

Identificación de Genotipos de *Eucalyptus Grandis* Mediante Marcadores Microsatélites



Lic. Diego Torres, Ing. Agr. (PhD) Zohra Bennadji,
Téc. Agr. Gissel Cantero,
Lab. Asist. Jorge Lemos, Ing. Agr. Isabel Trujillo
Programa Nacional de Producción Forestal

Introducción

Las huellas dactilares han sido usadas durante siglos para identificar a las personas. Tienen un alto valor como evidencia física, permitiendo la individualización de una persona del resto de la población.

De manera análoga la técnica de huella dactilar del ADN (en inglés: DNA fingerprinting) basada en marcadores moleculares posibilita la identificación de clones y la caracterización de variedades en los programas de mejoramiento genético, brindando un sistema de etiquetado molecular que permite asegurar una identificación genotípica confiable. Su poder de discriminación radica en las diferencias existentes a nivel del ADN y se emplea en el desarrollo de protocolos para la trazabilidad de los diferentes genotipos.

Tradicionalmente la identificación varietal se ha basado en descriptores de tipo morfológicos, cuya interpretación puede variar de un observador a otro pudiendo generar resultados ambiguos como para permitir una caracterización precisa. Con el avance de la biotecnología molecular surgió una nueva generación de descriptores que permiten una identificación genotípica confiable y son conocidos como marcadores moleculares.

Marcadores Microsatélites

Dentro de los marcadores moleculares se destacan los microsatélites o SSR que en los últimos años se han popularizado y actualmente se cuenta con una gran cantidad de éstos para las especies del género *Eucalyptus*. Según la UPOV (Unión internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales; Directrices BMT), se estipulan tres características necesarias que deben reunir los nuevos materiales para que se pueda adquirir su título de propiedad. Los tres requisitos son: distinguibilidad, homogeneidad y estabilidad (test de DHE). Para generar un sistema práctico, confiable y válido legalmente de identificación de materiales, las técnicas moleculares seleccionadas deben cumplir varios criterios:

- 1- Deben tener un alto poder de discriminación.
- 2- No deben presentar interacción con el ambiente.
- 3- Deben ser capaces de generar resultados equivalentes en distintos laboratorios.
- 4- Deben permitir el cálculo de distancias entre genotipos que sean consistentes con otros caracteres (pedigrí de los genotipos).
- 5- Preferentemente, debe conocerse su localización cromosómica.
- 6- La metodología usada para generar los perfiles de las bandas y para traducirlos en identificadores de variedades debe ser de disponibilidad pública.

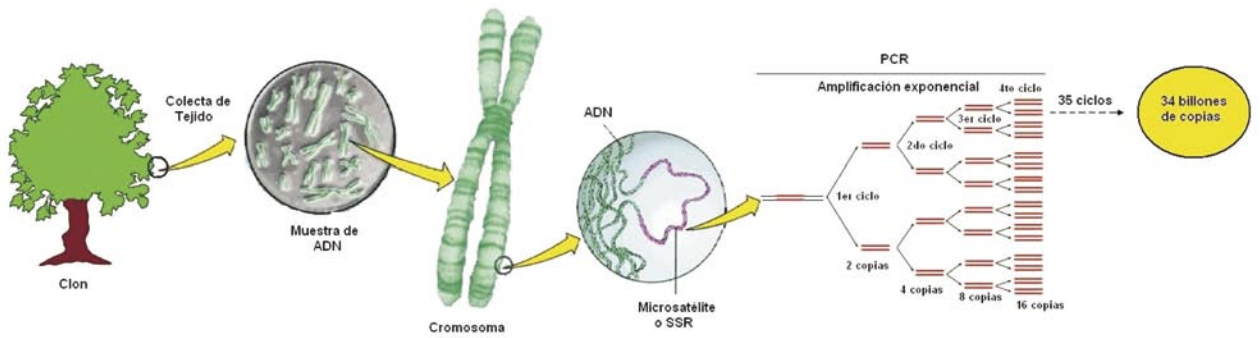


Figura 1 - Amplificación por PCR. El proceso se inicia con la colecta de tejido vegetal del clon a identificar. Posteriormente se realiza una purificación de ADN en la cual están representados todos los cromosomas del individuo. Finalmente se toma una alícuota del ADN purificado y se realiza la técnica de PCR que consiste en someter a la muestra a la acción de un grupo de reactivos como los que actúan durante la replicación natural del ADN en las células vivas. Luego de 35 ciclos de repetición de la reacción se han creado unas 34 billones de copias del segmento de ADN de interés.

