



INIA Las Brujas  
1964 - 2014

**INIA**  
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria  
URUGUAY

# Jornada Técnica

## VIII Jornada de Agrobiotecnología

The collage contains four images: a field of green crops, a petri dish with seedlings, a pipette in a lab, and a heatmap of genetic data. The heatmap shows LOO scores and r<sup>2</sup> values for various markers.

Marker	FM4	FM144	FM215	FM223	FM23550	FM22034	FM14970	FM14960	FM0547	FM319	FM297	FM11230	FM0051	FM10114
RM10114	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM851	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM11329	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM297	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM319	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM14900	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM14970	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM22034	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM23550	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM223	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM215	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM144	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
RM4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Unidad de Biotecnología  
Serie Actividades de Difusión N° 741  
30 de Octubre de 2014

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

## Integración de la Junta Directiva

**Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel** - Presidente

**D.M.T.V., PhD. José Luis Repetto** - Vicepresidente



**D.M.V. Álvaro Bentancur**

**D.M.V., MSc. Pablo Zerbino**



**Ing. Agr. Joaquín Mangado**

**Ing. Agr. Pablo Gorriti**



## INDICE

**P.3 – Caracterización de líneas de tomate transformadas con el Gen EFR.** Arruabarrena, A.; Stransfeld, L.; Dalla Rizza, M.; Zipfel, C.

**P.5 – Marcadores moleculares identificados en el Proyecto Mapeo Asociaativo para asistir el mejoramiento genético de arroz.** V. Bonnacarrere; G. Quero; J. Rosas; S. Fernández; S. Garaycochea; S. Martínez; F. Perez de Vida; P. Blanco; N. Berberian; L. Gutierrez.

**P.7 – Avances en la identificación de portadores de deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina en raza Holado.** Branda Sica, A; Federici, M.T.; Briano, C.; Romero, A.; Llambí, S.; Dutra, F.; Dalla Rizza, M.

**P. 10 – Manipulación *in vitro* de la ploidía en vegetales.** Castillo A., Lopez-Carro; B., Reyno; R. , Rivas; C.F., Blanco; P., Pérez F.; M. Dalla Rizza.

**P. 12 – Aplicación de la biotecnología y trabajo multidisciplinario en redes interinstitucionales.** De los Santos, Jorge; , Navajas, Elly A.; Pravia, Maria I.; Peraza, Pablo; , Mondelli, Mario.

**P. 15 – Evaluación de mínima concentración inhibitoria y fungicida en semillas de plantas autóctonas.** Maidana M.; Murchio S.; Vignale B.; Zoppolo R.; Leoni C.; Dalla Rizza M.

**P. 18 – Avances hacia la selección genómica en bovinos de carne: del dicho al hecho.** Navajas, E.A.; Aguilar, I.; Ravagnolo, O.,; Lema, M.; Peraza, P.

**P. 21 – Consanguinidad molecular en ovinos criollos uruguayos.** Pieruccioni, F.; Macedo, F.; Ciappesoni, G.; Navajas, E.A.



## CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS DE TOMATE TRANSFORMADAS CON EL GEN EFR

Arruabarrena, A.<sup>1\*</sup>, Stransfeld, L.<sup>2</sup>, Dalla Rizza, M.<sup>3</sup>, Zipfel, C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología, INIA Salto Grande, Camino al Terrible s/n, CP. 50000, Salto, Uruguay

<sup>2</sup>The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, UK.

<sup>3</sup>Unidad de Biotecnología, Estación Experimental “Wilson Ferreira Aldunate”, Ruta 48 Km. 10, Rincón del Colorado, CP. 90.200, Canelones, Uruguay.

\*aarruabarrena@inia.org.uy

**Palabras clave:** tomate, EFR, resistencia a enfermedades.

### Introducción

Las plantas tienen la capacidad de reconocer patógenos a través de dos sistemas de percepción. Un sistema detecta moléculas microbianas o celulares, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o daño celular (DAMPs). Esta percepción se lleva a cabo mediante receptores de reconocimiento de patrones bacteriano/celular (PRRs, pattern-recognition receptors) y desencadena la inmunidad activada por PAMPs (PTI). El otro sistema reconoce efectores microbianos a través de proteínas de resistencia (proteínas R). El mismo, desencadena la inmunidad activada por efectores (ETI). El receptor EFR es una PRR de *Arabidopsis thaliana* que reconoce el factor de elongación Tu (EF-Tu) y desencadena la inmunidad activada por PAMPs (PTI) (Zipfel C, et al., 2006). EF-Tu es una de las proteínas más conservadas y abundantes en bacterias, sin embargo, el receptor EFR se encuentra restringido a la familia de las Crucíferas. La expresión de este receptor en especies vegetales de otras familias confiere a las mismas la capacidad de desencadenar la PTI en respuesta a EF-Tu (Lacombe S, et al., 2010). El objetivo de este trabajo es caracterizar líneas de tomate transformadas con el gen *EFR* de *A. thaliana* y determinar si las mismas adquieren capacidad de desencadenar la PTI en respuesta a EF-Tu.

### Metodología

Plantas de tomate de la variedad Milongón fueron transformadas en The Sainsbury Laboratory (UK) con una construcción para sobreexpresión del gen EFR. Se analizaron plantas de siete líneas de tomate transformadas con esta construcción (Líneas 4, 6, 8, 10, 16, 20, 29).

Se realizaron extracciones de ADN, ARN y proteínas de plantas transformadas y de plantas control wt (sin transformar). Se constató la presencia del inserto mediante PCR con primers específicos para EFR. Se realizaron análisis de la expresión de ARNm mediante PCR en tiempo real y análisis de la expresión de la proteína mediante Western blot. Finalmente se determinó la capacidad de las líneas de reconocer al péptido elf18 (parte EF-Tu) y desencadenar la PTI mediante la cuantificación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) de las diferentes líneas al ser tratadas con el péptido elf18.

### Resultados y Discusión

Todas las líneas de plantas analizadas presentaron el inserto del gen EFR cuando se realizó la amplificación por PCR con primers específicos a diferencia de las plantas wt control donde no se observó la presencia de amplicón. En algunas de las plantas analizadas no se observó presencia del inserto. Esto se debe a que las plantas analizadas corresponden a la generación

T1 y fueron sembradas en tierra, sin selección por resistencia a antibiótico; por lo tanto, el inserto está segregando.

Para el análisis de la expresión génica se analizaron únicamente las líneas 4, 6, 8, 20 y 29 y se utilizaron tres plantas de cada línea. Se comparó la expresión del ARNm de *EFR* con respecto a plantas wt. Se determinó que la línea que tiene mayores niveles de expresión a nivel transcripcional es la línea 6 (Figura 1a). Lo mismo se observó a nivel proteico; las plantas de la línea seis presentan niveles mayores de expresión de la proteína EFR (Figura 1b).

En la determinación los niveles de producción de ROS y, por lo tanto, la capacidad de reconocer al péptido elf18 se observó que la línea 6 presenta niveles intermedios de producción de ROS (Figura 1c). El hecho de que esta línea presenta altos niveles de expresión del ARN y de la proteína no se corresponde con los niveles intermedios de capacidad de respuesta a elf18 e inducción de la PTI. Este resultado podría deberse a que la proteína producida no es totalmente funcional, por lo que la cantidad de receptor EFR que realmente reconoce a elf18 podría ser menor de lo observado en los análisis de expresión de ARNm y proteínas.

Las líneas que presentaron niveles mayores de inducción de la PTI (medido por acumulación de ROS) fueron las líneas 4, 20 y 29 (Figura 1c). Estas líneas serán seleccionadas para realizar futuros análisis como determinación del número de copias del inserto e inoculaciones con bacterias fitopatógenas.

