, el maní tiene muy poca variabilidad para algunas características principalmente relacionadas a estreses abióticos como tolerancia al déficit hídrico y bióticos, como resistencia a enfermedades y plagas (Burow et al 2009). La falta de biodiversidad en los cultivos suele generar susceptibilidad a patógenos y a otras variables ambientales que se han visto agravadas producto del cambio climático las cuales reducen la seguridad alimentaria (FAO, 2015; Hodgkin y Hunter, 2015).

En Uruguay las investigaciones en maní comenzaron en 1970 con el objetivo principal de conocer las limitantes agronómicas del cultivo. Luego de esto fueron retomadas en los 80 por la Facultad de Agronomía (Millot y Cairús 1984), con el objetivo de caracterizarlas y conservarlas. Durante estas investigaciones se realizaron colectas de las variedades criollas que estaban en manos de pequeños productores y se incorporaron 258 variedades locales al banco de

Germoplasma de la Facultad de Agronomía. Las colectas se registraron en Artigas, Rivera, Tacuarembó, Colonia y Río Negro. Parte de la colección nacional de maní se envió a diferentes bancos en años posteriores en 4 bancos de germoplasma internacionales: INTA-Manfredi (Argentina), CENARGEN-EMBRAPA (Brasil), ICRISAT (India) y USDA-ARS (Estados Unidos). Estudios de Facultad de Agronomía de 50 de las accesiones de la colección nacional mostraron altos niveles de variabilidad fenotípica en rendimiento, tamaño, forma, número de semillas, color y tamaño de granos, largo de los estolones, resistencia a enfermedades del suelo, rugosidad y pilosidad de frutos así como en el desarrollo vegetativo (Millot y Cairús 1985). Algunas fueron introducidas en programas de mejoramiento (Millot y Cairús 1985, Pereira 1994) y se liberó en el año 2007 el cultivar Noblía a partir de variedades criollas de Cerro Largo (Gonzalez y Gimenez 2017). Toda la producción de maní hasta ese momento estaba basada en variedades criollas. Las variedades criollas son el resultado de la selección de los agricultores, de sus formas de producción y del ambiente en que son cultivadas. De acuerdo con Camacho-Villa (2005) son poblaciones dinámicas, genéticamente diversas, localmente adaptadas, asociadas a sistemas de producción tradicionales y reconocidas por quienes las conservan. Este germoplasma tiene un valor como un elemento cultural e identitario de los agricultores y también como producto comercial, y para el mejoramiento como fuente de alelos de resistencia a enfermedades y de tolerancia a factores abióticos, estas características son particularmente relevantes en coyunturas de cambio climático. En los últimos años entre un 10 a 20 % de los predios pequeños a medianos han desaparecido con la consecuente pérdida de variedades criollas (información DINAMA 2014). En el informe nacional de Uruguay para la conferencia técnica internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos (Blanco et al 1995) se recomendaba monitorear, regenerar y realizar nuevas colectas de los materiales más comprometidos de maní. Sin embargo, los informes sobre el cultivo de maní en Uruguay son parciales y no hay registros de lo plantado en la actualidad. El maní probablemente estuviera presente en parte de nuestro territorio desde hace por lo menos 2000 años introducida por los Guaraníes (Rocha y Valls 2017) pero no se conoce el origen de las variedades criollas actuales, su diversidad y estado de conservación in situ-on farm. Lo que se conoce es que históricamente, en nuestro país siempre fue un rubro desarrollado por productores familiares, en pequeñas superficies y basados principalmente en mano de obra familiar (Pereira 1985). El origen más frecuente de la semilla es el propio predio y el objetivo de su producción es el autoconsumo, forraje y venta (Millot y Cairús 1985). El tipo de maní predominante hasta los años 70 era el de tipo Español de la subespecie *fastigiata* relacionado a su uso en la industria aceitera, y eran plantadas principalmente variedades locales conocidas como blanco chico, colorado común y moro chico (MGAP 1976). El centro de diversidad de la variedad vulgaris comprende a Uruguay, y se conoce que presenta un mejor comportamiento frente a enfermedades y mayor latencia en las semillas que las variedades de tipo Valencia (Pereira 1985). Luego de los 70 los registros muestran que este tipo de maní fue desplazado por el tipo valenciano, de uso confitero, al igual que en el estado de Río Grande del Sur (Quinteros et al 2012; Rocha y Valls 2017).

