



IX Reunión GeMFo

Comunicaciones Científicas

Sáenz Peña, Chaco, Argentina
20 al 22 de septiembre de 2022

ISBN: 978-987-88-6537-9

Grupo de Genética y Mejoramiento Forestal

IX Reunión GeMFo

**Sáenz Peña, Chaco, Argentina
20 al 22 de septiembre de 2022**

Editor/Compilador:

Juan Adolfo López



IX Reunión GeMFo
Comunicaciones Científicas

Diseño de portada:
Juan Adolfo López

Comisión Organizadora

Dr. Leonardo Gallo
INTA-EEA Bariloche

Dra. Cintia Acuña
INTA-Instituto de Biotecnología

Dr. Eduardo Cappa
INTA-Instituto de Recursos Biológicos

Dr. Javier Oberschelp
INTA-EEA Concordia

Dr. Diego López Lauenstein
INTA- Instituto de Fisiología y
Recursos Genéticos Vegetales

Ing. Ftal. (Mg.) Marcos Atanasio
INTA-EEA Sáenz Peña

IX Reunión GeMFo / Natalia Cristina Aguirre ... [et al.] ; compilación de Juan Adolfo López; editado por Juan Adolfo López. - 1a ed. - Bella Vista : Juan Adolfo López, 2022.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-88-6537-9

1. Genética Vegetal. 2. Árboles. 3. Especies Forestales. I. Aguirre, Natalia Cristina.
II. López, Juan Adolfo, comp.
CDD 581.35

ISBN 978-987-88-6537-9



Libro de edición Argentina.

Todos los derechos reservados. No se permite la reproducción total o parcial, la distribución o la transformación de este libro, en ninguna forma o medio. Ni el ejercicio de otras facultades reservadas sin el permiso previo y escrito del editor. Su infracción está penada por las leyes vigentes.

ÍNDICE

Respuesta del pino híbrido a las heladas invernales en función las condiciones de microsítio y caracteres de crecimiento. Hybrid pine response to winter frosts as a function of microsite conditions and growth characteristics. Schoffen, C.; Bulfe, N.; Belaber, E.; Gauchat, M. E.; Martínez Meier, A.	5
Respuestas fisiológicas y bioquímicas a la restricción hídrica en eucalipto: relación con la tolerancia a la congelación y la sequía. Physiological and biochemical responses to water restriction in Eucalypts: relationship to freezing and drought tolerance. Oberschelp, G.P.J.; Salto, C.S., Harrand, L.; Margarit, E.	9
Organogénesis <i>in vitro</i> en clones comerciales de Eucalipto de INTA. <i>In vitro</i> organogenesis of <i>Eucalypts</i> commercial clones from INTA. Ayala, P.G.; Vivas, V.L.; Sansberro, P. A.; Harrand, L.; Oberschelp, G.P.J.	13
Daño por heladas y crecimiento de <i>Corymbia</i> spp. al segundo año de edad en Concordia, Entre Ríos, Argentina. Frost damage and growth rate of 2-year-old <i>Corymbia</i> spp. in Concordia, Entre Ríos, Argentina. Gimenez, C.A.; Harrand, L.; López, J.A.; Martínez-Meier, A.	17
Tamaño mínimo muestral para caracteres anatómicos de <i>Corymbia torelliana</i> (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson. Minimum sample size for anatomical traits of <i>Corymbia torelliana</i> (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson. Gimenez, C.A.; Bruno, C., López, J.A.; Martínez-Meier, A.	21
Propagación vegetativa de tres taxones de <i>Corymbia</i> spp. (eucaliptos amarillos) a partir de brotes juveniles. Vegetative propagation of three taxa of <i>Corymbia</i> spp. (spotted gum) from juvenile shoots. Vera Bravo, C.D.; Balbín Marticorena E.	25
Nuevos híbridos de sauce seleccionados para producción de madera aplicable a diferentes usos y ambientes. New willow hybrids selected for wood production applicable to different uses and environments. Cerrillo, T.; Thomas, E.; Loyal, S.	29
Diversidad genética y estudio de asociación de genoma amplio para características de crecimiento y calidad de la madera en <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh. Genetic diversity and Genome-Wide Association Study for growth and wood quality traits in <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh. Aguirre, N.C.; Villalba, P.V.; García, M.N.; Acuña, C.V.; Rivas, J.G.; Martínez, M.C.; Ludueña, A.; Diaz, M.; Palazzini, D.; Pathauer, P.S.; Cappa, E.P.; Alves, A.; Rodrigues, J.C.; Grattapaglia, D.; Hopp, H.E.; Carreras, R.; Cisneros, F.; Marcucci Poltri, S.N.	33
Selección de los mejores individuos de <i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden mediante mapeo de QTLs de interés forestal. Selection of the best <i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden individuals through mapping forest interest' QTLs. García, .M.N.; Rivas, J.G.; Aguirre, N.C.; Villalba, P.V.; Martínez, M.C.; Acuña, C.V.; Oberschelp, J.; Harrand, L.; López, J.; Marcucci Poltri, S.N.	37
Transferencia de Marcadores Microsatelites (SSR) de <i>Eucalyptus</i> spp. a <i>E. sideroxylon</i> (A.Cunn. ex Woolls) en un Formato Múltiplex. Transfer simple sequence repeat (SSR) markers from <i>Eucalyptus</i> spp. to <i>E. sideroxylon</i> (A.Cunn. ex Woolls) in a cost-effective multiplex format. Rivas, J.G.; Pathauer, P.S.; Aguirre, N.C.; Villalba, P.V.; García, M.N.; Palazzini, D.; Acuña, C.V.; Martínez, M.C.; Hopp, H.E.; Marcucci Poltri, S.N.	41
Composición de los valores genéticos aditivos de modelos ABLUP y ssGBLUP multi-carácter para árboles sin fenotipo. Composition of the predicted breeding values from multiple-trait ABLUP and ssGBLUP models for trees without records. Jurcic, E.J.; Villalba, P.V.; Dutour, J.; Centurión, C.; Munilla, S.; Cappa, E.P.	44

Variabilidad genética preliminar del quebracho colorado chaqueño (<i>Schinopsis balansae</i> Engl.) en poblaciones del Chaco Húmedo argentino. Preliminary genetic variability of the quebracho colorado chaqueño (<i>Schinopsis balansae</i> Engl.) in populations of the Argentinian Humid Chaco. De Diego, F.C.; Torales, S.L.; Fortunato, R.H.	48
<i>Prosopis flexuosa</i>-rizobacterias en salares del Chaco Árido: diversidad genética, simbiosis y promoción del crecimiento. <i>Prosopis flexuosa</i> -rhizobacteria in Arid Chaco salt flats: genetic diversity, symbiosis and growth promotion. Espinosa, H.M.A.; González, P.; López Lauenstein, D.; Melchiorre, M.	52
Evidencia citogenética de hibridación entre <i>Prosopis alba</i> Griseb. y el complejo <i>P. hassleri</i> Harms. - <i>P. fiebrigii</i> Harms. Cytogenetic evidence of hybridization between <i>Prosopis alba</i> Griseb. and the <i>P. hassleri</i> Harms complex. - <i>P. fiebrigii</i> Harms. Vega, C.; Cosacov, A., Acosta, M.C.	56
Injerto de púa como procedimiento de propagación vegetativa para preservar poblaciones naturales de <i>Prosopis alba</i> Griseb. Cleft grafting as a vegetative propagation method to preserve natural populations of <i>Prosopis alba</i> Griseb. Carloni, E.; Vega, C.; Lopez Lauenstein, D. y Verga, A.	60
Potencial actividad antioxidante de extractos de hojas de <i>Cedrela balansae</i>, <i>Toona ciliata</i> y <i>Cedrela odorata</i>. Potential antioxidant activity of leaf extracts from <i>Cedrela balansae</i> , <i>Toona ciliata</i> and <i>Cedrela odorata</i> . Grignola, J.; Bejarano, G.; Marcinkevicius, K.; Salomón, V.; Maldonado, L.; Vera, N.	64
Evaluación al quinto año del primer ensayo en campo de orígenes argentinos de lenga (<i>Nothofagus pumilio</i> (Poepp. & Endl.) Krasser). Evaluation at the 5th year of the first field trial of Argentine origins of lenga, <i>Nothofagus pumilio</i> (Poepp. & Endl.) Krasser. Pastorino, M.; Azpilicueta, M.M.; Aparicio, A.; Huentú, M.; Jaque, F.; Mondino, V.; Schinelli, T.	68
Primeros cultivares de sauces-mimbres obtenidos por mejoramiento genético en Argentina. First willow cultivars for basket making obtained by genetic improvement in Argentina. Cerrillo, T.	72
Repetibilidad del peso de masa foliar en progenies de polinización abierta de yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.) Leaf mass repeatability in yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.) half-sib progeny trials. Schoffen, V.C.; Gauchat, M.E.; Belaber, E.C.	76

Respuesta del pino híbrido a las heladas invernales en función las condiciones de micrositio y caracteres de crecimiento.

Hybrid pine response to winter frosts as a function of microsite conditions and growth characteristics.

Schoffen, Cristian ¹; Bulfe, Nardia ¹; Belaber, Ector ¹; Gauchat, María Elena ¹; Martínez Meier, Alejandro ²

¹ INTA EEA Montecarlo, ² INTA EEA Bariloche – IFAB (INTA – CONICET)
schoffen.cristian@inta.gob.ar

Resumen.

La obtención de material genético de calidad superior o mejorado a partir del desarrollo de híbridos permite combinar los caracteres deseables de las especies parentales. La plantación del pino híbrido entre *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *Pinus caribaea* Morlet var. *hondurensis* (Sénéclauze) W.H. Barrett & Golfari. se limita actualmente a regiones tropicales y con restricciones en regiones subtropicales, principalmente por su susceptibilidad al daño por bajas temperaturas. Esto quedó demostrado por la afectación diferencial del daño por bajas temperaturas registrado en dos sitios de plantación (BAJO y ALTO). A su vez, fue posible establecer que existen familias del pino híbrido con mayor tolerancia a las bajas temperaturas. El crecimiento inicial en etapa de vivero, como así también la rápida respuesta a condiciones favorables de crecimiento, son los principales factores que afectan su susceptibilidad a heladas.

Palabras claves: fenología; *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *Pinus caribaea* var *hondurensis*; bajas temperaturas

Abstract

Obtaining higher quality or improved genetic material from the development of hybrids makes it possible to combine the desirable traits of the parent species. The plantation of the hybrid pine between *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *Pinus caribaea* Morlet var. *hondurensis* (Sénéclauze) W.H. Barrett & Golfari. it is currently limited to tropical regions and with restrictions in subtropical regions, mainly due to its susceptibility to damage by low temperatures. This was demonstrated by the differential affectation of the damage by low temperatures registered in two plantation sites (LOW and HIGH). In turn, it was possible to establish that there are hybrid pine families with greater tolerance to low temperatures. The initial growth in the nursery stage, as well as the rapid response to favorable growth conditions, are the main factors that affect its susceptibility to frost.

Key words: phenology; *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *Pinus caribaea* var *hondurensis*; low temperatures

Introducción

La productividad de las plantaciones forestales se relaciona estrechamente con las prácticas de manejo, su acervo genético y a las condiciones ambientales (Charrier et al. 2015). En relación a estas últimas, el impacto generado por las heladas sobre los plantines genera una preocupación creciente en regiones donde la ocurrencia de estos eventos es mayor. Es por ello que, el número de estudios en este campo ha aumentado durante la última década (Turchetto et al. 2020). Las especies originarias de áreas frías tienen una mayor tolerancia a las heladas, mientras que aquellas de climas tropicales-subtropicales son más susceptibles. Es así que la distribución de las especies está fuertemente relacionada con la tolerancia a las heladas invernales (Mabaso, Ham, and Nel 2019). Si las condiciones ambientales a las cuales las plantas están expuestas difieren de las óptimas para su desarrollo, decimos que éstas están bajo estrés (Arias 2015). Conocer los mecanismos de resistencia a eventos de estrés, como las bajas temperaturas, permiten no solamente comprender el proceso de adaptación sino además predecir las respuestas frente a futuros cambios en las condiciones ambientales. Por otro lado, puede ser aplicado en el proceso de selección con la finalidad de obtener materiales mejorados genéticamente más adecuados a condiciones ambientales particulares o capaces de soportar mejor las bajas temperaturas (Arias 2015). Por ello, es importante desarrollar métodos rápidos y confiables que permitan conocer cuáles son los mecanismos asociados a la resistencia a las bajas temperaturas.

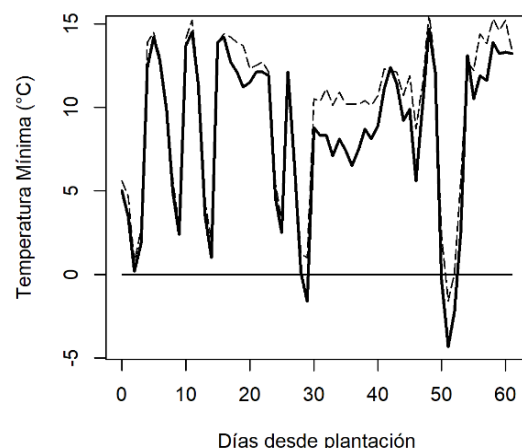
El híbrido entre *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* Morlet var. *hondurensis* (Sénéclauze) W.H. Barrett & Golfari (en adelante, híbrido) ha mostrado un buen desempeño en diferentes países donde se lo ha cultivado (Belaber et al. 2018; Nikles 2017; Nilsson et al. 2020; Slee 1972). Sin embargo, su plantación comercial se limita a regiones tropicales y con restricciones en regiones subtropicales, principalmente por su susceptibilidad al daño por bajas temperaturas (Mabaso et al. 2019). Es así que el objetivo del presente trabajo fue determinar si el crecimiento y el estado fenológico, asociado a las condiciones ambientales del sitio son capaces de explicar la afectación diferencial por bajas temperaturas entre familias del pino híbrido y un parental.

Materiales y Métodos

Se instalaron dos ensayos en julio del 2020 en el Campo Anexo Laharrague del INTA, en Montecarlo, Misiones. El primero de ellos se lo instaló en la parte alta del lote (ALTO), mientras que el segundo en la parte baja (BAJO) separados 200 m entre si con una pendiente del 3%; la finalidad de esto es captar la variabilidad ambiental existente. El material vegetal consistió en plantines de 13 meses de edad de pino híbrido, provenientes de tres familias (F12, F28 y F51) y plantines obtenidos de un bulk de semillas de *Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*. (PEE). Ambos materiales fueron brindados por el Programa de Mejoramiento Genético Forestal de la EEA Montecarlo. El diseño utilizado fue de cuatro bloques completos al azar, con cinco plantas por parcelas, haciendo un total de 160 plantas. La preparación del terreno consistió en líneas subsolados de 50 cm de profundidad, previamente desmalezado. El marco de plantación fue de 3 metros entre líneas por 1 metro entre plantas. En cuanto a las variables evaluadas se registró la temperatura ambiente (TA, °C) y la humedad relativa (HR, %) mediante sensores HOBBO instalados en cada sitio. Se evaluó la altura total (AT_inicial, cm) y el diámetro a la altura del cuello (DAC_inicial, mm) al inicio del ensayo. Además, para cada planta se calcularon los incrementos parciales mediante mediciones periódicas de AT (Inc_par_AT) y DAC (Inc_par_DAC), como también la Esbeltez (E, cm.mm⁻¹), relacionando la AT y el DAC. Por otro lado, se evaluó el estado de desarrollo de las plantas mediante una escala cuantitativa (Estado_Feno) con cinco categorías (de 0 a 4), donde 0 corresponden a yema apical dormida y 4 a yema apical en plenitud de desarrollo. Finalmente se identificaron las plantas afectadas por los eventos de heladas que se produjeron durante los meses de julio y agosto del mismo año. Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para lograr determinar que caracteres son los que explican mejor la variabilidad existente.

Resultados

Se registraron 4 días con temperaturas por debajo de los 0°C en el BAJO y solamente 1 día en el ALTO (Figura 1). Los primeros eventos de heladas se produjeron a los 29 días de instalados los ensayos, afectando solamente al sitio BAJO. Seguidamente entre los días 50 y 52 fueron registrados nuevamente temperaturas por debajo de los 0°C en el sitio BAJO, produciéndose en el día 51 heladas tanto en el ALTO como en el BAJO. Las temperaturas mínimas absolutas en cada sitio fueron de -1,6 °C y -4,5 °C



para ALTO y BAJO respectivamente. La presencia de plantas afectadas por las heladas se produjo solamente en el BAJO, por lo cual el análisis se centró solamente en esta situación de terreno.

Figura 1: Temperaturas mínimas registradas en terreno ALTO (línea discontinua) y BAJO (línea continua). El día 0 corresponde a la plantación, finalizando el período de análisis el día 66.

Figure 1: Minimum temperatures recorded in HIGH (dashed line) and LOW (solid line) terrain. Day 0 corresponds to plantation, ending the analysis period on day 66.

Los valores iniciales de AT y DAC mostraron diferencias significativas a nivel de familias ($p < 0,0001$). Para la variable AT la familia F51 presentó un menor tamaño promedio de planta ($18,73 \pm 4,20$ cm), mientras que para F12 se determinó un tamaño promedio mayor ($32,52 \pm 2,96$ cm). Por otro lado, F28 y PEE presentaron valores similares en AT_inicial ($24,13 \pm 3,08$ y $23,94 \pm 2,05$ cm, respectivamente). En cuanto al DAC_inicial, PEE presentó un valor promedio significativamente más bajo ($2,67 \pm 0,26$ mm) que las familias híbridas, mientras que para F51 se determinó un valor promedio más alto ($3,68 \pm 0,79$ mm). El ACP explica el 70,3% de la variabilidad en las dimensiones Dim1 y Dim2. Los caracteres que mayor variabilidad aportan a la Dim1 son la Esbeltez_inicial (32,3%), el Inc_par_AT (20,6%) y

AT_inicial (18,9%). Mientras que en la Dim2 los caracteres de mayor importancia son AT_inicial (26,9%), DAC_inicial (25,4%) y Estado_Feno (23,3%).

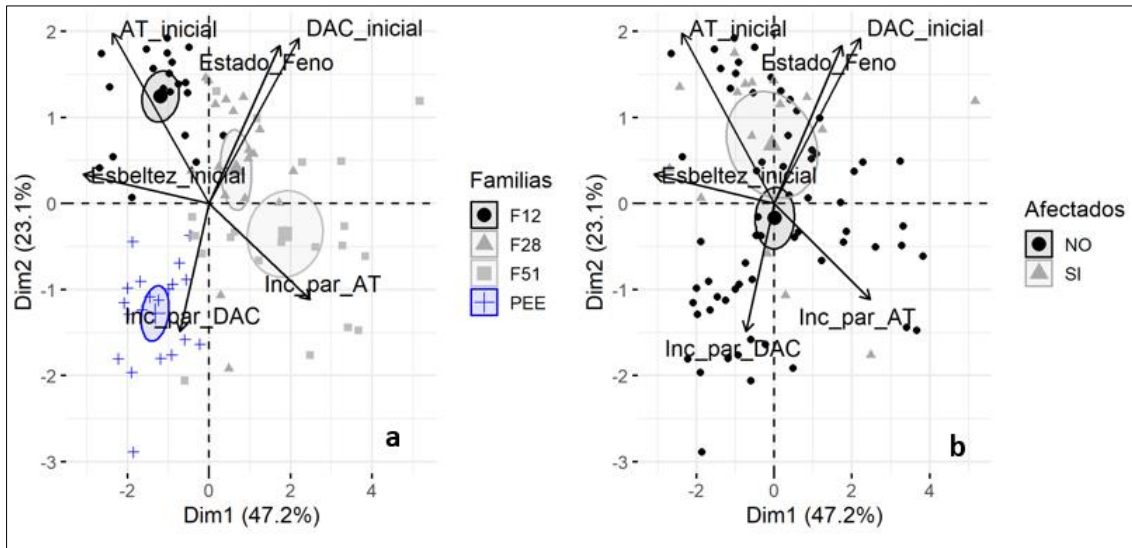


Figura 2: Biplot resultante del ACP sitio BAJO. Porcentajes de variabilidad que se logra explicar en cada dimensión. Criterios de clasificación: a) familias; b) plantas afectadas.

Figure 2: Biplot resulting from the PCA LOW site. Percentages of variability that can be explained in each dimension. Classification criteria: a) families; b) affected plants.

En la figura 2a se puede ver como se asocian las diferentes familias a cada una de las variables incluidas al análisis, la familia híbrida F12 está asociada positivamente con la altura inicial de las plantas mientras que PEE se asocia con el incremento parcial en DAC. Cuando la variable clasificatoria es la afectación por bajas temperaturas (Figura 2b) vemos que las familias híbridas fueron las afectadas, las cuales presentan una asociación positiva con los caracteres AT_inicial, DAC_inicial y Estado_Feno. Si bien solo se registraron plantas afectadas entre las familias híbridas, esta afectación no fue homogénea (F12: 8; F28: 5 y F51: 3 plantas afectadas), F12 fue la familia con mayor porcentaje de plantas afectadas, mientras que F51 fue la menos afectada. Sin embargo, no se registraron daños por heladas en PEE, cuyos valores de incremento en altura se asemejan con la familia híbrida F28 y se contraponen con F12 y F51. En lo que respecta a la fenología, PEE presenta más del 95% de las plantas en estadios 1 y 2, los cuales se corresponden con yemas apicales hinchadas y comenzando a elongar, pero protegida por brácteas. Sin embargo, las familias híbridas presentan entre 95 y 100% en estadios 3 y 4, correspondiente a yemas bien elongadas y acículas desplegándose. Entre los días 30 y 50 las temperaturas mínimas oscilaron entre los 6 y 10°C (Figura 1). Mientras que, las temperaturas medias se mantuvieron entre los 15 y 20 °C en este periodo. Produciéndose un aumento en la amplitud térmica durante los 10 días posteriores a las primeras heladas (Figura 3). Las familias híbridas mostraron una rápida respuesta ante estas condiciones favorables. Iniciando el proceso de elongación del brote terminal pasando de un estadio 1-2, (día 30) a un estadio 3-4 (día 50). Período en el cual se evidenciaron afectación por bajas temperaturas para estas familias.

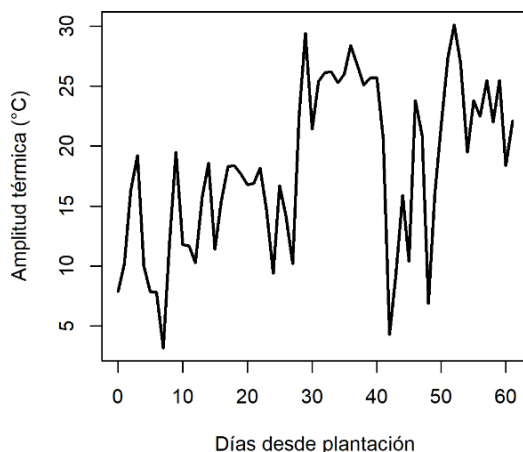


Figura 3: Amplitud térmica registrada en terreno BAJO desde el día 0 (plantación) al día 66.

Figure 3: Thermal amplitude recorded in LOW terrain from day 0 (plantation) to day 66.

Conclusiones

Los plantines del híbrido de mayor tamaño (AT y DAC inicial) fueron los más afectados. La esbeltez parece ser un carácter independiente de la afectación por heladas. Por otro lado, el incremento en AT como en DAC, se contraponen con los valores iniciales de AT y DAC y el estado fenológico. La rápida respuesta del híbrido frente a condiciones favorables para su desarrollo fenológico

es la causa principal relacionada al efecto negativo que tienen las bajas temperaturas sobre el material híbrido, las cuales alcanzaron mínimas absolutas de -5°C . Si bien las plantas afectadas no murieron debido a las heladas ocurridas, dichos eventos ambientales sí podrían afectar de manera negativa el crecimiento de estas, provocando una disminución en el ritmo de crecimiento, afectando la productividad de la especie.

Bibliografía.