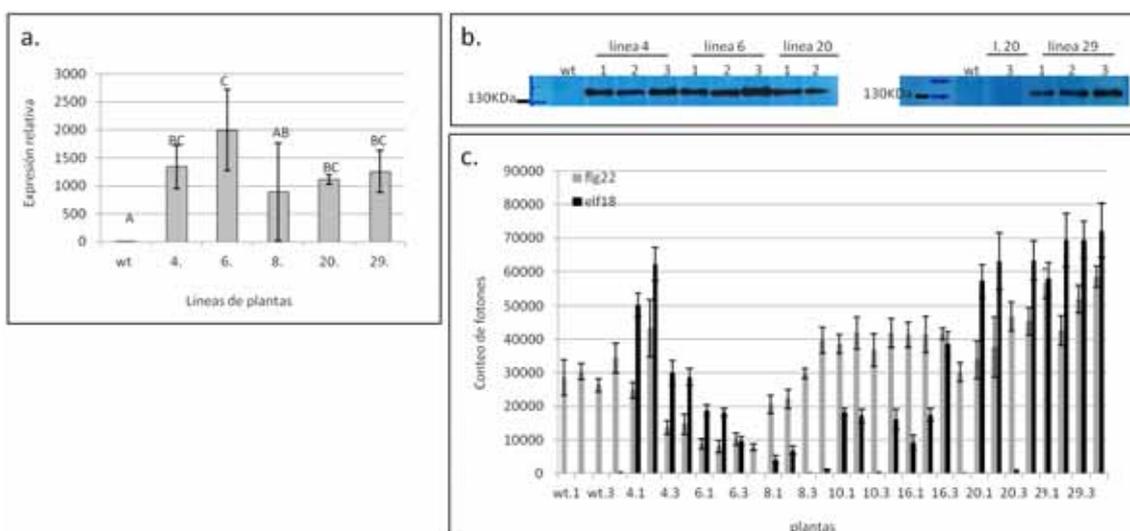


Figura 1. a. Niveles de expresión de ARNm de EFR. b. Niveles de expresión de proteína de EFR. c. Niveles de acumulación de ROS.

## Bibliografía

Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BP, Staskawicz B, Jones JDG, Zipfel C.

2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat Biotechnol* 28: 365–369.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125: 749–760.

## MARCADORES MOLECULARES IDENTIFICADOS EN EL PROYECTO MAPEO ASOCIATIVO PARA ASISTIR EL MEJORAMIENTO GENETICO DE ARROZ

V. Bonnacarrere D.Sc.<sup>\*1\*4</sup>, G. Quero MSc<sup>\*2</sup>, J. Rosas MSc.<sup>\*1</sup>, Lic. S. Fernández<sup>\*3</sup>, S. Garaycochea MSc.<sup>\*1</sup>, S. Martínez MSc<sup>\*1</sup>, F. Perez de Vida PhD.<sup>\*1</sup>, P. Blanco MSc.<sup>\*1</sup>, N. Berberian<sup>\*2</sup>, L. Gutierrez PhD.<sup>\*2</sup>.

<sup>\*1</sup> Programa de Arroz, INIA Treinta y Tres, <sup>\*2</sup> Unidad de Tecnologías de la Información, INIA Dirección Nacional, <sup>\*3</sup> Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, <sup>\*4</sup> Departamento de Biometría, Estadística y Cómputos, Facultad de Agronomía, UdelaR.

<sup>\*4</sup> Autor para correspondencia:

Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate, INIA. Ruta 48 Km 10, Rincón del Colorado, Canelones. Correo electrónico: vbonnacarrere@inia.org.uy

**Palabras claves:** QTL, SNP, yesado del grano.

### Introducción

En este informe se plantean los resultados del proyecto “Mapeo asociativo para la identificación de marcadores asociados a rendimiento, calidad y resistencia a enfermedades en la población de mejoramiento de arroz de INIA”. Este proyecto tiene como objetivo identificar marcadores moleculares, SNP (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism) para ser utilizados en selección asistida por el programa de mejoramiento, de manera de mejorar más rápidamente para características de calidad (yesado, grano entero y blancura de grano) y resistencia a enfermedades del tallo (*Rhizoctonia oryzae-sativae* y *Sclerotium oryzae*). En este reporte se presentaran los resultados para caracteres de calidad y fisiológicos. A partir de los datos de secuenciación parcial del genoma de 665 líneas del programa de mejoramiento se identificaron los 57400 SNPs y se procesaron los datos fenotípicos para los caracteres de interés como fue reportado en la Serie Técnica de Difusión de Arroz (2013). A partir de análisis de bioestadísticos de asociación entre datos genotípicos y fenotípicos se encontraron regiones cromosómicas o QTLs (del inglés, Quantitative Trait Loci), marcadores moleculares y genes candidatos asociados a yesado, grano entero, blancura del grano, fecha de floración y altura de la planta. La primer etapa en este proceso de análisis es la determinación de la estructura genética de la población de estudio, de manera de disminuir asociaciones espurias entre marcadores y fenotipo.

### Materiales y métodos

#### *Determinación de la estructura de la población de mapeo y análisis de asociación*

Para los análisis de asociación se utilizó un modelo lineal mixto que corrige por estructura de la población utilizando los coeficientes obtenidos por análisis de componentes. El modelo utilizado fue el siguiente:  $y = X\beta + Qv + \epsilon$  (Price et al. 2006) donde:  $Y$ = vector fenotípico,  $X$ = matriz de marcadores moleculares,  $\beta$ =vector de efectos alélicos,  $Q$  = estructura de la población representada por los scores de los ejes relevantes del PCA,  $v$ = vector del efecto poblacional y  $\epsilon$ = errores residuales.

#### *Anotación de genes*

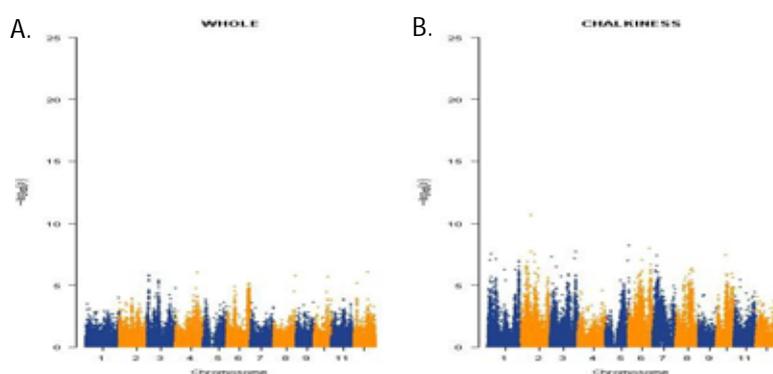
A partir de la información de QTLs encontradas y considerando umbrales de p valores superiores a  $1 \times 10^{-4}$  se seleccionaron los SNPs. Utilizando las coordenadas de localización de

éstos SNPs, se localizaron en el genoma de arroz reportado en RAP (Rice Annotation Project) de modo de vincularlos a genes cuya función puede ser asociada al carácter de interés.

### Resultados

El análisis de componentes principales (PCA) de los datos genotípicos mostró una clara estructura correspondiente a los tipos *indica* y *japónica* tropical presentes en la población. Los dos componentes principales explicaron más del 60% de la varianza genotípica. El germoplasma *Indica* presenta mayor diversidad que el *Japónica*.

Se encontraron QTLs asociados a todas las características evaluadas. Para fecha a floración se destaca un QTL en el cromosoma 3; para altura de la planta en los cromosomas 1, 3, 5, 6, 8, 10, 11 y 12; para grano entero en cromosomas 3, 4 y 6; para yesado en cromosomas 1,2,3,6,7,8,10; y para blancura del grano en los cromosomas 1, 4, 6 y 12.



**Figura 1.** Manhattan plot que muestran los QTLs asociados a los caracteres de interés. A. Grano entero. B. Yesado del grano.

Los SNPs asociados para los diferentes caracteres fueron visualizados en el genoma del arroz, encontrando que muchos de ellos se encontraban en secuencias génicas. A partir de revisiones bibliográficas, se seleccionaron aquellos SNPs asociados que se localizaban en genes cuya función pudiera estar relacionada con el carácter estudiado. En el caso de grano entero y yesado se encontró una asociación muy alta en 3 SNPs localizados en un gen del cromosoma 6 que codifica para una topirim domain-containing protein implicada en la degradación del almidón. Además, para grano entero se encontró un SNP en un gen de expansina en el cromosoma 4 cuya función está asociada al tamaño del grano.