7- Las metodologías deben ser, dentro de lo posible, susceptibles de automatización.

8- Deben tener una relación costo/beneficio adecuada. (Directrices de la UPOV 2007; Torales et al; 2005).

Los microsatélites son los marcadores que mejor cumplen con todas estas características. Actualmente existen reportados mas de 400 marcadores microsatélites del género *Eucalyptus*, los mismos han sido aplicados exitosamente en distintos programas de mejoramiento genético forestal alrededor del mundo demostrando tener altos niveles de polimorfismo y muy buena reproducibilidad lo que se traduce en confiabilidad y elevado poder de resolución (Brondani et al 1998; Barros et al, 2002; Kirst et al, 2005; Torales et al; 2005; Brondani et al, 2006).

¿Qué es un Microsatélite?

Cada microsatélite es un segmento de ADN cuya longitud en pares de bases (bp) es altamente variable. Este carácter de variabilidad extrema los convierte en herramientas eficientes para la identificación clonal. De la misma manera que la imagen de una huella dactilar se usa para identificar a un individuo, los perfiles moleculares observados para un grupo de microsatélites permiten asignar un patrón de bandas característico para cada genotipo.

Estos son identificados de forma altamente específica en una muestra de ADN gracias a una técnica conocida como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta técnica permite multiplicar de forma exponencial un segmento de ADN generando unas 34 billones de copias (Figura 1), hasta un punto tal que pueden ser observados a simple vista a través de una técnica de revelado denominada electroforesis (Figura 2 y 3).

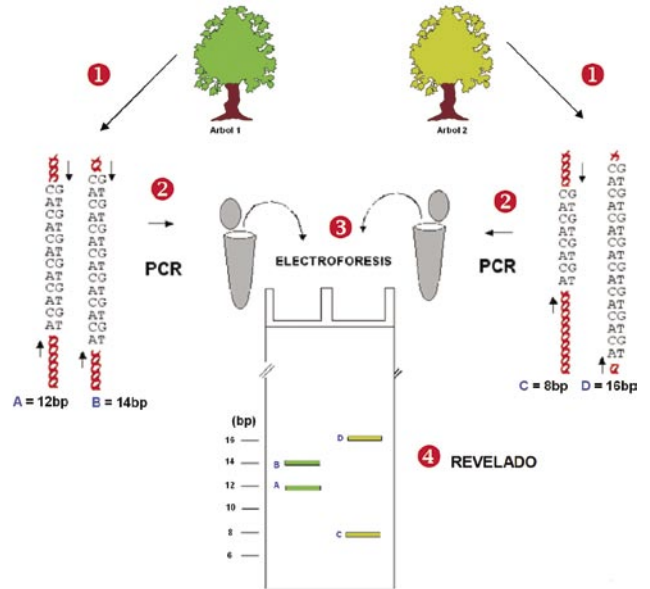


Figura 2 - Diferentes etapas de la identificación genotípica (ADN Fingerprinting). 1- Se colecta tejido de los árboles a diferenciar y se purifican sus ADNs. 2 - Se seleccionan los marcadores microsatélites a emplear. 3 - Se realiza la reacción de PCR en condiciones idénticas para ambos individuos. 4 - El resultado de la PCR es analizado en un gel de electroforesis evidenciándose las dos variantes alelicas presentes en cada genotipo, señaladas como A, B, C y D además sus pesos moleculares de 12, 14, 8, y 16 bp respectivamente. Los diferencias exhibidas por los perfiles de amplificación de cada individuo son el resultado directo de su variabilidad genética, dejándola de manifiesto en esta imagen de electroforesis que funciona como una “huella dactilar del ADN”.