- Arias, Nadia S. 2015. "Respuestas Morfo-Fisiológicas a Bajas Temperaturas y Disponibilidad de Agua En Variedades de *Olea Europaea* L." (September):154.
- Belaber, Ector C., María E. Gauchat, Hugo D. Reis, Nuno M. Borralho, and Eduardo P. Cappa. 2018. "Genetic Parameters for Growth, Stem Straightness, and Branch Quality for *Pinus Elliottii* Var. *Elliottii* x *Pinus Caribaea* Var. *Hondurensis* F 1 Hybrid in Argentina." *Forest Science* 64(6):595–608.
- Charrier, Guillaume, Jérôme Ngao, Marc Saudreau, and Thierry Améglio. 2015. "Effects of Environmental Factors and Management Practices on Microclimate, Winter Physiology, and Frost Resistance in Trees." *Frontiers in Plant Science* 6(APR):1–18.
- Mabaso, Fanelesibonge, Hannél Ham, and André Nel. 2019. "Frost Tolerance of Various *Pinus* Pure Species and Hybrids." *Southern Forests* 81(3):273–80.
- Nikles, D. .. 2017. "Southern Pines." *Woods Wiki Short Stories*.
- Nilsson, O., G. R. Hodge, L. J. Frampton, W. S. Dvorak, and J. Bergh. 2020. "Growth and Modulus of Elasticity of Pine Species and Hybrids Three Years after Planting in South Africa." *Southern Forests* 82(4):367–76.
- Slee, M. U. 1972. "GROWTH CARIBBEAN PATTERNS OF SLASH AND PINE AND THEIR HYBRIDS." *Euphytica* 21(1):129–42.
- Turchetto, Felipe, Maristela Machado Araujo, Adriana Maria Griebeler, Daniele Guarienti Rorato, Álvaro Luis Pasquetti Berghetti, Felipe Manzoni Barbosa, and Marillos Santos de Lima. 2020. "Can Intensive Silvicultural Management Minimize the Effects of Frost on Restoration Plantations in Subtropical Regions?" *Journal of Environmental Management* 269(May).

Respuestas fisiológicas y bioquímicas a la restricción hídrica en eucalipto: relación con la tolerancia a la congelación y la sequía.

Physiological and biochemical responses to water restriction in Eucalypts: relationship to freezing and drought tolerance.

Oberschelp, G.P.J.¹; Salto, C.S.¹; Harrand, L.¹; Margarit, E.²

¹ EEA INTA Concordia, RP 22 y vías del ferrocarril, Concordia, E. Ríos. ² Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI). Suipacha 570, Rosario, Santa Fe. margarit@cefobi-conicet.gov.ar

Resumen

Las heladas y los períodos de estrés hídrico representan una limitante para el cultivo de eucaliptos en la Mesopotamia Argentina, en especial en plantas jóvenes. Sin embargo, las plantas son capaces de desplegar complejos programas de tolerancia para hacer frente a estas condiciones, los cuales en algunos casos brindan tolerancia cruzada a diferentes estreses. En este trabajo se caracterizaron las respuestas fisiológicas y bioquímicas de tres especies de eucalipto y un clon híbrido frente a un régimen de restricción hídrica, evaluándose el efecto de este en los niveles de tolerancia a estrés hídrico y de congelación. Los resultados muestran diferencias entre las especies y tratamientos y sugieren posibles marcadores metabólicos para el mejoramiento genético de *Eucalyptus*.

Palabras clave: Eucalipto, heladas, sequía.

Abstract

Frosts and periods of water stress are limitations for the cultivation of eucalyptus in Mesopotamia Argentina, especially for young plants. However, plants are capable of deploying complex tolerance programs to cope with these conditions, which in some cases provide cross-tolerance to different stresses. In this work, the physiological and biochemical responses of three species of eucalyptus and a hybrid clone against a water restriction regime were characterized, evaluating the effect of this on the levels of tolerance to water stress and freezing. Our findings showed differences among species and treatments and suggest possible metabolic markers for the genetic improvement of *Eucalyptus*.

Keywords: Eucalyptus, frost, drought.

Introducción

El estrés abiótico representa una limitante para el establecimiento de plantaciones de Eucalipto. Así, las heladas y el estrés hídrico, de forma aislada o combinados, pueden tener gran impacto especialmente en plantaciones menores al año. El congelamiento, así como el estrés hídrico, provoca la deshidratación celular, daño en membranas, y en casos más extremos, la pérdida de conductividad hidráulica por cavitación (Davis et al. 1999). Sin embargo, las plantas son capaces de activar cambios fisiológicos y bioquímicos para tolerar el impacto de estos estreses y prevenir el daño (Gusta y Wisniewski, 2013; Fürtauer et al. 2019; Mukarram et al., 2020). Notablemente, existen mecanismos de tolerancia compartidos para sequía y congelación, como la acumulación de solutos compatibles como azúcares o aminoácidos, que contribuyen a la prevención de la deshidratación y a la protección de las membranas celulares (Beck et al. 2007). Identificar estos mecanismos, marcadores de tolerancia y genes asociados es clave para la aplicación de técnicas avanzadas de mejoramiento genético. Para ello, se evaluaron las respuestas a nivel fisiológico y bioquímico en plantines de *E. benthamii*, *E. dunnii* y *E. grandis* y la tolerancia a temperaturas de congelación, bajo distintos niveles de estrés hídrico.

Materiales y Métodos

Se emplearon plantines de 90 días de *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed), y un clon de *E. grandis* x *E. camaldulensis* GC27 (GC). Quince plantas por material genético fueron trasplantadas a macetas de plástico de 2 L, donde se irrigaron y fertilizaron por 45 días. Para iniciar el ensayo las macetas se irrigaron a saturación, se dejó drenar el exceso de agua, se colocaron bolsas de plástico

para evitar la evaporación y se pesaron. Se aplicaron dos regímenes de riego (tratamientos): 100 % (C, control) y 25 % (D, estrés hídrico) de reposición de agua transpirada cada dos días, durante 20 días, valores obtenidos por diferencia de peso. Una vez cumplidos los 20 días de estrés, se muestrearon hojas (3.^{er} y 4.^a) de 10 plantas por tratamiento y se evaluó la tolerancia a congelación mediante ensayos de pérdida de electrolitos (EL) a cuatro temperaturas de congelación (0, -2, -4 y -6 °C), según Thalhammer et al. (2014). Adicionalmente, se tomaron muestras de hojas de cinco plantas por tratamiento, y se conservaron a -80 °C para ensayos de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GCMS) y medidas espectrofotométricas según Oberschelp et al. (2020, 2022). Se evaluó el contenido relativo de agua (RWC), el contenido de materia seca en hojas (LDW), raíces (RDW), tallo (SDW) y su porcentaje (PDW), el área foliar total (LA), el área foliar específica (SLA) y la eficiencia en el uso del agua (WUE), en cinco plantas por tratamiento. A fin de imponer un estrés hídrico pronunciado y evaluar su recuperación, se excluyó el riego por 10 días a un grupo de cinco plantas por tratamiento, volviendo a riego completo luego de ese tiempo. Pasados 45 días se evaluó el daño en las plantas con una escala de 0 a 1 (0: sin daño en tallo; 1: con daño en tallo) y el número de rebrotes basales. Los datos se analizaron y graficaron en R, con los paquetes 'ggplot2', 'emmeans', 'mulcomp' y 'FactoMineR'. El mapa de calor fue generado con el programa MeV (TM4).

Resultados y Conclusiones

Inducción de tolerancia a congelación y sequía en plantas bajo 20 días de restricción hídrica

Las medidas de pérdida de electrolitos (EL), pasados los 20 días de irrigación controlada, indicaron que tanto Eb como Ed presentaban menores niveles de daño a -2 °C tanto para plantas C como D (Figura 1A), lo cual sugirió la presencia de una tolerancia basal a este estrés, previamente observada en Eb (Oberschelp et al. 2022). Por otra parte, Eg y GC presentaron una inducción de tolerancia al frío (menor EL) comparable, solamente en plantas sometidas a estrés hídrico (D) (Figura 1A). Para la condición D, Eb, Ed y GC mostraron menores niveles de daño a -4 °C que las plantas C, aunque los valores de EL medidos estaban entre el 50 y el 70 %. Este hecho se replicó a -6 °C, pero con mayores niveles de daño (mayor EL). Si bien estos resultados sugieren una inducción de la tolerancia al congelamiento por exposición a estrés hídrico de 20 días, esta dista de la obtenida con la aclimatación a bajas temperaturas, que es mayor y más rápida (Floriani et al. 2013; Oberschelp et al. 2022).

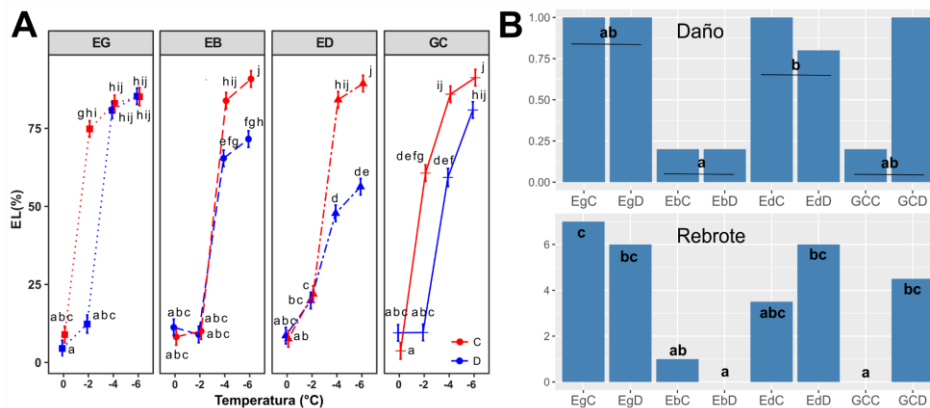


Figura 1. A, fuga de electrolitos (EL) por congelamiento de hojas a 0, -2, -4, y -6 °C de *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC). C, control; D, sequía. B, daño y rebrote en plantas expuestas a restricción total de riego por 10 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (Ajuste de Tukey de 'emmeans', $p < 0,05$).

Figure 1. A, Electrolyte leakage by freezing of leaves at 0, -2, -4, and -6°C in *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) and *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC). C, control; D, drought. B, plant damage and regrowth in plants exposed to 10 days of total irrigation restriction. Different letters indicate significant differences (Tukey adjustment from 'emmeans', $p < 0.05$).

Posteriormente, tras aplicar una exclusión total de riego por 10 días sobre el mismo grupo de plantas, se observaron altos niveles de daño en Eg y Ed, independientemente del nivel de estrés previo (C o D), GC en cambio respondió en forma diferencial de acuerdo al tratamiento de estrés, donde las plantas de los tratamientos bien irrigados (C) manifestaron poco daño, mientras que Eb no manifestó daños significativos en ninguna de las dos condiciones (Figura 1B). Un alto daño en el tejido de los tallos se tradujo en pérdida de dominancia y en la emergencia de rebrotes basales, como se observó en Eg, Ed y GC, solamente en plantas provenientes de estrés hídrico (D) para este último (Figura 1B).

Respuesta fisiológica de las plantas a los tratamientos

Pasados los 20 días de estrés hídrico (D), se observó una disminución (respecto de C) en RWC y un aumento del PDW para Eg, Ed y GC, así como una caída de LA, LDW y SLA en las 4 especies (Figura 2). Notablemente, Eb no mostró cambios significativos en RWC y PDW, aunque presentó bajos LA y LDW en la condición C respecto de Eg, Ed y GC (Figura 2). Así, cada material genético presenta una respuesta diferente frente al estrés, siendo Eb la menos afectada en estos parámetros.

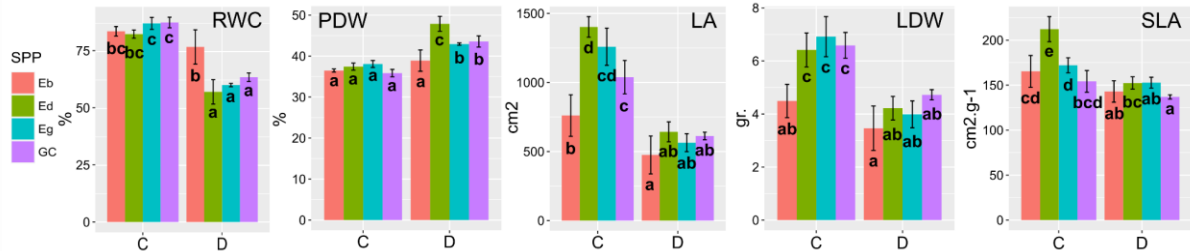


Figura 2: Contenido relativo de agua (RWC), porcentaje de materia seca (PDW), área foliar total (LA), peso seco de hojas (LDW) y área foliar específica (SLA) en *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC) expuestas a condiciones C (control) y D (estrés hídrico) por 20 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (Ajuste de Tukey de 'emmeans', $p < 0,05$).

Figure 2: Relative water content (RWC), percent dry matter (PDW), total leaf area (LA), leaf dry weight (LDW) and specific leaf area (SLA) of *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) and *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC) plants exposed to C (control) and D (drought) conditions for 20 days. Different letters indicate significant differences (Tukey adjustment from 'emmeans', $p < 0.05$).

Caracterización del metaboloma de las hojas en respuesta a los tratamientos

El estudio del metaboloma foliar permitió conocer similitudes y diferencias entre las especies, así como las respuestas a los tratamientos aplicados (Figura 3). Se encontraron ocho grupos (clusters) de metabolitos, algunos de ellos acumulados principalmente en una especie, como en el cluster VII para Eg compuesto mayormente de monosacáridos, el cluster II en Eb incluyendo entre otros al ácido quínico, el myo inositol y algunos aminoácidos, y el V y el VI en Ed y GC, respectivamente (Figura 3). Asimismo, se encontraron metabolitos incrementados por la restricción hídrica (D) como algunos aminoácidos (serina, prolina, arginina y ácido aspártico) en Eb (cluster I), o diferentes monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa) en Eg y GC (clusters VII y VIII), así como ácido glutámico, cítrico y sacarosa en Eb y Ed (cluster IV). Llamativamente, la sacarosa, principal azúcar soluble en plantas, se acumulaba en Eg, Eb y Ed frente al tratamiento D (cluster IV).

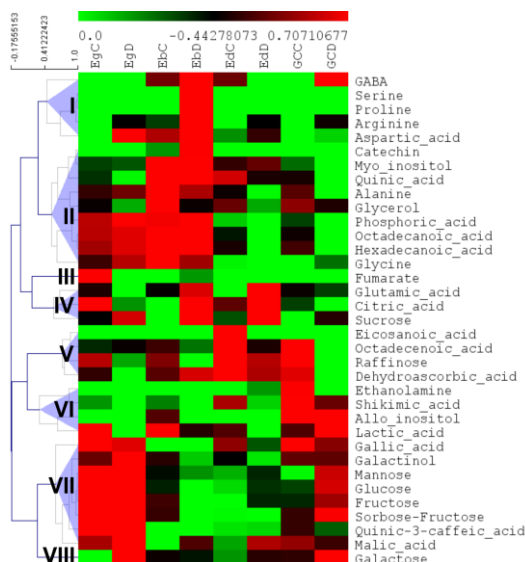


Figura 3: Mapa de calor del metaboloma de la hoja de plantas *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC) expuestas a condiciones C (control) y D (sequía) durante 20 días. Los datos se agrupan jerárquicamente por patrones de metabolitos (ocho grupos, números romanos). La escala muestra los valores más altos en rojo y los más bajos en verde.

Figure 3: Leaf metabolome heat map of *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) and *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC) plants exposed to C (control) and D (drought) conditions for 20 days. Data were grouped hierarchically by metabolite patterns (eight groups, roman numbers). The scale shows the highest values in red and the lowest in green.

Integración de las respuestas observadas

El análisis de componentes principales para los datos obtenidos identificó 4 dimensiones con el 86 % de la variabilidad, con un 56 % correspondiendo a las componentes 1 y 2 (31,6 y 25 % para CP1 y CP2, respectivamente). El análisis gráfico mostró que las observaciones se agrupan siguiendo los tratamientos de estrés, principalmente mediante la CP1 (Figura 4). A esta componente contribuyen las medidas de pérdida de electrolitos (EL) a distintas temperaturas, LA, LDW, RDW, SDW, almidón, y los

ácidos shikímico y gálico, que en general presentan altos valores para las muestras EgC, EdC y GCC. Por otra parte, las muestras bajo estrés (D) estuvieron relacionadas por la CP1 a altos niveles de sacarosa, myo inositol, arginina, ácido aspártico, serina, prolina, así como altos valores de eficiencia del uso del agua (WUE). Notablemente, la CP2 sugiere un ordenamiento a nivel de especies, ya que agrupa a EbC y EbD en el extremo superior. Así, Eb se ubica con mayores niveles de ácido quínico, myo inositol, y altos valores de RWC, mientras que las muestras correspondientes a Eg, Ed y GC estaban asociadas a mayores valores de azúcares, galactinol, así como de daño por restricción de riego y altos niveles de rebrote.

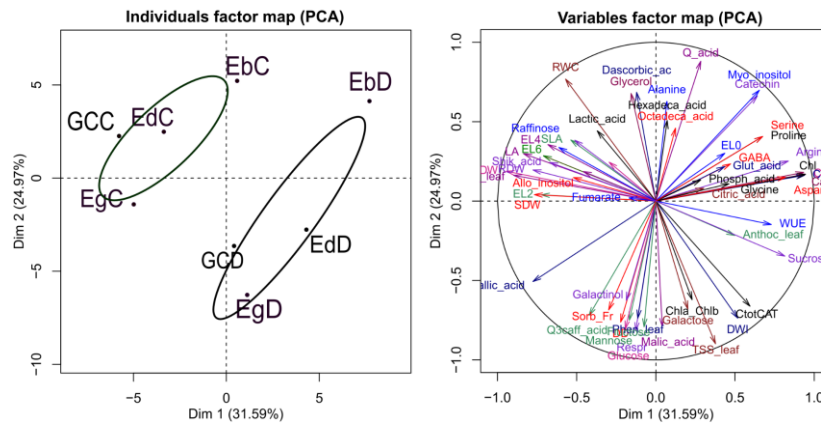


Figura 4. Análisis de componentes principales para los datos de tolerancia, y medidas fisiológicas y bioquímicas. Biplot de componente 1 y 2 para tratamientos y variables. *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC). C, control; D, sequía.

Figure 4. Principal component analysis for tolerance data, physiological and biochemical measurements. Biplot for treatments and variables for components 1 and 2. *E. grandis* (Eg), *E. benthamii* (Eb), *E. dunnii* (Ed) and *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC). C, control; D, drought.

Conclusiones

Los estudios permitieron observar diferencias en los mecanismos de respuesta al estrés hídrico entre especies, destacándose Eb por su elevada tolerancia al estrés hídrico en las condiciones ensayadas y a la congelación, esto último en coincidencia con Floriani et al. (2013) y Oberschelp et al. (2020, 2022). Los estudios fisiológicos y bioquímicos evidenciaron diferencias y similitudes respecto de las otras especies, notando en Eb la acumulación de algunos aminoácidos y solutos compatibles, como el myo inositol o el ácido quínico, recientemente asociados a la tolerancia al frío de esta especie (Oberschelp et al. 2022). Esto indica que es posible encontrar mecanismos de tolerancia cruzada para la sequía y las heladas, próximos trabajos permitirán identificar a procesos metabólicos y genes involucrados, que serán un insumo clave para la aplicación de técnicas avanzadas de mejoramiento.

Bibliografía

- Beck EH, Fettig S, Knake C, Hartig K, Bhattarai T (2007) Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress; *J. Biosci.* 32:501–510.
- Davis SD, Sperry JS, Hacke UG (1999) The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *Am. J. Bot.* 86:1367-1372.
- Floriani MMP et al. (2013) Relationship between concentrations of total soluble carbohydrates in the leaves and cold tolerance in different species of *Eucalyptus* spp. *Ciência Florestal* 23:165-174
- Fürtauer, L., Weiszmann, J., Weckwerth, W., & Nägele, T. (2019). Dynamics of plant metabolism during cold acclimation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215411>
- Gusta, L. V., & Wisniewski, M. (2013). Understanding plant cold hardiness: An opinion. *Physiologia Plantarum*, 147(1), 4–14. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01611.x>
- Mukarram, M., Choudhary, S., Kurjak, D., Petek, A., & Khan, M. M. A. (2021). Drought: Sensing, signalling, effects and tolerance in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1291–1300.
- Oberschelp, G.P.J., Guarnaschelli, A.B., Teson, N., Harrand, L., Podestá, F.E., Margarit, E. (2020). Cold acclimation and freezing tolerance in three *Eucalyptus* species: A metabolomic and proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry* 154, 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.05.026>
- Oberschelp, G.P.J., Morales, L.L., Montecchiarini, M.L., Harrand, L., Podestá, F.E., Margarit, E. (2022). Harder, better, faster, stronger: Frost tolerance of *Eucalyptus benthamii* under cold acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 186(April), 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.06.022>
- Thalhammer A., Hincha D.K., Zuther E. (2014) *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1166. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0844-8_3

Organogénesis *in vitro* en clones comerciales de Eucalipto de INTA

In vitro organogenesis of Eucalypts commercial clones from INTA

Ayala, Paula G.¹; Vivas, Vanina L.¹; Sansberro, Pedro A.^{2,3}; Harrand, Leonel¹; Oberschelp, Gustavo P.J.¹.

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Ruta 22 y vías del ferrocarril, CP E3200AQQ, Estación Yuquerí, Concordia, Entre Ríos, Argentina; ²Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional. Instituto de Botánica del Nordeste (CONICET); ³Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). Sgto. Cabral 2131. W3402BKG, Corrientes, Argentina.

ayala.paula@inta.gob.ar

Resumen

La aplicación de técnicas de ingeniería genética sobre clones de reconocido desempeño permitirá obtener material mejorado con características que son complejas de abordar para el mejoramiento clásico. Para ello, es indispensable un protocolo de organogénesis *in vitro* eficaz y eficiente, siendo un factor limitante en eucalipto debido a su recalcitrancia. Se propuso evaluar el porcentaje de regeneración y número de yemas adventicias en segmentos nodales de cuatro clones selectos de *E. grandis* W. Hill ex Maiden y *E. grandis* x *E. camaldulensis* subsp. *camaldulensis* Dehnh bajo distintas condiciones de cultivo *in vitro*. Los resultados obtenidos demuestran que el medio MS con la adición de Ácido indol-3-butírico 0,10 mg·L⁻¹, Thidiazuron 0,025 mg·L⁻¹ y sacarosa 2% induce respuestas favorables en todos los genotipos ensayados, siendo los clones GC_INTA_8 y EG_INTA_152 los de mejor respuesta. Estos resultados constituyen la base para la aplicación de técnicas de ingeniería genética en eucalipto.

Palabras clave: regeneración, clones, segmentos nodales.

Abstract

The application of genetic engineering techniques on clones of recognized performance will make it possible to obtain improved material with characteristics that are complex to address in classical improvement. For this, an effective and efficient *in vitro* organogenesis protocol is indispensable, with this being a limiting factor in eucalypts because of its recalcitrance. We proposed to evaluate the percentage of regeneration and number of adventitious buds in nodal segments of four selected clones of *E. grandis* W. Hill ex Maiden and *E. grandis* x *E. camaldulensis* subsp. *camaldulensis* Dehnh a different *in vitro* culture conditions. The results obtained show that MS medium with the addition of Indole-3-butyric acid 0.10 mg·L⁻¹, Thidiazuron 0.025 mg·L⁻¹ and sucrose 2% induces favorable responses in all genotypes tested, with GC_INTA_8 and EG_INTA_152 clones having the best response. These results constitute the basis for the application of genetic engineering techniques in eucalyptus.

Keywords: regeneration, clones, nodal segments.

Introducción

El eucalipto es originario de Australia y se cultiva en todo el mundo como árbol multipropósito debido a su rápido crecimiento, su gran adaptabilidad y alta calidad de su madera. En nuestro país se cultiva principalmente en la región mesopotámica, siendo *E. grandis* la especie de mayor difusión, debido a que responde a una silvicultura de plantación y de manejo intensivos, combinando complementariamente características deseables en híbridos interespecíficos con *E. camaldulensis* Dehnh (Marcó et al. 2006).

Sin embargo, los factores de estrés bióticos (como las plagas de insectos) y abióticos (como las heladas) causan daños irremediables a las plantaciones, lo que provoca importantes pérdidas económicas. Por lo tanto, es de gran interés cultivar árboles resistentes a dichos estreses.

La transgénesis y la edición génica permiten resolver estos problemas mediante la transferencia y/o edición de genes de interés a la planta para obtener un genotipo deseable. Para ello es necesario un sistema de regeneración *in vitro* eficiente para lograr una transformación y/o edición genética estable, siendo la organogénesis la forma más común de obtener plantas regeneradas.

Aunque en los últimos años se ha logrado establecer protocolos de transformación con diferentes especies de Eucaliptos para obtener plántulas transgénicas y editadas, debido a su recalcitrancia sigue siendo difícil superar las dificultades de regeneración *in vitro*, limitando la implementación de sistemas de transformación y edición génica para la obtención de genotipos mejorados.

La mayoría de los protocolos de regeneración para esta especie utilizan plantas de semillas como material de partida (Ouyang et al. 2020; Shwe y Leung 2020; Oberschelp et al. 2015 y Ayala et al. 2019). Pero los brotes originados a partir de explantes de plántulas de semilla muestran variaciones entre ellos, lo que resulta inadecuado para la propagación y posterior transformación genética.

Debido a esto, el desarrollo de Eucaliptos transgénicos ha sido retrasado en comparación con otras plantas leñosas. Por lo tanto, es fundamental desarrollar protocolos de transformación y/o edición génica en esta especie, utilizando materiales clonales de probado comportamiento a campo, capaces de multiplicarse por organogénesis.

