

En Eucalyptus grandis

Identificación Genética de Clones Utilizando Microsatélites

La utilización de descriptores moleculares para la identificación de clones de especies forestales contribuye a la protección de la propiedad intelectual y al control de la pureza de los clones en sucesivos ciclos de multiplicación

De manera tradicional, la identificación varietal se ha basado en descriptores morfológicos, fenológicos, fisiológicos y agronómicos que, en determinadas circunstancias, resultan ambiguos e insuficientes para lograr una caracterización precisa de las variedades. En los últimos años, con el advenimiento de técnicas basadas en la manipulación del DNA, se ha desarrollado una nueva generación de descriptores, los marcadores moleculares que permiten una identificación genotípica precisa (DNA fingerprinting o huella digital genética).

Los marcadores moleculares se caracterizan por estar bien distribuidos en todo el genoma por su versatilidad y gran número, y resultan adecuados para su utilización en la identificación varietal de especies forestales. Contrariamente a las características fenotípicas de los individuos en estudio, como el vigor, la calidad del fuste y diversos aspectos morfológicos, ofrecen la ventaja de que no varían por efecto del ambiente, por la fase de desarrollo de la planta, ni por la subjetividad del técnico. Por lo tanto, el uso de técnicas moleculares puede considerarse como un sistema capaz de complementar y subsanar los problemas de la utilización de los datos morfológicos.

Si bien en la Argentina el uso de marcadores moleculares para caracterización genotípica en otros cultivos se está llevando a cabo de manera rutinaria, no ocurre lo mismo con las especies forestales, siendo ésta una herramienta promisoriosa.

Existen varios tipos de marcadores moleculares que permiten detectar diferencias o similitudes entre organismos más o menos relacionados entre sí. Según cuán interconectados entre sí estén estos organismos, se utilizará una u otra herramienta o combinación de ellas. Los marcadores moleculares que se utilizan para diferenciar individuos, aún aquellos que son muy afines entre sí, son los "microsatélites" o SSR. El alto grado de polimorfismo y su característi-

ca de codominancia (pueden distinguirse los dos alelos de un mismo locus), proveen un sistema muy poderoso para generar una identificación única de individuos (huella digital). Cada SSR examina una sola porción del genoma y, por lo tanto, se requiere de varios de ellos para hacer una estimación válida.

El poder de resolución de los microsatélites quedó una vez más demostrado en un trabajo realizado en una población de mejoramiento de *Eucalyptus grandis* de 192 individuos los cuales pudieron ser caracterizados utilizando únicamente 6 microsatélites altamente polimórficos. En este caso, la probabilidad que dos individuos fueran iguales utilizando los 6 loci fue menor que 1 en 2 billones, por esta razón se puede considerar un número óptimo para la diferenciación de clones.

En nuestro país, aunque la producción de clones a nivel comercial es una actividad todavía incipiente, tanto a nivel oficial (INTA) como privado (empresa Forestadora Tapebicuá y otras), se han desarrollado programas clonales en *Eucalyptus grandis* mediante el uso de técnicas de macro y micro propagación.

El uso comercial de la producción clonal requie-



● Bandeja clonal

● **Ing. Agr. Susana Torales y Dra. Susana Marcucci Poltri**

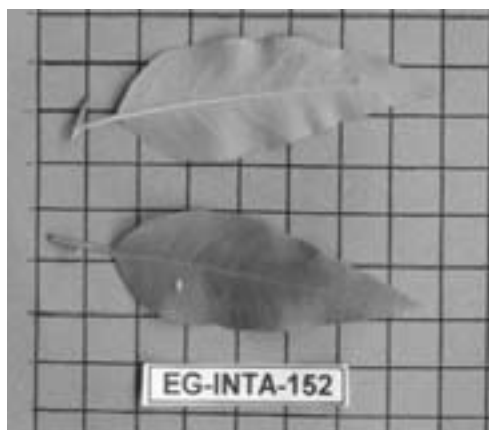
Instituto de Recursos Biológicos, CNIA, INTA Castelar
Ing. Ftal. Leonel Harrant
INTA Concordia, Entre Ríos

re, en primer lugar, de una caracterización adecuada que permita la obtención de un certificado de propiedad de los nuevos clones y de un apropiado marco legal para brindar protección a los obtentores de los nuevos materiales.

En la Argentina, la reglamentación de la Ley de Semillas y Creaciones Fitogenéticas (N° 20247), mediante el Decreto N° 2183/91, y la creación del Instituto Nacional de Semillas, mediante el Decreto N° 2817/91, brindaron la normativa necesaria para un adecuado desarrollo de la producción y comercialización de semillas, para la protección de la propiedad de las creaciones fitogenéticas nacionales y para la protección del consumidor. El Decreto N° 2183/91 (artículo 26, Capítulo V) estableció las condiciones para el otorgamiento de títulos de propiedad de cultivares en el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares. Además, en la ley N°24736/94, establecida por el Congreso que adhiere a la Convención Internacional para la Protección de Obtenciones Varietales (UPOV), 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 cultivares, las técnicas moleculares seleccionadas deben cumplimentar 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).