La limitante de la baja variabilidad en el maní para características de importancia económica, despertó el interés por la incorporación de variabilidad genética a través de sus parientes silvestres que presentan altos niveles de resistencia y tolerancia a múltiples tipos de estrés tanto bióticos como abióticos (Cherry 1977, Subramanyam et al 1989, Reddy et al 2000, Fávero et al 2009, de Blas et al 2019). Además de las variedades criollas de maní en Uruguay se encuentran dos especies silvestres diploides y nativas, *A. villosa* perteneciente a la sección *Arachis* y *A. burkartii* de la sección *Rhizomatosae*. *Arachis villosa* presenta genomio A similar al presente en el maní (Robledo et al 2009). Estas especies se pueden cruzar entre sí, por lo que puede ser un recurso para los programas de mejoramiento del maní cultivado. *A. villosa* es la especie silvestre con la distribución más al sur del género y su distribución abarca las márgenes del Río Uruguay y norte del Río de la Plata. En Brasil su conservación in situ es crítica siendo incluida en lista de especies amenazadas del Estado de Río Grande del Sur (Rocha y Valls 2017). Varias investigaciones basadas en una accesión colectada en el norte de Uruguay han mostrado que tiene resistencia a varias enfermedades que afectan al maní (Fávero et al 2009).

El proyecto "Nuestro maní nativo: diversidad genética y estado de conservación de *Arachis hypogaea* y *Arachis villosa* en Uruguay" tuvo como objetivo estudiar la diversidad de recursos genéticos de maní (*A. hypogaea*) mantenidos por los productores en forma artesanal o in situ – on farm y sus parientes silvestre (*A. villosa*) presentes en Uruguay. Para ello se realizaron colectas de plantas y sus rizobios asociados y tres etapas de caracterización: etnobotánica, fenotípica y molecular de los materiales colectados y colecciones conservadas ex situ en bancos de germoplasma internacionales y nacionales. La caracterización etnobotánica se realizó en base a entrevistas de forma de conocer los usos actuales, la conservación, el intercambio y formas de selección. Para la caracterización fenotípica se utilizaron 24 descriptores recomendados para maní y la caracterización genética estuvo basada en marcadores moleculares de tipo SNPs utilizando un chip de 48K diseñado y ampliamente utilizado para el maní. El uso de esta estrategia permite incorporar y comparar el germoplasma de Uruguay con datos genéticos de materiales cultivados en la región y el resto del mundo. La caracterización fenotípica fue relacionada con la genética y etnobotánica para definir grupos de interés para la conservación y detectar microcentros de diversidad. La estrategia del proyecto permitió ampliar el conocimiento del

germoplasma nacional, describir las variedades criollas presentes, compararlas con las identificadas previamente y evaluar su evolución. Además de esto, se logró caracterizar la producción de maní en el país, zonas y formas de producción desarrolladas. Identificar quienes conservan la diversidad, cuales son sus usos y en qué sistemas productivos se desarrolla el rubro. El proyecto también incluyó la determinación de rizobios presentes en algunas de las variedades criollas mantenidas en distintas regiones. Como en otras leguminosas, el maní es capaz de establecer una asociación simbiótica con las bacterias del suelo del género *Rhizobium*. Durante las colectas de 1984-85 se colectaron y analizaron los rizobios de chacras de la región noreste (Pereira 1984). En Uruguay, si bien no se detectaron cambios significativos en ensayos, en chacra de productores se detectó un aumento en la nodulación con los años de cultivo y disminución por déficit hídrico (Pereira 1984). Se conoce que la eficiencia de fijación en maní es variable entre genotipos y condiciones ambientales (Stalker et al 1994; Mokgehle et al 2014). Por esto en el proyecto se procuró determinar la diversidad de rizobios y la capacidad de nodulación de plantas colectadas en diferentes regiones.

En el caso de *Arachis villosa* el pariente silvestre del maní se incluyó el estudio de su distribución y estado de conservación, además de un análisis de divergencia del genoma A a nivel de la fracción repetida del genoma. Para determinar el estado de conservación de la especie en el país se realizó una colecta en base a datos de los bancos de germoplasma y colectas realizadas por los colaboradores del proyecto (Seijo). Mientras que para la caracterización de sus secuencias repetidas se utilizaron estrategias de secuenciación de nueva generación, análisis bioinformáticos y datos previos de secuencias en especies de genoma A y el maní.

## Metodología/diseño del estudio

1. Conservación de las variedades criollas de *A. hypogaea* y generación de información sobre la diversidad de usos por los agricultores

La caracterización de conservación y usos se realizó con entrevistas semiestructuradas y las respuestas fueron organizadas en una planilla de cálculos. En base a estos datos se estimaron las estadísticas descriptivas que caracterizan al grupo de productores y regiones que conservan más diversidad de especies y variedades criollas. Los datos de usos y valores de las variedades criollas y su localización fueron organizados en una matriz de presencia y ausencia. Con la matriz se hizo un análisis de coordenadas principales para identificar usos y valores que caractericen mejor las variedades y localidades. Los análisis fueron realizados con PAST3.5 (Hammer 2001) y Statistica7 (Statsoft 2004).

