

Las siguientes etapas del proceso se realizaron con la misma metodología ya publicada para micropropagación de *Eucalyptus grandis*.

Resultados y discusión

- El porcentaje de contaminación fue extremadamente bajo (3 %)
- La respuesta al crecimiento *in vitro* fue bueno en la mayoría de los genotipos evaluados. En el 70 % de los genotipos se logró obtener plántulas enraizadas
- El proceso completo hasta la obtención de plántulas enraizadas duró entre 4 y 7 meses

Al comparar estos resultados con los obtenidos cuando se propagan árboles adultos, se aprecia una respuesta muy rápida al trabajar con material juvenil explicada por la gran plasticidad morfogénica que presentan los tejidos juveniles.

De todas maneras se observaron algunos genotipos que no lograron enraizar lo cual se debería principalmente a limitantes genéticos.

3) ACUERDO DE TRABAJO PARA LA MICROPROPAGACION DE CLONES DE *Eucalyptus grandis*

Ma. Isabel Trujillo

En marzo de 2004 se firmó un acuerdo de trabajo por un año con una empresa forestal con el objetivo de micropropagar 30 clones de *Eucalyptus grandis*. En marzo del 2005 se prorrogó dicho acuerdo por un nuevo año incorporándose 30 nuevos clones.

A partir del material recibido en etapa de multiplicación se acordó entregar 30 plantas aclimatadas por clon. Se procedió con la metodología ya enumerada para la micropropagación de *Eucalyptus grandis*. Los principales problemas encontrados fueron contaminación, clones con marcada facilidad para la vitrificación y clones con dificultades para la emisión de raíces.

A la fecha se han logrado enraizar el 52 % de los clones y se han entregado 425 plantas aclimatadas.

4) FINGERPRINTING DE LOS CLONES INIAFOR.

Jorge Lemos²

Con el objetivo de tener identificados genéticamente los clones INIAFOR, se procedió a realizar los estudios de ADN correspondientes.

EXTRACION ADN: Se realizaron las extracciones de ADN a 2 individuos por clon según la metodología Wash Buffer (Lemos, J. *et al.* 2002)

Dicha extracción se cuantificó mediante el uso del espectrofotómetro arrojando resultados en el rango de 200-900 ng/ul lo cual permite comprobar la presencia de ADN en todas las muestras extraídas.

² Ayudante Laboratorio Biotecnología INIA Tacuarembó

SCREENING: De los 50 primer probados en trabajos anteriores se eligieron los 7 que se detallan por haber presentado las mejores bandas polimorf (presencia y ausencia de banda)

- OPA 08
- OPA 12
- OPB 03
- OPB 13
- OPB 14
- OPB 19
- OPC 06

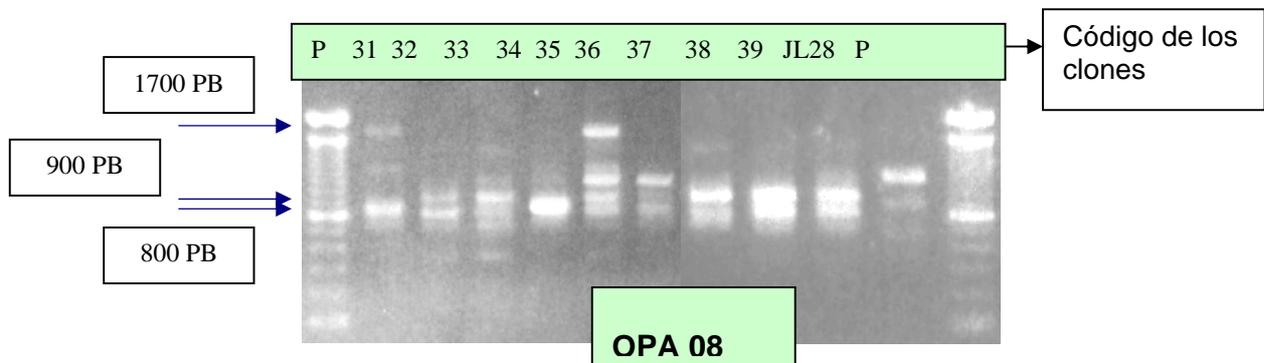
PCR Y ELECTROFORESIS: Luego de extraer el ADN este debe ser amplificado utilizando el PCR.

Resultados

La electroforesis y la fotografía de los geles obtenidos permitieron obtener los siguientes resultados preliminares:

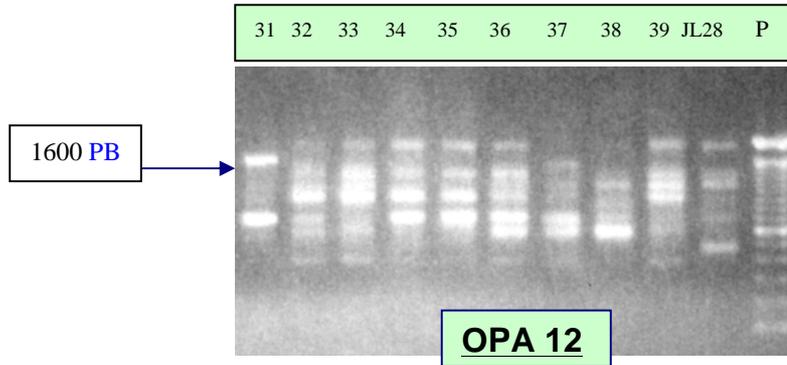
A modo de ejemplo se presentan las fotografías de los geles obtenidos con 4 primers y los resultados que de ellos se obtienen.