Entre los factores que afectan a la organogénesis, se encuentran los reguladores del crecimiento y su interacción con la sacarosa ya que la misma está implicada en la regulación de la división celular, la expansión celular y la acumulación de carbohidratos de reserva (Yaseen et al. 2013). Esto se debe a que actúa como molécula de señalización cuyas vías de transducción influyen en los procesos metabólicos y de desarrollo interviniendo en la regulación hormonal (Smeekens, 2000, Rolland et al., 2002, 2006)

Con el objetivo de obtener un protocolo funcional de transformación y/o edición génica, se iniciaron en 2021 ensayos en diferentes condiciones de cultivo y fuente de explantes. Se evaluaron 67 tratamientos, hasta llegar al estado de avance reportado en este trabajo, donde se obtuvo la regeneración de brotes adventicios y posterior producción de plántulas a partir del cultivo de segmentos nodales de cuatro clones selectos de eucalipto bajo dos concentraciones de sacarosa.

Hasta la fecha, la regeneración y posterior obtención de plantas no ha sido reportada para estos materiales genéticos.

Materiales y Métodos

Se utilizó como material vegetal porciones de segmentos nodales (5 mm de longitud) de vitroplantas obtenidas a partir de clones de *E. grandis* (EG_INTA_1 y EG_INTA_152) y *E. grandis* x *E. camaldulensis* (GC_INTA_8 y GC_INTA_24). Por cada tratamiento se cultivaron tres repeticiones con 10 segmentos de entrenudos en placas de petri conteniendo 40 mL del medio semisólido de Murashige y Skoog 1962 (MS), el pH de la solución fue ajustado a 5.8 antes de la adición del agente gelificante (agar, Plant TC PhytoTech). Se desarrolló un experimento factorial con el propósito de analizar el efecto que ejerce la adición al medio de cultivo MS semisólido (agar 7,5 g·L⁻¹) de Ácido indol-3-butírico (IBA) 0,10 mg·L⁻¹ y Thidiazuron (TDZ) 0,025 mg·L⁻¹ con 2% y 6% de sacarosa, sobre la neoformación de yemas vegetativas. Los cultivos fueron incubados durante los primeros 10 días en oscuridad y luego transferidos a condiciones lumínicas (fotoperiodo 14 h) y de temperatura controlada (25±1°C).

Resultados y Conclusiones

Transcurridos 30 días de incubación pudo observarse la formación de yemas adventicias en los explantes de los cuatro clones ensayados, logrando obtenerse una mayor tasa de regeneración en el clon GC_INTA_8 de hasta 90±17,32% con la adición de 2% y 6% de sacarosa, no existiendo diferencias significativas entre la mayoría de los clones evaluados evidenciándose un crecimiento vigoroso y proliferación de múltiples brotes (Fig. 1.A), una excepción fue el clon GC_INTA_24, que no regeneró yemas cuando fue cultivado con 6% de sacarosa, vislumbrando una mayor proliferación de callo.

Estos resultados concuerdan con otros trabajos realizados por Wang et al. 2021 en *E. urophylla* x *E. tereticornis* donde obtuvieron una tasa de regeneración de 85,6% en explantes de entrenudos, utilizando como medio de cultivo Modified Woody Plant Medium (mWPM) y la adición de IBA 0,10 mg·L⁻¹ y TDZ 0,025 mg·L⁻¹ con 3% de sacarosa.

La sacarosa es un ingrediente importante a considerar en los procesos organogénicos ya que generalmente se añade por su rol como fuente de carbono y regulador osmótico (Yasheen et al. 2013) y generalmente se pretende que no interfiriera en la regeneración de yemas adventicias. Su acción

subyace a la regulación equilibrada de la formación de callos y la regeneración de yemas y que al igual que cualquier componente en los ensayos de regeneración, debe ser considerado como un factor de riesgo de no ser optimizado.

Como puede verse en la figura 1.B, la generación de múltiples yemas adventicias en los segmentos nodales fue significativamente mayor en los clones EG_INTA_152 y GC_INTA_8 con $5,86\pm 0,25$ y $5,60\pm 1,31$ respectivamente, con una concentración de sacarosa de 2%. Sin embargo, en los tratamientos donde se utilizó una concentración de sacarosa de 6% se vio disminuido el número de yemas por explante en los cuatro genotipos evaluados.

Los brotes adventicios regenerados se transfirieron a un medio MS que contenía 6-Bencilaminopurina (BAP) $0,1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y Ácido naftalenacético (ANA) $0,05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para multiplicar y elongar las brotaciones. El enraizamiento se logró individualizando los brotes elongados en medio MS suplementado con ANA $0,1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, obteniendo plantas enteras a los 4 meses desde el inicio del ensayo.

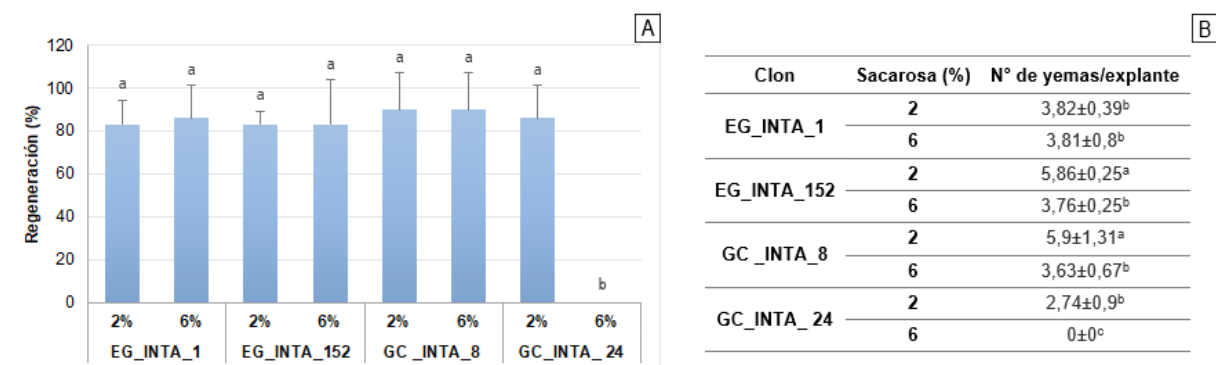


Figura 1. a. Porcentaje de regeneración en segmentos nodales de *E. grandis* y *E. grandis* x *E. camaldulensis*, sujetos a una incubación de 30 días. b. Número promedio de yemas adventicias por cada segmento nodal de los clones evaluados. Los resultados indican el promedio de 3 repeticiones \pm SE (n= 30). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p>0,05$).

Figure 1. a. Regeneration in nodal segments of *E. grandis* and *E. grandis* x *E. camaldulensis*, subjected to a 30-day incubation. b. Average number of adventitious buds per nodal segment of the clones evaluated. Results indicate the average of 3 replicates \pm SE (n= 30). Different letters indicate significant differences according to Tukey's test ($p>0.05$).

En conclusión, los resultados presentados aquí muestran que la interacción de los reguladores de crecimiento exógenos (IBA y TDZ) junto a la sacarosa estimulan a la neoformación de yemas adventicias con la posterior obtención de plantas enteras en los cuatro genotipos evaluados.

Con la obtención de dicho protocolo de organogénesis *in vitro* estable y altamente eficiente se abre la posibilidad de desarrollar un sistema de transformación y/o edición génica en *Eucalyptus*, permitiendo transferir/editar características de interés y disminuyendo los tiempos de mejora en la obtención de un genotipo deseables.

Agradecimientos

Los proyectos que financiaron este trabajo fueron: 2019-PE-E6-I115-001 "Edición génica, transgénesis y mutagénesis como generadores de nueva variabilidad en especies de interés agropecuario" y 2019-PE-E6-I146-001 "Mejoramiento genético de especies forestales cultivadas de rápido crecimiento: un desarrollo clave para el fortalecimiento de la foresto industria nacional".

Bibliografía

- Ayala, P. G.; Brugnoli, E. A.; Luna, C. V.; González, A. M.; Pezzutti, R.; Sansberro, P. A. (2019). *E. nitens* plant regeneration from seedling explants through direct adventitious shoot bud formation. *Trees*, 33(6), 1667-1678.
- Gabryszewska, E. Te effects of glucose and growth regulators on the organogenesis of *Paeonia lactiflora* Pall. in vitro. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 18, 309–320 (2010).
- Marcó, M; Harrand, L; Oberschelp, G. P. J. (2006). Oportunidades y limitaciones en el mejoramiento genético de *E. grandis* para usos sólidos. XXI Jornadas Forestales de Entre Ríos.

-
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Oberschelp, G. P. J.; Gonçalves, A. N.; Meneghetti, E. C.; Graner, E. M.; de Almeida, M (2015) *E. dunnii* maiden plant regeneration via shoot organogenesis on a new basal medium based on the mineral composition of young stump shoots. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 51, 626–636.
- Ouyang, L.; Wang, Z.; Li, L.; Chen, B. (2020). Physiological parameters and differential expression analysis of N-phenyl-N'-[6-(2-chlorobenzothiazol)-yl] urea-induced callus of *E. urophylla* x *E. grandis*. *PeerJ*, 8, e8776.
- Rolland F.; Moore B.; Sheen J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14 (Suppl.), 185-205.
- Rolland F.; Baena-Gonzalez E.; Sheen J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual review of plant biology*. 57, 675-709.
- Shwe, S. S.; Leung, D. W. M. (2020) Plant regeneration from *E. bosistoana* callus culture. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 56, 718–725.
- Smeekens S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 51: 49-81.
- Wang, X.; Luo, P.; Qiu, Z.; Li, X.; Zeng, B.; Fan, C. (2022). Adventitious bud regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *E. urophylla* x *E. tereticornis* interspecific hybrid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 58(3), 416-426.
- Yaseen, M.; Ahmad, T.; Sablok, G.; Standardi, A.; Hafiz, I. A. (2013). Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular biology reports*, 40(4), 2837-2849.

Daño por heladas y crecimiento de *Corymbia* spp. al segundo año de edad en Concordia, Entre Ríos, Argentina.

Frost damage and growth rate of 2-year-old *Corymbia* spp. in Concordia, Entre Ríos, Argentina.

Gimenez, Carla A.¹; Harrand, L.²; López, J.A.³; Martínez-Meier, A.⁴

¹ Becaria INTA-CONICET. ² EEA INTA Concordia, Entre Ríos. ³ EEA INTA Bella Vista, Corrientes. ⁴ EEA INTA Bariloche, Río Negro.

gimenez.carla@inta.gob.ar

Resumen

En un ensayo instalado en la EEA INTA Concordia, Entre Ríos, Argentina (Lat 31°21'43" S, Long 58°07'16" E) se evaluó al segundo año de edad el daño producido por las heladas y los indicadores de velocidad de crecimiento de *C. citriodora* subsp. *citriodora* (CCC), *C. citriodora* subsp. *variegata* (CCV) y *C. torelliana* (CT). Considerando al volumen medio individual como principal indicador de la velocidad de crecimiento, se encontraron diferencias altamente significativas entre los tres taxones, donde: CCV>CCC>CT. En cuanto al efecto de las heladas, CT se destacó como la entidad de mayor tolerancia, CCV tuvo un comportamiento intermedio y CCC evidenció ser la más susceptible. A nivel de orígenes-procedencias, tanto para CCV como para CT, no se detectaron diferencias significativas en tolerancia al frío ni en volumen medio individual.

Palabras Clave: *Corymbia citriodora*, *Corymbia variegata*, *Corymbia torelliana*.

Abstract

Frost damage and growth rate indicators were evaluated in a provenance-progeny trial of *C. citriodora* subsp. *citriodora* (CCC), *C. citriodora* subsp. *variegata* (CCV) and *C. torelliana* (CT) and assessed at the age of 2 years. The trial was installed at the EEA INTA Concordia, Entre Ríos, Argentina (Lat 31°21'43" S, Long 58°07'16" E). Considering the mean individual volume as the main growth rate indicator, the results showed highly significant differences among the three taxa, where CCV>CCC>CT. Regarding the effect of frost, CT distinguished as the most tolerant entity, CCV had an intermediate behavior and CCC was the most susceptible. At origins-provenance level, CCV and CT showed no significant differences in cold tolerance neither in mean individual volume.

Keywords: *Corymbia citriodora*, *Corymbia variegata*, *Corymbia torelliana*.

Introducción

Eucalyptus citriodora y *Eucalyptus torelliana*, reubicados taxonómicamente por Hill and Johnson (1995) como *Corymbia citriodora* subsp. *citriodora* (CCC) y *Corymbia torelliana* (CT), tienen registros en Argentina desde hace muchos años (Cozzo, 1976, Golfari, 1985; Perborell, 1988).

Por su parte, *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* fue introducido formalmente a fines de la década de los 2000 y los primeros resultados fueron publicados por López *et al.* (2009) y López y Vera Bravo (2018). Según éstos autores, *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* (CCV) se destacó como un taxón promisorio en velocidad de crecimiento y rectitud del fuste. Como contrapartida, CCV no tiene buena tolerancia a las bajas temperaturas, tiene poca capacidad de enraizamiento y es susceptible a *Quambalaria pitereka*. No obstante, la generación de híbridos con *Corymbia torelliana* sería una estrategia a iniciar a efectos de salvar dichas desventajas, tal como lo indicaban los resultados obtenidos por Lee *et al.* (2005). Por ello, a efecto de corroborar algunos de los rasgos anteriormente mencionados, al segundo año de edad en un ensayo que contiene taxones de CCC, CCV y CT se evaluó el daño producido por las heladas y los indicadores de velocidad de crecimiento de dichas entidades.

Materiales y Métodos

El experimento se instaló en la EEA INTA Concordia, Entre Ríos, Argentina (Lat 31°21'43" S, Long 58°07'16" E, 37 m.s.n.m.). Esta región es caracterizada por Köppen-Geiger como clima templado cálido (subtropical) sin estación seca y posee un período medio libre de heladas de 298 días (INTA Concordia, 2010).

En la Tabla 1 se describen las progenies (half-sib) y los orígenes-procedencias de los taxones de *Corymbia citriodora* subsp. *citriodora* (CCC), *C. citriodora* subsp. *variegata* (CCV) y *C. torelliana* (CT).

Dichos materiales fueron instalados en un diseño experimental de set en bloques y parcelas de un solo árbol con 14 repeticiones. Cada set estuvo compuesto por cada uno de los 3 taxones de *Corymbia* y fueron distribuidos al azar dentro de cada bloque. Las procedencias y sus progenies fueron distribuidas al azar dentro de cada set. La distancia de plantación fue de 4,0 m x 2,5 m.

Tabla 1. Materiales evaluados, indicando número de progenies, fuente de semilla y sus respectivas coordenadas geográficas

Table 1. Tested materials, indicating number of progenies, seed source and their respective geographic coordinates.

Taxones	Orígenes/Procedencias	Número de progenies	Latitud	Longitud
CCC	1-IPEF-Anhembi, Sao Paulo, Brasil	42	22° 47' S	48° 09' O
	2-Woondum (QLD). CSIRO, Australia	20	26° 25' S	152° 81' E
CCV	3-Humaitá, Entre Ríos, Argentina	6	31° 46' S	58° 06' O
	4-IPEF-Anhembi, Sao Paulo, Brasil	30	22° 47' S	48° 09' O
CT	5-Helenvale, 25 km south of Cooktown, (QLD), SeedEnergy, Australia	24	15° 42' S	145° 13' E
	6-Ex-IFONA, Goya, Corrientes, Argentina	13	29° 16' S	59° 13' O
	7-INTA, Bella Vista Corrientes, Argentina	3	28° 26' S	58° 59' O

Los datos de crecimiento de los árboles se recolectaron a los 2 años de edad. Los atributos medidos incluyeron el diámetro a la altura del pecho (DAP, cm) y la altura total (ALT, m). El DAP se midió con cinta diamétrica y la altura total se midió con un hipsómetro Vertex Laser Haglöf.

Dado que en la región no existen desarrolladas funciones de volumen para *Corymbia* spp., las estimaciones de los volúmenes individuales con corteza expresados en dm³ (VOL) fueron calculados con un factor de forma de 0,5 utilizando la siguiente ecuación: $VOL = (\pi/4) \times (DAP)^2 \times ALT \times 0,5$ donde $\pi = 3,14$, DAP y ALT expresados en decímetros.

Luego de las mediciones de crecimiento anteriormente comentadas, se evaluó el efecto de las heladas (FROST) a través de la siguiente escala subjetiva (Figura 1):

- 1- Ningún daño observable.
- 2- Daño en la base de la copa o sólo en algunas ramas.
- 3- Daño en menos del 50% de la copa.
- 4- Daño en más del 50% de la copa.
- 5- Daño del 75-80% de la copa.
- 6- Toda la copa afectada sin presencia de hojas vivas o solo algunas hojas vivas.

Siguiendo a Gianola & Norton (1981) dichas variables categóricas también fueron transformadas en *normal scores* (FROST NS).

Para determinar las diferencias estadísticas entre taxones y entre orígenes-procedencias dentro de taxones, se realizó el análisis de la varianza utilizando el procedimiento GLM (SAS 9.2, 2016).

Para las comparaciones múltiples entre taxones y entre orígenes-procedencias dentro de taxones ajustadas por LSMEAN se utilizó la prueba de Tukey-Kramer, que permite la inferencia a través de intervalos, ejecutando la opción PDIFF ADJUST=TUKEY (SAS 9.2, 2016).

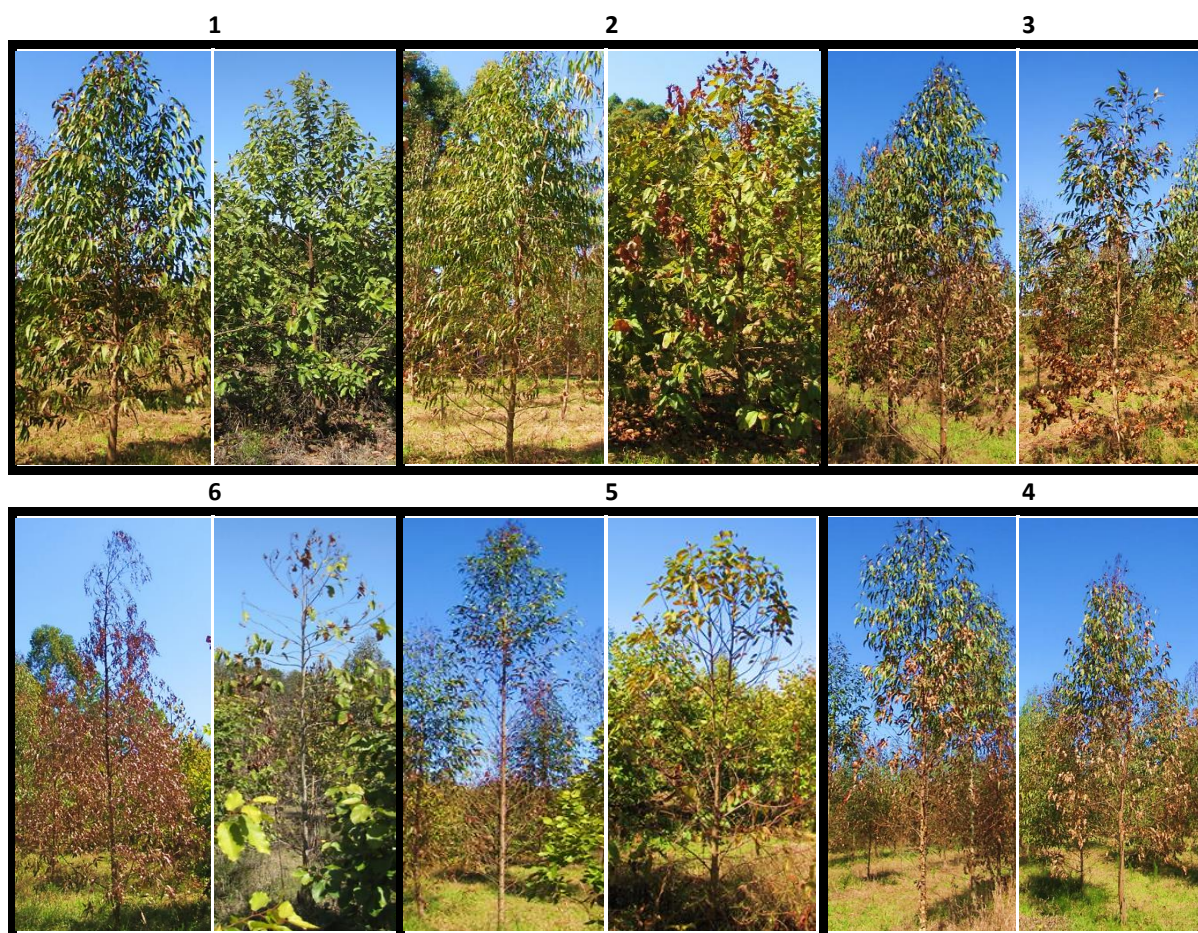


Figura 1. Daño por heladas (FROST) con escala 1-6 (Crédito de las imágenes: Ing. Leonel Harrand).
Figure 1. Frost damage (FROST) with scale 1-6 (Image credit: Ing. Leonel Harrand).

Resultados y Discusión

En la Tabla 2 se observa que, a nivel de taxones, considerando al volumen medio individual como principal indicador de la velocidad de crecimiento, CCV fue significativamente superior a CCC. Este resultado es coincidente con lo obtenido para esta región por López y Vera Bravo (2018). Por su parte CCC superó significativamente a CT. Observando los valores medios, puede notarse que hay una marcada diferencia en crecimiento en altura en CT con respecto a CCC y CCV, en contraposición con el DAP.

En cuanto al efecto de las heladas CT se destacó como la entidad de mayor tolerancia, CCV tuvo un comportamiento intermedio y CCC evidenció ser la más susceptible, considerando tanto la escala subjetiva (FROST 1-6) como la transformada en *normal score* (FROST NS).

Tabla 2. Nivel de probabilidad obtenido en el análisis de la varianza a nivel de taxones y valores medios de los caracteres evaluados.

Table 2. Probability level obtained of the analysis of variance at taxa level and mean values of each traits.

	DAP (cm)	ALT (m)	VOL (dm ³)	FROST (1-6)	FROST (NS)
Taxones $P_{r>F}$	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Promedio Taxones					
CCC	5,36 b	6,89 a	8,928 b	3,65 a	0,47 a
CCV	5,75 a	6,63 b	9,806 a	3,42 b	0,32 b
CT	5,19 b	4,27 c	5,206 c	1,53 c	-0,87 c

Medias de Taxones ajustadas por LSMEANS. Taxones con distintas letras son diferentes al 1% (Tukey-Kramer).

A nivel de orígenes-procedencias, y dado que CCC estuvo representada por una única procedencia (1-IPEF), el análisis sólo fue realizado para CCV y CT. En este sentido, se puede observar que considerando VOL y efecto de las heladas entre los orígenes-procedencias de CCV no se detectaron diferencias significativas para ambos rasgos (Tabla 3). Igual resultado fue obtenido para CT (Tabla 4).

Tabla 3. Nivel de probabilidad obtenido en el análisis de la varianza a nivel de orígenes-procedencias de *Corymbia citriodora* subsp *variegata* (CCV) y *Corymbia torelliana* (CT).

Table 3. Probability level obtained of the analysis of variance at the origins-provenances level of *Corymbia citriodora* subsp *variegata* (CCV) and *Corymbia torelliana* (CT).

CCV	DAP (cm)	ALT (m)	VOL (dm³)	FROST (1-6)	FROST (NS)
Oríg.-Proc. Pr>F	0,8449	0,0544	0,7077	0,4222	0,4919
Promedio Orígenes-Procedencias					
3-Humaitá	5,68 a	6,82 a	10,124 a	3,58 a	0,087 a
4-IPEF	5,74 a	6,68 a	9,869 a	3,43 a	0,011 a
2-Woondum	5,79 a	6,49 a	9,590 a	3,35 a	-0,054 a
CT	DAP (cm)	ALT (m)	VOL (dm³)	FROST (1-6)	FROST (NS)
Oríg.-Proc. Pr>F	0,1028	0,0361	0,2034	0,4310	0,2612
Promedio Orígenes-Procedencias					
6-Ex-IFONA	5,29 a	4,27 ab	5,39 a	1,49 a	-0,049 a
7-INTA	4,77 a	3,95 b	4,49 a	1,42 a	-0,014 a
5-Helenvale	5,19 a	4,31 a	5,19 a	1,58 a	0,043 a

Medias de Orígenes-Procedencias ajustadas por LSMEANS.

Orígenes-Procedencias con distintas letras son diferentes al 1% (Tukey-Kramer).

Los resultados presentados muestran las diferencias en crecimiento y tolerancia al frío de los 3 taxones y alientan la continuidad de la estrategia de mejoramiento iniciada a través de cruzamientos controlados incorporando a CT por su mayor tolerancia a las heladas y un mayor porcentaje de enraizamiento (Lee *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2014; Rockwood, *et al.*, 2022,) y a CCV por su mayor velocidad de crecimiento (Lee *et al.*, 2011, López y Vera Bravo, 2018). Por ello, avanzar con la selección genética de los mejores individuos dentro de las mejores progenies de ambos Taxones, propagarlos a través de injertos y posteriormente realizar cruzamientos controlados utilizando a CT como parental femenino, se considera la estrategia más adecuada.