2.1 Colecta de variedades criollas de *A. hypogaea*.

Se colectaron 38 variedades criollas de *Arachis hypogaea* de 31 familias en 8 departamentos, en cada caso se le solicitó a las familias si podían donar o vender semillas para el proyecto. En los casos que fue posible se colectaron vainas con semillas, plantas enteras y muestras de suelo. Los materiales obtenidos fueron identificados, acondicionados y conservados en el Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía.

2.2 Repatriación de variedades criollas de Bancos de Germoplasma Internacionales

Se solicitaron al Banco de Germoplasma del USDA 68 variedades criollas con datos de pasaporte completos. Se solicitaron los permisos correspondientes y luego de su arribo se analizó el porcentaje de germinación de forma de acondicionar las muestras para el ingreso al Banco de Germoplasma de Facultad de Agronomía y realizar los análisis genéticos.

3. Diversidad genética y origen de las variedades criollas de *A. hypogaea* presentes en las distintas regiones de Uruguay

Para establecer la diversidad genética se estudiaron 34 variedades criollas conservadas por los productores en la actualidad y 17 accesiones repatriadas del banco de germoplasma del USDA de colectas realizadas en la década del 80. Se realizó la extracción de ADN utilizando el protocolo CTAB y se enviaron a genotipar a la empresa GENEXA (Uruguay) utilizando la matriz SNP ThermoFisher 'Axiom\_arachis2' de 48k (Clevenger et al., 2018; Korani et al. 2019). Los datos crudos fueron procesados mediante el programa Axiom Analysis Suite filtrando por datos faltantes (<0.2) y frecuencia alélica (>0.5), obteniéndose de esta manera los SNPs polimórficos. Para comparar las poblaciones uruguayas de maní con poblaciones, tanto de la región como del resto del mundo, se utilizaron los datos genotípicos de algunas de las accesiones núcleo del USDA que fueron genotipadas anteriormente mediante la misma tecnología y cedidas por el Prof. Bertoli de la Universidad de Georgia (Estados Unidos). Para los análisis de diversidad y estructura genética se utilizaron los índices FST, HS y Ho. Los análisis se realizaron de manera de estimar la estructura genética a nivel geográfico y temporal. Para establecer las relaciones y orígenes de los materiales estudiados se construyeron diferentes árboles filogenéticos a partir de la distancia euclidiana construida en base a los SNPs. Se utilizó el algoritmo Neighbour Joining del paquete de "R" "Ape4". Estos árboles fueron enraizados utilizando una accesión de *Arachis monticola* también cedida por el Prof. Bertoli. Los mismos fueron graficados mediante el paquete "ggtree" de "R".

4. Caracterización fenotípica de las variedades criollas de *A. hypogaea*

Para la caracterización fenotípica se realizó un ensayo en el predio de Sayago de la Facultad de Agronomía entre 2020-2021 con 18 variedades criollas provenientes de diferentes regiones del Uruguay (Artigas, Cerro Largo, Paysandú, Tacuarembó, Río Negro y Lavalleja). Las semillas fueron germinadas en bandejas y trasplantadas a campo en parcelas con una distancia de 1,5 m entre plantas y 2 m entre hileras. Se analizaron diez plantas por accesión y se evaluaron 24 descriptores, precosecha y poscosecha, propuestos para maní por IBPGR (1992) y Veiga et al. (1986). La medición de los descriptores se realizó siguiendo las especificaciones detalladas en (IBPGR, 1992) y caracterizando las plantas en los estados fenológicos estipulados siguiendo las especificaciones particulares para cada descriptor. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis univariados y multivariados. Para las variables continuas se realizaron análisis univariados de tipo ANOVA y las variables cualitativas mediante el modelo de Chi cuadrado de Pearson. El análisis multivariado de los datos se realizó utilizando un análisis de componentes principales (PCA). Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el entorno R.

#### 5. Establecimiento de la diversidad de los rizobios que acompañan a las poblaciones de *A. hypogaea*

Para obtener los aislamientos de rizobios presentes en los suelos originales se realizó la extracción de muestras de suelo correspondiente a cada localidad estudiada. Se seleccionaron suelos de 7 localidades diferentes de los departamentos de Artigas, Paysandú, Río Negro y Colonia. El suelo de cada sitio fue colocado en macetas y se sembraron 5 semillas por localidad. Las plantas se cultivaron en invernáculos durante 4 meses. Se cosecharon las plantas colectando el sistema radicular el cual se inspeccionó buscando la presencia de nódulos. Se extrajeron 5 nódulos de cada planta, se los desinfectó superficialmente y se los maceró asépticamente para obtener el jugo nodular. Con el jugo obtenido se sembraron placas con medio YEM rojo congo. Las placas se incubaron a 28°C hasta obtener colonias. De cada placa se seleccionaron colonias cuyo aspecto coincidía mejor con el esperado para rizobios y se repicaron en medio YEM rojo congo y se volvieron a incubar. Para la caracterización filogenética se partió de colonias y el genotipado se realizó mediante ERIC PCR con los cebadores de Bruijn, 1992. Los productos de PCR se sembraron en gel de agarosa 2% con GoodView como agente intercalante y se visualizaron mediante transiluminador UV. Los patrones de bandas generados se analizaron mediante el software GelCompar II y a partir de esto se seleccionaron los aislamientos con perfiles ERIC diferentes. Se realizó la amplificación del gen rRNA16S por PCR y los productos se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación de Macrogen (Korea). Las secuencias obtenidas se editaron y analizaron filogenéticamente para la identificación taxonómica.