● Hojas Juveniles - Clon EG-INTA-152



● Flores Clon EG-INTA-152

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.

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

8-Deben tener una relación costo/beneficio adecuada.

MARCADORES MICROSATÉLITES

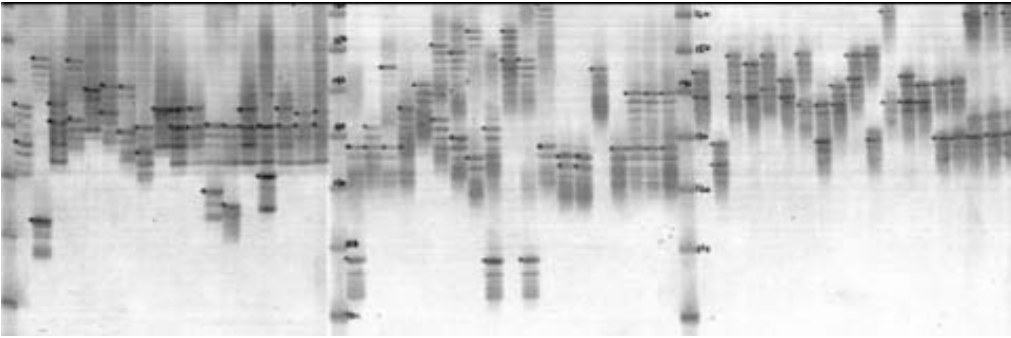
Según estudios previos, la tecnología que mejor cumple con todos los requisitos necesarios para generar un sistema confiable son los marcadores microsatélites.

Estos marcadores consisten en regiones del genoma que contienen secuencias simples repetitivas que son amplificadas a través de PCR utilizando un par de primers específicos (de 20 a 30 bases), complementarias a secuencias únicas que flanquean al microsatélite. Estas regiones son altamente polimórficas entre los individuos, ricas en formas alélicas, posibilitando un análisis genético preciso y un elevado poder de resolución para el test de DHE.



● Plantin clonal

- *Figura 1. Perfiles de bandas de clones de E. grandis obtenidos con tres loci de microsatélites. Se muestran grupos de 20 genotipos (incluidos testigos) separados por marcadores con pesos conocidos. Se observa que la mayoría de los individuos presenta dos alelos por locus, lo que facilita la discriminación entre ellos.*



DESCRIPTORES MOLECULARES PARA CULTIVARES DE *EUCALYPTUS*

En este trabajo, para la determinación del perfil genético de las muestras, se utilizaron seis loci de microsatélites, 5 de los cuales fueron optimizados para la identificación genética de *Eucalyptus* en EMBRAPA, Brasil. Asimismo, fueron ampliamente utilizados y validados en diversos laboratorios en el mundo.

En el laboratorio del IRB, se realizó la caracterización molecular de 17 clones de *E. Grandis*, provenientes del INTA Concordia, a fin de complementar la caracterización morfológica realizada en la experimental para su inscripción en el INASE. Los 17 clones fueron diferenciados y se determinó un perfil genético para cada clon. Diez de ellos fueron inscriptos y representaron los primeros clones forestales inscriptos en el INASE.

Los descriptores moleculares usados fueron EMBRA 02, EMBRA 05, EMBRA 10, EMBRA 21 y EMBRA 25, que fueron amplificados mediante el método de reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR). Posteriormente, los productos de esta amplificación fueron separados en geles de poliacrilamida y campos eléctricos apropiados y visualizados mediante tinción con nitrato de plata (ver Fig. 1). Con los datos obtenidos se realizó una matriz de identificación (Tabla 1) en el que están representados los clones con números, y los tamaños de las variantes alélicas correspondientes a cada loci, con letras.

Para determinar la similitud genética entre clones, que representa la tasa del número de fragmentos de ADN que comparten (variantes alélicas), se realizó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard, cuyos valores oscilan entre 0 (desigualdad absoluta) y 1 (todas las variantes iguales).