Bibliografía

- Cozzo, D. 1976. Tecnología de la forestación en Argentina y América Latina. Edit. Hemisferio Sur. 610 p.
- Gianola, D. & Norton, H.W. 1981. Scaling threshold Characters. *Genetics* 99: 357-364. October, 1981.
- Golfari, L. 1985. Distribución regional y condiciones ecológicas de los eucaliptos cultivados en la Argentina. Problemas inherentes. Publicación Técnica N°1. CIEF. 19 p.
- Lee, D.; Nikles, G.; Pomroy, P.; Brawner, J.; Wallace, H.; Stokoe, R. 2005. *Corymbia* species and hybrids: a solution to Queensland hardwood plantations? *Corymbia* Research Meeting. Gympie, Queensland 1- 2 junio de 2005. 5-7p.
- Lee, D.; Brawner, J.; Smith, T.; Hogg, B.; Meder, R. & Osborne, D. 2011. Productivity of plantation forest tree species in north-eastern Australia: a report from the Forest Adaptation and Sequestration Alliance. The Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. 52 p.
- López, J.A., M.A. Hernández, y P.Y. Genes. 2009. *Corymbia* spp. ¿Una alternativa para usos sólidos de alto valor? Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina (INTA). Tech. Rep. 8 p.
- López J. A. y C. D. Vera Bravo. 2018. Crecimiento y rectitud del fuste de orígenes geográficos de *Corymbia* spp. en la Mesopotamia argentina. *RIA*. 44 (3)
- Perborell, P.J. 1988. Comportamiento en suelos hidromórficos de la Provincia de Corrientes de *Eucalyptus torelliana* F. Muell. VI Congreso Forestal Argentino. Tomo II. Santiago del Estero: 454.
- Reis, C.A.F.; Assis, T.F.; Santos, A.M.; Paludzyszy, E. 2014. *Corymbia torelliana*: estado da arte de pesquisas no Brasil. Embrapa Florestas. Documentos 261. 48 p.
- Rockwood, D. L., Huber, D. A., Crawford, M. A., Rucks, P. C., Lamb, E., Fabbro, K. W., & Hodge, G. R. (2022). *Eucalyptus Amplifolia* and *Corymbia Torelliana* in the Southeastern USA: Genetic Improvement and Potential Uses. *Forests*, 13(1), 75. 11 p
- SAS 9.2 TS Level 2MO XP_PRO Platform.2016. Licensed to INTA Site 70067979.

Tamaño mínimo muestral para caracteres anatómicos de *Corymbia torelliana* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson.

Minimum sample size for anatomical traits of *Corymbia torelliana* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson.

Gimenez, Carla A.¹; Bruno, C.², López, J.A.³; Martínez-Meier, A.⁴

¹ Becaria INTA-CONICET. ²Facultad Cs. Agropecuarias, UNC. UFyMA-INTA-CONICET, Córdoba. ³ EEA INTA Bella Vista, Corrientes. ⁴ EEA INTA Bariloche, Río Negro.

gimenez.carla@inta.gob.ar

Resumen

Corymbia torelliana es una especie que ha adquirido relevancia desde el punto de vista del mejoramiento genético por su tolerancia a heladas y al estrés hídrico, entre otros. Las características anatómicas de la madera y la tolerancia al frío tienen relación desde la resistencia a la cavitación del xilema en diferentes especies forestales. Por tal, es necesario realizar un análisis anatómico preciso. El objetivo de este trabajo fue determinar el tamaño mínimo de muestra (TMM) para dos variables anatómicas: diámetro de lumen y espesor de pared de fibra. Para ello se utilizó una metodología paramétrica y otra no paramétrica. Los resultados indican que el TMM para los atributos anatómicos oscilan en un rango de n= 30 – 40 mediciones para obtener una estimación con una variabilidad del 4%.

Palabras clave: *Tamaño mínimo de muestra, anatomía de la madera, tolerancia a heladas.*

Abstract

Corymbia torelliana has become important from the perspective of forest breeding because of its tolerance to frost and water stress, among others. The anatomical traits of wood and cold tolerance are related from the resistance to xylem cavitation in different forest species. Therefore, an accurate anatomical analysis is necessary. The aim of this work was to determine the minimum sample size (MSS) for two anatomical variables: lumen diameter and fibre wall thickness. A parametric and non-parametric methodology were used. The results suggest that the MSS for anatomical traits range from n= 30 – 40 measurements to obtain an estimate with a variability of 4%.

Keywords: *Minimum sample size, wood anatomy, cold hardiness.*

Introducción

Corymbia torelliana (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson es una especie nativa del norte de Queensland, Australia. Actualmente, forma parte de programas de mejoramiento genético forestal, como parental femenino para la obtención de híbridos debido a sus características adaptativas, su tolerancia a heladas y su capacidad rizogénica (Lee *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2014) y como especie pura en cortinas rompevientos (Rockwood *et al.*, 2022). Así como las características de adaptabilidad ambiental, la tolerancia al frío es un atributo deseable en los materiales genéticos para aquellas zonas marginales de Argentina, en donde las bajas temperaturas son letales a edades juveniles para las plantaciones comerciales.

Antecedentes en otras especies forestales indican que existe una relación entre la tolerancia al frío y las características anatómicas de madera desde su rol en la resistencia a la cavitación del xilema (Barotto *et al.*, 2018, Sperry & Sullivan, 1992). Es por ello que la cuantificación de los elementos anatómicos es de vital importancia al permitir realizar las estimaciones óptimas de los parámetros genéticos y heredabilidades, para la selección y reproducción de materiales con características deseables, como ser sus propiedades físicas y mecánicas y sus atributos ecofisiológicos (Carlquist,

2012). Sin embargo, aún no se ha dilucidado el rol de los elementos anatómicos en relación con la tolerancia a heladas para *C. torelliana* (CT).

Estudios preliminares son útiles para evitar una recolección de datos poco representativa de la población, tal que los estadísticos muestrales estimados sean inconsistentes, ineficientes y sesgados (Balzarini *et al.*, 2016). Cuando los datos son sometidos a estudios comparativos para selección de individuos con características anatómicas superiores, un tamaño muestral menor al necesario incrementa la probabilidad de cometer error de tipo II (β). Un aumento de β provoca una disminución de la potencia de una prueba estadística ($1-\beta$) para encontrar diferencias significativas. Por el contrario, al realizar un elevado número de mediciones, se incurriría en consumo de tiempo y recursos económicos innecesarios. Existen trabajos de tamaño mínimo muestral para caracteres como densidad de la madera (da Páscoa *et al.*, 2020); sin embargo, existe un vacío en el conocimiento del número de observaciones óptimo a recolectar para estimar los valores individuales de los caracteres anatómicos de CT, que represente objetivamente y con precisión las dimensiones celulares, evitando las desventajas de una subestimación. El objetivo de este trabajo fue estimar el tamaño mínimo muestral para diámetro de lumen de fibra y espesor de pared de fibra, con un nivel de precisión y confianza apropiados para realizar inferencias.

Materiales y Métodos

Se analizaron los caracteres anatómicos, espesor de pared y diámetro de lumen de fibras, de 6 árboles de 2 años de edad plantados en un ensayo de progenies de medios hermanos, ubicados en la EEA INTA Concordia, Entre Ríos, Argentina (31°21'43" S, 58°07'16" E) El material utilizado corresponde a 6 familias de CT, seleccionadas por su fuente de semilla. (Ex-IFONA, Goya, Corrientes, Argentina (29° 16' S, 59° 13' O) para las familias denominadas 100, 103, 106 y 107; INTA, Bella Vista Corrientes, Argentina (28° 26' S, 58° 59' O) para la familia 113; y Helenvale, 25Km South of Cooktown, (QLD) SeedEnergy, Australia (15° 42' S, 145° 13' E) para la familia 117).

Para el estudio se obtuvieron muestras de madera de cada árbol a 0,5 m de altura, utilizando el barreno de Pressler. A partir de éstas, con un micrótopo de deslizamiento se obtuvieron cortes transversales para la medición de variables anatómicas. Los cortes histológicos de 25 μ m de espesor y teñidos con safranina (1% v/v), fueron montados en microscopio óptico (Olympus BH2, Japón) utilizando un aumento de 100x, y con cámara digital (Sony DSC-W100) incorporada. El procesamiento de imágenes fue realizada a través del software ImagePro-Plus, Media Cybernetics, USA.

Se midieron en las imágenes digitales de los cortes transversales los valores del espesor doble de pared de las fibras, que al dividirlos por 2 arrojan el espesor de pared (μ m, EP), y el diámetro de lumen de las fibras (μ m, DLF). En total se tomaron 11 imágenes por individuo analizado y de cada imagen, se obtuvieron 30 mediciones de cada variable anatómica, totalizando 330 observaciones anatómicas por individuo.

Se estimaron medidas descriptivas y estadísticos muestrales utilizados para el cálculo del tamaño muestral. Para la obtención de resultados se utilizó el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2022).

Se realizó una estimación paramétrica del Tamaño Mínimo Muestral (TMM) basado en la distribución t de Student según la siguiente fórmula:

$$n \leq \frac{(2 \cdot t_{1-\alpha/2} \cdot s)^2}{c}$$

Donde, n representa la cantidad de mediciones a muestrear; S^2 la varianza muestral; la confianza ($1-\alpha$) de la estimación, bajo el estadístico t de Student; y c la amplitud del intervalo de confianza. Se estimaron los límites del intervalo de confianza (IC) para una distribución t de Student con 3 niveles de confianza 0,90; 0,95 y 0,99.

También se realizó una estimación no paramétrica del TMM, aplicando el método de muestreo y re-muestreo con reposición *bootstrap* (Efron, 1979). El tamaño muestral (n) fue variando de 5 en 5, es decir desde $n=5$ hasta $n=40$ con 500 repeticiones *bootstrap* por cada tamaño muestral.

Resultados y Conclusiones

Se pueden observar los resultados de TMM para los dos caracteres anatómicos evaluados en cada familia de CT en la Tabla 1. La variable DLF es el carácter anatómico que presenta los valores más altos de TMM para la especie, arrojando un promedio, entre todas las familias, de TMM=33 para un IC de 95%. Tanto EP como DLF, son medidas que se utilizan en conjunto para la obtención del carácter

anatómico ancho de fibra. Por tal motivo, en función de los resultados obtenidos el tamaño óptimo de mediciones para ambos caracteres se encuentra dentro del intervalo $n=30-40$.

En la Figura 1, se grafican los valores de Coeficiente de Variación (% CV) para cada muestra *bootstrap* por carácter anatómico evaluado. Se destaca, como era de esperar que el CV disminuyó a medida que aumentó el tamaño de muestra, tanto para el carácter DLF, como para EP. Estos resultados evidencian que con un tamaño muestral de 10 mediciones, el CV de la estimación de los caracteres anatómicos EP y DLF estarían por debajo del 10%. Así mismo, también se observa que tamaños muestrales por encima de 30 medidas, tendrían una variación del 4% en la estimación de los caracteres anatómicos. Estos resultados indican que un aumento en el tamaño muestral por encima de 30 no provoca una disminución del CV.

Tabla 1. Estimación del tamaño mínimo muestral para los caracteres EP y DLF, con sus distintos niveles de confianza en la estimación del IC.

Table 1. Minimum sample size estimation for EP and DLF traits, with their different confidence levels in the CI estimation.

Identificación del Individuo	Confianza del Intervalo	EP				DLF			
		Amplitud IC	Tamaño mínimo muestral (n) estimado para diferentes niveles de significancia (α)			Amplitud IC	Tamaño mínimo muestral (n) estimado para diferentes niveles de significancia (α)		
			0,01	0,05	0,1		0,01	0,05	0,1
100	99	0,50	15	8	6	1,54	46	25	18
	95	1,14	20	11	8	1,14	62	34	24
	90	0,95	24	13	9	0,95	75	41	28
103	99	1,31	19	11	7	1,31	39	22	15
	95	0,97	26	14	10	0,97	53	29	20
	90	0,81	31	17	12	0,81	64	35	24
106	99	1,39	18	10	7	1,39	42	23	16
	95	1,03	25	14	9	1,03	56	31	21
	90	0,86	29	16	11	0,86	67	37	26
107	99	1,77	18	10	7	1,77	53	29	20
	95	1,31	24	13	9	1,31	71	39	27
	90	1,09	29	16	11	1,09	86	47	33
113	99	1,37	15	8	6	1,37	41	23	16
	95	1,02	21	11	8	1,02	56	31	21
	90	1,47	25	14	9	1,47	67	37	25
117	99	1,45	15	8	6	1,45	44	24	17
	95	1,08	11	11	7	1,08	32	32	22
	90	0,89	24	13	9	0,89	71	39	27

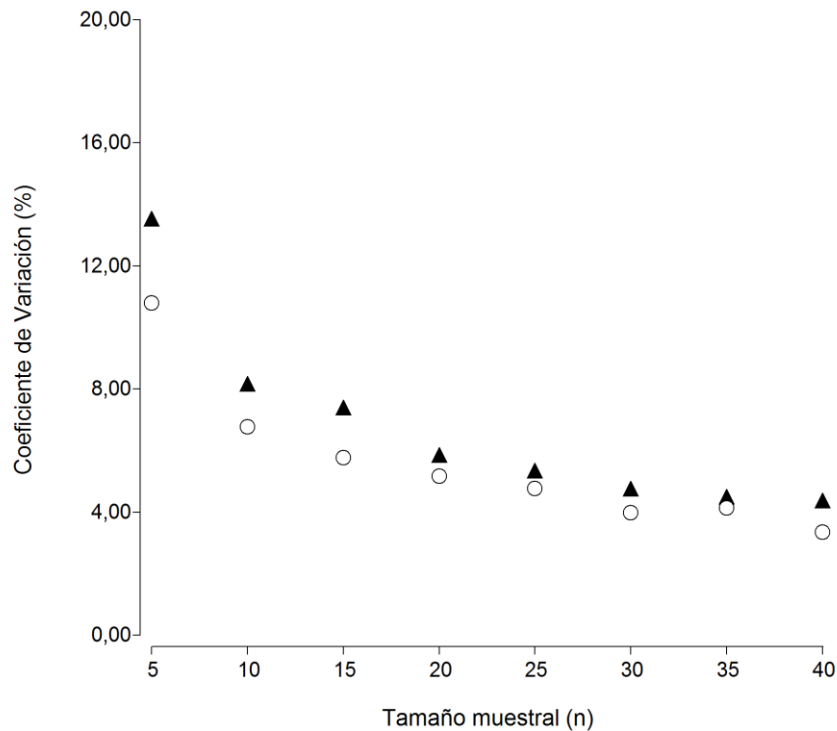


Figura 1. Estimación de la variabilidad muestral en función del tamaño muestral a través de un método no paramétrico de muestreo y re-muestreo con reposición *bootstrap*. Símbolos: triángulos representa el carácter DLF, y círculos el carácter EP.

Figure 1. Variability sample estimation depending on the sample size, using a non-parametric method of sampling and re-sampling with bootstrap replenishment. Symbols: triangles represent the DLF trait, circles represent the EP trait.

Bibliografía

- Balzarini, M. G., Di Rienzo, J., Tablada, M., Gonzalez, L. A., Bruno, C., Córdoba, M., & Casanoves, F. (2012). Estadística y Biometría: Ilustraciones del uso de InfoStat en problemas de agronomía. Universidad Nacional de Córdoba. 400 pp.
- Barotto, A. J., Monteoliva, S., Gyenge, J., Martinez-Meier, A., & Fernandez, M. E. (2018). Functional relationships between wood structure and vulnerability to xylem cavitation in races of *Eucalyptus globulus* differing in wood density. *Tree Physiology*, 38(2), 243-251 p.
- Carlquist, S. (2012). How wood evolves: a new synthesis. *Botany*, 90(10), 901-940.
- da Páscoa, K. J. V., Gomide, L. R., Tng, D. Y. P., Scolforo, J. R. S., & de Mello, J. M. (2020). How many trees and samples are adequate for estimating wood-specific gravity across different tropical forests? *Trees*, 34(6), 1383-1395.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2022. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Efron, B. (1979). Bootstrap methods: Another look at the jackknife. *Ann. Stat.* 7: 1-26 p.
- Lee, D.; Nikles, G.; Pomroy, P.; Brawner, J.; Wallace, H.; Stokoe, R. (2005). *Corymbia* species and hybrids: a solution to Queensland hardwood plantations? *Corymbia* Research Meeting. Gympie, Queensland 1- 2 junio de 2005. 5-7p.
- Reis, C. A. F., de Assis, T. F., Santos, A. M., & Paludzyszyn Filho, E. (2014). *Corymbia torelliana*: estado da arte de pesquisas no Brasil. Embrapa Florestas-Documentos. 261. 48 p.
- Rockwood, D. L., Huber, D. A., Crawford, M. A., Rucks, P. C., Lamb, E., Fabbro, K. W., & Hodge, G. R. (2022). *Eucalyptus Amplifolia* and *Corymbia Torelliana* in the Southeastern USA: Genetic Improvement and Potential Uses. *Forests*, 13(1), 75. 11 p.
- Sperry, J. S., & Sullivan, J. E. (1992). Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous, and conifer species. *Plant physiology*, 100(2), 605-613.

Propagación vegetativa de tres taxones de *Corymbia* spp. (eucaliptos amarillos) a partir de brotes juveniles.

Vegetative propagation of three taxa of *Corymbia* spp. (spotted gum)
from juvenile shoots.

Vera Bravo, Carlos David¹; Balbín Marticorena Eduardo²

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Bella Vista, Ruta 27, km 38,3, Bella Vista, Corrientes.

² Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Sargento Cabral 2131, W3402BKG Corrientes, Argentina.

vera.bravo@inta.gob.ar

Resumen

Este trabajo aporta información sobre la propagación vegetativa de *Corymbia citriodora* subsp. *citriodora* (CCC), *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* (CCV) y *Corymbia torelliana* (CT), taxones cuya madera posee un alto potencial de uso y producción en el nordeste argentino. El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de enraizamiento de los tres taxones. Para ello, se evaluó el porcentaje de enraizamiento de brotes provenientes de plantas madres utilizando brotes epicórmicos y de los lignotubérculos. Para el estudio se utilizó el diseño en Bloques Aleatorizados; los promedios fueron comparados a través del test de Duncan al 5% de probabilidad. Los resultados mostraron que el taxón CT tuvo un mayor enraizamiento con 22,5%, seguido por las estacas de los lignotubérculos de CCC con 18,7%, con 11,2% de enraizamiento las estacas de los lignotubérculos de CCV, seguido de los brotes epicórmicos de CCV con 10,5% y, por último, las estacas de los tallos de CCC fueron los de menor enraizamiento con un 5,5%. Entre los tres taxones, *Corymbia torelliana* posee una mayor capacidad de enraizamiento, no obstante, se afirma que son taxones considerados de difícil enraizamiento.

Palabra clave: *Corymbia*, cuttings, enraizamiento, lignotuberculos

Abstract

This work provides information on the vegetative propagation of *Corymbia citriodora* subsp. *citriodora* (CCC), *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* (CCV) and *Corymbia torelliana* (CT), taxa whose wood has a high potential for use and production in northeastern Argentina. The objective of this work was to determine the rooting capacity of the three taxa. For this, the percentage of rooting of shoots from mother plants were evaluated using epicormic shoots and lignotubers. The Randomized Blocks design was used for the study; the means were compared through Duncan's test at 5% probability. The results showed that the taxon CT had a greater rooting with 22.5%, followed by the cuttings of the lignotubers of CCC with 18.7%, with 11.2% of rooting the cuttings of the lignotubers of CCV, followed by the epicormic shoots of CCV with 10.5% and, finally, the cuttings of the stems of CCC were the ones with the least rooting with 5.5%.

Key words: *Corymbia*, cuttings, rooting, lignotuber

Introducción

En Argentina, y especialmente en la región Mesopotámica se viene trabajando con esta especie, determinándose que CCV es la especie más promisoría para ser plantada en ésta región (López y Vera Bravo, 2018). CT es una especie muy utilizada como cortina rompevientos (Tamang *et al.*, 2011) y es tolerante resistente a ciertas enfermedades fúngicas en su lugar de origen. por tal motivo, se están generando híbridos con el objetivo de obtener materiales más tolerantes a enfermedades, sequía, heladas, con mayor capacidad de enraizamiento y plasticidad ambiental (Lee, 2007). Se han logrado propagar materiales jóvenes de CCV solamente a partir de brotes provenientes de los lignotubérculos (Assis, 2014), éstas estructuras de reserva presentes en las axilas de los cotiledones, poseen yemas vegetativas que producen rebrotes ante eventos climáticos como fuego, heladas, vientos y sequías, estos brotes poseen características morfológicas y fisiológicas juveniles, que favorecen el

enraizamiento; utilizando estos rebrotes en CCC se ha logrado propagar árboles adultos (Assis, 2014). En general estos taxones son considerados recalcitrantes en cuanto a la propagación vegetativa; a diferencia de CT que no poseen estas estructuras, sin embargo, esta especie posee mayor capacidad de enraizamiento (Assis, 2014). Ante nuevas demandas del mercado, las exigencias para ganar continuamente productividad, disponer de especies alternativas ante el cambio climático se tornan imprescindibles. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue generar información sobre la propagación vegetativa con vistas a una propagación clonal a partir de plantines de estos tres taxones.

Materiales y Métodos

Se utilizaron plantines de 1 año de edad de los 3 taxones, los plantines fueron trasplantados a macetas de 7 litros para la producción de plantas madres dadoras de brotes para ser enraizadas. El sustrato comercial Grow Mix fue utilizado para el crecimiento de las plantas madres; las mismas fueron fertilizadas con 5 gr. de Multicote 4M después de cada corte y regadas manualmente. Los brotes epicórmicos se produjeron en los primeros 15 a 20 cm de tallo y en los lignotubérculos después del descopado.

Para el enraizamiento se procedió a contar los brotes del tallo o del lignotúber según tratamiento y se realizaron una mezcla de los brotes provenientes de cada planta, luego de eliminar algunas hojas y cortar las láminas de las hojas por la mitad para disminuir el área de transpiración, se sumergieron en una solución de agua y benomyl al 2 %, luego se insertaron los brotes a una profundidad de 2 a 3 cm en el sustrato, y colocados en una estructura de enraizamiento con humedad del 90% (± 5 %) producidas por nebulizadores con encendido automático cada 5 a 20 minutos según temperaturas máximas, las mismas variaron en promedio entre 25°C y 35°C. El sustrato para el enraizamiento estuvo compuesto de una mezcla de turba y 20 % de perlita, fertilizados con basacote 4M a razón de 2 kg por m³ de sustrato.

El experimento fue conducido en un delineamiento en Bloques Aleatorizados, considerando al bloque cada corte de los brotes, (estación del año en que se realizó el corte) con 4 bloques y 5 tratamientos (Tres corresponden a los brotes producidos en el tallo y dos corresponden a los brotes de los lignotubérculos de los taxones CCC y de CCV), el stock de plantas madres estuvo compuesto por 10 a 12 plantas iniciales, las unidades experimentales fueron las bandejas con 33 a 111 brotes como mínimo y máximo a ser enraizados por tratamiento.

El efecto entre los tratamientos fue examinado a través del Análisis de la Varianza. Los valores descriptivos de probabilidad (p) obtenidos fueron calculados por el procedimiento GLM del Sistema Estadístico SAS estudiantil.

Resultados y Discusión

Durante las primeras semanas en la estructura de enraizamiento, en las estacas ocurrió una oxidación de las hojas en las zonas de corte, este fenómeno también se observa en la región de corte del tallo lo que probablemente dificulta el enraizamiento, fenómenos similares ocurren en *Eucalyptus grandis*, con ataques de pudrición que son originados por condiciones abióticas, colonizados luego por hongos saprófitos (Alfenas *et al.*, 2004). A los 70 días de permanecer en la estructura de enraizamiento se observaron las primeras raíces que sobresalen en la parte inferior de las bandejas, tiempo largo en comparación con materiales clonales de *Eucalyptus grandis* e híbridos que en un periodo de 30 días ocurre este proceso (Titon *et al.*, 2003). Las primeras raíces que se observaron fue en CT.

Del estudio del análisis de varianza se desprende que hay diferencias significativas entre los tratamientos como puede apreciarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Promedio de enraizamiento de estacas (%), letras iguales no hay diferencias significativas (datos transformados*) entre las medias del porcentaje de enraizamiento de las estacas de los cinco tratamientos, por el test de Duncan ($\alpha=0,05$).

Table 1. Mean rooting of cuttings (%), equal letters there are no significant differences (transformed data*) between the means of the rooting percentage of the cuttings of the five treatments, by Duncan's test ($\alpha=0.05$).