### Conclusiones

Se identificaron marcadores asociados a caracteres de calidad como yesado, grano entero y blancura del grano y a caracteres fisiológicos como fecha a floración y altura de la planta que serán utilizados como marcadores para selección asistida en el programa de mejoramiento de INIA.

### Bibliografía

Elshire, R.; Glaubitz, J.; Sun, Q.; Poland, J.; Kawamoto, K.; Buckler, E.; Mitchell, S. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. Plos One v. 6, no.5, e 19379.

## AVANCES EN LA IDENTIFICACIÓN DE PORTADORES DE LA DEFICIENCIA EN LA ADHESIÓN LEUCOCITARIA BOVINA EN RAZA HOLANDO

Branda Sica, A<sup>1\*</sup>; Federici, M.T.<sup>1</sup>; Briano, C.<sup>2</sup>; Romero, A.<sup>2</sup>; Llambí, S<sup>3</sup>., Dutra, F.<sup>2</sup>; Dalla Rizza, M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay.

<sup>2</sup> DILAVE “Miguel C. Rubino”, Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres, Uruguay.

<sup>3</sup> Cátedra de Genética, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

### Introducción

La deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina (BLAD) representa un problema a nivel de los tambos por generar inmunodepresión que podría ser la causa predisponente de muchas de las patologías infecciosas reconocidas en terneros. Los animales afectados mueren a causa de la extrema susceptibilidad a las infecciones, causada por la incapacidad de glóbulos blancos (leucocitos) para pasar al espacio extravascular en el tejido infectado. Es una enfermedad autosómica, producto de una mutación puntual en el gen CD18 que codifica una glicoproteína de membrana del leucocito llamada subunidad beta-2 integrina (Shuster y col., 1992). En la raza Holando, la enfermedad es causada por una mutación que provoca un cambio de Adenina (A) a Guanina (G) en el exón 4 de la subunidad beta-2 integrina, donde se produce una sustitución de un aminoácido por otro, del ácido aspártico por glicina en la posición 128 de la proteína del receptor. La mutación afecta el funcionamiento de un receptor proteico en los leucocitos y en la respuesta inmune contra las infecciones. En nuestro país, utilizando el diagnóstico con marcadores de ADN sobre una muestra de 138 bovinos Holando en establecimientos lecheros, se encontró que el 7.2% eran portadores de esta patología, con una prevalencia génica de 0.96%, 13.3% y 36.8% en vacas, toros y terneros, respectivamente (Llambi y col., 2007). Otro muestreo posterior en 253 vacas Holando en el departamento de Colonia confirmó la importancia de BLAD en el país (Kelly y col., 2010). El diagnóstico de BLAD es difícil de realizar por métodos de diagnósticos convencionales, sólo puede confirmarse por técnicas biotecnológicas tales como PCR/RFLP o PCR/Secuenciación.

### Materiales y métodos

Se ha realizado un muestreo en forma aleatoria en 190 vacas de la raza Holando provenientes de predios lecheros de nuestro país. Se realizaron las extracciones de glóbulos blancos a partir de sangre fresca. Se cuantificó y se determinó la calidad de ADN obtenido en el laboratorio del Banco de ADN de la Unidad de Biotecnología, siguiendo normas y protocolos del mismo. Para la realización de este diagnóstico se utilizaron 2 metodologías distintas: (1) **PCR- RFLP**: Se amplificó por PCR una región del gen CD18 (159 pares de bases) y se digirió posteriormente el producto amplificado con la endonucleasa *TaqI* de acuerdo a Llambi y col. (2003), y (2) **PCR-Secuenciación** (MACROGEN, Korea): Se enviaron a secuenciar los amplicones (secuencias *forward* y *reverse*). Se analizaron mediante alineamiento múltiple (software *BioEdit*), restricción virtual (software *NEBcutter*) y análisis visual del SNP por observación de la superposición de los picos de fluorescencia en el electrofenograma respectivo (para el caso de un heterocigota portador de BLAD).

### Resultados y Discusión

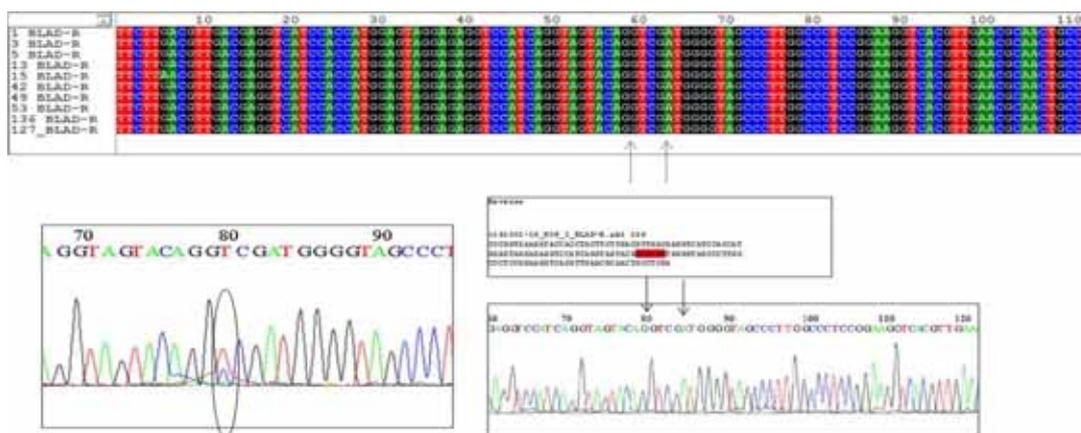
De un total de 190 muestras, se analizaron 94 mediante PCR- RFLP. Los amplicones respectivos se fueron secuenciados y analizados. De este total se confirma un único portador de BLAD para este muestreo aleatorio por PCR- RFLP y secuenciación del amplicón. Se determinaron por PCR- RFLP 23 portadores de BLAD, 2 de ellos mostraron las tres bandas bien claras (159, 109 y

50 pb) y en el resto se observó la banda de 109 pb tenue, lo cual puede deberse a la metodología utilizada, que si bien es sensible, existen muchas variables que pueden influir en la lectura de los resultados tales como las bandas tenues o la digestión incompleta de la enzima. En este último caso, se observaría la banda correspondiente al amplicón no digerido, lo que se puede confundir con la ausencia del sitio de corte de *TaqI* correspondiente a la mutación. En el gel que se muestra a continuación (**Figura 1**) se observa un heterocigota portador de BLAD que presenta las bandas correspondientes de 159, 109 y 50 pb, respectivamente.



**Figura 1.-** Corrida electroforética en gel de agarosa 3% en TBE 0.5X de las amplificaciones de los productos PCR y digestiones con la enzima *TaqI*. Carril 1: Marcador de peso molecular *Gene Ruler Low Range DNA ladder*. Carriles 2-7: Digestiones con la enzima *TaqI*. Carriles 8-12: Amplificación del fragmento 159 pb por PCR. Carril 13: Control negativo de PCR. Carriles 2-6: Animales con patrones de fragmentos de 109 y 50 pb, indicando que corresponde a un homocigota dominante normal (se observó el fragmento de 109 pb muy tenue en el carril 6, debido al PCR del carril 12 que fue bajo). Carril 7: Animal con patrones de fragmentos de 159, 109 y 50 pb, indicando que es heterocigota portador de BLAD.

Una vez obtenidas las secuencias, se realizó el alineamiento múltiple y la restricción virtual (datos no presentados), métodos con los que no fue posible determinar portadores. Esto se debe a que al secuenciar se lee la base que presenta la señal más intensa, por lo tanto no puede determinarse el alelo mutado del portador. Posteriormente se analizaron todas las secuencias junto a sus electrofenogramas (**Figura 2**), buscando el SNP (mutación) dentro del sitio de corte de *TaqI*. Mediante este método sólo un portador fue detectado. En éste, en la secuencia *reverse* se observó claramente la superposición de la señal de fluorescencia de ambas bases: la de un individuo normal, Timina (en rojo) con mayor intensidad de fluorescencia y la correspondiente a la mutación, Citosina (en azul) de menor intensidad (**Figura 2**). En la secuencia *forward* se encontró la mutación A→G (Adenina a Guanina), no tan clara como en la *reverse*, ya que la calidad al inicio de la secuenciación no es buena (**Figura 3**).