- *Tabla 1: Matriz de Identificación de los 17 clones de E. grandis. En la primera columna están representados los clones numerados del 1 al 17. Se señalan con letras los pesos moleculares de los dos alelos correspondientes a cada locus.*

Clon	EMBR A 2	EMBR A 5	EMBR A 6	EMBRA 10	EMBRA 21	EMBRA 25
1	E	A	D	C	J	E
1	I	D	G	A	J	B
2	A	D	B	F	I	C
2	M	F	A	B	H	B
3	G	D	D	F	F	C
3	J	K	I	C	B	B
4	H	D	D	C	J	E
4	M	H	H	A	H	B
5	K	J	E	E	A	K
5	K	J	I	E	A	F
6	I	G	D	F	I	J
6	L	N	F	D	E	B
7	F	E	C	E	H	H
7	L	M	I	B	D	D
8	E	C	B	G	D	G
8	G	O	C	F	C	C
9	J	A	C	C	H	E
9	J	F	E	B	C	A
10	G	L	F	C	G	I
10	J	O	I	B	B	G
11	G	A	B	C	F	I
11	J	L	I	A	B	E
12	C	D	C	C	J	D
12	G	P	K	C	I	B
13	B	B	C	F	J	F
13	G	C	F	C	B	F
14	G	B	C	F	J	F
14	J	C	E	F	H	F
15	D	K	B	G	H	C
15	G	K	E	C	F	B
16	G	C	B	F	H	F
16	J	D	E	C	F	B
17	G	D	B	G	I	B
17	I	I	J	A	F	A

● Tabla 2: Matriz de Similitud entre clones. En negrita se indican los valores de similitud más elevados. En la diagonal se observan los valores de identidad de los clones.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	1.000																
2	0.125	1.000															
3	0.227	0.273	1.000														
4	0.350	0.217	0.217	1.000													
5	0.000	0.000	0.044	0.000	1.000												
6	0.130	0.125	0.125	0.080	0.000	1.000											
7	0.000	0.080	0.039	0.039	0.095	0.040	1.000										
8	0.083	0.174	0.174	0.000	0.040	0.040	1.000										
9	0.130	0.125	0.080	0.125	0.046	0.000	0.130	0.083	1.000								
10	0.039	0.037	0.217	0.077	0.044	0.039	0.080	0.125	0.174	1.000							
11	0.174	0.037	0.217	0.167	0.000	0.000	0.080	0.227	0.400	1.000							
12	0.182	0.125	0.174	0.174	0.046	0.083	0.083	0.130	0.125	0.125	1.000						
13	0.087	0.040	0.182	0.083	0.000	0.087	0.142	0.191	0.087	0.182	0.130	0.250	1.000				
14	0.044	0.136	0.191	0.136	0.105	0.044	0.191	0.200	0.200	0.087	0.087	0.143	0.438	1.000			
15	0.130	0.227	0.350	0.125	0.046	0.040	0.040	0.238	0.182	0.080	0.174	0.130	0.087	0.143	1.000		
16	0.130	0.286	0.421	0.174	0.095	0.040	0.040	0.238	0.182	0.125	0.227	0.130	0.250	0.500	0.368	1.000	
17	0.174	0.167	0.167	0.200	0.044	0.025	0.000	0.125	0.080	0.077	0.217	0.186	0.083	0.142	0.227	0.174	1.000

En la Tabla 2 puede observarse que todos los clones tienen valores de similitud muy bajos (siendo el máximo de 0.50), y esto confirma que todos los clones son diferentes. Se observa también que hubo clones que tuvieron un grado de similitud de 0, es decir que no comparten ningún alelo en los 6 loci analizados. Una vez conocido el perfil genético es posible controlar la estabilidad y la pureza de cada clon en las sucesivas etapas de multiplicación, debi-

do a la permanencia de los alelos con el correr del tiempo.

Para finalizar, se destacan los siguientes puntos: a) se obtuvo la huella digital de los 17 clones; b) los 6 loci evaluados fueron capaces de diferenciar a los 17 clones (no hubo similitud igual a uno entre ninguno de ellos); c) los valores de similitud entre pares de clones resultaron muy bajos.

Bibliografía

- Brondani, R.P.V., Brondani, C., Tarchini, R., Grattapaglia, D. 1998. Development and mapping of microsatellite based markers in *Eucalyptus*. *Theor. Appl. Genet.* 97,816-829.
- Brondani, R.P.V., Brondani, C., Grattapaglia, D. 2002. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. *Mol Genet Genomics* 267: 338-347.
- Grattapaglia, D. 2000. Molecular breeding of *Eucalyptus*. State of the art, operational applications and technical challenges. In: Jain, S.M. Minocha, S.C. (editors). *Molecular Markers and Genome Mapping in Woody plants*. v.157 6pp., p.451-474, Kluwer Academic Publishers.
- Kirst, M., Brondani, R.P.V., Ciampi, A.Y., Gaiotto, F.A., Gomes, M. and Grattapaglia, D. (1998). Fingerprinting *Eucalyptus* genotypes with highly informative microsatellite markers. *Genet. and Mol. Biol.* 21,185 abs.I 41.
- Jones, R.C.; Steane, D.A., Potts, B.M. and Vaillancourt. R. 2002. Microsatellite and morphological analysis of *Eucalyptus globulus* populations. *Can.J.For.Res.* 32:59-66.