#### 6. Colecta y determinación del estado de conservación de la especie *A. villosa*

Para determinar los sitios de colecta y área de distribución se analizaron datos de pasaporte de las muestras de *Arachis villosa* mantenidas en los herbarios de Facultad de Agronomía, Jardín Botánico y el Museo de Historia Natural. Además, se utilizaron datos de colectas anteriores realizadas por miembros del proyecto (Seijo G y Valls JFM com pers). A partir de esta información se realizaron salidas de colecta en toda el área propuesta para la especie. En cada población se colectaron muestras de herbario para ser depositadas en el herbario de Facultad de Agronomía, plantas para establecer una colección viva, semillas para conservar en Banco de Germoplasma y hojas en sílica para futuros análisis moleculares. Se compararon los datos anteriores con los actuales para las distintas poblaciones.

#### 7. Caracterización de la fracción repetida del genoma de *A. villosa*

Para el estudio y anotación de secuencias repetidas se siguió el procedimiento de Samoluk et al 2022. En forma resumida, se realizó la extracción de ADN mediante el protocolo modificado de CTAB y se envió a secuenciar a BGI (Hong Kong). Se realizó una secuenciación mediante la plataforma DNBseq de baja cobertura (1x), paired end y reads de 150pb. Las secuencias obtenidas fueron procesadas y el análisis de las secuencias repetidas fue mediante clustering utilizando el pipeline RepeatExplorer en ambiente Galaxy (Novak et al 2013). La anotación fue en el ambiente de RepeatExplorer utilizando la base de datos RexDB (Neumann et al 2019). Los datos obtenidos fueron comparados con los resultados de Samoluk et al 2022.

## Resultados, análisis y discusión

Se identificaron 31 productores de maní, se entrevistaron 30 familias en 8 departamentos: Artigas (3), Cerro Largo (8), Colonia (1), Lavalleja (1), Paysandú (5), Río Negro (1), Rivera (3) y Tacuarembó (8) y se colectaron semillas en Rocha. Los departamentos con más áreas de producción son Paysandú; Cerro Largo; Tacuarembó y Rivera. El 77% de los cultivos son responsabilidad de hombres, 20% de mujeres, habiendo un caso en que la producción es desarrollada de manera conjunta. Los sistemas productivos son principalmente familiares. Tienen una superficie media de 48 ha, variando entre 1 y 340 ha, el 73% de las familias maneja predios de menos de 50 ha. El acceso a la tierra es uno de los principales factores limitantes para la producción, la mitad de los entrevistados arrienda u ocupa. Según los productores, uno de los problemas para el acceso a la tierra es la competencia de la forestación y agricultura extensiva.

Los sistemas que cultivan maní son diversos en cuanto a rubros productivos. Junto al maní los entrevistados que también

desarrollan apicultura, avicultura, producción de suinos y otros cultivos. Los productores que viven principalmente del maní se ubican en Cerro Largo y en Paysandú que es donde se maneja la mayor superficie (50 ha).

La edad promedio de los entrevistados es de 57 años, presentando un mínimo de 31 y un máximo de 78 años. La mayoría de los entrevistados vive en el medio rural (77 %). Hay un alto nivel de arraigo de la población a los territorios, el 33% de los entrevistados ha estado radicado en la misma zona durante toda su vida y las personas que no han nacido en el lugar donde viven radican en el lugar en promedio 29 años (mínimo 5 y máximo 69 años). El 57% de los entrevistados tiene como ocupación principal la producción, el 33% son jubilados y el 10% asalariados y complementan los ingresos con la producción o tienen producción para autoconsumo.

El 40 % de los entrevistados tiene como máximo nivel educativo formal la primaria incompleta, 30% primaria completa, 13% secundaria incompleta y el 3% universitario completo.

El 70% de los entrevistados conservan también variedades criollas de otras especies, 14 conservan entre 1 y 6 variedades criollas y 7 conservan entre 8 y 17 variedades criollas. Las especies más frecuentemente citadas fueron *Ipomoea batatas* 21 variedades criollas; *Cucurbita* spp. 22 variedades criollas y *Zea mays* 17 variedades criollas.