**Figura 2.-** Alineamiento de 10 secuencias *reverse* utilizando el software BioEdit. Electrofenogramas de las muestras normal (derecha) y portadora de BLAD (izquierda). En esta última se observan dos picos de fluorescencia superpuestos (T- rojo y C- azul) en el nucleótido señalado en círculo, indicando que el individuo es portador de BLAD. Sobre el electrofenograma derecho se muestra la secuencia *forward* obtenida señalando con un recuadro rojo el sitio de corte de la enzima *TaqI*.

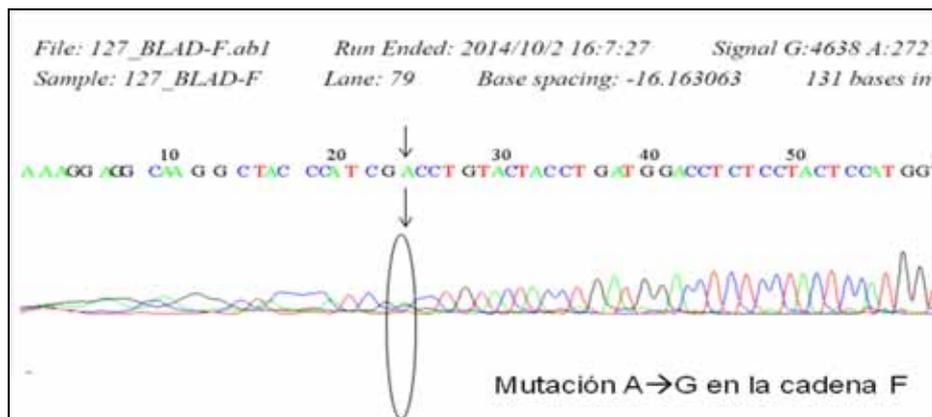


Figura 3.- Localización de la mutación en la secuencia *forward*, indicando la superposición de los picos, Adenina (en verde) y Guanina (en negro).

### Conclusiones y Perspectivas

Se compararon distintas metodologías de diagnóstico de la enfermedad BLAD: RFLP y análisis de secuencias. Tanto el alineamiento como la restricción virtual se demuestra que no son viables debido a que la secuencia leída corresponde a la señal de mayor intensidad, quedando invisible la mutación existente en los portadores. Sólo el análisis caso a caso de la secuencia junto al electrofenograma dan una información fiable de la existencia de portadores de esta enfermedad.

Se propone que el diagnóstico utilizando PCR- RFLP sea confirmado con el análisis de la secuencia, o sustituido por esta tecnología para un análisis de rutina. En la actualidad, con la disminución de los costos de la secuenciación, este método se vuelve una alternativa viable y económica, en relación al alto costo de las enzimas de restricción y de la agarosa, la gran laboriosidad y subjetividad del PCR- RFLP.

Se logró por métodos precisos y sensibles la confirmación del diagnóstico de un animal portador BLAD en una muestra de 94 animales tomados al azar, proporcionando una información más actualizada de incidencia de esta enfermedad en Uruguay. Se propone realizar un estudio más extensivo para determinar las frecuencias alélicas en ganado de leche en Uruguay.

### Bibliografía

Kelly L., Dutra F., Trenchi G., Llambí S., Rivero R., Moraes J., D'Agosto S., Peraza P., Ravagnolo O., Dalla Rizza M. (2012). Diagnóstico molecular de enfermedades bovinas hereditarias presentes en el Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48(188) 3-11.

Llambí S., Guevara K., Rincón G., Zaffaroni R., de Torres E., Barrera J., Arruga M.V., Rodríguez V., Postiglioni A. (2003). Frecuencia da deficiência na adesão leucocitaria em uma população de bovinos da raça holandesa, no Uruguai. *Ars. Veterinaria*. 19:52–56.

Llambí S., Nicolini P., Kelly L., de Torres E. (2007). Frecuencia de la enfermedad hereditaria BLAD en vacas Holando-Uruguayo con control de mastitis. *Jornadas Técnicas Veterinaria-UdelaR V<sup>o</sup>*, Montevideo. Uruguay, páginas 26-27.

Shuster D.E., Bosworth B.T., Kehrlí M.E. (1992). Sequence of the Bovine CD18-Encoding cDNA Comparison with the Human and Murine Glycoproteins. *Gene*. 114:267-271.

## MANIPULACIÓN *IN VITRO* DE LA PLOIDÍA EN VEGETALES

Castillo<sup>1</sup> A., Lopez-Carro<sup>2</sup> B., Reyno<sup>3</sup> R., Rivas<sup>4</sup> C.F., Blanco<sup>5</sup> P., Pérez<sup>5</sup> F. y M. Dalla Rizza<sup>1</sup>  
acastillo@inia.org.uy

1. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Canelones
2. Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo SECIF-IIBCE
3. Mejoramiento Genético Pasturas, INIA Tacuarembó
4. Mejoramiento Genético de Cítricos, Programa de Producción Citrícola. INIA Salto Grande.
5. Mejoramiento Genético de Arroz INIA Treinta y Tres.

**Palabras clave:** *haploide, dobles haploides, poliploide, triploide.*

### Introducción

Los fitomejoradores, genetistas, y biotecnólogos han utilizado diversos enfoques para la producción de haploides (monoploides), dihaploides y poliploides. Los avances en el desarrollo de marcadores moleculares y los modelos estadísticos de predicción aplicados al mejoramiento genético de plantas, han permitido aumentos continuos en los rendimientos de diversos cultivos. Sin embargo, un importante cuello de botella es el tiempo de generación de las plantas que está limitado biológicamente. La herramienta de introducción de dobles haploides, permite acortar sustancialmente la generación de tiempo a través de ciclos rápidos de la meiosis y mitosis. Las plantas haploides y dihaploides se emplean cada vez más para el estudio de alelos en diferentes niveles del genoma, para la generación de híbridos, avance generacional en cereales y evaluación agronómica.

Por otra parte, en vegetales es común la presencia de dos o más juegos de cromosomas completos en las células somáticas. Cualquier organismo cuyas células somáticas contienen tres o más conjuntos de cromosomas completos es denominado poliploide. Estas plantas poliploides con frecuencia exhiben muchas de las características morfológicas distintivas como órganos de mayor tamaño. Esta propiedad se ha explotado principalmente en plantas ornamentales, este es el caso de las flores y frutos, y para el caso de las plantas triploides, las frutas no contienen semillas.

En este trabajo se presentan las herramientas de cultivo *in vitro* disponibles en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales para la obtención de plantas con diferentes niveles de ploidía de acuerdo al objetivo particular de los distintos programas de mejoramiento genético de INIA.

### Materiales y métodos

Ejemplo 1: Obtención de dobles haploides en arroz. Para la selección de las panojas provenientes del plan de cruzamientos, se utilizaron los indicadores morfológicos descritos por Lentini et al, 1997 y se utilizaron los medios de cultivos detallados por estos autores

Ejemplo 2: Obtención de triploides en citrus. Se recibieron 1524 semillas de mandarina de la variedad Marisol subdesarrolladas colectadas por el programa de mejoramiento de citrus. Las semillas son desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 20 minutos. Luego se realizan tres enjuagues con agua destilada estéril; bajo lupa son extraídos los embriones y colocados en medio de cultivo (Ollitrault et al., 2010).

Ejemplo 3: Inducción de tetraploides en especies leguminosas nativas. Se utilizaron dos agentes antimitóticos para inducir duplicación cromosómica. El tipo de explante utilizado fue semilla pregerminada. Los tratamientos utilizados fueron: 2,88  $\mu\text{M}$ ; 28,8  $\mu\text{M}$ ; 57,6  $\mu\text{M}$ ; durante 6 y 24 horas de oryzalin, y 0,1; 0,2 y 0,3% durante 6 y 24 horas de colchicina.

