

AVANCES Y POTENCIALIDADES DE LA BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR EN LA SANIDAD FORESTAL

Diego Torres Dini

Introducción

Históricamente la caracterización de patógenos se ha realizado en base a las características macro y micromorfológicas de las muestras colectadas a campo, o de los cultivos obtenidos de los materiales afectados. Sin embargo, la alta similitud en los caracteres morfológicos, la baja tasa de crecimiento y la limitada capacidad de esporulación de algunos de estos hongos en medio de cultivo dificultan muchas veces la identificación precisa.

Las técnicas de biología molecular basadas en PCR son una herramienta que complementan los análisis taxonómicos y tienen la ventaja de ser independientes de las características morfológicas y síntomas producidos en el hospedero. A nivel del ADN la diferencia entre las distintas especies es analizada según las distintas combinaciones de A, C, T y G que representan las cuatro bases del código genético (Figura 1). Estas metodologías a su vez tienen un gran potencial de uso en el diagnóstico, ya que reducen el tiempo del análisis a unas pocas horas. Adicionalmente pueden ajustarse para la detección en muestras colectadas en distintos puntos la cadena de producción (semillas, vivero, plantaciones o la propia madera).

Una vez determinado el patógeno en cuestión, puede ser empleado en la caracterización de germoplasma resistente. A su vez esta información resulta útil desde el punto de vista biotecnológico, para el desarrollo de mapas de ligamiento genético que faciliten la selección en los procesos de mejoramiento genético.

Identificación del Patógeno problema

El grado de variabilidad genética a evidenciar es el punto de partida de todo análisis molecular. Dependiendo de las características y el grado de conocimiento previo del problema, se puede plantear como objetivo: determinar el género, la especie(s) o las cepas en cuestión. Actualmente en nuestro país se están empleando estas metodologías para caracterización de mycosphaerellas, teratosphaerias, Puccinia psidii etc

En la caracterización de especies han sido ampliamente usadas la secuenciación del ARN ribosomal, como el ITS, IGS o LSU (White et al 1990; Gardes et al 1993). También se puede optar por ir aumentando el grado de resolución llegando a identificar a nivel genético entre las variantes (o cepas), de un mismo patógeno. En este caso resulta de gran utilidad usar marcadores hipervariables a nivel molecular, como los microsatélites o SSR (Zhong et al 2007, Hunter et al 2006).

De esta manera se identifica el problema, integrando la información molecular con la información fenotípica, obtenida de la caracterización morfológica. Asociando un patrón molecular para cada uno de los aislamientos obtenidos, facilitando así su identificación.

Evaluación de Germoplasma.

Una vez identificado el patógeno se pueden realizar ensayos de inoculación evaluando así como reaccionan los diferentes clones ante la enfermedad. De esta manera se pueden determinar cuales son las cepas más agresivas y cuales son los clones más resistentes. Esta información resulta muy valiosa para mejoramiento genético ya que permite determinar cuales son los materiales más promisorios. A su vez estos datos pueden ser utilizados como insumos en el desarrollo de estrategias de mejoramiento que permitan obtener más información acerca del mecanismo de resistencia.

Por ejemplo cruzando un clon resistente con uno susceptible se genera una progenie segregante la cual es nuevamente caracterizada por inoculaciones con el patógeno. De esta manera se puede inferir si se está ante una resistencia de tipo monogénica (asociada a un solo gen) o poligénica (varios genes implicados). En caso

de estar ante una resistencia monogénica tienden a predominar dos estados contrastantes en la descendencia conocidos como resistencia (R) o susceptibilidad (S) (Torres-Dini 2004; Dalla Rizza 2006). En caso de ser una resistencia de tipo poligénica predominan los estados intermedios. Contar con una población segregante fenotípicamente caracterizada, permite la construcción de mapas de ligamiento genético y la identificación de marcadores para la selección asistida (MAS).

Construcción de Mapas de Ligamiento.