Tratamientos	Porcentaje de enraizamiento (%)	Medias
CT	22,5	A
CCC lignotubérculos	18,75	A B
CCV lignotubérculos	11,25	C B
CCV tallo	10,5	C B
CCC tallo	5,5	C

*datos transformados según la raíz cuadrada del [porcentaje de enraizamiento + 0,5].

El porcentaje de enraizamiento de estacas fue bajo a pesar de la juvenilidad de estos materiales, ya que éstos son tejidos jóvenes y ésta edad juvenil está ligada a una mayor capacidad de enraizamiento sobre todo en especies leñosas (Hartmann *et al.* 2010), no obstante, esa capacidad está determinada por el material genético como lo indica Hartmann *et al.* (2011) y Ayala *et al.* (2020).

En promedio el mayor porcentaje de enraizamiento detectado fue para *Corymbia torelliana* con 22,5 % seguido por *Corymbia citriodora* subsp. *citriodora* (CCC) con 18,75 % de estacas enraizadas, y el menor porcentaje de enraizamiento fue para *Corymbia citriodora* subsp. *variegata* (CCV) con 11,25%. Al comparar el porcentaje de enraizamiento en promedio entre los taxones que poseen lignotubérculos; el enraizamiento en CCC fue mayor que CCV, no obstante, no se detectaron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Cuando se comparan los porcentajes de enraizamiento entre las estacas provenientes de los lignotubérculos y de los tallos dentro de cada taxón se observó que hay un mayor porcentaje de enraizamiento en las estacas provenientes de los lignotubérculos tanto en CCC como en CCV, sin embargo, solo hubo diferencias significativas en el taxón CCC mientras que en CCV las diferencias no fueron significativas.

De los resultados encontrados y considerando la sobrevivencia de los plantines enraizados, se deduce claramente que estos taxones son de bajo porcentaje de enraizamiento, porcentajes similares o mayores se han obtenido en híbridos intraespecíficos en *Corymbia* (Reis *et al.*, 2014), utilizando a CT como madre ya que posee un efecto materno favorable en cuanto al porcentaje de enraizamiento (Assis, 2000).

Como se puede observar en la Figura 1, los desvíos estándares, en general se aprecia una gran dispersión de los valores de enraizamiento; del mismo modo el coeficiente de variación determinado es alto (30 %), lo que indica una alta variabilidad en cuanto al enraizamiento dentro de cada tratamiento.

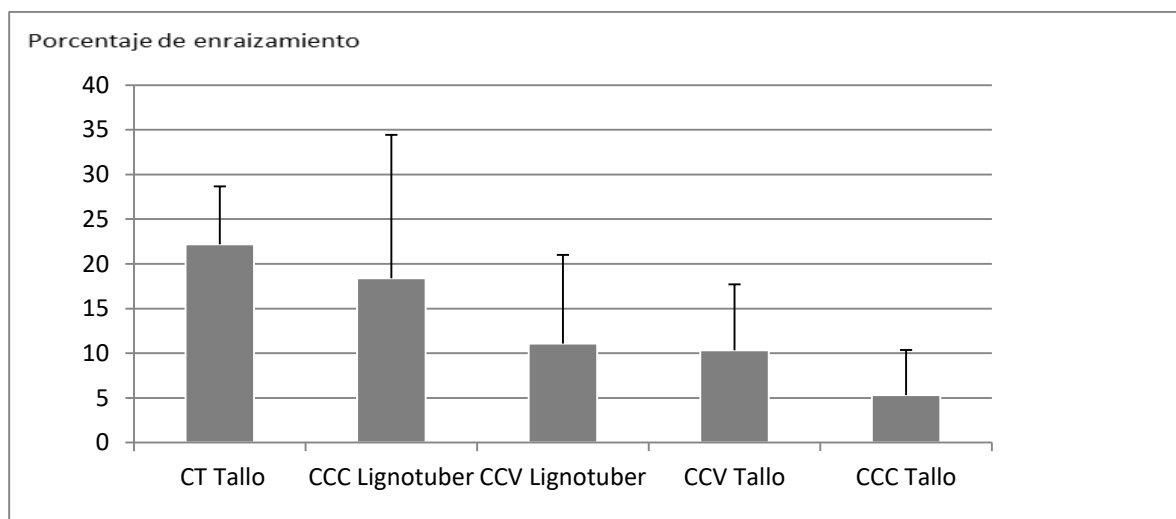


Figura 1. Promedios en porcentajes de enraizamiento de las estacas de los cinco tratamientos de los tres taxones de *Corymbia* estudiados a los 90 días del inicio del proceso de enraizamiento. Las barras corresponden a los desvíos estándares. Los resultados indican el promedio de 4 repeticiones (n= 280 para CT Tallo; n=164 para CCC Lignotúber; n=311 para CCV Lignotúber; n=280 para CCV Tallo y n=280 para CCC Tallo).

Figure 1. Means in rooting percentages of the five treatments in three *Corymbia* taxa studied 90 days after the beginning of the rooting process. The bars correspond to the standard deviations. The results indicate the average of 4 repetitions (n= 280 for CT Stem; n=164 for CCC Lignotuber; n=311 for CCV Lignotuber; n=280 for CCV Stem and n=280 for CCC Stem).

El enraizamiento de CT muestra una mayor homogeneidad en cuanto al enraizamiento, dado que, es uno de los que posee un menor desvío estándar en relación a los otros tratamientos. El enraizamiento de las estacas provenientes de los lignotubérculos tanto de CCC y CCV fueron de 18,75% y 11,25% respectivamente, no obstante, no hubo diferencias estadísticas entre ambos tratamientos.

En el presente trabajo se evitó el uso de reguladores de crecimiento; no obstante, Trueman y Richardson (2008) demostraron que la aplicación de IBA incrementó el porcentaje de enraizamiento en CT y de sus híbridos; así mismo, Bryant y Trueman (2015) encontraron que la aplicación de reguladores de crecimiento incrementaron el porcentaje de enraizamiento en *C. torelliana* x *C. citriodora* y producen más de cuatro raíces adventicias en diferentes posiciones alrededor del tejido vascular de los cuttings. Otros autores reportaron datos de enraizamiento de híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* y viceversa, con porcentajes de enraizamiento que varían de 39 a 43 % (Reis *et al.* 2014) cuando la

madre es CT y con menores porcentajes de enraizamiento cuando CT es el padre. Debido al vigor híbrido, los porcentajes de enraizamiento son superiores a los encontrados en el presente trabajo, por esta razón, las especies del género *Corymbia* son consideradas como difíciles de propagar vegetativamente (Fernandes, 2020), quien cita valores de 5 % de enraizamiento.

Las estacas enraizadas después de 90 días de permanecer en la estructura de enraizamiento se los sometió a un proceso de rustificación, colocándolas a pleno sol y con riego intermitente para que el cambio no sea brusco, en este proceso se produjo la mortandad del 50 % de las plantas, al observar las raíces se comprobó que las raíces eran insuficientes en número donde la mayoría de los plantines tenía una sola raíz y sin raíces secundarias ni pelos absorbentes, solo en los plantines que permanecieron vivos luego del procesos de rustificación se pudo apreciar raíces secundarias y menos cantidad de pelos absorbentes que en las raíces de origen seminal; en las estacas muertas se observaron callos que no generaron raíces. En los plantines logrados se observó que las raíces primarias y secundarias no poseían una arquitectura ni distribución adecuadas, mientras que las raíces seminales que poseían numerosos pelos absorbentes y una arquitectura y distribución simétricas.

En los tres taxones, la sobrevivencia de los plantines después del proceso de rustificación fue baja, debido a una elevada mortandad de raíces, probablemente este fenómeno de deba a un mal funcionamiento de las raíces, este proceso también ha sido observado por otros autores al tratar de propagar especies de éste género. No obstante, CT fue el taxón que mayor sobrevivencia tuvo.

Conclusiones

Este estudio preliminar sobre la capacidad de enraizamiento de estos taxones brinda información para generar estrategias de mejoramiento. Con los resultados obtenidos se confirma lo expresado por otros autores que los taxones estudiados se corresponden a una especie recalcitrante en cuanto a la capacidad de enraizamiento.

La propagación clonal de especies del genero *Corymbia* todavía está en una fase inicial de desarrollo, por ende, falta estudios que promuevan el desarrollo de un sistema radicular, simétrico, en un menor tiempo de inducción de raíces para favorecer a futuro la propagación clonal.

Los cuttings de *Corymbia torelliana* poseen una mayor capacidad de enraizamiento que *C. citriodora* subsp *citriodora* y que *C. citriodora* subsp *variegata*.

Bibliografía

- Alfenas, A. C.; V. E. A. Zauza; R. G. Mafia; y T. F. Assis. 2004. *Doenças causadas por Agentes Bióticos ou Infeciosos*. En: *Clonagen e Doenças do Eucalipto*. Editorial UFV. Viçosa, MG, Brasil. p. 199-303.
- Assis, T. F. 2000. Production and use of Eucalyptus hybrids for industrial purposes. In: *QFRI/CRC-SPF SYMPOSIUM*, Noosa, Queensland. Hybrid breeding and genetics of forest trees: proceedings. Brisbane: Department of Primary Industries 63-75.
- Assis T. F. 2014. Melhoramento genético de Eucalyptus: desafios e perspectivas. In: *SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SILVICULTURA* [en línea], 3, 2014, Campinas. Anais... Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 2014, v.1, p. 127-148.
- Ayala, P.; M. Surenciski; L. Harrant; y C. Luna 2020. Capacidad de enraizamiento de clones híbridos de *Eucalyptus* del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. *Revista Temas Agrarios*. Vol. 25(1): 66-76.
- Bryant, P. H. y S. J. Trueman. 2015. Stem Anatomy and Adventitious Root Formation in Cuttings of *Angophora*, *Corymbia* and *Eucalyptus*. *Forests* 6:1227-1238.
- Fernandes O.S.J. (2020). Micropropagación e miniestaquia seriada de clones híbridos de *Corymbia*. Tesis de Doctorado. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina. MG. Brasil. 104 p.
- Hartmann, H. T.; D. E. Kester; F. T. Davies; R. L. Geneve. 2010. *Plant propagation: principles and practices*. New Jersey: Prentice Hall. 915 p.
- Hartmann, H. T.; D. E. Kester; F. T. Davies Jr. and R. L. Geneve. 2011. *Plant propagation: principles and practices*. 8th ed. São Paulo, SP, Brazil: Prentice Hall. 915 p.
- Lee, D. J. 2007. Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 2: Development of *Corymbia* species and hybrids for plantations in eastern Australia. *Australian Forestry* 70 (1):11–16
- López J. A. y C. D. Vera Bravo. 2018. Crecimiento y rectitud del fuste de orígenes geográficos de *Corymbia* spp. en la Mesopotamia argentina. *RIA*. 44 (3), [fecha de consulta: Junio 2019].
- Reis F. C. A., Assis T. F., A. M. Santos y Paludzyn, E. (2014). *Corymbia torelliana*: estado da arte de pesquisas no Brasil. Documentos Nº 261 EMBRAPA, Colombo, PR, Brasil. 1 - 54 p.
- Tamang B.; M. G. Andreu; C. L. Staudhammer; D. L. Rockwood and S. Jose. 2011. Towards an empirical relationship between root length density and root number in windbreak-grown cadaghi (*Corymbia torelliana*) trees. *Plant Root* 5: 40-45. doi:10.3117/plantroot.5.40
- Titon M.; A. Xavier; G. Gonçalves dos Reis e W. C. Otoni. 2003. Eficiência das minicepas e microcepas na produção de propágulos de clones de *Eucalyptus grandis*. R. Árvore, Viçosa-MG, v.27, n.5, p.619-625
- Trueman S. J. and D. M. Richardson. 2008. Relationships between Indole-3-Butyric Acid, Photoinhibition and Adventitious Rooting of *Corymbia torelliana*, *C. citriodora* and F1 Hybrid Cuttings. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 2 (1): 26-33

Nuevos híbridos de sauce seleccionados para producción de madera aplicable a diferentes usos y ambientes.

New willow hybrids selected for wood production applicable to different uses and environments.

Cerrillo, Teresa¹; Thomas, Esteban²; Loyal, Sabrina¹

¹ INTA - EEA Delta del Paraná – Buenos Aires; ² INTA - EEA Alto Valle – Río Negro; cerrillo.teresa@inta.gob.ar

Resumen

Se presentan los principales resultados alcanzados recientemente en la selección de clones de sauce de rápido crecimiento en la fase final de mejoramiento genético, a partir de ensayos en las regiones del delta del Río Paraná y Patagonia Norte. La evaluación se ha centrado en 19 genotipos experimentales, de los cuales en 2021 se preseleccionaron 9 clones (originados en los cruzamientos controlados *Salix matsudana* x *S. alba*, *Salix matsudana* x *S. nigra* y polinización abierta de *Salix amygdaloides*). Uno de ellos, *Salix matsudana* x *S. alba* Tehuelche INTA, registrado en enero de 2022, fue seleccionado para sitios altos en el delta del Paraná y para la región de los valles de Patagonia Norte. Los materiales poseen rápido crecimiento, buena adaptabilidad, forma recta del fuste y destacada aptitud tecnológico-maderera para usos industriales (papel y aserrado). En una evaluación integrada, estos genotipos muestran superioridad respecto a los clones tradicionales, con resultados equivalentes a los 5 nuevos cultivares liberados entre 2013 y 2017 por el INTA.

Palabras clave: *Salix*, clones seleccionados, aplicaciones industriales y ambientales

Abstract

Main results achieved in the last three years in the selection of fast-growing willow clones in the final phase of genetic improvement, based on trials in delta of Paraná River and northern Patagonia regions are presented. The evaluation has focused on 19 experimental genotypes, of which 9 clones (from *Salix matsudana* x *S. alba*, *Salix matsudana* x *S. nigra* controlled crossings and open pollination of *Salix amygdaloides*) The most recent evaluation has focused on 19 experimental genotypes; of which, 9 clones were preselected in 2021. One of them, *Salix matsudana* x *S. alba* Tehuelche INTA, was selected for high sites in delta of Paraná River and irrigated valleys of northern Patagonia and was registered in 2022. The materials have rapid growth, good adaptability, straight stem shape and outstanding technological-wood aptitude for industrial uses (paper and sawing). In an integrated evaluation, these outstanding genotypes show superiority over traditional clones and results equivalent to the 5 new cultivars released between 2013 and 2017 by INTA.

Key words: *Salix*, selected clones, industrial and environmental applications

Introducción

La industria del papel, para diarios y embalajes, consume más del 60% de la madera de sauce (*Salix* spp) producida en el delta del Paraná, núcleo principal de este género en el país. El clon *Salix babylonica* var *sacramenta* 'Soveny Americano' (SA) ha venido ocupando por décadas la mayor superficie de las plantaciones de Salicáceas en el delta del Paraná, que se estiman en 83.000 hectáreas (Borodowski, 2017). Este sauce tradicional, introducido al país en 1928, se destaca por las características tecnológicas de su madera muy favorables para la elaboración de papel para diarios y para embalaje, principalmente por los elevados valores de longitud de la fibra, resistencia al rasgado y otros parámetros específicos (Grande, 2019). Sin embargo, en su valoración integral, es de lento crecimiento y fuste muy ramificado, lo que se ve reflejado en un bajo rendimiento forestal y limitada aptitud para la transformación mecánica. Entre 2013 y 2017 el Programa de mejoramiento genético de sauces del INTA seleccionó e inscribió en el INASE 7 híbridos de características forestales altamente superadoras respecto a los clones tradicionales (Cerrillo, 2017); 5 de éstos poseen atributos destacados para la los estándares de papel para diarios y embalaje, a la vez que son aptos para aserrado, por lo que se los califica como de "doble propósito" (Cerrillo et al, 2019).

En los últimos años se observa en la cuenca forestal del delta del Paraná un gradual reemplazo a través de su incorporación a las plantaciones (Jouanny, 2021). También se están aplicando para usos en servicios ambientales, como la rehabilitación de canteras, con experiencias satisfactorias en Patagonia Norte (Thomas *et al*, 2021).

Dando continuidad al Programa de mejoramiento, entre 2021 y 2022 se ha avanzado en la evaluación y selección de una nueva serie de genotipos con aptitud para la región delta del Paraná y ambientes en ambientes de los valles irrigados de Patagonia Norte, sobre los cuales trata el presente trabajo.

Materiales y Métodos

En tres ensayos de 12 años de edad en la red instalada en el delta del Paraná se evaluaron 28 genotipos, comparados con 6 cultivares seleccionados en los últimos 10 años y otros 3 clones tradicionales. La evaluación final se centró en los 19 genotipos (Tabla 1) que superaron o igualaron el crecimiento medio del mejor testigo (Barrett 13-44 INTA).

Tabla 1. Genotipos experimentales evaluados y clones de referencia.

Table 1. Evaluated experimental genotypes and reference clones.

Genotipo		Madre	Padre	Año del Cruzamiento/ inscripción	Status
94.08.03	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. alba</i> SIA7	1994	Genotipos experimentales en etapa final de mejoramiento genético
94.08.74	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. alba</i> SIA7	1994	
94.08.94	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. alba</i> SIA7	1994	
95.07.11	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 693	?	1995	
95.12.06	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 694	<i>Salix alba</i> SI58-004	1995	
96.01.12	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 694	004	1996	
98.07.19	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. alba</i> SIA1	1998	
98.07.27	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. alba</i> SI61-002	1998	
98.07.57	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. alba</i> SI61-002	1998	
98.07.71	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. alba</i> SI61-002	1998	
98.10.07	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 692	<i>S. alba</i> SI61-002	1998	
98.11.01	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 692	<i>S. alba</i> SIA1	1998	
C-30-12	♀	<i>S. nigra</i> C7-71	?	1991	
C-14-12	♂	<i>S. matsudana</i> (JBAR, CIRN '87)	<i>S. matsudana</i> x <i>S. alba</i> cv NZ 26992	1989	
98.13.03	♀	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. nigra</i> C7-22	1998	
98.13.06	♂			1998	
97.24.02	♀	<i>S. amygdaloides</i> CAN 666	?	1997	
97.24.05	♀	<i>S. amygdaloides</i> CAN 666	?	1997	
97.24.07	♂	<i>S. amygdaloides</i> CAN 666	?	1997	
Tehuelche INTA	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 692	<i>S. alba</i> SI58-004	1994 / 2022	Inscrip. 2022
Géminis INTA CIEF	♀	<i>S. matsudana</i> NZ 694	?	1990 / 2012	Seleccionados e inscriptos, entre 2013 y 2017
Los Arroyos INTA CIEF	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. alba</i> SIA7	1994 / 2012	
Lezama INTA CIEF	♀	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. nigra</i> C7-22	1994 / 2012	
Yaguareté INTA CIEF	♂	<i>S. alba</i> SI64-004	?	1994 / 2012	
Carapachay INTA CIEF	♂	<i>S. matsudana</i> NZ 693	<i>S. alba</i> SI61-002	1998 / 2017	
Ragonese 131-27 INTA	♀	<i>S. babylonica</i>	<i>S. alba</i>	1957 / 1972	Clones tradicionales (testigos históricos)
Barrett 13-44 INTA	♂	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	1967 / 1995	
Soveny Americano	♀	(*) <i>Salix babylonica</i> var <i>sacramenta</i> (SA) - Introducido en 1928			

(*) SA ocupa actualmente la mayor superficie plantada de sauces en el Delta. Destacado para la elaboración de papel, pero mal comportamiento forestal. Está siendo progresivamente reemplazado por los nuevos sauces mejorados del Programa de MG de INTA.

Para la evaluación calidad de pulpa para papel, de cada genotipo, en diciembre de 2019 se tomaron muestras (trozas de 1,5 m) de la base, parte media y tercio superior del árbol, a razón de dos árboles por clon tomados al azar en ensayos comparativos de 12 años de edad en dos sitios del delta del Río Paraná. El muestreo se repitió en noviembre de 2021 en los mismos sitios y clones. Al mismo tiempo, se llevaron a cabo pruebas en aserradero de los 19 genotipos. Se estudiaron las propiedades de la madera (densidad y longitud de fibra) y resistencias de la pulpa para papel para diarios (rasgado) y para papel para embalaje: Corrugated Medium Test (CMT) y Short Span Compression Test (SCT).

Resultados y Conclusiones

Considerando una evaluación integrada de las características forestales (supervivencia, sanidad, crecimiento, adaptación, forma) y de aptitud tecnológica de la madera, resultaron seleccionados 9 genotipos de aptitud industrial “doble propósito” (papel + aserrado), señalados en color verde en el Gráfico 1. Estos individuos destacados tuvieron una supervivencia superior al 90,5%, ausencia de enfermedades que afectan la corteza, de roya (*Melampsora* spp) y bajos niveles de antracnosis (*Marssoninia salicicola*). El nuevo clon Tehuelche INTA, resultó seleccionado para para ambientes en los valles irrigados de Patagonia Norte donde presenta buena adaptabilidad (Thomas y Cerrillo, 2016). Debido a la baja tolerancia al anegamiento en el delta del Río Paraná no resulta apto para sitios bajos inundables o con presencia de la napa cercana a la superficie, siendo sólo recomendable en esta región para sitios altos (albardones). En el Gráfico 1 se comparan los valores de Incremento Medio Anual (IMA) de los materiales evaluados (en verde) vs los testigos “históricos” (en negro). El conjunto de nuevos materiales mejorados “doble propósito”, compuesto por los 9 clones seleccionados en esta etapa (incluido Tehueche INTA), sumados a 5 clones de la nueva serie inscrita entre 2013 y 2017 (en rojo), muestran en promedio una superioridad del 66,2% respecto al promedio de los tres clones testigos “históricos”.

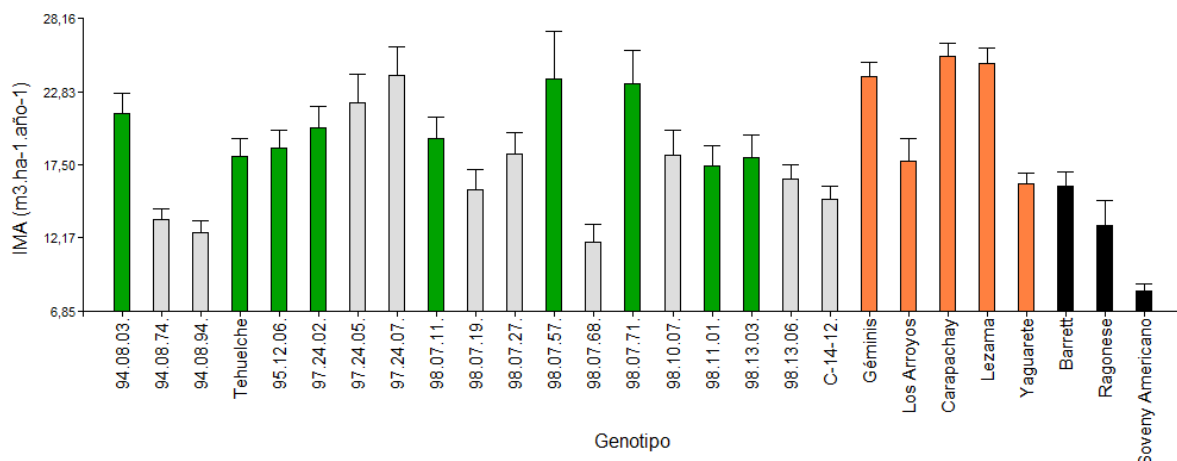


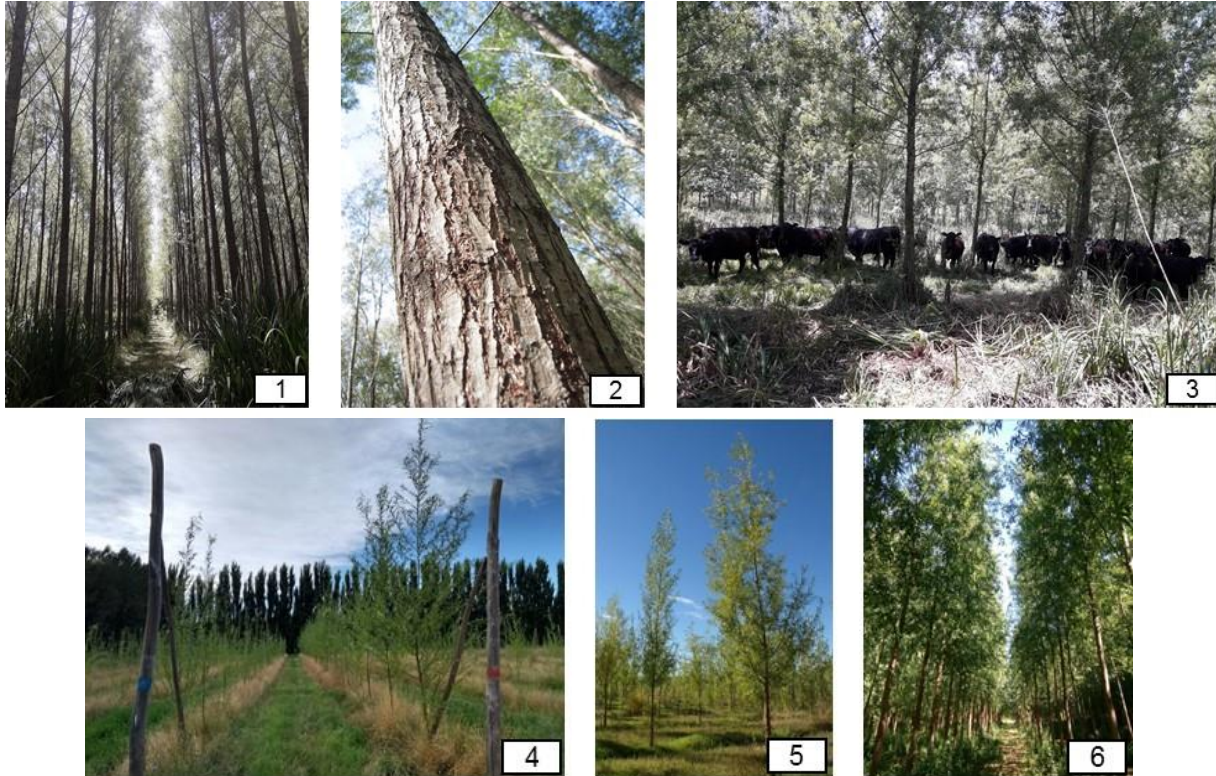
Figura. 1. Incremento medio anual de volumen (IMA) en m³.ha⁻¹.año⁻¹ de nueve nuevos genotipos preseleccionados por aptitud “doble propósito” (en verde), comparados con 5 clones seleccionados recientemente (en rojo) y sauces tradicionales como control (en negro).