#### Variedades criollas de maní

Se identificaron 38 variedades criollas de maní, con un tiempo de conservación en la familia de dos a 65 años. La mitad de los entrevistados (30) llevan más de una generación produciendo maní, ninguno de los entrevistados usa semillas comerciales lo que coincide con los antecedentes (Berretta et al., 2007b; DINAMA, 2014).

Los nombres de las variedades criollas pueden ser un indicador de la diversidad que los productores conservan (Bajracharya et al. 2010; Morgounov et al. 2016), se identificaron 13 nombres diferentes. La mayoría de los nombres refieren a fenotipos u origen: valencia, Yatay, grande, colorado, blanco, blanco de dos granos, dos granos, colorado, colorado grande, común, chiquito, tatú y brasilero.

La mayoría de las variedades criollas fueron recibidas de sus padres o abuelos (40%) o de sus vecinos (27%), por otra parte el 33% provienen de redes de intercambio o comercios. La conservación por familias puede indicar adaptación de las variedades criollas a una región. Los atributos más destacados por los entrevistados fueron rendimiento y tamaño de grano.

El 77% de los entrevistados comercializa al menos una parte de la producción, 23% cultivan para autoconsumo. De los productores que comercializan, la mayoría lo hace en forma directa en la misma región en que viven y el 39% vende el producto a través de intermediarios, con destino a la Unidad Agroalimentaria de Montevideo (UAM). El 23% de los productores comercializa algún tipo de producto elaborado en base a maní.

Se identificaron cinco formas de preparar el maní (tostado, garrapiñada, manicete, gofio de maní y con chocolate). Además del grano se citan usos de las vainas vacías molidas para ración de animales, pastoreo, como fardos, cama de boniatos y abono.

Se repatriaron 68 variedades criollas originarias de Uruguay desde el Banco de Germoplasma del USDA, estas son las únicas con datos de pasaporte completos. Presentaron nula o baja germinación (30%) y solamente 17 pudieron ser analizadas. Proviene de Colonia, Rivera, Paysandú, Artigas, Colonia y Canelones. La única región de colecta de 1984 que no está representada en los resultados es Tacuarembó.

#### Diversidad fenotípica

Las variedades criollas comparten características de hábito erecto, ramificación irregular y flores en el tallo principal, correspondientes a la subespecie *fastigiata* de maní. Estos resultados coinciden con otros estudios para Uruguay (Pereira, 1995; Rocha y Valls, 2017). Las variedades criollas presentaron diversidad morfológica para características cualitativas y cuantitativas. El número de granos por vaina varió entre 1 a 5 y se encontraron vainas sin estrangulamiento hasta fuertemente estranguladas. Se identificaron seis colores de granos blanco, amarillo, rosado, rojo, castaño y morado, se destacan variedades de Artigas, Río Negro y Paysandú con hasta 3 colores. Esta gran variabilidad morfológica ya había sido observada por Alza et al.(1989) y Millot (1994). Las características morfológicas se asociaron a los dos tipos de la subespecie *fastigiata* presentes en Uruguay (Español y Valencia), y todas las variedades fueron asignadas a los mismos. El tipo Valencia está presente en todas las localidades y el tipo Español en Artigas, Paysandú, Tacuarembó y Rivera, en varias oportunidades se identificó una misma variedad con mezcla de ambos tipos. De acuerdo con Pereira (1995) la predominancia del maní tipo Valencia está relacionada a cambios en el uso por el cierre de las fábricas de aceite de maní y el aumento del consumo directo. Las variedades del tipo Español se cultivan para la preparación de manufacturas para

venta local y como forraje. Presentaron menor variabilidad en el color de granos, son moros o amarillos (raramente rojos), las vainas de punta moderada, reticulación mayoritariamente moderada y estrangulamiento de moderado a prominente, siempre con dos granos por vaina. Las plantas tipo Valencia presentaron mayor variabilidad que las tipo Español, con vainas con puntas generalmente moderadas, pudiendo ser también ligeras y en menor proporción prominentes, reticulaciones desde ligeras a prominente, las vainas poseen estrangulamiento ligero, el número de granos varía entre 2 a 4 predominando las vainas con 3 semillas, mientras que el color del grano mayoritariamente es rojo pero también aparecen rosados, blancos, castaños y amarillos.

#### Diversidad genética

La diversidad genética de las variedades criollas de Uruguay fue analizada considerando departamentos, regiones consideradas por Arocena (2011), y momento de colecta (antiguas de colectas de los 80 mantenidas en Banco de Germoplasma).

A nivel de departamento, regional y temporal el FST fue de 0.19; 0.04 y 0.1, respectivamente. El valor del HS (0.23 y 0.21) es muy similar para colectas del pasado y presente. El rango del HS a nivel de departamentos tuvo un valor mínimo de 0.1 en Cerro Largo y máximo de 0.22 en Rivera.