Estos se realizan con el fin de identificar puntos en el Genoma asociados a características fenotípicas de interés para el mejoramiento como ser: resistencia, calidad de madera, DAP etc (Junghans et al 2003; Thamarus et al 2004; Novaes 2007). Una vez identificados estos puntos, se podrán utilizar como marcadores moleculares en la selección asistida.

Para construir un mapa de ligamiento se necesita:

- Contar con una buena metodología caracterización fenotípica, en el caso de sanidad mediante inoculaciones con el patógeno.
- Una población de mejora, resultado de un cruzamiento controlado entre individuos fenotípicamente contrastantes, para la característica de interés, en el caso de sanidad un cruzamiento de RxS.
- Marcadores moleculares hipervariables y de amplia distribución en el genoma.

Una vez que se reúnen todos estos elementos se puede aplicar el marco teórico que sustenta la construcción de los mapas de ligamiento. El mismo surge de la genética tradicional, más precisamente de las leyes de Mendel (Figura 2).

Equilibrio de Ligamiento: cuando genes de poblaciones segregan de manera totalmente independiente uno del otro. La frecuencia de recombinación de estos dos marcadores es exactamente de 50%. Por lo que no se puede determinar si están en puntos distantes de un mismo cromosoma o en cromosomas separados.

Desequilibrio de Ligamiento: propiedad de algunos marcadores de las poblaciones genéticas de no segregar de forma independiente, o sea que poseen una frecuencia de recombinación menor del 50%. Esto se debe a que los dos marcadores se encuentran físicamente cerca en el mismo cromosoma, lo que imposibilita su transferencia a la progenie de manera aleatoria. Es precisamente este concepto el que se usa para construcción de mapas de ligamiento.

Si contamos con un amplio número de marcadores, equitativamente distribuidos a lo largo del genoma, podemos generar mapas de alta densidad. O sea, mapas en los cuales la distancia entre un marcador y el siguiente es muy estrecha (Petroli 2010; Sansaloni 2010a). La unidad empleada para medir la distancia es el CentiMorgan (1 CM equivale a un 1% de recombinación entre dos marcadores). Por ejemplo en *Eucalyptus grandis* se identificó el gen Ppr1 que confiere resistencia a *Puccinia psidii* mediante esta metodología. Dicho gen confiere resistencia monogénica y segrega junto con un marcador molecular estrechamente ligado a 3,6 CM. Dicho marcador ha sido usado para asegurar la presencia de Ppr1 en ensayos de introgresión (Figura 3; Junghans et al 2003; Mamani et al 2010).

Mediante la incorporación de mapas de ligamiento en los programas de mejoramiento genético se logra un conocimiento más profundo de la población de mejora. Al analizar como segregan los fenotipos y asociarlos a los marcadores con los que estén más estrechamente ligados en la progenie. Una vez identificados estos marcadores pueden emplearse en las próximas generaciones como marcadores de selección asistida (Torres-Dini 2004; Dalla Rizza et al 2006), reduciendo así los tiempos del mejoramiento y aumentando la productividad (Grattapaglia & Kirst 2008, Sansaloni 2010b).

Selección asistida por marcadores (MAS).

Esta es una de las principales aplicaciones de la biotecnología molecular, se puede aplicar a cualquier característica fenotípica. En los programas de mejoramiento se puede tardar varios años hasta que se pueda desarrollar la selección fenotípica. Sin embargo existen antecedentes de programas forestales que mediante el empleo de MAS lograron reducir a semanas los tiempos de selección, en características como calidad de madera (Figura 4; Grattapaglia com pers; Novaes 2007). En la evaluación de germoplasma resistente a *Puccinia Psidii* también han sido utilizadas estas herramientas. Mas precisamente mediante en monitoreo del gen de resistencia *Ppr1*, asegurando así la obtención de clones resistentes (Figura 3; Junghans et al 2003; Mamani et al 2010).

Discusión

La biotecnología molecular contribuye así a generar un mayor conocimiento del problema sanitario. Dicha información surge del abordaje interdisciplinario junto disciplinas como la fitopatología y mejoramiento genético.