Figure 1: Mean annual volume increment (MAI) in m³.ha⁻¹.year⁻¹ of nine “double purpose” new preselected genotypes (in green), compared to 5 recently released clones (in red) and traditional willows as control (in black)

En las evaluaciones realizadas en el laboratorio de madera, se observó una amplia variación en los parámetros de la pulpa de los clones experimentales. El rango de valores de densidad de la madera de los clones seleccionados se encuentra entre 0,360 g/cm³ y 0,416 g/cm³; mientras que la longitud de fibra varía entre 0,987 y 1,220 mm.

Los materiales evaluados resultan altamente promisorios al superar significativamente a los testigos tradicionales en las características de crecimiento y forma del árbol, junto a la aptitud de la madera para papel (para diarios y para embalaje) y para aserrado. Esta nueva serie con perfil doble propósito se agrega a los 5 clones inscritos por INTA entre 2013 y 2017, que actualmente están siendo adoptados en el delta del Paraná, reemplazando gradualmente al sauce Soveny Americano. La performance forestal y tecnológica de estos genotipos los convierte de interés para plantaciones productivas para

usos complementarios de la madera y para otros más innovadores, como servicios ambientales y sistemas silvopastoriles. La disponibilidad de estos recursos genéticos mejorados constituye un insumo valioso también para otras regiones, como Valles irrigados de Patagonia Norte, donde se han identificado híbridos de *Salix matsudana* x *Salix alba* como los más promisorios, destacándose Tehuelche INTA y el experimental 98.07.71, que se agregan a Los Arroyos INTA-CIEF y Agronales INTA-CIEF, ya aplicados en plantaciones y en algunos esquemas de fitorremediación en la región.



Imágenes 1, 2 y 3: Nuevos híbridos en Delta del Río Paraná y **4, 5 y 6:** En valles irrigados de Patagonia Norte

Images 1, 2 and 3. New hybrids in Delta of the Paraná River and **4, 5 and 6:** In irrigated valleys of Northern Patagonia

Bibliografía

- Borodowski, E. 2017. Jornadas de Salicáceas 2017: Quinto Congreso Internacional de Salicáceas. Talca, Chile.
- Jouanny, M. 2021. "Manejo silvícola y adopción de nuevos clones de sauce como parte de la reconversión forestal". 33º Seminario Virtual: Del Delta al continente, conocimientos y experiencias para establecer plantaciones de sauce. Organizado por Proyecto de Silvicultura I016. 13 de mayo e 2021.
- Cerrillo, T.; Loval, S.; Casaubón, E.; Thomas, E.; Grande, J. and S. Monteoliva. 2019. Willow Breeding for diversified and sustainable applications in Argentina. 25º Congreso Mundial IUFRO, Curitiba, sept. 2019.
- Grande, J. 2019. Informe de nuevos clones experimentales de sauces. Laboratorio Central del Papel Prensa. San Pedro. Julio de 2019
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Thomas, E. and T. Cerrillo. 2016. "Evaluation of Improved Willows in North Patagonia, Argentina". 25º Session IPC FAO, International Poplar Commission (IPC) – FAO, Berlín, 13- 16 Sept 2016.
- Thomas E; Romagnolli, S; Voglino, S; Mariguan, P and T Cerrillo. 2021. Initial survival of improved willow clones in afforestation for quarry rehabilitation in upper valley of Río Negro, Argentina. 26th Session of the International Poplar Commission (IPC) – FAO, Rome, 5 – 8 Oct 2021. Virtual mode.

Diversidad genética y estudio de asociación de genoma amplio para características de crecimiento y calidad de la madera en *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.

Genetic diversity and Genome-Wide Association Study for growth and wood quality traits in *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.

Aguirre, Natalia Cristina^{1*}; Villalba, Pamela Victoria^{1*}; García, Martín Nahuel¹; Acuña, Cintia Vanesa¹; Rivas, Juan Gabriel¹; Martínez, María Carolina¹; Ludueña, Alvaro²; Diaz, Matías²; Palazzini, Dino³; Pathauer, Pablo Santiago³; Cappa, Eduardo Pablo³; Alves Ana⁴; Rodrigues, José Carlos⁴; Grattapaglia, Dario⁵; Hopp, Horacio Esteban¹; Carreras, Rocio²; Cisneros, Felipe²; Marcucci Poltri, Susana Noemí¹.

¹Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, UEDD INTA-CONICET, Hurlingham, Argentina. ²Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE), Santiago del Estero, Argentina. ³Instituto de Recursos Biológicos, INTA, Hurlingham, Argentina. ⁴Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. ⁵Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil.

*Ambas autoras contribuyeron de igual forma

aguirre.natalia@inta.gob.ar; villalba.pamela@inta.gob.ar

Resumen

Los enfoques moleculares y la evaluación de la diversidad genética son fundamentales y hacen más eficientes los programas de mejoramiento forestales en el contexto del cambio climático. Este trabajo evaluó la variación genética de una población de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh y la detección de nuevos marcadores genéticos asociados (MGA) a rasgos de crecimiento y calidad de madera mediante un estudio de asociación de genoma amplio.

Para ello, 689 árboles fueron fenotipados mediante mediciones de crecimiento y análisis NIR de la madera y genotipados mediante el microarreglo EUChip60K.

Los valores de diversidad genética fueron consistentes con los esperados para la especie y la estructura poblacional mostró seis subgrupos con poca diferenciación. Se identificaron tres y seis MGA para dos rasgos de crecimiento y seis de calidad de madera, respectivamente, y se identificaron 31 genes cercanos interesantes.

Estos estudios proporcionan información valiosa sobre la diversidad genética y marcadores asociados a características de interés útiles para el mejoramiento genético de *E. camaldulensis*.

Palabras clave: SNP, EUChip60K, población de mejoramiento, variabilidad genética, marcadores asociados.

Abstract

Molecular breeding and genetic diversity assessment approaches in forest breeding programs are crucial in the context of climate change. This work evaluated the genetic variation of a population of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh and the detection of new genetic associated markers (GAM) with growth and wood quality traits by means of the Genome-Wide Association Study.

To achieve these goals, 689 trees were phenotyped by growth conventional measurements and NIR analysis of wood and genotyped by EUChip60K microarray, resulting in 19,034 SNPs.

Genetic diversity values were consistent with those expected for the species. An analysis of population

structure showed six subgroups and low differentiation among them. Three and six GAMs were identified for two growth and six wood quality traits, respectively. GAMs were annotated using *E. grandis* genome, identifying *in silico* 31 nearest interesting genes.

These studies provide valuable information regarding genetic diversity and useful marker-trait associations for *E. camaldulensis* genetic breeding.

Keywords: SNP, EUChip60K, breeding population, genetic variability, marker-trait association.

Introducción

Las poblaciones forestales son sistemas biológicos complejos y con una gran diversidad genética lo que les permite a estas especies sobrevivir a los constantes cambios ambientales y proporciona una base fundamental para el mejoramiento genético. La utilización de la estrategia de mapeo por asociación de genoma amplio (GWAS) permite detectar QTL (loci que contribuyen a la variación de un carácter cuantitativo) mediante el análisis de asociación entre las variantes genéticas y las variantes fenotípicas para luego utilizar esta información en el mejoramiento asistido por marcadores en cualquiera de sus variantes. En el presente trabajo dichas metodologías se han empleado en *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh que es uno de los eucaliptos más utilizados a nivel mundial para bioenergía debido a su alto valor dendroenergético, cualidad que se ve potenciada por el rápido crecimiento del género. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo son: (1) estudiar la variación genética y (2) la detección de nuevos marcadores genéticos asociados (MGA) a ocho rasgos de crecimiento y a la calidad de la madera.

Materiales y Métodos

Población de Mapeo: La población de *E. camaldulensis* evaluada pertenece a un ensayo de progenie implantado en 1996 por la Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. Está constituida por 2.200 árboles (entre 1 y 12 individuos por familia) de 110 familias de polinización abierta de 14 procedencias australianas diferentes. Para el presente trabajo se evaluaron 689 individuos.

Fenotipado: Rasgos de crecimiento: DBH (DBH5 y DBH12 diámetro a la altura del pecho a los 5 y 12 años), FORM (rectitud del fuste), PILO5 (densidad de madera por pilodyn a los 5 años de edad). Rasgos químicos de calidad de la madera estimados mediante NIR (*Near Infrared Reflectance*) a los 24 años de edad: LIG24 y KLAS24 (lignina total y lignina Klason), SG24 (relación de los monómeros Syringil:Guayacil de lignina), CEL24 (contenido de celulosa), ETEXT24 y EXTTOT24 (extractos etanólicos y totales).

Genotipado: El sistema comercial EUChip60K (GeneSeek, EE. UU.) de 64.639 marcadores SNP se utilizó para genotipar a los individuos seleccionados (Silva-Junior et al. 2015), lo que resultó en 19.034 SNP polimórficos.

Análisis de diversidad y estructura poblacional: Los análisis de diversidad genética se realizaron utilizando el paquete R snpReady (Granato & Fritsche-Neto, 2018). Para el análisis de la estructura poblacional se utilizó el método DAPC (Discriminant Analysis of Principal Components, paquete de R adegenet, Jombart 2008) con un análisis de K-means (Legendre & Legendre 1998) para identificar los subgrupos utilizando un subconjunto de 800 SNPs.

Estudio de asociación de genoma amplio o Genome-Wide Association Study (GWAS): El análisis se realizó aplicando el Modelo Lineal Mixto Comprimido (CMLM; Zhang et al. 2010) considerando la matriz de parentesco (VanRaden, 2008) que se incluye en la Herramienta Integrada de Predicción y Asociación Genómica (GAPIT 2.0; Lipka et al., 2012).

Post-GWAS: Las secuencias de MGA se mapearon (Bowtie2 con parámetros predeterminados; Langmead & Salzberg, 2012) y se anotaron utilizando el genoma de *E. grandis* v2.0 (Myburg et al. 2014). Utilizando la información de la anotación de dicho genoma, se identificaron genes potencialmente interesantes alrededor de ventanas de 50 kbp (script perl).

Resultados

Genotipado: Después filtrar por una frecuencia de alelo menor (MAF) inferior a 0,05 y un porcentaje de datos faltantes de hasta el 10%, se detectó un total de 19.034 marcadores SNP polimórficos para la población (distribuidos entre los 11 cromosomas, Figura 1).

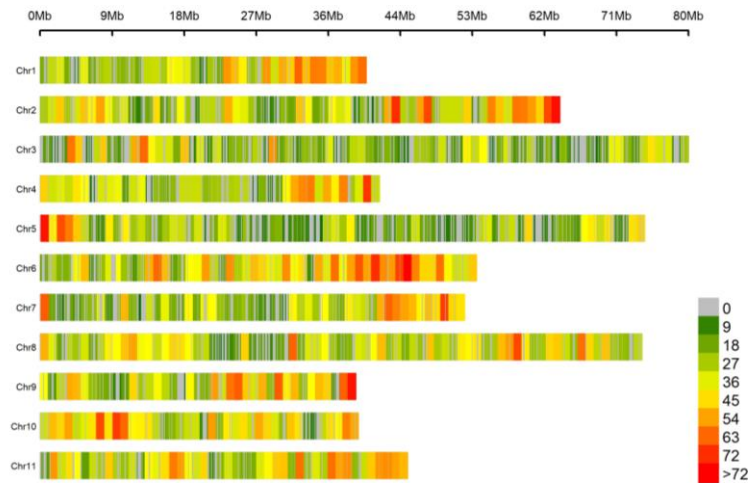


Figura 1. Distribución de marcadores en los 11 cromosomas de Eucalyptus. La escala de colores indica la densidad de los marcadores dentro de un tamaño de ventana de 1 Mb.

Figure 1. Marker distribution in the 11 chromosomes of Eucalyptus. The colour scale indicates markers density within 1Mb window size.

Análisis de diversidad y estructura poblacional: El análisis de diversidad genética mostró valores consistentes con los esperados para la especie (Contenido de información polimórfica, PIC = 0,27; Heterocigosis observada, $H_o = 0,35$; Heterocigosis esperada, $H_e = 0,34$). El análisis de la estructura poblacional mediante el método DAPC evidenció seis grupos genéticos ($K=6$) para la población de *E. camaldulensis* (Figura 2). Sin embargo, los grupos mostraron poca diferenciación entre ellos ($F_{ST} = 0,062$).

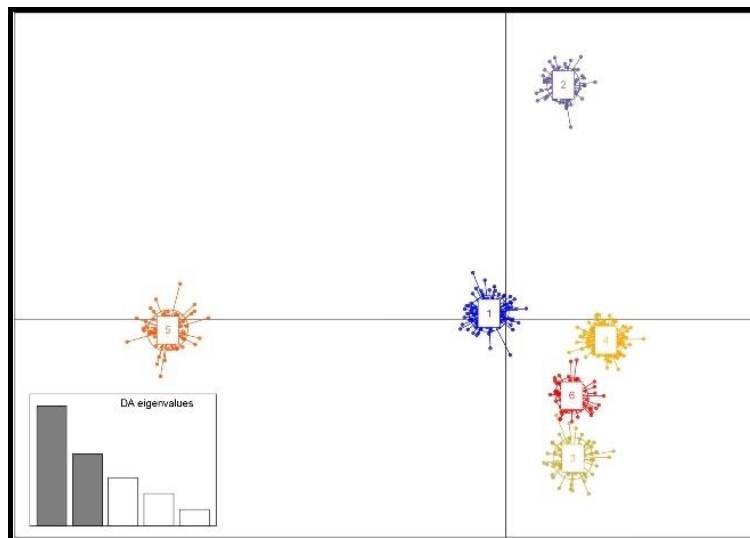


Figura 2. Subpoblaciones obtenidas por DAPC (varianza explicada = 97%). Los diferentes colores indican las subpoblaciones.

Figure 2. Subpopulations obtained by DAPC (explained variance = 97%). The different colors indicate the subpopulations.

Estudios de GWAS: Se encontraron un total de nueve MGAs después de pasar un umbral de significancia de $1e-4$ ($p < 0,0001$) en la población analizada (Figura 3). Para los caracteres de crecimiento se identificaron dos MGA para diámetro a la altura del pecho (explicando 2 y 2,3% de la variación fenotípica a los cinco y 12 años, respectivamente) y uno para densidad de la madera (2,1% de variación fenotípica). Para las características de la calidad de la madera, se detectaron: un MGA compartido entre extractivos totales y etanólicos (3 y 2,8 % de varianza, respectivamente), uno para celulosa (3 % de varianza), uno para la relación siringilo: guayacilo (3,1 % de varianza) y tres compartidos entre lignina total y lignina Klason (9,1% de la varianza fenotípica explicada sumando los tres MGA, para cada rasgo).

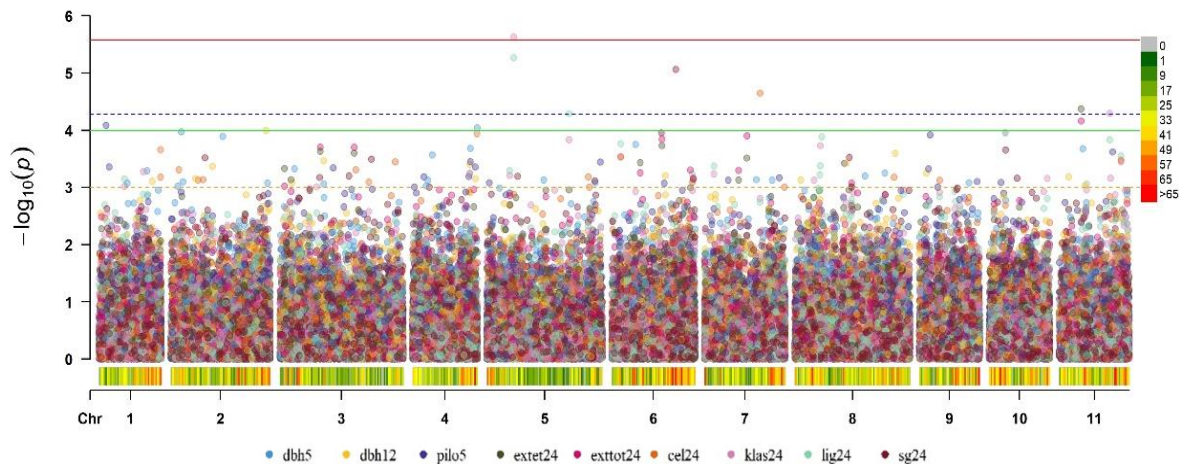


Figura 3. Diagrama de Manhattan de nueve asociaciones marcador-carácter encontradas en la población de *E. camaldulensis*. La línea roja indica el umbral de significancia para Bonferroni, la línea azul el umbral para FDR, la línea verde umbral de significancia de $1e-4$ ($p < 0,0001$) y la línea amarilla umbral de significancia de $1e-3$ ($p < 0,001$).

Figure 3. Manhattan plot of nine marker-trait association found in the *E. camaldulensis* population. Red line indicates the Bonferroni significance threshold, blue line is the threshold for FDR, green line is the threshold of $1e-4$ ($p < 0,0001$) and yellow line is significance threshold of $1e-3$ ($p < 0,001$).

Post-GWAS: se identificaron 31 genes interesantes para siete de los MGA alrededor de ventanas de 50 kbp.

Por ejemplo, se encontró un gen único Eucgr.G01991 dentro de una ventana de 50 kbp del MGA para el contenido de celulosa en el cromosoma 7, y su supuesta función corresponde a un transportador de potasio de alta afinidad. Se expresa en tejidos vasculares, principalmente dentro del floema, y aumenta su transcripción con la privación de potasio en *E. grandis* (Costa et al. 2017).

Además, se encontraron dos genes cerca de uno de los MGA para el contenido de lignina total y Klason en el cromosoma 5, ambos relacionados con la O-metiltransferasa 1. Se sabe que una baja expresión de la cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT) da como resultado una disminución del contenido de lignina, mientras que la sobreexpresión de CCoAOMT resulta en un incremento (Song et al. 2022).

Conclusiones

Los hallazgos de este trabajo proporcionan información valiosa sobre la diversidad genética y contribuyen en el descubrimiento de nuevas asociaciones útiles entre marcadores y las características estudiadas en esta población. Estos marcadores proporcionan información útil a tener en cuenta en futuros programas de mejora, aconsejando el aumento de la frecuencia de alelos favorables en próximas generaciones, como por ejemplo mediante el filtrado de marcadores en la Selección Genómica.

Bibliografía

- Costa et al. (2017). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) volume 131, pages213–222
 Jombart, T. (2008) - Bioinformatics 24:1403-1405.
 Langmead & Salzberg (2012). Nat Methods 9, 357–359
 Legendre & Legendre (1998) - Numerical ecology. 2nd English Edition, Elsevier, Amsterdam.
 Lipka et al. (2012). Bioinformatics, 28(18), 2397–2399
 Ma & Constabel (2019) - Trends in plant science.
 Myburg et al. (2014). Nature, 510(7505), 356–362.
 Silva-Junior et al. (2015) - New Phytologist, 206(4), 1527-1540.
 Soler et al. (2015) - New Phytologist, 206 (4):1364-77
 Song et al. (2022) Front. Plant Sci..
 VanRaden (2008). Journal of Dairy Science, 91(11), 4414–4423
 Zhang et al. (2010). Nature Genetics, 42(4), 355–360

Selección de los mejores individuos de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden mediante mapeo de QTLs de interés forestal.

Selection of the best *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden individuals through mapping forest interest' QTLs.

García, Martín Nahuel¹; Rivas, Juan Gabriel¹; Aguirre, Natalia Cristina¹; Villalba, Pamela Victoria¹; Martínez, María Carolina¹; Acuña, Cintia Vanesa¹; Oberschelp, Javier²; Harrand, Leonel²; López, Juan³; Marcucci Poltri, Susana Noemí¹

¹Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, UEDD INTA-CONICET, Hurlingham, Argentina, ²EAA INTA Concordia, Entre Ríos

³EAA INTA Bella Vista, Corrientes

garcia.martin@inta.gob.ar

Resumen

Con el objetivo de detectar QTLs involucrados en características de productividad y calidad de la madera en germoplasma local de *Eucalyptus grandis*, se desarrolló un mapa de ligamiento integrado de un cruzamiento controlado (106 hijos) contrastante principalmente para densidad de madera. El mismo posee buena cobertura genómica (3,63 marcadores/cM), totalizando 3499 marcadores segregando de manera esperada. Se detectó una alta colinealidad (96%) con el genoma de referencia de *E. grandis*. Se detectaron siete QTLs: uno para altura, dos para densidad de madera, uno para forma del fuste y tres para tolerancia al cancro del tallo. Se utilizaron los marcadores asociados a los QTLs para la identificación de los individuos portadores de los alelos favorables. Adicionalmente, los QTLs hallados para tolerancia al cancro del tallo y para forma se validaron sobre ensayos instalados en otros dos sitios. Con estas aproximaciones se generaron datos robustos que permiten acelerar la selección de los individuos superiores de esta población en el programa de mejoramiento.

Palabras clave: Mapeo de QTLs, Selección Asistida por marcadores, Mejoramiento forestal

Abstract

To detect QTLs involved in productivity and wood quality traits in the local germplasm of *Eucalyptus grandis*, one integrated linkage map was developed involving controlled crosses mainly contrasting for wood density (106 F1 trees). The genetic map is well covered (3.63 markers/cM), totalizing 3499 markers with expected segregation. On average, 96% co-linearity was found when compared with *E. grandis* reference map. In total, seven QTLs were detected: one was related to growth, two were related to wood density, one was related to stem form and three were related to stem canker tolerance. The associated markers were used to identify the individuals carrying the favourable QTLs. Additionally, the QTLs found for tolerance to stem canker and for stem form were validated on assays installed in two other sites. These approaches generated robust data that allow to enhance the selection of the superior individuals for this population of the breeding program.

Key words: QTL mapping, Molecular Assisted Selection, Tree breeding

Introducción

El mapeo de QTLs a partir de cruzamientos biparentales en especies forestales encuentra limitaciones al momento de transferir esta información a otros individuos de la población base no relacionados, dada la gran diversidad que se maneja en estos programas. Sin embargo, los marcadores asociados a los QTLs hallados pueden explicar parte de la componente genética del carácter en cuestión dentro del cruzamiento sobre el cual se realizó el análisis permitiendo seleccionar entre la progenie individuos superiores a sus parentales.

En este trabajo se generó un mapa integrado altamente saturado sobre el cual se mapearon de forma robusta (5 réplicas por individuo) cuatro caracteres y los marcadores asociados a los QTLs hallados fueron utilizados para ordenar a los individuos en un ranking de acuerdo a la acumulación de alelos

favorables. A modo de validación se evaluó el comportamiento de individuos con alelos favorables en otros dos ambientes.

Materiales y Métodos

Material vegetal: Progenie de *E. grandis* de Clon EG-INTA-157 x Clon EG-INTA-36 (referido aquí como “Gx36”), contrastantes principalmente para densidad de madera, con ensayos evaluados en tres sitios: Concordia ER, Gualaguaychú ER y San Carlos Ms (Tabla 1).