En el análisis de componentes principales (PCA) (que resume el 66% de la varianza) se distinguen dos grandes grupos. El primero (U1) conformado por la mayoría de las accesiones de colectas del 80 provenientes de Canelones, Rivera y Colonia y variedades actuales de Rivera, Artigas, Paysandú y Tacuarembó. El segundo grupo (U2) conformado por la mayoría de las variedades actuales con accesiones de Artigas, Tacuarembó, Paysandú, Río Negro, Rivera y todas las de Cerro Largo. Se encontraron plantas pertenecientes a una misma variedad que se encontraron en ambos grupos, caso de Rivera, Río Negro y Artigas.

También pertenecen a este segundo grupo accesiones de colectas anteriores y del Banco de Germoplasma de INIA. Todas las accesiones de Cerro Largo forman un subgrupo muy cercano genéticamente y con el cultivar Noblí. Los análisis de correlación con las características morfológicas muestran que estos grupos se corresponden con los tipos comerciales Español (U1) y Valencia (U2). Los análisis de diversidad muestran que es ligeramente mayor la variabilidad en Valencia que en el tipo Español, lo que también coincide con la diversidad fenotípica observada. Los análisis filogenéticos incluyendo las accesiones del core del USDA muestran a todas las accesiones actuales y del 80 mayormente en dos clados que se corresponden con los grupos del PCA y relacionados a variedades de otros países clasificados como Español y Valencia. Las accesiones de Uruguay que pertenecen al core del USDA, forman parte de otros clados que no incluyen a las accesiones analizadas en este proyecto pero sí corresponden a los dos tipos presentes en el país. Las accesiones pertenecientes al core incluyen materiales de la década del 70, con poca información de pasaporte. Estas fueron seleccionados al azar a partir de las accesiones pertenecientes al país que se encontraban depositados en el Banco del USDA (Holbrook et al 1993). Nuestros resultados muestran que las accesiones incluidas en este core no representan la variabilidad genética actual ni de colectas anteriores de Uruguay.

#### Caracterización de rizobios

Todas las plantas incluídas en el estudio de suelos originales presentaron nódulos de tamaño aproximado de 5mm, color amarillento y forma esférica. En tres plantas de Artigas, se identificaron *Rhizobium alamii* y *Rhizobium rhizophorum*. De acuerdo a los antecedentes de rizobios asociados al maní, los resultados obtenidos no coinciden con especies de rizobios relevados en estudios anteriores, por lo que se puede considerar como el primer registro de estas especies asociadas al cultivo del maní. Además, se detectó la especie *Paenibacillus glycanilyticus* recientemente detectado por otros investigadores en *A. villosa*. En ese trabajo, los autores sugieren que su presencia confiere ventajas para la planta en el combate a hongos u oomicetes y sin afectar la asociación simbiótica con los rizobios (Costa et al., 2022). Además de estos aislamientos, también se realizaron otros 31 en 34 variedades criollas que fueron incorporadas a un ensayo de multiplicación en el predio de la Intendencia Municipal de Montevideo (PAGRO). Los mismos son mantenidos en forma de colección en el Laboratorio de Microbiología.

#### Distribución de *Arachis villosa* y fracción repetida del genoma

En base a registros de herbario, registros de colecta y datos de ambiente se realizó un relevamiento de la distribución actual de *A. villosa* en Uruguay. Se realizaron 26 expediciones de campo, de las cuales 13 fueron a localidades registradas en muestras de herbario y 13 a lugares nuevos. En la mayoría se identificaron poblaciones naturales, y sólo en cinco localidades no se encontró la especie (Salto en Belén y arroyo San Antonio, Paysandú en Saladero Guaviyú, Colonia en Punta Gorda y Montevideo en Punta Espinillo). Sin embargo, se registraron 13 nuevos puntos de presencia en Artigas, Río



Negro, Soriano, Colonia y San José. En total se identificaron 21 poblaciones, cuatro dentro de dos áreas protegidas, el Parque Nacional de Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (Río Negro) y en el Área Natural Protegida y Parque Lineal de la Zona de Franquía (Bella Unión, Artigas). En todos los lugares está asociada a barrancos o suelos arenosos en las márgenes o cercanías del curso del río. Las poblaciones varían en número de plantas desde 5 a más de 50 y se localizan en regiones naturales hasta zonas altamente antropizadas. La fracción repetida representa aproximadamente 60% del genoma y un 52% son elementos transponibles tipo retrotransposon-LTR. Al igual que las especies de la sección *Arachis*, el genoma de *A. villosa* es rico en la familia Athila (LTR-Gypsy). En *A. villosa* las secuencias satélites representan solamente 3 familias y el 1.2% del genoma. Los análisis filogenéticos basados en las secuencias repetidas muestran que las especies de genoma A están diferenciadas de los otros genomas conocidos en *Arachis* (Samoluk et al 2022, este proyecto). Las secuencias repetidas de ADN cumplen un papel fundamental en el apareamiento de los cromosomas en la meiosis, en la divergencia de los genomas y por lo tanto involucradas en la probabilidad de recombinación en híbridos interespecíficos. Los estudios en *A. villosa* mostraron resultados similares a los encontrados en otras especies de genoma A.