Los avances en el campo de la Biotecnología se incorporan a la mejora genética tradicional, y la fitopatología. Generando un conocimiento mucho más profundo sobre las interacciones árbol patógeno (Torres-Dini 2010). A través del estudio de las relaciones existentes entre la variabilidad genética a nivel del ADN y la diversidad fenotípica observada tanto a nivel de enfermedades como del germoplasma resistente. Para lograr el máximo aprovechamiento de la variabilidad fenotípica natural del genero *Eucalyptus*, no solo se requerirá de incorporar estas nuevas herramientas, sino además un trabajo multidisciplinario profundamente interconectado con los ensayos de campo, el mejoramiento genético y el aporte de otras disciplinas (Grattapaglia 2004).

Bibliografía

- Gardes, M., and T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, no. 2: 113–118.
- Grattapaglia, D. 2004. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. *Genetics and Molecular Research* 3: 369-379.
- Grattapaglia, Dario, and Matias Kirst. 2008. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytologist* 179, no. 4: 911-929.
- Hunter, G. C, M. N Cortinas, B. D Wingfield, P. W Crous, and M. J Wingfield. 2006. Development of polymorphic microsatellite markers for the *Eucalyptus* leaf pathogen *Mycosphaerella nubilosa*. *Molecular Ecology Notes* 6, no. 3: 900–903.
- Junghans, D.T., A.C. Alfenas, S.H. Brommonschenkel, S. Oda, E.J. Mello, and D. Grattapaglia. 2003. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 108, no. 1 (December 1): 175-180.
- Mamani, E, Bueno, N, Faria, D, Guimarães, L, Douglas, L, Alfenas A, and Grattapaglia, D. 2003 Positioning of the major locus for *Puccinia psidii* rust resistance (*Ppr1*) on the *Eucalyptus* reference map and its validation across unrelated pedigrees. *Tree Genetics & Genomes*.

- Novaes, Evandro. 2007. Mapemamento de QTLs para qualidade da madeira em *Eucalyptus grandis* X. e *Urophilla* e ancoragem de clones BAC no mapa genético. Tesis de Maestria, Universidad de Vicosá.
- Petroli, C. 2010. Conceptos de Ligamiento recombinación y mapeo: Mapas de ligamiento con Marcadores Moleculares. Asunción, Paraguay.
- Dalla Rizza, M. Vilaró F, Torres-Dini D, and Maeso D. 2006. Detection of PVY extreme resistance genes in potato germplasm from the Uruguayan breeding program. *American Journal of Potato Research* 83, no. 4: 297–304.
- Sansaloni, C. 2010. Mapeo de Genes Simples - BSA Mapeo de QTLs - Mapeo de asociación. Asunción, Paraguay.
- Sansaloni, C, Petroli, C, Carling, J, Hudson, CJ, Steane, DA, Myburg, A, Grattapaglia, D, Vaillancourt, RE, and Kilian, A. 2010. A high-density Diversity Arrays Technology (DART) microarray for genome-wide genotyping in *Eucalyptus*. *Plant Methods* 6, no. 1: 16.
- Thamarus, K., K. Groom, A. Bradley, C. A Raymond, L. R. Schimleck, E. R Williams, and G. F Moran. 2004. Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib pedigrees of *Eucalyptus globulus*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 109, no. 4: 856–864.
- Torres-Dini D. 2004. Detección de Resistencia extrema a PVY en papa. Montevideo: Facultad de Ciencias. UDELAR.
- Torres-Dini D. 2010. Avances y potencialidades de los marcadores moleculares en la genética forestal. *Revista de la Sociedad de Productores Forestales*.
- White, T.J, T. D. Bruns, S Lee,, and J Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. Vol. 38.
- Zhong, S., B. Yang, and A. C ALFENAS. 2008. Development of microsatellite markers for the guava rust fungus, *Puccinia psidii*. *Molecular Ecology Resources* 8, no. 2: 348–350.