## Resultados

Ejemplo 1: El uso de plantas haploides tiene gran interés porque permite la obtención de individuos dobles haploides en una sola generación de cruzamientos. La importancia de los dobles homocigotas es que no segregan y la población es uniforme. Con estas plantas es posible descartar rápidamente genes deletéreos, que en general están enmascarados por el efecto de la dominancia. Cerca del 90 % de las plantas haploides o dobles haploides son producidas a partir de cultivo de anteras (Gutiérrez et al., 2003). El éxito en la regeneración dependió de los genotipos, en arroz tipo indica, el porcentaje de éxito es menor al 3%, en cambio en los genotipos japónica, se obtuvieron porcentajes del orden del 30%. Las plantas regeneradas a partir de callo, fueron mantenidas *in vitro* hasta el mes de octubre y se llevaron a campo en noviembre.

Ejemplo 2: La importancia en la obtención de individuos triploides radica en que no producen semilla, y tampoco inducen la producción de semilla en otras variedades por polinización cruzada, por esta causa son una buena estrategia para la generación de nuevas variedades. El rescate de embriones *in vitro* y la citometría de flujo se utilizaron para la detección de individuos triploides. En el caso de las variedades monoembriónicas como Marisol, se obtuvo el 50% de embriones aproximadamente 700, y más de la mitad de éstos, regeneraron plantas que serán evaluadas por citometría de flujo. De los individuos regenerados a partir de semilla subdesarrollada, se obtiene un porcentaje variable entre 3 y 10% de individuos triploides que ingresan a un programa de evaluación.

Ejemplo 3: *Trifolium polymorphum* Poir, es una especie nativa diploide y anficárpica. En este ensayo se buscó evaluar distintos tratamientos para inducir la obtención de individuos tetraploides (4x) con el fin de incrementar la producción de materia seca. El único tratamiento efectivo en la inducción de individuos 4x, fue el de colchicina al 0,3% durante 24hrs. El porcentaje de duplicación fue del orden del 10%. Esta metodología se utiliza ampliamente en muchas especies (Schiffino and Moraes, 1987). El uso de alcaloides tales como la colchicina, con un efecto inhibitor del desarrollo del huso acromático, es el tratamiento más utilizado habitualmente para obtener individuos poliploides artificialmente. Las plantas 4x obtenidas están en proceso de evaluación.

## Bibliografía

- Gutiérrez A., Santacruz F., Cabrera J., y B.Rodríguez. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. E-Gnosis [on line] Vol1 art 4.1-19.
- Lentini Z., Martínez C y W. Roca. 1997. Cultivo de anteras de Arroz en el Desarrollo de Germoplasma. ISBN 958-9439-92-96 Publicación CIAT N° 293.
- Ollitrault P., Froelicher Y., Dambier D., Luro F., and M. Yamamoto. 2007. Citrus Genetics Breeding and Biotechnology (ed. IA.Khan) chap. 8 Seedlessness and Ploidy manipulation. p197-218.
- Schiffino M.T., and M.I. Moraes. 1987. Induction of polyploids and cytological characterization of autotetraploids of *Trifolium riograndense* Burbark (leguminosae). *Euphytica*, 36:863-972.
- Silva T. 2009. Indica Rice anther culture: can the impasse be surpassed? *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 89:123-135.

## APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA Y TRABAJO MULTIDISCIPLINARIO EN REDES INTERINSTITUCIONALES

De los Santos, Jorge<sup>1,2</sup>, Navajas, Elly A.<sup>1</sup>, Pravia, Maria I.<sup>1</sup>, Peraza, Pablo<sup>1</sup>, Mondelli, Mario P<sup>2</sup>

1. Instituto Nacional de Investigación Agropecuarias. Estación Las Brujas. Uruguay
2. Ministerio de Agricultura y Pesca, Oficina de Programación y Políticas Agropecuarias. Uruguay.

Palabras claves: Biotecnología, red interinstitucional, base de datos, uso de la información.

### Introducción

Características multidisciplinarias definen a la biotecnología y su aplicación. En la definición de biotecnología se encuentra implícito el uso de diferentes y variadas técnicas propias de ciencias de la vida tales como bioquímica, bióloga molecular, química entre otras. Por otro lado, los resultados obtenidos de la aplicación de estas técnicas impactan en las cadenas productivas en las etapas de producción agropecuaria, de transformación y elaboración de bioinsumos, y los servicios de soporte como medicina o información necesaria para la toma de decisiones en las etapas de producción y transformación. En este marco, el desarrollo de proyectos de base biotecnológica involucra recursos humanos de diferentes disciplinas. La conformación de redes de trabajo para desarrollar e implementar productos de base biotecnología es necesaria y relevante.

### Biotecnología y trazabilidad: interacciones y ramificaciones

Se presenta como caso de estudio el proyecto “Mejora de la competitividad de la ganadería uruguaya por el desarrollo de nuevas herramientas genómicas que mejoren la eficiencia de alimentación y la calidad de canal de la raza Hereford” (RTS\_1\_2012\_1\_3489). Este proyecto se diseña e implementa con un enfoque de trabajo en red entre seis organizaciones y cuenta con financiamiento de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) además de co-participación de las organizaciones miembro.

Para la ejecución de éste en el 2014 se avanzó en la consolidación de la red interinstitucional con la meta de fortalecer las sinergias e identificar posibles conflictos en cuanto al uso de la información y su aplicación, que interfieran con la ejecución del proyecto. La red está integrada por la Sociedad de Criadores de Hereford de Uruguay (SCHU), la Asociación Rural del Uruguay (ARU), el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), el Instituto Nacional de Carnes (INAC), el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Desde la formulación del proyecto se planteó el trabajo en red, donde participan instituciones públicas y privadas con diferentes organizaciones internas por lo que es necesaria la cohesión de los miembros. Las tres innovaciones propuestas en el proyecto son: (1) uso integrado de los sistemas de información ganadera, (2) mejora genética de la eficiencia de conversión del alimento y calidad de canal de la raza Hereford, y por último (3), articulaciones entre las organizaciones participantes tanto públicas como privadas.

Paralelo al sistema de trazabilidad grupal ganadero, Uruguay se plantea en 2004 un programa piloto de trazabilidad individual. En una primera instancia, el programa introdujo en forma ordenada los primeros identificadores de ganado, tales como caravanas y chips, con la participación y capacitación voluntaria de los productores (Osorio, 2009). Actualmente, todo el ganado nacional del país se encuentra trazado convirtiéndose en una poderosa fuente de

información para la toma de decisiones. Si bien en su origen el sistema de trazabilidad individual fue concebido con fines sanitarios, hoy en día se exploran otras aplicaciones.

La conjunción de bases de datos extraídos del SNIG, con la información recolectada por el Sistema Electrónico de Información de la Industria Cárnica (SEIIC) gestionada por INAC, con los datos genómicos, fenotípicos y genealógicos constituirán una población de entrenamiento que viabilizará el desarrollo de la selección genómica. El mejoramiento genético a través de la selección genómica es una de las aplicaciones antes mencionadas. Como resultado del proyecto, estarán disponibles a productores y cabañeros estimaciones del mérito genético (DEP, diferencia esperada en la progenie) de los reproductores para características de relevancia económica como son la eficiencia de conversión y calidad de canal y carne. Estas estimaciones, factibles a partir de la inclusión de la genómica, son la herramienta más precisa al momento de definir la selección de los reproductores más adecuado para cada empresa agropecuaria.

En la figura 1 se detallan los aportes generales de cada institución. El MGAP no solo participa con los aportes técnicos de las bases de datos de SNIG sino que por medio de la Oficina de Programación y Políticas Agropecuarias (OPYPA) oficia de marco político con la finalidad de articular las instituciones participantes. De forma general estas actividades se centran en dos cometidos: establecer reglas de gobernanza e identificación de posibles conflictos inherentes al trabajo en red. Los aportes de la SCHU y del sector representado por la ARU en términos de información genealógica y productiva son componentes fundamentales para la implementación de la herramienta genética en desarrollo, junto con los datos de la canal proveniente del SEIIC y el apoyo técnico de INAC en esta área. Estas bases de datos, junto con la información genómica, son sustrato fundamental para la investigación que llevan a cabo INIA y el IIBCE para la estimación de las DEP genómicas.