## Conclusiones y recomendaciones

El cultivo de maní en Uruguay continúa realizándose en su mayoría por productores familiares. El número de estos productores siguió registrando una disminución en su número, identificándose dentro del proyecto de una lista unicial de 70 solamente 31 productores distribuidos en distintas áreas del territorio (Artigas, Cerro Largo, Colonia, Lavalleja, Paysandú, Río Negro, Rivera, Tacuarembó y Rocha). Se pueden identificar tres grandes áreas de mayor producción: Paysandú, Cerro Largo, Tacuarembó y Rivera. También el área de cultivo ha sufrido una disminución con aproximadamente 300 hectáreas plantadas entre 2020-2023, esto significa 7 veces menos que lo sembrado en 1980. El sistema tradicional presenta una gran fragilidad debida al acceso a la tierra, competencia de la forestación y agricultura extensiva, comercialización del producto en el mercado y mano de obra.

Toda la producción nacional de maní está basada en variedades criollas y los análisis fenotípicos y genéticos mostraron que todas pertenecen a la subespecie *fastigiata*. No se detectó pérdida significativa de diversidad genética y fenotípica in situ a pesar de la disminución en el número de productores, área de cultivo y diferencias en el uso. Aunque, a causa de la pérdida de accesiones en colecciones ex situ, puede que se esté subestimando el nivel de erosión genética. Los análisis de diversidad mostraron que hay estructuración espacial de la diversidad y que la misma cambió desde las últimas colectas del 80. También muestran que hay poca relación entre las colectas del 40-70 con las accesiones de las subsiguientes colectas cuyo origen no está bien documentado. Dentro de esta subespecie están presentes aún los tipos reconocidos para el país, Valencia y Español. La diversidad genética del primero es relativamente mayor al segundo, pero existe alta diversidad en ambos. Esto está de acuerdo con la propuesta de un centro de diversidad para *fastigiata* en Uruguay. Los productores conservan y valoran ambos tipos de maní. No obstante, en general conservan mayormente varias líneas puras dentro del tipo Valencia. El maní de tamaño menor y considerado antiguo por los productores es plantado principalmente en Rivera, de color amarillo o blanco, y se relaciona con el uso como forraje o para la preparación de productos secundarios vendidos en mercados locales.

El maní tipo Valencia es el predominante en todas las regiones, presenta una alta diversidad morfológica en casi todas las características estudiadas. En la zona de Cerro Largo es plantado en exclusividad y la variabilidad genética presente es menor. En esta región casi todos los productores conservan e intercambian semillas de la misma o pocas líneas de Valencia. Estas se encuentran próximas al cultivar *Noblía* lo que muestra el probable origen de lo que siembran en la actualidad en este departamento. La menor diversidad genética en las variedades de Cerro Largo podría estar relacionada también con una mayor presión de selección de los productores que prefieren tipo de vaina grande, grano colorado y mayor número de granos. Estas características están relacionadas al uso del grano, exclusivamente confitero. Existe gran diversidad a nivel morfológico tanto entre variedades como dentro de una variedad, los resultados fenotípicos están de acuerdo con los genéticos. La diversidad se encontró en características de interés productivo así como en aquellas asociadas al tipo y a su uso.

Las variedades criollas de la actualidad se distinguen en los análisis filogenéticos encontrándose en dos grandes clados que se corresponden con los tipos Valencia y Español. Los materiales de maní de la colección núcleo de USDA que incluye distintas regiones del mundo e inclusive de Uruguay (colectas del 40-70) quedan también agrupados según subespecie y tipo comercial. Sin embargo, las variedades criollas de Uruguay actuales y del 80 se distinguen del resto. Los análisis genéticos por lo tanto permiten determinar diferenciar genéticamente entre la diversidad actual y la seleccionada para la colección núcleo del USDA. Los datos del proyecto resaltan y refuerzan la importancia del estudio de variedades locales, el valor de las mismas y la necesidad de actualizar las colecciones núcleo.

Además de la diversidad a nivel fenotípico y genético también se pudo observar diversidad de rizobios inclusive en una

variedad criolla colectada en una misma localidad se encontraron dos especies diferentes. Se mantienen varios aislamientos en forma de colección que serán identificados en etapas posteriores al proyecto. En la colecta de estos aislamientos se observó variabilidad en forma, número, color y posición de los nódulos lo que permite sugerir que pueden ser encontradas aún un número mayor de especies de rizobios.