A) PRIMER OPA 08



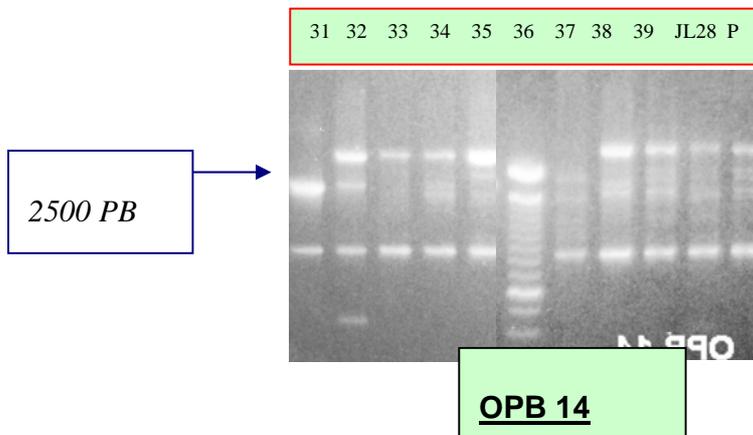
1700 PARES BASES BANDAS CARRIL 31 Y 35 AUSENCIA EN OTROS CARRILES
 900 PARES BASE BANDAS EN CARRILES 32,33,34,35,36 Y 39 AUSENCIA EN OTROS CARRILES.
 800 PARES BASE BANDAS CARRIL 32,33,35,36,37,38 Y 39 AUSENCIA EN OTROS CARRILES.

B) PRIMER OPA 12



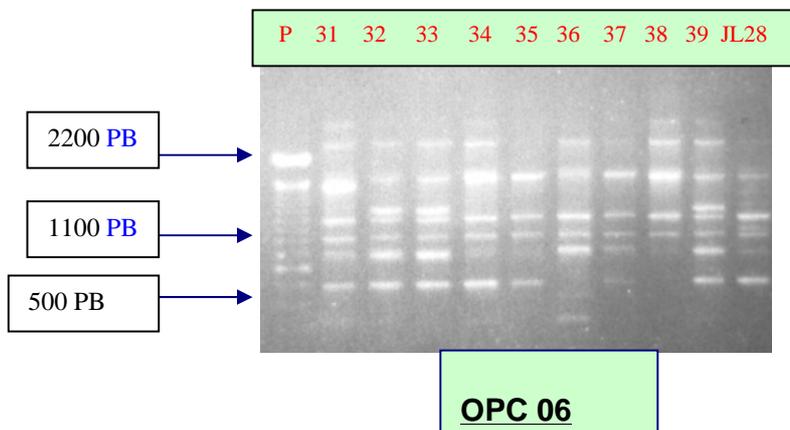
1600 PB: BANDA EN CARRIL 31 Y AUSENCIA EN OTROS CARRILES.

C) PRIMER OPB 14



2500 PB: BANDAS EN CARRIL 31,32,33,34,36,37,38 Y 39 AUSENCIA EN OTROS CARRILES.

D) PRIMER OPC 06



2200 PARES BASES BANDAS CARRIL 31,32,33,34,36,37,38 Y 39 AUSENCIA EN OTROS CARRILES
 1100 PARES BASE BANDAS EN CARRILES 32,33 Y 39 AUSENCIA EN OTROS CARRILES.
 500 PARES BASE BANDAS CARRIL 31,32,33,34,35,37,39 Y JL28 AUSENCIA EN OTROS CARRILES.

Con los geles obtenidos para todos los primers utilizados se construyó la tabla de datos binarios que se presenta a continuación

Tabla de Datos binarios

PRIMER	OPA08	OPA08	OPA08	OPA12	OPB14	OPC06	OPC06	OPC06
ARBOL	1700	900	800	1600	2500	2200	1100	500
031	1	0	0	1	1	1	0	1
032	0	1	1	0	1	1	1	1
033	0	1	1	0	1	1	1	1
034	0	1	0	0	1	1	0	1
035	1	1	1	0	0	0	0	1
036	0	1	1	0	1	1	0	0
037	0	0	1	0	1	1	0	1
038	0	0	1	0	1	1	0	0
039	0	1	1	0	1	1	1	1
40	0	0	0	0	0	1	0	1

A partir del análisis binario se construye la Tabla 1 que permite visualizar la diferencia de ADN entre los árboles evaluados.

Tabla 1: Tabla binaria de presencia, ausencia de banda

ARBOL	BANDAS	
40	00000101	
38	00101100	
37	00101101	
34	01001101	
36	01101100	
32	01101111	igual*abajo
33	01101111	igual*abajoigual*arriba
39	01101111	igual*arriba
31	10011101	
35	11100001	

Analizando la tabla se observa que con los primeros utilizados es posible diferenciar los clones 31, 34, 35, 36, 37, 38 y 40 y no se pueden diferenciar los clones 32, 33 y 39. Es necesario por lo tanto continuar los estudios con otros primers para diferenciar estos tres clones.

Bibliografía

Lemos, J.; Goto, Y.; Maruyama, T. 2002. Metodología para la identificación de clones de *Eucalyptus grandis* mediante el método RAPD (ADN polimórfico aplicado al azar). Serie Aftercare Forestal INIA-JICA N° 13. 22p.