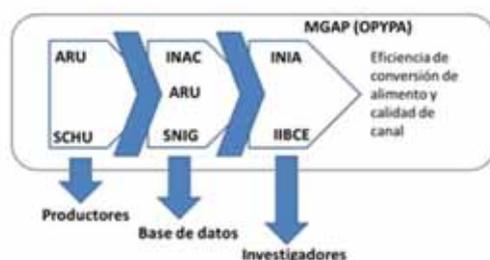


Figura 1. Esquema indicando las organizaciones participantes en el proyecto. Se resumen las principales interacciones y aportes generales de cada institución.

La conformación de bases de datos en las que diferentes instituciones de gestión pública y privada aporten sus conocimientos, productos y herramientas, con reglas claras de participación permitirán desarrollar no solo el presente proyecto si no otros de base tecnológica. La construcción de bases de datos que contemplen la información genética con la obtenida en el sistema de trazabilidad integral, puede dar lugar a varios y diversos proyectos de investigación que generen nuevas soluciones tecnológicas aplicables a las diferentes cadenas agroindustriales.

Desde el punto de vista de la gestión de la información una de las características de la red conformada, es la confianza de los miembros para aportar información, así como en el correcto uso y gerenciamiento de las nuevas bases de datos que se conformen.

### **Comentarios finales**

De la definición de biotecnología se desprende el carácter multidisciplinario de esta, así como el impacto transversal que tiene en diferentes áreas productivas. En este contexto de búsqueda de resolución de problema a partir de técnicas básicas, el trabajo en áreas biotecnológicas requiere expandirse, interactuar e integrar áreas del conocimiento clásicas como las ciencias agrarias con áreas intensivas de conocimiento tales como genómica y TICs. Para lograr estos cometidos se entiende necesario el uso de las herramientas generadas por las instituciones públicas y privadas así como la validación y gerenciamiento de las innovaciones resultantes.

A nivel de país, avances en el funcionamiento y gobernanza de esta red son fundamentales para la dinámica tecnológica nacional. Estos avances se suman a otras iniciativas nacionales de alianzas y redes de innovación que permiten potenciar las capacidades y sistemas de información para el desarrollo biotecnológico.

### **Bibliografía**

Osorio G., (2009).Trazabilidad Individual a campo. En “La experiencia de Uruguay en trazabilidad bovina”. Publicado por Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). pp 33 -a 37. ISBN 13: 978-92-9248-137-7

## EVALUACIÓN DE MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA Y FUNGICIDA EN SEMILLAS DE PLANTAS AUTÓCTONAS.

Maidana M.<sup>1</sup>, Murchio S.<sup>1</sup>, Vignale B.<sup>2</sup>, Zoppolo R.<sup>1</sup>, Leoni C.<sup>1</sup>, Dalla Rizza M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas. matiasmaidana@inia.uy

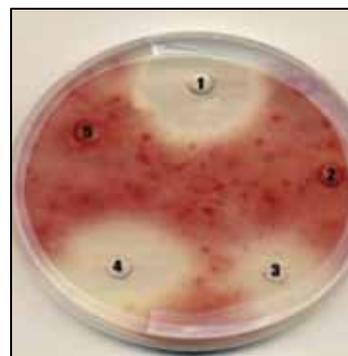
<sup>2</sup> Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto

### Introducción

En la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas se desarrolla un proyecto de investigación en péptidos con actividad antimicrobiana como una alternativa para el control de patógenos. El proyecto tiene tres componentes fundamentales: identificación y purificación de péptidos antimicrobianos, caracterización *in vitro/in vivo*, y escalado en la producción de péptidos antimicrobianos. El trabajo se centró en el diseño y planificación de una metodología simple y de bajo costo para la obtención de extractos proteicos de bajo peso molecular provenientes de semillas como aproximación a la identificación de péptidos. Este componente brinda la información primaria (MIC, MFC, caracterización molecular) para la búsqueda e identificación de péptidos con actividad antimicrobiana de posible aplicación tópica para el control de patógenos de post-cosecha.

### Materiales y Métodos

Las semillas evaluadas fueron: *Adesmia bicolor* (*Adesmia*), *Anethum graveolens* (*Eneldo*), *Coriandrum sativum* (*Coriando*), *Eugenia uniflora* (*Pitanga*), *Hexachlamis edulis* (*Ubajay*), *Ornithopus pinnatus* (*Ornitopus*), *Oryza sativa* (*Arroz negro*), *Paspalum notatum* (*Paspalum*), *Psidium cattleianum* Sab (*Arazá*), *Trifolium resupinatum* (*Trébol*), *Trifolium vesiculosum* (*Trébol*). Los patógenos seleccionados por su relevancia agronómica fueron *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Pseudomonas syringae*. Las semillas fueron molidas en frío hasta obtener harina. Posteriormente se les agregó buffer de extracción ácido-salino en relación 1:3 (Pellegrini, 2006). Se clarificó el extracto por centrifugación, se filtró en papel wattman y se guardó una alícuota de 5ml (Extracto crudo). El resto se utilizó para la precipitación proteica con acetona en dos etapas, primero con un volumen de acetona donde se logra precipitar proteínas de alto peso molecular (un volumen) y luego con seis volúmenes de acetona donde se obtienen proteínas de bajo peso molecular y péptidos (seis volúmenes). Con las muestras de los extractos proteicos obtenidos se procedió a la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana utilizando la técnica difusión en PDA (Fig 1). Se determinó la mínima concentración inhibitoria (MIC) utilizando las técnicas de microtitulación en placa de 96 pocillos (Díaz Dellavalle *et al* 2011;) (Fig 2). La Mínima Concentración Fungicida (MFC) de aquellas fracciones activas se determinó según la técnica descrita por Díaz Dellavalle y colaboradores (Fig 3).



**Figura 1:** Ensayo de inhibición extractos de Arazá a 1mg/mL en PDA con esporas de *F.oxysporum*. 1- Captan 0,2 mg/mL. 2- Extracto un volumen. 3- Extracto seis volúmenes. 4- Extracto crudo; 5- H<sub>2</sub>O mQ

## Resultados

En la Tabla 1 se resumen los resultados de MIC para cada extracto de semilla evaluada frente a los patógenos previamente mencionados. Los extractos de semillas que mostraron actividad inhibitoria mayor en el extracto seis volúmenes frente a *F.oxysporum* fueron Adesmia, Arazá y Arroz negro con un MIC de 125 µg/mL. De la misma manera Adesmia, Arazá, Ornithopus, Arroz negro y Ubajay presentaron un MIC en algunos casos sensiblemente menor de 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 125 µg/mL y 31,25 µg/mL respectivamente contra *P. digitatum* y *P. italicum*. Por otro lado los extractos seis volúmenes de Arroz negro, Ornithopus, Pitanga y Ubajay presentaron actividad inhibitoria contra *P. syringae* con un MIC de 125 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL y 125 µg/mL respectivamente.

