BV33

**Evaluación** **de las potencialidades del método de *Genotyping by Sequencing* (GBS-ddRADseq) para el Mejoramiento Asistido de *Eucalyptus dunnii***

Aguirre, N.1,2; Filippi, C. 1,2; Acuña, C. 1; Villalba, P. 1,2; Martinez, C. 1; Rivas, G. 1; García, M. 1,2; López, J. 3, López, A. 3, Oberschelp, J. 4, Harrand, L. 4; Puebla, A. 1; Paniego, N. 1,2; Hopp, E. 1; Rivarola, M 1,2; Marcucci Poltri, S. 1. Email:  aguirre.natalia@inta.gob.ar

1) Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA; 2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. 3) EEA INTA Bella Vista. 4) EEA INTA Concordia.

En la Mesopotamia Argentina se localiza el polo forestal más importante del país, siendo *Eucalyptus* uno de los géneros mayormente implantados y *E. grandis* su especie más difundida. En los últimos años, las heladas han sido más habituales e intensas en esta región, lo que afecta al desarrollo temprano de plantaciones de *E. grandis*. Por este motivo, el programa de mejoramiento forestal del INTA propone como alternativa, en sitios de alta posibilidad de daño, a *E. dunnii* por su mayor tolerancia a bajas temperaturas, y aunque presenta menor aptitud para usos como madera sólida, estos caracteres muestran gran variación entre individuos posibilitando su mejoramiento genético. Debido a los largos ciclos del mejoramiento forestal, la caracterización de las poblaciones con marcadores genómicos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), conjuntamente con las evaluaciones fenotípicas, permitirá incrementar la ganancia genética por unidad de tiempo debido a una mayor exactitud de los valores de mejora y una reducción en el tiempo de dichos ciclos, respecto del proceso convencional.

El presente trabajo muestra la optimización de la detección de SNPs mediante el método de GBS-ddRADseq, puesto a punto anteriormente, y la caracterización de sus potencialidades para su aplicación en el mejoramiento molecular de *E. dunnii*.

Se generaron 24 genotecas de GBS-ddRADseq mediante la digestión de ADN genómico con *SphI* y *MboI*, su ligación incorporando 24 adaptadores con *barcodes* optimizados y la secuenciación a baja profundidad (140000 *reads* promedio, *MiSeq*, *Paired End* 250pb, 10% del protocolo original) de fragmentos de entre 310 a 410 pb.

Se evaluaron dos métodos para la búsqueda de SNPs con el paquete bioinformático *Stacks v1.41*. En el primero, se utilizó el genoma de *E. grandis* *v2.0*, donde mapearon un promedio de 83% de las secuencias de cada muestra en los 11 grupos cromosómicos (*software Bowtie-2,* parámetros *default*), y se encontraron 99128 SNPs en 29955 regiones polimórficas (3,3 marcadores por región). El segundo método consistió en un análisis *de novo*, donde se identificaron 106974 SNPs en 44764 regiones polimórficas (2,4 marcadores por región).

La optimización realizada permitió genotipificar 24 muestras en simultáneo (aumentando las capacidades de multiplexado previas a más de mil), minimizar el uso de reactivos, simplificar el protocolo, y generar miles de marcadores moleculares. Fue posible la identificación de SNPs con y sin el genoma de referencia, obteniendo un número mayor de marcadores en el análisis *de novo*, lo que podría estar indicando que son exclusivos de *E. dunnii*. Los marcadores generados con la totalidad de una población de mejoramiento y a la profundidad de secuenciación recomendable, serán empleados en estrategias de Mapeo por asociación y Selección Genómica para características maderables de interés.