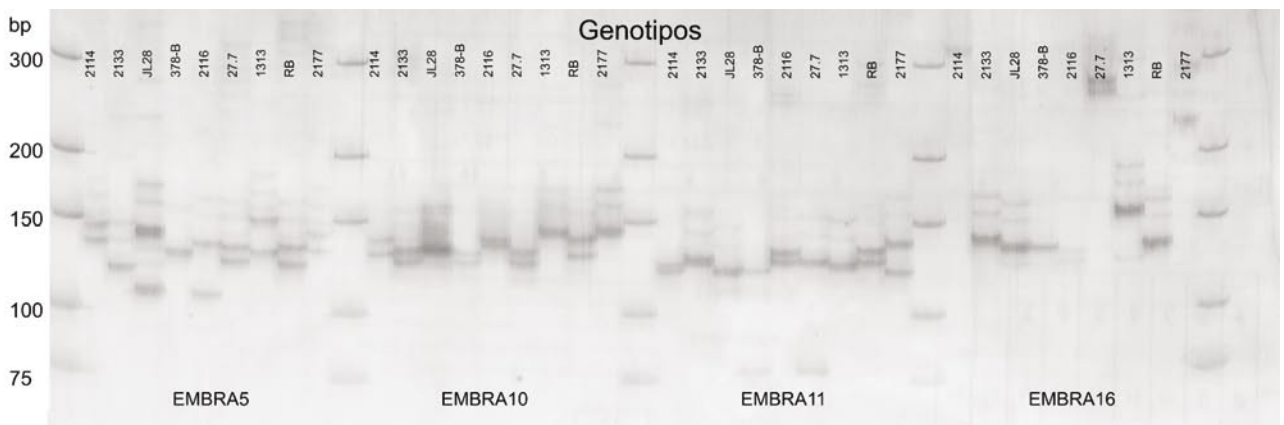


Figura 3 - Los resultados obtenidos para los microsatélites EMBRA 5, 10, 11 y 16 han mostrado un alto grado de polimorfismo para los nueve materiales del PNPF. El rango de peso molecular de estos marcadores oscila entre 100 y 150 bp.

A medida que se aumenta el número de microsatélites empleados se incrementa su poder de discriminación. Estudios previos demuestran que basta con seis microsatélites para discriminar entre todos los individuos de una población de mejoramiento.

Se estima que la probabilidad de encontrar dos individuos iguales es de 1 en 2 billones, por esta razón se puede considerar que seis SSRs es un número óptimo para la diferenciación de clones (Kirst et al, 2005).

Esta metodología se está empleando en los distintos clones de *Eucalyptus grandis* desarrollados por el Programa Nacional de Producción Forestal (PNPF) de INIA y permitirá la puesta en marcha del proceso su registro en INASE.

Consideraciones finales

Los resultados obtenidos para los microsatélites EMBRA 4, 5, 10, 11 15 y 16 han mostrado un alto grado de polimorfismo para los nueve materiales del PNPF. El rango de peso molecular de estos marcadores oscila entre 100 y 150 bp (Figura 3).

De la misma manera que las huellas dactilares sirven para identificar a las personas, el genotipado basado en microsatélites permite la identificación de los diferentes clones del genero *Eucalyptus*. Este sistema de trazabilidad molecular permite asegurar la identidad de los materiales durante las sucesivas etapas de la multiplicación clonal y en los intercambios interinstitucionales y comerciales protegiendo los derechos de propiedad y el registro de los materiales de elite.

Bibliografía

Barros R, Muro JI, Pires IE, Fernandez, E: Fingerprint an genetic diversitu análisis of *Eucalyptus* spp genotypes using RAPD and SSR markers. *Scientia Forestalis* 2002, 62:24-31.

Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R, Grattapaglia D: Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor Appl Genet* 1998, 97:816-827.

Brondani RPV, Williams ER, Brondani C, Grattapaglia D: A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. *BMC Plant Biology* 2006, 6:20. (online)

Kirst M, Cordeiro CM, Rezende GD, Grattapaglia D: Power of Microsatellite Markers for Fingerprinting and Parentage Analysis in *Eucalyptus grandis* Breeding Populations. *Journal oh Heredity* 2005, 96(2):1-6.

Torales S, Marcucci S, Harrant L: Identificación Genética de Clones utilizando Microsatélites. *IdiaXXI* 2005, 8:191-194. (online)

UPOV: Directrices para los perfiles de ADN: selección de los marcadores moleculares y creación de una base de datos. Directrices BMT (proj 9) 2007,