Tabla 1. Datos de MIC para cada semilla evaluada frente a hongos fitopatógenos

	Nombre común	<i>F.oxysporum</i>			<i>P. digitatum</i>			<i>P. italicum</i>			<i>P. syringae</i>		
		Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)	Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)	Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)	Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)
1	Adesmia	31,25	1000	125	> 31,25	1000	62,5	31,25	-----	> 62,5	-----	-----	-----
2	Arazá	31,25	-----	125	62,5	-----	125	62,5	-----	< 125	-----	-----	-----
3	Arroz negro	16,25	-----	> 125	31,25	-----	125	15,65	-----	62,5	250	500	125
4	Coriando	500	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	Eneldo	-----	-----	-----	31,25	-----	-----	31,25	-----	-----	125	-----	-----
6	Ornithopus	1000	-----	1000	15,65	1000	31,25	15,65	1000	31,25	250	-----	125
7	Paspalum	1000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	Pitanga	>31,25	-----	-----	62,5	-----	-----	< 62,5	-----	-----	125	-----	62,5
9	Trebol blanco	1001	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
10	Trebol rojo	500	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11	Ubajay	16,25	-----	250	15,65	1000	31,25	>15,65	1000	>31,25	250	1000	125

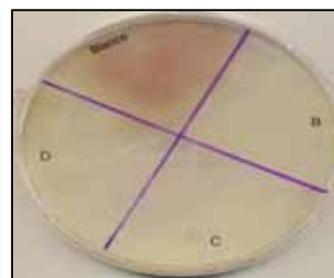
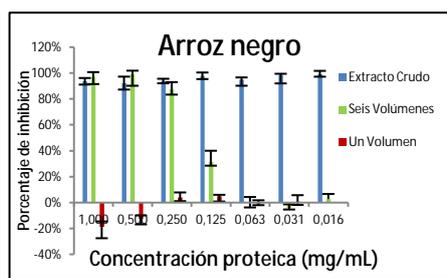
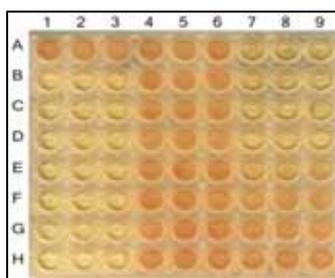


Figura 2. Izquierda: bioensayo para la determinación del MIC empleando extractos de Arroz negro y *F.oxysporum*. En pocillos A1-A6 control de crecimiento en agua.; A7-A9 Captan 0,2mg/mL; B1-B3 Extracto crudo 1mg/mL; B4-B6 Extracto un volumen 1mg/mL. B7-B9 Extracto seis volumen 1mg/mL. Pocillos de C a la H diluciones seriadas al medio. Derecha, Gráfico de dosis respuesta a tiempo final 48 hs. Extractos de Arroz negro contra *F.oxisporum*

Figura 3. Ensayo de MFC para extractos de Arroz negro empleando *F.oxysporum*. A: control de crecimiento; B 20µL de pocillo B-8; C 20µL de pocillo C-8; D 20µL de pocillo D 8.

## Conclusiones

De los resultados obtenidos se concluye que de 11 especies evaluadas hay cinco que presentaron una marcada actividad antimicrobiana frente a más de un patógeno evaluado. Los valores de MIC para la cinco especies activas están comprendidos entre 0,0312 mg/mL (Ubajay contra *P. digitatum*) y 1mg/mL (Ornitopus contra *F.oxysporum*), resultando alguno de estos muy promisorios para un trabajo posterior de identificación del factor tóxico. Se resalta además que en el extracto de arroz negro se encontró actividad fungicida del crecimiento miceliano.

## Referencias

Díaz Dellavalle P, Cabrera A, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, Dalla Rizza M (2011) Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus Alternaria spp. Chilean Journal of Agricultural Research 71: 231-239

Pelegri PB, Noronha EF, Muniz MAR, Vasconcelos IM, Chiarello MD, Oliveira JTA, Franco OL (2006) An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Proteins and Proteomics* 1764: 1141-1146

## AVANCES HACIA LA SELECCIÓN GENÓMICA EN BOVINOS DE CARNE: DEL DICHO AL HECHO

Navajas, E.A. \*, Aguilar, I., Ravagnolo, O., Lema, M., Peraza, P.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Las Brujas, Canelones, 90200, Uruguay.

\*E-mail: [enavajas@inia.org.uy](mailto:enavajas@inia.org.uy)

**Palabras claves:** selección genómica, bovinos

### Selección genómica y población de entrenamiento

El mejoramiento genético animal por selección se base en la identificación, y posterior uso de los reproductores genéticamente superiores para las características relevantes económicamente en los sistemas de producción. Las principales razas bovinas y ovinas cuentan en Uruguay con predicciones de las Diferencias Esperadas en la Progenie (EPD, del inglés *expected progeny difference*) para dichas características, las cuales se encuentran disponibles para productores y cabañeros en el momento del año en que se seleccionan los progenitores de la siguiente generación.

El término selección genómica hace referencia a las decisiones de selección basadas en la utilización de EPD genómicos que son calculados utilizando información de marcadores moleculares que cubren todo el genoma (Meuwissen et al., 2001), como son los nucleótidos de polimorfismo simple (SNP). La selección genómica permite aumentar las tasas de progreso genético por un aumento de la precisión de la predicción del mérito genético a una edad más temprana. Además la selección genómica permite contar con EPD genómicos para características que afectan las rentabilidad pero cuya medición es difícil, cara o solo posible en parientes de los toros. Este es el caso de la eficiencia de conversión, resistencia genética a enfermedades y calidad de canal y carne. La predicción genómica está basada en la información que proveen las poblaciones de entrenamiento, las cuales están constituidas por aquellos animales de los cuales contamos con datos genómicas y registros de las características de interés.

### Un poco de historia

La selección genómica es una tecnología desarrollada recientemente que está revolucionando el mejoramiento genético animal y cuya adopción por el sector productivo ha sido acelerado. El caso extremo es la raza Holando en la cual la primer evaluación genética que incluyó información genómica fue realizada en 2009, 12 meses luego que el primer panel para bovinos conteniendo 50 mil SNP estuvo disponible a nivel comercial. Actualmente está también en marcha en razas de carne en Estados Unidos y Australia, así como en los programas de mejoramiento de aves y cerdos.

El INIA ha apostado a la investigación en genómica animal y su integración en el mejoramiento genético, siendo la creación del Banco de ADN genómico animal en convenio con la Asociación Rural en el 2010 un paso significativo hacia la consolidación de este proceso. En el Plan Estratégico Institucional actual, el Instituto enfatiza la

relevancia de fortalecer las capacidades nacionales para el desarrollo de metodologías y selección genómica que potencien el mejoramiento genético convencional.

En este contexto se inicia la integración de recursos humanos para apoyar este proceso y la formulación de proyectos específicos orientados a la formación de las poblaciones de entrenamiento, teniendo como desafío importante la implementación de la selección genómica. Se han considerado las poblaciones de entrenamiento tanto para las características ya en las evaluaciones genéticas como aquellas cuya dificultad de medición implica del uso de la genómica para viabilizar la selección por ellas.

### **Poblaciones de entrenamiento para selección genómica en bovinos**

La raza Hereford de Uruguay está hoy muy próxima a publicar los primeros EPD genómicos en el marco de la Evaluación Genética Panamericana de la raza, que incluye características como peso al nacer, peso al destete, peso a los 18 meses, habilidad lechera, área del ojo del bife, espesor de grasa, circunferencia escrotal, facilidad de parto directa y facilidad de parto materna. En una primera instancia se recolectaron muestras para la extracción de ADN y posterior genotipado de 400 animales que contaban con EPD en la evaluación. Estudios realizados en conjunto con las poblaciones de entrenamiento de los demás países (Estados Unidos, Canadá y Argentina), y junto a la Universidad de Iowa, mostraron que era importante aumentar la población de entrenamiento para mejorar las precisiones de las DEP genómicas (Saatchi et al., 2013). Consecuentemente, se incrementó la población de entrenamiento a 1000 animales, lo que hoy ha habilitado la concreción de DEP genómicos para los reproductores de origen uruguayo.

Además de las características en la evaluación, en enero de 2014 se inició la formación de la población de entrenamiento de 1000 toritos y novillos para eficiencia de conversión de alimento y calidad de canal y carne, en el marco del proyecto "Mejora de la competitividad de la ganadería uruguaya por el desarrollo de nuevas herramientas genómicas que mejoren la eficiencia de alimentación y la calidad de canal de la raza Hereford". Los datos de calidad de canal y carne se sumarán a un proyecto anterior basado en el genotipado de muestras de ADN de un experimento en la raza Hereford en el cual se usaron padres relevantes de la población (Grasso et al., 2014).

Un proceso similar se ha iniciado este año con la Sociedad de Criadores de Aberdeen Angus del Uruguay para la formación de la población de entrenamiento para las características de la evaluación. En un primer relevamiento ya se cuentan con 1500 muestras de la raza disponibles en la ARU, que será complementado con muestras de semen de toros relevante en las cabañas. Se iniciarán también la población de entrenamiento de la raza Holando.