Datos fenotípicos evaluados: altura (TH) medida en metros mediante hipsómetro, diámetro a la altura del pecho (DBH) medida en centímetros mediante cinta diamétrica, densidad básica estimada con pilodyn (PILO), forma del fuste (FORMA) medida mediante una escala visual (1 muy buena; 6 muy mala), tolerancia al cancro del tallo (CANCRO) causado por el complejo fúngico *Teratosphaeria gauchensis* y *T. zuluensis*, medida mediante una escala visual (1 sin síntomas; 6 muy atacada).

Cálculo de BLUPs: Se obtuvieron modelos lineales con efectos aleatorios para componentes de varianza mediante el paquete “lme4” (Bates y Maechler, 2008) del software R (R Core Team 2021).

Datos genotípicos: Se genotificaron los parentales y 106 progenies mediante el microarreglo EuCHIP60K diseñado para el género (Silva Junior et al., 2015). Se identificaron los marcadores con segregaciones 1:1 y 1:2:1 a partir de los genotipos de los parentales. Los marcadores que cosegregaron fueron agrupados en un único punto (BIN). Se filtraron aquellos BINs cuya segregación se distorsionaba (de acuerdo a la corrección de Bonferroni luego de aplicar χ^2 ($\alpha = 0,05$)).

Mapa de ligamiento: Fue generado mediante el paquete de R “onemap” (Margarido et al., 2007), el cual implementa la metodología de mapeo desarrollada por Wu y Zeng (2002) para cruzamientos de parentales heterocigotas, con LOD>7 y frecuencia de recombinación <0,35.

Mapeo de QTLs: Se realizó mapeo por intervalos compuestos (CIM) a partir de los BLUPs del ensayo de Gualaguaychú ER mediante el paquete de R “fullsibQTL” (Gazaffi et al, 2020) que utiliza el algoritmo desarrollado por Gazaffi et al. (2014) para este tipo de poblaciones. La determinación del nivel umbral de LOD se realizó mediante 1000 permutaciones y una significancia de 0,05 de acuerdo a lo sugerido por Chen y Storey (2006).

Selección de individuos con alelos favorables: se identificaron las configuraciones alélicas favorables y se ordenaron en un ranking los individuos para cada carácter.

Validación: Se compararon los individuos con configuraciones alélicas favorables contra los que poseían configuraciones desfavorables en los ensayos de San Carlos Ms y Concordia ER mediante la prueba de Wilcoxon para CANCRO y FORMA (datos categóricos en ambos casos) y HT mediante prueba t, utilizando el paquete de R gpubr (Kassambara y Kassambara 2020).

Tabla 1. Ensayos de Gx36 instalados en tres sitios con diseños Sigle Tree Plot con 3 y 5 réplicas evaluados para 4 caracteres en común (DBH, HT, FORMA y CANCRO).

IND: nro de individuos; REP: Promedio de clones por individuo; GENO: Individuos genotipados.

Table 1. Gx36 trials installed in three sites with Sigle Tree Plot designs with 3 and 5 replicates evaluated for 4 traits in common (DBH, HT, FORMA and CANCRO).

IND: number of individuals; REP: Average number of clones per individual; GENO: Genotyped individuals.

ENSAYOS	DISEÑO	IND	REP	GENO	DBH	HT	FORMA	CANCRO	PILO
GUALEGUAYCHU	5STP	88	4.17	85	7 años	7 años	7 años	7 años	7 años
SAN CARLOS	5STP	45	3.91	44	5 años	5 años	5 años	5 años	ND
CONCORDIA	3STP	82	2.55	81	5 años	5 años	5 años	5 años	ND

Resultados

Mapa de ligamiento

Se obtuvieron 8822 marcadores segregantes que se agruparon en 2659 BINs de los cuales se excluyeron del análisis 186 BINs (1234 marcadores) que segregaron de manera significativamente distorsionada. El mapa de ligamiento integrado construido Gx36 contó con 1106 BINS que representan 3499 SNPs (46,11% de los marcadores) y cubren 11 grupos de ligamiento con un largo total de 963,96 cM (**Figura 1**). Obteniéndose una amplia cobertura del genoma y alta densidad de marcadores (3,63 marcadores/cM). Se realizó la comparación entre el mapa de Gx36 y el genoma de referencia de *E.*

grandis público (Myburg et al, 2014) obteniéndose una correlación promedio de 0,956.

Mapeo de QTLs

Se hallaron 7 QTLs para 4 de los 5 caracteres evaluados, no encontrándose asociaciones significativas para DBH. Se halló 1 QTL para altura (HT) en el LG9 que explicó el 6,38 % de la variación del carácter; 1 QTL para FORMA en LG8 que explicó el 17,63%; 3 QTLs para la tolerancia al cancro del tallo (CANCRO) en LG2, LG6 y LG7 que explicaron el 8,05%, 11,07% y 21,37% respectivamente; y 2 QTLs para densidad de la madera (PILO) en LG1 y LG6 que explicaron el 7,03% y 24,77% respectivamente (**Figura 1**).

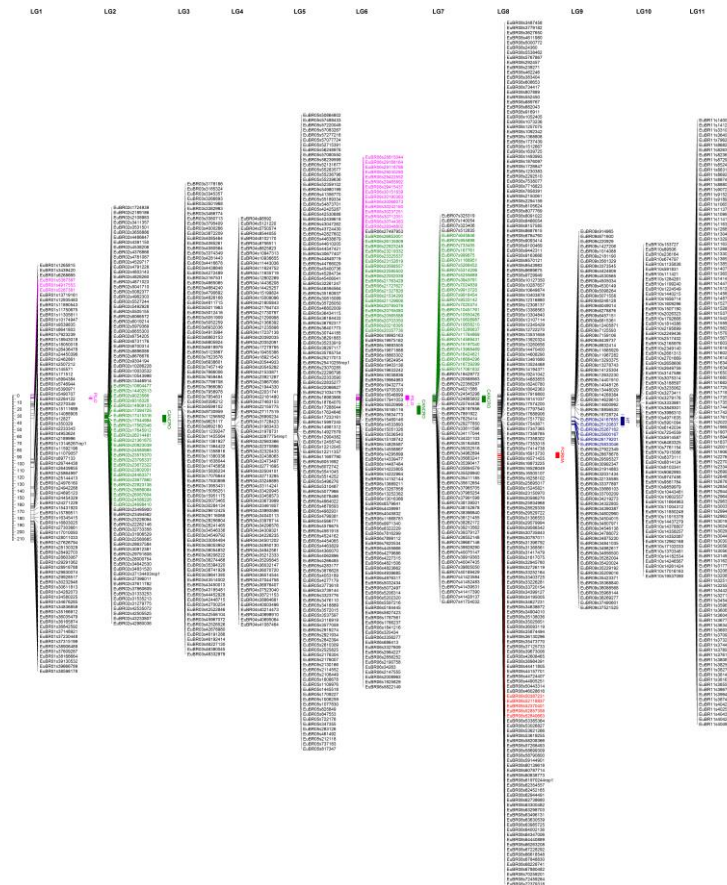


Figura 1. Mapa de ligamiento del cruzamiento Gx36 (*E. grandis* x *E. grandis*). A la izquierda se muestra la escala en centimorgans (cM). A la derecha de cada grupo se representan los QTLs encontrados para densidad (PILO), altura total (HT), tolerancia a cancro del tallo (CANCRO) y forma (FORMA). En color se destacan los marcadores significativamente asociados a los QTLs hallados (rojo: FORMA; azul: ALTURA; fucsia: PILO; verde: CANCRO).

Figure 1. Linkage map of the Gx36 cross (*E. grandis* x *E. grandis*). On the left is the scale in centimorgans (cM). To the right of each group, the QTLs found for density (PILO), total height (HT), tolerance to stem canker (CANCRO) and shape (FORMA) are represented. Markers significantly associated with the QTLs are highlighted in color (red: SHAPE; blue: HEIGHT; fuchsia: PILO; green: CANCRO).

Identificación de individuos con alelos favorables

Se ordenaron los individuos de acuerdo a la acumulación de alelos favorables para los distintos caracteres destacándose el individuo “EG104” que posee alelos favorables para los tres QTLs de tolerancia a cancro y alelos favorables para el QTL de forma del fuste, los cuales fueron validados a través de ambientes.

Validación de QTLs

Se compararon los individuos con mayor probabilidad de poseer los alelos favorables para los QTLs hallados en los distintos caracteres contra aquellos que tenían una baja probabilidad de poseerlos en los ensayos de San Carlos y Concordia, encontrándose diferencias significativas para tolerancia al cancro del tallo en los dos sitios con $p = 0,011$ y $p = 1,7 \times 10^{-5}$ respectivamente y, para FORMA en el

ensayo de Concordia con $p = 0,047$, sin embargo no se encontraron diferencias significativas para altura (HT) (Figura 2).

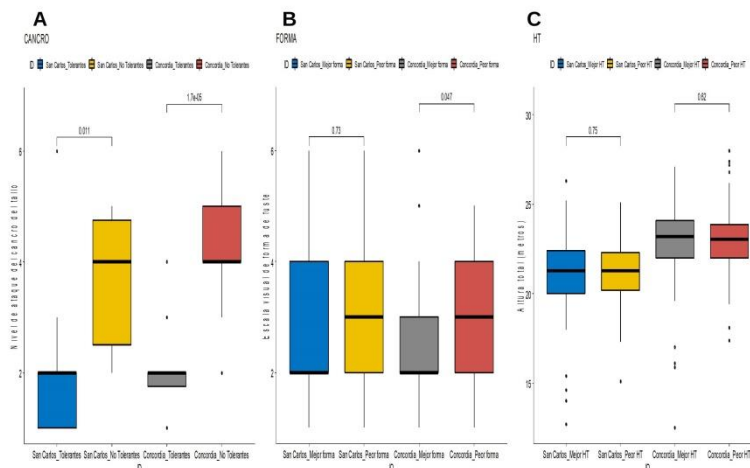


Figura 2. Comparación mediante gráficos de cajas de los individuos con mayor probabilidad de poseer los alelos favorables contra los que tienen una baja probabilidad de poseerlos en los ensayos de San Carlos (cajas azules: individuos con alelos favorables; cajas amarillas: individuos sin alelos favorables) y Concordia (cajas grises: individuos con alelos favorables; cajas rojas: individuos sin alelos favorables): a) tolerancia a cancro (3 QTLs); b) Forma (1 QTL); c) HT (1 QTL).

Figure 2. Comparison by means of box plots of individuals with a higher probability of possessing the favorable alleles against those with a low probability of possessing them in the San Carlos trials (blue boxes: individuals with favorable alleles; yellow boxes: individuals without favorable alleles) and Concordia (grey boxes: individuals with favorable alleles; red boxes: individuals without favorable alleles): a) canker tolerance (3 QTLs); b) Form (1 QTL); c) HT (1 QTL).

Conclusiones

El mapa de ligamiento generado a partir del cruzamiento intraespecífico de *E. grandis* presentó elevada colinealidad con el genoma de referencia para la especie (96%). La segregación de los caracteres medidos en el cruzamiento contrastante principalmente para densidad de madera también permitió detectar asociaciones genéticas vinculadas a otras propiedades no relacionadas con la densidad, reflejando el alto potencial de la selección de un carácter sin detrimento de otro. Se validaron los QTLs hallados para tolerancia al CANCRO (ensayos de San Carlos y Concordia) y FORMA (ensayo de Concordia). En esta población, se propone la selección de los mejores individuos para estos caracteres mediante esta estrategia.

Bibliografía

- Bates, D., and M. Maechler. 2008. The Comprehensive R Archive Network. <http://cran.r-project.org/>
- Chen, L., & Storey, J. D. (2006). Relaxed significance criteria for linkage analysis. *Genetics*, 173(4), 2371-2381.
- Gazaffi, R., Margarido, G. R., Pastina, M. M., Mollinari, M., & García, A. A. F. (2014). A model for quantitative trait loci mapping, linkage phase, and segregation pattern estimation for a full-sib progeny. *Tree Genetics & Genomes*, 10(4), 791-801.
- Gazaffi, R., Amadeu, R. R., Mollinari, M., Rosa, J. R., Taniguti, C. H., Margarido, G. R., & Garcia, A. A. (2020). fullsibQTL: an R package for QTL mapping in biparental populations of outcrossing species. *BioRxiv*.
- Kassambara, A., & Kassambara, M. A. (2020). Package 'ggpubr'. *R package version 0.1, 6*.
- Margarido, G. R., Souza, A. P., & Garcia, A. A. (2007). OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*, 144(3), 78-79.
- Myburg, A. A., Grattapaglia, D., Tuskan, G. A., Hellsten, U., Hayes, R. D., Grimwood, J., ... & Schmutz, J. (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature*, 510(7505), 356-362.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Silva-Junior, O. B., Faria, D. A., & Grattapaglia, D. (2015). A flexible multi-species genome-wide 60K SNP chip developed from pooled resequencing of 240 *Eucalyptus* tree genomes across 12 species. *New Phytologist*, 206(4), 1527-1540.
- Wu, R., Ma, C. X., Painter, I., & Zeng, Z. B. (2002). Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. *Theoretical population biology*, 61(3), 349-363.

Transferencia de Marcadores Microsatelites (SSR) de *Eucalyptus* spp. a *E. sideroxylon* (A.Cunn. ex Woolls) en un Formato Múltiplex.

Transfer simple sequence repeat (SSR) markers from *Eucalyptus* spp. to *E. sideroxylon* (A.Cunn. ex Woolls) in a cost-effective multiplex format.

Rivas, Juan Gabriel¹; Pathauer, Pablo Santiago²; Aguirre, Natalia Cristina¹; Villalba, Pamela Victoria¹; García, Martín Nahuel¹; Palazzini, Dino²; Acuña, Cintia Vanesa¹; Martínez, María Carolina¹; Hopp, Horacio Esteban¹; Marcucci Poltri, Susana Noemí¹

¹Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, UEDD INTA-CONICET, Hurlingham, Argentina. ²Instituto de Recursos Biológicos, INTA, Hurlingham, Argentina.

rivas.juan@inta.gob.ar

Resumen

Eucalyptus sideroxylon, está catalogado bajo la norma AS 5604 2005 (Timber - Natural durability ratings) de Standards Australia, como Tipo 1 con una durabilidad superior a 25 años. Además, la especie posee buen comportamiento frente al frío y la sequía. En Argentina, en la zona rural pampeana, la utilización de *E. globulus* o *E. dunnii* como fuente de madera para postes, varillas de alambrado, boyeros, estacones no es muy deseable debido a su baja durabilidad natural y a la necesidad de ser tratada químicamente para resistir el deterioro. Un paso importante para impulsar la multiplicación de *E. sideroxylon*, es conocer la diversidad genética de las poblaciones de donde se van a seleccionar individuos. En este sentido, los marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats* o Microsatélites) son una herramienta muy útil para este fin. Debido a la carencia de marcadores SSR desarrollados para la especie y al costo asociado al genotipado, se realizó la transferencia de marcadores SSR provenientes de *E. grandis* y *E. globulus*. Se generó un sistema en formato multiplexado de 23 SSR, distribuidos en 10 de los 11 cromosomas, con alto nivel de discriminación. Este avance permitirá un rápido genotipado con un costo accesible, dando impulso a la caracterización genética de *E. sideroxylon* con fines de selección, multiplicación y mejoramiento.

Palabras claves: marcadores moleculares, multiplexado, genotipificación

Abstract

Eucalyptus sideroxylon, is cataloged under the AS 5604 2005 standard (Timber - Natural durability ratings) of Standards Australia, as Type 1 with a durability of more than 25 years. In addition, the species has good behavior against cold and drought. In Argentina pampas, the use of *E. globulus* or *E. dunnii* as source of wood for poles and fence rods is not very desirable due to its low natural durability and the necessity to be chemically treated to resist deterioration. An important step in promoting the multiplication of *E. sideroxylon* is to know the genetic diversity of the populations from which individuals are to be selected. In this sense, SSR markers (Simple Sequence Repeats or Microsatellites) are a very powerful tool for this purpose. Due to the lack of SSR markers developed for the species and the cost associated with genotyping, SSR markers from *E. grandis* and *E. globulus* were transferred. As a result, a multiplexed system of 23 SSRs, distributed on 10 of the 11 chromosomes, was generated with a high level of discrimination. This development will allow fast genotyping at an affordable cost, driving the genetic characterization of *E. sideroxylon* for selection, multiplication and improvement purposes.

Key words: molecular markers, multiplex, genotyping

Introducción

Eucalyptus sideroxylon, está catalogado dentro de las especies más duraderas, Tipo 1, y posee buen comportamiento frente a frío y la sequía (CABI, 2016). De acuerdo a la norma AS 5604 2005 (Timber - Natural durability ratings) de Standards Australia. Se considera como Tipo 1 cuando la madera en el suelo (enterrada) o sobre el suelo posee una durabilidad superior a los 25 años. Particularmente en Argentina, en las zonas de producción rural pampeana, la utilización de *E. globulus* o *E. dunnii* como fuente de madera para postes, varillas de alambrado, boyeros, estacones no es muy deseable debido

a su baja durabilidad natural. Teniendo que ser tratada químicamente para resistir el deterioro causado por bacterias, hongos, termitas, barrenadores.

Un paso de importancia para dar impulso a la multiplicación de *E. sideroxylon* como fuente de madera Tipo 1 en la zona pampeana es conocer la diversidad genética de las poblaciones presentes en la región para evitar pérdida de variabilidad durante la selección de los individuos para cruzamiento y multiplicación. Los marcadores más utilizados para identificación y trazabilidad de los materiales son los marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*, Repeticiones de Secuencias Simples) o Microsatélites. Aunque, en este punto, la mayor dificultad actual es la carencia de marcadores SSR desarrollados para la especie y los costos asociados a la generación de perfiles moleculares individuales.

Una alternativa para disminuir los costos es la utilización de la técnica de *PCR* multiplexada. Esta técnica tiene el potencial de reducir considerablemente el tiempo, esfuerzo y costo en el laboratorio, siendo rápida y conveniente para la obtención de información de múltiples sitios del genoma al mismo tiempo y, de esta manera, generar los perfiles genéticos que se necesitan para cada individuo.

Por consiguiente, en este trabajo se llevó adelante la evaluación de transferencia de marcadores SSRs desarrollados en *E. grandis* y *E. globulus* a *E. sideroxylon* en formato multiplexado.

Materiales y Métodos

Material vegetal: Hojas de cuatro individuos de *E. sideroxylon*, pertenecientes a tres procedencias distintas, fueron colectadas en ensayos de crecimiento ubicados en el predio experimental del Instituto de Recursos Biológicos (IRB- CNIA).

Obtención de ADN: El ADN genómico se obtuvo a partir de hojas jóvenes previamente liofilizadas mediante el protocolo CTAB (Doyle & Doyle, 1987) con modificaciones. Posteriormente, el mismo fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y posterior tinción con bromuro de etidio. Para establecer su calidad y cantidad se empleó espectrofotometría.

Armado de grupos de oligonucleótidos iniciadores para multiplexado: un total de 28 oligos desarrollados en *E. grandis* (Brondani et al, 2006) y *E. globulus* (Acuña et al, 2020) marcados fluorescentemente fueron evaluados en formato multiplexado. Dichas combinaciones se evaluaron *in silico* mediante el programa Multiplex Manager (<http://www.multiplexmanager.com>).

Condiciones de ciclado y genotipado: las reacciones de *PCR* se llevaron adelante utilizando el sistema comercial de multiplexado *Type-it^R* (Qiagen) usando 6 *ul* de Master Mix, 0,2 *uM* de cada *primer*, 2 ng de ADN molde, en un volumen final de 12 *ul*. El ciclado se llevó adelante según el manual del sistema comercial *Type-it^R*, con modificaciones. Todos los productos de *PCR* se diluyeron 20 veces con el fin de ser resueltos mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático (ABI 3500). Los tamaños alélicos fueron asignados mediante el programa Genemapper 4.0. Como control de transferencia, se utilizó ADN perteneciente a individuos de *E. grandis* y *E. globulus*.

Resultados

Mezclas de multiplexado: usando los resultados del programa Multiplex Manager como base, se agregaron manualmente y se mejoró el número de marcadores SSR en cada mezcla. Así, se generaron cuatro mezclas de reacción conteniendo siete a cinco marcadores (Figura 1).

Tabla 1. Mezclas de reacción multiplexadas. E: EMBRA (Brondani et al, 2006), DES: Desarrollo (Acuña et al, 2020). Fluoróforos: fam (azul), vic (verde), pet (rojo) y ned (amarillo).

Table 1. Multiplex mixes. E: EMBRA (Brondani et al, 2006), DES: Desarrollo (Acuña et al, 2020). Flourescent dyes: fam (blue), vic (green), pet (red) y ned (yellow).

Mezcla 1	E1008-fam, E1811-ned, E1040-pet, E949-vic, E904-ned, E2002-ned, Des54-fam
Mezcla 2	GST-fam, PER-fam, CesA3B-fam, LIM1-hex, E204-ned, E1616-vic
Mezcla 3	E5-fam, E10-hex, E1757-ned, E1924-pet, Des49-pet, Des57-hex
Mezcla 4	E6-fam, Des7-ned, Des19-hex, Des11-ned, Des50-pet, Des115-hex

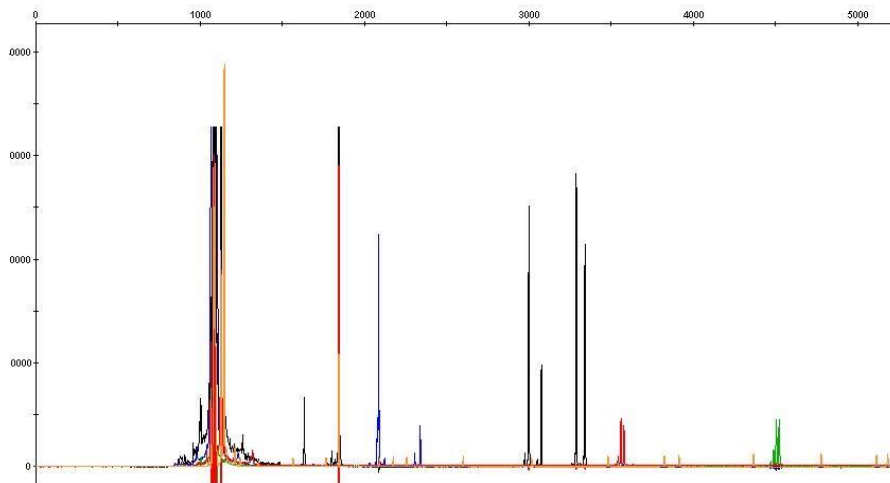


Figura 1. Salida visual de Genemapper 4.0. Perfil generado para un individuo de *E. sideroxylon* mediante la mezcla de reacción multiplexada 1.

Figure 1. Genemapper 4.0 visual output. Molecular profile of an *E. sideroxylon* individual generated by multiplex Mix 1.

Transferibilidad: se transfirió exitosamente 23 de los 28 marcadores SSR ensayados (82%) con patrones de amplificación de fácil lectura y reproducibles (Tabla 1). Veintiuno de ellos, fueron polimórficos y dos monomórficos. Los 23 marcadores se localizaron en 10 de los 11 cromosomas que tiene el género, no pudiéndose transferir marcadores del cromosoma 11. El resto de los marcadores no presentaron productos de amplificación en *E. sideroxylon* (transferencia negativa) en los individuos evaluados.

Conclusiones

Dado el alto porcentaje de transferencia de marcadores SSR y del formato multiplexado, será posible un rápido genotipado de individuos a costo accesible. Estas herramientas moleculares desarrollada, son un sistema eficiente que permitirá conocer y evaluar la variabilidad genética en las poblaciones de *E. sideroxylon*. Será posible la selección de individuos genéticamente diversos para el establecimiento de un futuro programa de multiplicación y mejoramiento que proporcionará una fuente de madera Tipo 1 a la región pampeana.

Bibliografía

- Acuña C. V., Rivas J. G., Aguirre N. C., Villalba P. V., Martínez M. C., García M. N., Hopp H. E., & Marcucci-Poltri S. N. (2021). New validated Eucalyptus SSR markers located in candidate genes involved in growth and plant development. *Forest Systems*, 29(3), eSC08. <https://doi.org/10.5424/fs/2020293-17074>
- Brondani, R. P., Williams, E. R., Brondani, C., & Grattapaglia, D. (2006). A microsatellite-based consensus linkage map for species of Eucalyptus and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. *BMC plant biology*, 6(1), 1-16.
- CABI. 2016. *Eucalyptus sideroxylon*. En: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International.
- Doyle J.J. and Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15

Composición de los valores genéticos aditivos de modelos ABLUP y ssGBLUP multi-carácter para árboles sin fenotipo.

Composition of the predicted breeding values from multiple-trait ABLUP and ssGBLUP models for trees without records.

Jurcic, Esteban J. ^{12*}; Villalba, Pamela V. ²³; Dutour, Joaquín ⁴; Centurión, Carmelo ⁴; Munilla, Sebastián ⁵⁶; Cappa, Eduardo P. ¹²

¹ Instituto de Recursos Biológicos, Centro de Investigación en Recursos Naturales, INTA. ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

³ Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMo), INTA-CONICET.