La distribución de *Arachis villosa* en Uruguay es aún extensa y las poblaciones presentan tamaños pequeños a grandes. Sin embargo, 5 de las poblaciones colectadas en el pasado no fueron encontradas, se destaca la población de Montevideo que era la localizada más al este sobre el Río de la Plata. En Brasil fue considerada en 2019 dentro de la categoría de casi en peligro (NT) debido a las condiciones de cambio climático, expansión de la agricultura y destrucción del sistema rivero (Valls y Simón 2019). Esto resalta la importancia de la conservación de las accesiones en Bancos de Germoplasma y la importancia de su caracterización genética y fenotípica. Los análisis bioinformáticos mostraron la similitud de la fracción repetida de su genoma con las otras especies de genoma A, análisis de genómica comparativa podrán determinar la posibilidad de introgresión de características de esta especie al maní cultivado.

## Referencias bibliográficas

- Alza J et al Caracterización y evaluación primaria de germoplasma nacional de maní. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Montevideo 71p
- Bajracharya, J et al 2010. Genetic Resources and Crop Evolution, 57, 1013-1022.
- Bertoli et al 2019 Nature Genetics <https://www.nature.com/articles/s41588-019-0405-z>
- Bertioli et al 2011 Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 9: 134–149
- Blanco G et al 1995 Informe nacional y para la conferencia técnica internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos. Montevideo 43.
- Camacho-Villa TC et al 2005 Defining and identifying crop landraces. Plant genetic resources, 3(3), 373-384.
- Catálogo de Cultivares Hortícolas, INIA SBN: 978-9974-38-370-8
- Costa A et al 2022 Appl Environ Microbiol. 2022 Jan 25;88(2):e0164521. doi: 10.1128/AEM.01645-21. Epub 2021 Nov 10. PMID: 34757818; PMCID: PMC8788682.
- Du et al 2018 BMC Plant Biology 18:240 <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1468-1>
- Fávero et al 2009 Scientia Agricola Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), v.66, n.1, p.110-117 DOI: 10.1590/S0103-90162009000100015
- FÁVERO et al 2015 Genetics and Molecular Biology, 38: 353-365.
- Hodgkin T y Hunter D 2015. Agricultural biodiversity, food security and human health. En: Connecting Global Priorities: Biodiversity and Human Health A State of Knowledge Review
- Holbrook CC et al 1993 <https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300040044x>
- IBPGR 1992 Descriptors for groundnuts. Roma Italy,125 p
- Krapovickas y Gregory 1994 Bonplandia 8: 1-186. 1994
- Korani et al 2018 <http://dx.doi.org/10.1101/274407>
- Millot JC y Cairús E 1985 Informe preliminar. Germoplasma Nacional de Maní. Facultad de Agronomía. IBPGR. 20 pp.
- Morgounov A et al 2016. Wheat landraces currently grown in Turkey: distribution, diversity, and use. Crop Science, 56(6), 3112-3124.
- Moretzsohn et al. 2005 BMC Plant Biology, 4: 11.
- Neumann P et al 2019 Mobile DNA 10, 1 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13100-018-0144-1>
- Nogueira RJMC y Távora 2005 In: SANTOS, R.C. (Eds.). O Agronegócio do Amendoim no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão. p. 71-122
- Novák et al BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE Vol. 29 no. 6 2013, pages 792–793 doi:10.1093/bioinformatics/btt054
- Pandey et al 2017 Scientific Reports | 7:40577 | DOI: 10.1038/srep40577
- Pereira G 1995 Cultivo de maní. Montevideo, INIA. 23 pp. (Serie Técnica no. 48).
- Quintero J et al 2012 La producción y comercialización de alimentos para el consumo local en la 5a Sección del Departamento de Cerro Largo. Montevideo, SCEAM (UdelaR). 46 pp.
- Rocha RA y Valls JFM 2017. [www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3722](http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3722)
- Samoluk S et al 2019 <https://www.isra.sn/aagb2018/?p=1059>
- Samoluk S et al 2022 Planta 256(3) DOI: 10.1007/s00425-022-03961-9
- Seijo et al 2007 American Journal of Botany 94: 1963-1971
- Seijo et al 2014 American Journal of Botany 91: 1294-1303.
- Valls JFM y Simon MF 2019. Arachis villosa. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T71714847A71714872.
- Valls JFM y Simpson CE 2005 Bonplandia 14: 35-63
- Valls JFM et al 2013 Bonplandia 22: 91-97
- Veiga RFA et al 2001 Bragantia 60.3: 167-176.
- Veiga RFA et al 1986 Campinas: Instituto Agronômico, 1986.21p. (Boletim Técnico, 28)
- Zhao et al 2017 Front. Plant Sci. 8:1209.doi: 10.3389/fpls.2017.01209

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)