### **Comentarios finales**

Los avances en la formación de poblaciones de entrenamiento, como paso clave para la implementación de selección genómica han sido acompañados por progresos en el establecimiento de bases de datos y su conexiones entre el Banco de ADN, estudios

preliminares de asociación utilizando diferentes metodologías, uso de la información en estudios de imputación y determinación de parentesco.

Los pasos a futuro implican la instrumentación del flujo de muestras y datos genómicos que viabilicen su incorporación en las evaluaciones genéticas y explorar nuevas áreas de investigación incluyendo nuevos atributos y la integración de resultados de otras "ómicas" al mejoramiento genético en bovinos.

### **Bibliografía**

Meuwissen, T.H.E., Hayes, B., and Goddard, M.E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819-1829.

Saatchi, M., Ward, J, and Garrick, D.J. 2012. Accuracies of direct genomic breeding values in Hereford beef cattle using national or international training populations. *Journal of Animal Science* 91: 1538-1551.

Grasso, N., Aguilar, I., Clariget, J., Lema, M., Brito, G., Navajas, E.A. 2014. Genomics of carcass and meat quality traits in Hereford – preliminary results. *Proceedings of 60<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology*, 17-22<sup>nd</sup> August 2014. Uruguay.

**Agradecimientos.** A la ANII por el apoyo a los proyectos RTS\_1\_2012\_3489 y FMV\_1\_2011\_6671 así como a todas las organizaciones públicas y privadas socias.

## CONSANGUINIDAD MOLECULAR EN OVINOS CRIOLLOS URUGUAYOS

Pieruccioni, F.<sup>1\*</sup>, Macedo, F.<sup>2</sup>, Ciappesoni, G.<sup>1</sup>, Navajas, E.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Las Brujas, Canelones, 90200, Uruguay.

<sup>2</sup> Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, Montevideo, 11600, Uruguay.

\* E-mail: [florpieruccioni@gmail.com](mailto:florpieruccioni@gmail.com)

**Palabras claves:** tramos de homocigosis, diversidad genética, *Ovis aries*

### Introducción

La consanguinidad molecular es la probabilidad de que un determinado individuo tenga los dos alelos de un locus idénticos en estado (Toro et al., 2011). La consanguinidad es un importante parámetro en el estudio de la variabilidad genética y la depresión endogámica (Falconer y Mackay, 1996), que aumenta el riesgo de extinción.

Los grandes avances realizados en tecnologías de genotipado masivo y el desarrollo de paneles (chips) densos de polimorfismos de nucleótido simple (SNP), han permitido la implementación de nuevas medidas de diversidad genética tales como los tramos de homocigosis (ROH, runs of homozygosity) (Purfield et al., 2012; Bjelland et al., 2013). Los ROH se utilizan para estimar la consanguinidad, siendo los tramos largos (>10000kb) generados por una consanguinidad reciente, mientras que los segmentos cortos (<5000kb) reflejan consanguinidades lejanas (Purfield et al., 2012; Bjelland et al., 2013). El tamaño de los ROH indican recientes o antiguos cuellos de botella u otros eventos asociados con la consanguinidad (Bosse et al., 2012).

Los ovinos Criollos de Uruguay se encuentran clasificados en riesgo de extinción, según los criterios establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2010). El objetivo de este trabajo fue estimar la consanguinidad molecular en base a los ROH en el rebaño de ovinos Criollos del Parque Nacional de San Miguel, utilizando tres longitudes mínimas.

### Materiales y Métodos

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular utilizando tubos con EDTA del rebaño de ovinos Criollos localizado en el Parque de San Miguel, supervisado por el Servicio de Parques del Ejército. La extracción de ADN siguió el protocolo de Sambrook modificado (Sambrook et al., 1989), en la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas. El estudio se realizó en base al genotipado con paneles de 606.000 SNP (AgResearch, Nueva Zelanda), de 174 animales, que representan el 59 % de la población existente. Los análisis se realizaron utilizando el software GoldenHelix SNP & Variation Suite (SVS) (GoldenHelix Inc., Bozeman, MT, USA). La calidad de la información genómica se evaluó a través de los valores de call rate por muestra (umbral superior a 95%), y por SNP (umbral superior a 90%).

Para la determinación de los ROH, se consideraron tres longitudes mínimas en kilobase (kb): 250, 500 y 1000, con un umbral mínimo de 25 SNP homocigotos consecutivos. En base a los ROH de todos los individuos, se calcularon la longitud media y el número de ROH, para cada longitud mínima considerada.

El coeficiente de consanguinidad ( $F_{ROH}$ ) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$F_{ROH} = \sum_k \text{longitud} (ROH_k) / L$$

donde, k es el número de ROH identificado para cada animal y L la longitud total del genoma (4.271.655.307 pares de bases).

## Resultados y Discusión

Del total de las muestras genotipadas 158 muestras y 562.294 SNP cumplieron los criterios de calidad. En el Cuadro 1 se presenta el coeficiente de consanguinidad, la longitud media y el número de ROH, para las diferentes longitudes mínimas.

**Cuadro 1.** Estadísticas descriptivas del coeficiente de consanguinidad ( $F_{ROH}$ ), longitud media y número de ROH, según las diferentes longitudes (250, 500 y 1000 kb).

Longitud mínima (kb)	$F_{ROH}$		Longitud de los ROH (kb)		Número de ROH		
	Media	Desvío estándar	Media	Media	Mínimo	Máximo	
250	0,1775	0,0229	1695	450	374	538	
500	0,1600	0,0242	3026	226	183	325	
1000	0,1483	0,0244	4139	158	120	235	

La longitud mínima para la identificación de un ROH tiene relación directa e inversa con la longitud media y el número de los mismos, respectivamente. Por otro lado, no se encontraron grandes variaciones en la proporción de genoma cubierta por ROH para los diferentes umbrales establecidos. En términos generales, al aumentar el umbral se incrementó la longitud media de los ROH, pero se redujo el número de ROH identificados.

Los niveles de  $F_{ROH}$  sugieren un relativo bajo nivel de homocigosis que varía entre 15% y 18%, dependiendo del largo del ROH. La longitud de los ROH sugiere que la consanguinidad es de origen lejano, debido a que la media de la longitud de los ROH es menor a 5000 kb.

## Conclusiones

La consanguinidad molecular estimada media de los ROH fue menor a la que se espera obtener en una población con censo reducido como es el caso de los ovinos Criollos, lo cual resulta alentador desde el punto de vista de la conservación de este recurso. Los resultados presentados se complementarán con estudios adicionales sobre la distribución del tamaño de los ROH a lo largo del genoma y su capacidad predictiva de la depresión endogámica.

## Bibliografía

Bjelland D, Weigel K, Vukasinovic N, Nkrumah J. 2013. Evaluation of inbreeding depression in Holstein cattle using whole-genome SNP markers and alternative measures of genomic inbreeding. *Journal Dairy Science*, 96 :4697– 4706.

Bosse M, Megens H, Madsen O, Paudel Y, Frantz L, Schook L, Crooijmans R, Groenen M. 2012. Regions of Homozygosity in the Porcine Genome: Consequence of Demography and the Recombination Landscape. *PLOS Genetics*, 8 (11).

FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación Roma.

Falconer D, Mackay F. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. (Eds.) 4. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.

Purfield D, Berry D, McParland S, Bradley D. 2012. Runs of homozygosity and population history in cattle. *BioMed Central Genetics*, 13(70).

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Eds) 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SVS Golden Helix ([www.goldenelix.com/SNP\\_Variation/SNP\\_Analysis\\_Package/index.html](http://www.goldenelix.com/SNP_Variation/SNP_Analysis_Package/index.html)). Consultado 10 de octubre de 2014. Disponible en: [http://www.goldenelix.com/SNP\\_Variation/SNP\\_Analysis\\_Package/index.html](http://www.goldenelix.com/SNP_Variation/SNP_Analysis_Package/index.html)

Toro M, García-Córtés L, Legarra A. 2011. A note on the rationale for estimating genealogical coancestry from molecular markers. *Genetics Selection Evolution*. 43:27.