⁴ Forestal Oriental SA, Paysandú, Uruguay. ⁵ Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. ⁶ CONICET - Universidad de Buenos Aires. Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA).

jurcic.esteban@inta.gob.ar

Resumen

La selección genómica (SG) emplea modelos estadísticos para predecir los valores genéticos aditivos (VGA) de árboles genotipados, a partir de individuos genotipados y fenotipados para caracteres de interés. El desempeño predictivo de estos modelos depende de la estrategia de validación utilizada. En este sentido, la composición del VGA resulta fundamental para esclarecer las características de cada medida de desempeño. Estudios previos mostraron la composición del VGA para individuos con fenotipo de modelos de SG uni-carácter. Sin embargo, la composición del VGA de modelos multi-carácter de SG para individuos sin fenotipo aún no fue reportada. En esta presentación se describe la derivación de las ecuaciones correspondientes a los VGA de modelos multi-carácter con y sin información genómica para árboles de polinización abierta sin fenotipo y sin descendencia. Los desarrollos se ilustran mediante datos de un ensayo de progenies de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden).

Palabras Clave: Selección Genómica, modelo mixto de árbol individual, *Eucalyptus grandis*.

Abstract

Genomic selection (GS) uses statistical models to predict the breeding values (BV) of genotyped trees, from genotyped and phenotyped individuals for traits of interest. The predictive performance of these models depends on the validation strategy used. In this sense, the composition of the BV is essential to clarify the characteristics of each performance measure. Previous studies showed the composition of the BV for individuals with the phenotype of single-trait GS models. However, the composition of the BV of multi-trait GS models for individuals without phenotype has not yet been reported. This presentation describes the derivation of the equations corresponding to the BV of multi-trait models with and without genomic information for open-pollinated trees without phenotype and offspring. Developments are illustrated by means of data from a progeny trial of *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden).

Keywords: Genomic Selection, individual-tree mixed model, *Eucalyptus grandis*.

Introducción

Tradicionalmente las evaluaciones genéticas forestales combinan únicamente datos fenotípicos e información de pedigrí. Sin embargo, los recientes avances tecnológicos en genética molecular han mejorado en gran medida la capacidad de utilizar información del ADN para la selección genética de árboles. La disponibilidad de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) hizo posible generar predicciones por medio del enfoque de selección genómica (SG) (Meuwissen et al. 2001). La SG emplea una población de entrenamiento conformada por individuos genotipados mediante un panel de marcadores de todo el genoma y fenotipados para rasgos objetivo de interés. A partir de este conjunto de entrenamiento, se ajustan modelos estadísticos para predecir los valores genéticos aditivos (VGA) o valores de cría de árboles en una población de validación, conformada por los candidatos a la

selección con solo información genotípica.

Para evaluar el desempeño predictivo de los modelos estadísticos utilizados en la SG, muchos estudios realizan un procedimiento llamado validación cruzada. La manera usual de emplear esta técnica es la de k -iteraciones con réplicas (Hastie et al. 2009). En este caso, la población es dividida k -grupos y se le excluye el fenotipo de uno de esos grupos. Luego, se utilizan el resto de los grupos para realizar predicciones sobre el conjunto de datos sin fenotipos, obteniendo así una medida de desempeño del modelo estadístico evaluado. Este proceso se repite n veces y se promedia la medida de desempeño elegida sobre el número de réplicas realizadas.

Misztal (2016) observó que el desempeño predictivo de los modelos estadísticos utilizados en la SG depende de la estrategia de validación empleada. Además, remarcó que la composición del VGA podría esclarecer las características propias de cada medida de desempeño utilizada en la validación de los modelos de SG. En este sentido, estudios previos desde un contexto de mejoramiento genético animal mostraron la composición de los VGA para individuos con fenotipo correspondientes a modelos basados en la matriz de relaciones aditivas del pedigrí (ABLUP) uni-carácter (UC) (VanRaden and Wiggans 1991), y multi-carácter (MC) (Schaeffer 1984), y modelos basados en la matriz conjunta de pedigrí y genómica (ssGBLUP) UC (Lourenco et al. 2015). Sin embargo, hasta donde conocemos, la composición de los VGA para individuos sin fenotipo correspondientes a los modelos MC-ABLUP o -ssGBLUP aún no fue reportada.

Esta presentación describe la derivación de las ecuaciones correspondientes a los VGA para árboles de polinización abierta (PA) sin fenotipo y sin descendencia de modelos MC-ABLUP y -ssGBLUP. Adicionalmente, con el objeto de evaluar el efecto de los modelos MC sobre la exactitud predictiva de los VGA de rasgos escasamente medidos, los desarrollos son ilustrados utilizando datos de un ensayo progenies de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) (*E. grandis*) para caracteres predictores de crecimiento medidos en toda la población y caracteres objetivos de calidad de madera escasamente medidos.

Materiales y Métodos

Modelo estadístico de análisis: asumiendo un modelo mixto de árbol individual MC con un efecto fijo de procedencia ($\hat{\beta}$) y un efecto aleatorio genético aditivo (\hat{u}) para t caracteres (p caracteres predictores y s carácter objetivo), las ecuaciones de modelos mixtos (EMM) para el modelo MC-ABLUP son:

$$\begin{bmatrix} X'R^{-1}X & X'R^{-1}Z_u \\ Z_u'R^{-1}X & Z_u'R^{-1}Z_u + \Sigma_u^{-1} \otimes A^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\beta} \\ \hat{u} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'R^{-1}y \\ Z_u'R^{-1}y \end{bmatrix} \quad [1]$$

donde los vectores $\hat{\beta} = [\hat{\beta}'_1 | \hat{\beta}'_2 | \dots | \hat{\beta}'_t]$ y $\hat{u} = [\hat{u}'_1 | \hat{u}'_2 | \dots | \hat{u}'_t]$ se relacionan al vector de fenotipos $y = [y_1 | y_2 | \dots | y_t]$, por las matrices de incidencia $X = \bigoplus_{l=1}^t X_l$ y $Z_u = \bigoplus_{l=1}^t Z_{u_l}$, respectivamente, siendo el subscripto l para todos los rasgos: $l = 1, 2, \dots, t$. Σ_u^{-1} es la inversa de la matriz de covarianzas genética aditiva de orden $t \times t$, $A^{-1} \{a^{ij}\}$ es la inversa de la matriz de relaciones aditivas derivadas del pedigrí (Henderson 1984), y $R^{-1} = R_0^{-1} \otimes I$, donde R_0^{-1} es la matriz de covarianzas residual de orden $t \times t$ e I la matriz identidad. Los símbolos \oplus , \otimes y $'$ indican la notación de suma directa de matrices, producto Kronecker y la transpuesta de la matriz, respectivamente. En el modelo ssGBLUP, la matriz A^{-1} en las EMM [1] fue reemplazada por la matriz $H^{-1} \{h^{ij}\}$ (Legarra et al. 2009):

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \lambda(G^{-1} - A_{22}^{-1}) \end{bmatrix}$$

Una aplicación a *E. grandis*: Las MME [1] fueron ajustadas a un set de datos de un ensayo de progenie de *E. grandis* del programa de mejoramiento de la empresa Forestal Oriental S.A, conformado por 125 familias de PA. Las familias fueron dispuestas en bloques incompletos al azar con 8 repeticiones y cuatro árboles por parcela. El ensayo está localizado en Sánchez Grande, Departamento de Río Negro, Uruguay (32°48'49"S 57°39'40"W). En todos los árboles sobrevivientes (3159) se midieron caracteres de crecimiento (caracteres predictores) al cuarto año de edad: diámetro a la altura del pecho (1,3 m, DBH, cm) y altura total (HT, m), y sobre una muestra de 1214 árboles, al quinto año de edad, se registraron caracteres químicos y físicos de la madera (carácter objetivo) medidos mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR): rendimiento pulpable (% , PY), celulosa (% , CEL), extractivos (% , EXT) y densidad de madera (kg.m⁻³, WD). Se utilizó el Axiom Eucalyptus Genotyping Array (Axiom Euc72K) para genotipificar a 548 árboles (de 1214).

Resultados

A partir de la segunda fila de las EMM [1] se derivaron las ecuaciones de los valores genéticos predichos (\hat{u}) para todos los árboles de la población:

$$\begin{aligned} \mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} \hat{\boldsymbol{\beta}} + [\mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_u + (\boldsymbol{\Sigma}_u^{-1} \otimes \mathbf{A}^{-1})] \hat{\mathbf{u}} &= \mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{y} \\ [\mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_u + (\boldsymbol{\Sigma}_u^{-1} \otimes \mathbf{A}^{-1})] \hat{\mathbf{u}} &= \mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{y} - \mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} \hat{\boldsymbol{\beta}} \end{aligned}$$

Para una fila correspondiente al árbol sin registro i para el rasgo objetivo s , con sólo un progenitor conocido (PA) y sin descendencia, cada columna de \mathbf{Z}_u tiene todos los elementos iguales a 0 excepto 1 en la fila que corresponde al individuo i con fenotipo para el rasgo predictor p , y la matriz \mathbf{A}^{-1} tiene elementos fuera de la diagonal distintos de cero sólo para la madre del individuo i (m , a^{mi}) (Mrode 2005; página 46). Entonces, la solución del valor genético aditivo para un árbol i sin registro para el rasgo objetivo s (\hat{u}_{i_s}) es:

$$\begin{aligned} \sigma_u^{1s} a^{mi} \hat{u}_{m_{p_1}} + \sigma_u^{1s} a^{ii} \hat{u}_{i_{p_1}} + \sigma_u^{2s} a^{mi} \hat{u}_{m_{p_2}} + \sigma_u^{2s} a^{ii} \hat{u}_{i_{p_2}} + \dots + \sigma_u^{ts} a^{mi} \hat{u}_{m_{p_t}} + \sigma_u^{ts} a^{ii} \hat{u}_{i_{p_t}} + \sigma_u^{ss} a^{mi} \hat{u}_{m_s} + \sigma_u^{ss} a^{ii} \hat{u}_{i_s} &= 0 \\ \sigma_u^{ss} a^{ii} \hat{u}_{i_s} &= -\sigma_u^{1s} a^{mi} \hat{u}_{m_{p_1}} - \sigma_u^{1s} a^{ii} \hat{u}_{i_{p_1}} - \sigma_u^{2s} a^{mi} \hat{u}_{m_{p_2}} - \sigma_u^{2s} a^{ii} \hat{u}_{i_{p_2}} - \dots - \sigma_u^{ts} a^{mi} \hat{u}_{m_{p_t}} + \sigma_u^{ts} a^{ii} \hat{u}_{i_{p_t}} - \sigma_u^{ss} a^{mi} \hat{u}_{m_s} \\ \sigma_u^{ss} a^{ii} \hat{u}_{i_s} &= -\sigma_u^{ss} a^{mi} \hat{u}_{m_s} - \sigma_u^{1s} (a^{ii} \hat{u}_{i_{p_1}} + a^{mi} \hat{u}_{m_{p_1}}) - \sigma_u^{2s} (a^{ii} \hat{u}_{i_{p_2}} + a^{mi} \hat{u}_{m_{p_2}}) - \dots - \sigma_u^{ts} (a^{ii} \hat{u}_{i_{p_t}} + a^{mi} \hat{u}_{m_{p_t}}) \\ \hat{u}_{i_s} &= -\frac{a^{mi}}{a^{ii}} \hat{u}_{m_s} - \frac{\sigma_u^{1s}}{\sigma_u^{ss}} \left(\hat{u}_{i_{p_1}} + \frac{a^{mi}}{a^{ii}} \hat{u}_{m_{p_1}} \right) - \frac{\sigma_u^{2s}}{\sigma_u^{ss}} \left(\hat{u}_{i_{p_2}} + \frac{a^{mi}}{a^{ii}} \hat{u}_{m_{p_2}} \right) - \dots - \frac{\sigma_u^{ts}}{\sigma_u^{ss}} \left(\hat{u}_{i_{p_t}} + \frac{a^{mi}}{a^{ii}} \hat{u}_{m_{p_t}} \right) \\ \hat{u}_{i_s} &= -\frac{a^{mi}}{a^{ii}} \hat{u}_{m_s} - \sum_{l=1}^{t-1} \frac{\sigma_u^{ps}}{\sigma_u^{ss}} \left(\hat{u}_{i_{p_l}} + \frac{a^{mi}}{a^{ii}} \hat{u}_{m_{p_l}} \right) \end{aligned}$$

donde σ_u^{ps} son los elementos fuera de la diagonal de la matriz $\boldsymbol{\Sigma}_u^{-1}$ entre el rasgo predictor p y el rasgo objetivo s , y σ_u^{ss} es el elemento diagonal de la matriz $\boldsymbol{\Sigma}_u^{-1}$ correspondiente al rasgo objetivo s . Dado que los árboles de PA tienen un solo progenitor conocido y no tienen descendencia, a^{mi} es igual a $-2/3$ y a^{ii} es igual a $4/3$ (Henderson 1976). Por lo tanto:

$$\hat{u}_{i_s} = \frac{1}{2} \hat{u}_{m_s} - \sum_{l=1}^{t-1} \beta_{p_s} \left(\hat{u}_{i_{p_l}} - \frac{1}{2} \hat{u}_{m_{p_l}} \right) \quad [2]$$

siendo β_{p_s} los coeficientes de regresión parcial del rasgo objetivo s en el rasgo predictor p (es decir, $\sigma_u^{ps}/\sigma_u^{ss}$). Para el modelo MC-ssGBLUP, las soluciones para los VGA son:

$$\begin{aligned} \mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} \hat{\boldsymbol{\beta}} + [\mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_u + (\boldsymbol{\Sigma}_u^{-1} \otimes \mathbf{H}^{-1})] \hat{\mathbf{u}} &= \mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{y} \\ [\mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_u + (\boldsymbol{\Sigma}_u^{-1} \otimes \mathbf{H}^{-1})] \hat{\mathbf{u}} &= \mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{y} - \mathbf{Z}'_u \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} \hat{\boldsymbol{\beta}} \end{aligned}$$

La solución del VGA para un árbol genotipado i sin registro para el rasgo objetivo s (\hat{u}_{i_s}) es:

$$\begin{aligned} \sigma_u^{1s} h^{mi} \hat{u}_{m_{p_1}} + \sigma_u^{1s} h^{ii} \hat{u}_{i_{p_1}} + \sigma_u^{1s} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_1}} + \sigma_u^{2s} h^{mi} \hat{u}_{m_{p_2}} + \sigma_u^{2s} h^{ii} \hat{u}_{i_{p_2}} + \sigma_u^{2s} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_2}} + \dots + \\ \sigma_u^{ts} h^{mi} \hat{u}_{m_{p_t}} + \sigma_u^{ts} h^{ii} \hat{u}_{i_{p_t}} + \sigma_u^{ts} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_t}} + \sigma_u^{ss} h^{mi} \hat{u}_{m_s} + \sigma_u^{ss} h^{ii} \hat{u}_{i_s} + \sigma_u^{ss} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_s} &= 0 \\ \sigma_u^{ss} h^{ii} \hat{u}_{i_s} &= -\sigma_u^{1s} h^{mi} \hat{u}_{m_{p_1}} - \sigma_u^{1s} h^{ii} \hat{u}_{i_{p_1}} - \sigma_u^{1s} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_1}} - \sigma_u^{2s} h^{mi} \hat{u}_{m_{p_2}} - \sigma_u^{2s} h^{ii} \hat{u}_{i_{p_2}} - \\ &\quad \sigma_u^{2s} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_2}} - \dots - \sigma_u^{ts} h^{mi} \hat{u}_{m_{p_t}} - \sigma_u^{ts} h^{ii} \hat{u}_{i_{p_t}} - \sigma_u^{ts} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_t}} - \sigma_u^{ss} h^{mi} \hat{u}_{m_s} - \\ &\quad \sigma_u^{ss} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_s} \\ \sigma_u^{ss} h^{ii} \hat{u}_{i_s} &= -\sigma_u^{ss} h^{mi} \hat{u}_{m_s} - \sigma_u^{ss} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_s} - \sigma_u^{1s} (h^{ii} \hat{u}_{i_{p_1}} + h^{mi} \hat{u}_{m_{p_1}}) - \sigma_u^{1s} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_1}} - \\ &\quad \sigma_u^{2s} (h^{ii} \hat{u}_{i_{p_2}} + h^{mi} \hat{u}_{m_{p_2}}) - \sigma_u^{2s} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_2}} - \dots - \sigma_u^{ts} (h^{ii} \hat{u}_{i_{p_t}} + h^{mi} \hat{u}_{m_{p_t}}) - \\ &\quad \sigma_u^{ts} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_t}} \\ \hat{u}_{i_s} &= -\frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_s} - \frac{\sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_s}}{h^{ii}} - \frac{\sigma_u^{1s}}{\sigma_u^{ss}} \left(\hat{u}_{i_{p_1}} + \frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_{p_1}} \right) - \frac{\sigma_u^{1s} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_1}}}{\sigma_u^{ss} h^{ii}} - \frac{\sigma_u^{2s}}{\sigma_u^{ss}} \left(\hat{u}_{i_{p_2}} + \frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_{p_2}} \right) - \\ &\quad \frac{\sigma_u^{2s} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_2}}}{\sigma_u^{ss} h^{ii}} - \dots - \frac{\sigma_u^{ts}}{\sigma_u^{ss}} \left(\hat{u}_{i_{p_t}} + \frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_{p_t}} \right) - \frac{\sigma_u^{ts} \sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_t}}}{\sigma_u^{ss} h^{ii}} \\ \hat{u}_{i_s} &= -\frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_s} - \sum_{l=1}^{t-1} \beta_{p_s} \left(\hat{u}_{i_{p_l}} + \frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_{p_l}} \right) - GI_s \quad [3] \end{aligned}$$

donde h^{mi} es el elemento fuera de la diagonal de \mathbf{H}^{-1} entre el árbol i y su madre m y la contribución de la información genómica para el modelo MC-ssGBLUP (GI_s) es:

$$GI_s = \frac{\sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_s}}{h^{ii}} + \sum_{l=1}^{t-1} \beta_{p_s} \frac{\sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{p_l}}}{h^{ii}}$$

Finalmente, las ecuaciones de los VGA para el ssGBLUP de árboles sin genotipo son iguales a las obtenidas por ABLUP.

Con el objetivo de aplicar las derivaciones realizadas, se ajustaron los modelos MC-ABLUP y -ssGBLUP en un ensayo de PA de *E. grandis* para tres caracteres: dos rasgos predictores de crecimiento (DBH y HT) y un rasgo de calidad de madera ($s = \text{PY, CEL, EXT o WD}$). Por lo tanto, las ecuaciones del VGA [2] y [3] para un árbol sin fenotipo en este caso son:

$$\hat{u}_{i_s} = \frac{1}{2} \hat{u}_{m_s} - \beta_{DBH_s} \left(\hat{u}_{i_{DBH}} - \frac{1}{2} \hat{u}_{m_{DBH}} \right) - \beta_{HT_s} \left(\hat{u}_{i_{HT}} - \frac{1}{2} \hat{u}_{m_{HT}} \right) \quad \text{MC-ABLUP}$$

$$\hat{u}_{i_s} = -\frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_s} - \beta_{DBH_s} \left(\hat{u}_{i_{DBH}} - \frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_{DBH}} \right) - \beta_{HT_s} \left(\hat{u}_{i_{HT}} - \frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_{HT}} \right) - GI_s \quad \text{MC-ssGBLUP}$$

donde \hat{u}_{m_s} , $\hat{u}_{m_{DBH}}$, $\hat{u}_{m_{HT}}$ son los VGA de la madre para el rasgo de calidad de madera, DBH y HT, respectivamente, β_{DBH_s} y β_{HT_s} son los coeficientes de regresión parcial de los rasgos de calidad de madera sobre los de crecimiento, y la contribución de la información genómica (GI_s) es:

$$GI_s = \frac{\sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_s}}{h^{ii}} + \beta_{DBH_s} \frac{\sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{DBH}}}{h^{ii}} + \beta_{HT_s} \frac{\sum_{i,i \neq j} h^{ij} \hat{u}_{j_{HT}}}{h^{ii}}$$

Conclusiones

A partir de las ecuaciones [2] y [3] se observa que los cambios en exactitud predictiva (EP) podrían explicarse por las variaciones de los componentes de los VGA derivados; es decir, las contribuciones maternas ($\frac{1}{2} \hat{u}_{m_s}$ para ABLUP y $-\frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_s}$ para ssGBLUP), las contribuciones de los rasgos predictores ($\sum_{l=1}^{t-1} \beta_{p_s} (\hat{u}_{i_{p_l}} - \frac{1}{2} \hat{u}_{m_{p_l}})$ para ABLUP y $\sum_{l=1}^{t-1} \beta_{p_s} (\hat{u}_{i_{p_l}} + \frac{h^{mi}}{h^{ii}} \hat{u}_{m_{p_l}})$ para ssGBLUP), y la información genómica (GI_s) para ssGBLUP. Por ejemplo, cuando los fenotipos de los caracteres predictores son considerados sólo en la población de entrenamiento (Estrategia de Validación, EV1), los modelos MC mostrarán exactitudes similares a los modelos UC debido a que en ambos casos los VGA estarán conformados sólo por la contribución materna. Por otro lado, cuando los fenotipos de los caracteres predictores son considerados tanto en la población de entrenamiento como en la de validación (EV2), las contribuciones de los rasgos predictores permitirán explicar mayormente las diferencias en exactitud de los VGA entre los modelos MC y UC. Por último, cuando los modelos ssGBLUP y ABLUP son comparados dentro de los escenarios UC y MC, las diferencias pueden también explicarse por la información genómica.

En el caso de estudio analizado, la EP de los modelos MC (calculada mediante la correlación entre el fenotipo corregido por efectos de diseño y el VGA predicho) en el EV1 no mostró cambios para los rasgos PY y CEL, aunque mostró leves disminuciones para EXT y WD, en comparación con los modelos UC. En el EV2 se observaron ganancias en exactitud de los modelos MC para los rasgos PY (hasta un 13.54%) y CEL (hasta un 13.69%), mientras que hubo disminuciones para EXT y WD. Por último, se observaron aumentos en exactitud de los modelos ssGBLUP sobre los ABLUP (hasta un 7.66% en MC), aunque no fueron significativos.

Concluimos que la composición del VGA de árboles sin fenotipo es una valiosa herramienta para comprender mejor el efecto de los modelos MC-ABLUP y -ssGBLUP sobre la exactitud de los VGA en árboles provenientes de ensayos de PA. La descomposición del VGA de árboles sin fenotipo para los caracteres de calidad de madera en *E. grandis* permitió comprender mejor el efecto de los modelos MC-ssGBLUP sobre la exactitud de los VGA.

Bibliografía

- Hastie T, Tibshirani R, Friedman JH (2009) The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction. Springer
- Henderson CR (1976). A simple method for computing the inverse of a numerator relationship matrix used in prediction of breeding values. Biometrics, 69-83.
- Henderson, C. R. (1984). 1984-Guelph.
- Legarra, A., Aguilar, I., & Misztal, I. (2009). A relationship matrix including full pedigree and genomic information. Journal of dairy science, 92(9), 4656-4663.
- Lourenco D, Fragomeni BO, Tsuruta S, et al (2015) Accuracy of estimated breeding values with genomic information on males, females, or both: an example on broiler chicken. Genet Sel Evol 47:56.
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. Genetics 157:1819–1829.
- Misztal I (2016) Is genomic selection now a mature technology? J Anim Breed Genet 133:81–82.
- Mrode R (2005) Linear models for the prediction of animal breeding values, 2nd edn. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Schaeffer LR (1984) Sire and cow evaluation under multiple trait models. J Dairy Sci 67:1567–1580.
- VanRaden PM, Wiggans GR (1991) Derivation, calculation, and use of national animal model information. J Dairy Sci 74:2737–46.

Variabilidad genética preliminar del quebracho colorado chaqueño (*Schinopsis balansae* Engl.) en poblaciones del Chaco Húmedo argentino.

Preliminary genetic variability of the quebracho colorado chaqueño (*Schinopsis balansae* Engl.) in populations of the Argentinian Humid Chaco.

De Diego, Fernando Carlos^{1,2}; Torales, Susana Leonor¹; Fortunato, Renée Hersilia²

¹IRB-CIRN, INTA Castelar, ² CONICET

dediego.fernando@inta.gob.ar

Resumen

El quebracho colorado chaqueño (*Schinopsis balansae* Engl.) es uno de los recursos forestales más importantes de la Argentina y, sin embargo, actualmente no cuenta con herramientas moleculares que permitan estudiar su variabilidad genética poblacional. Para conocer el estado de conservación genético y evaluar futuras estrategias de recuperación, se analizaron 8 poblaciones del Chaco Húmedo argentino. Estas poblaciones estaban sometidas a diferentes sistemas de manejo como clausuras conservacionistas, actividades silvopastoriles, forestación o explotación maderera. Hasta el presente se han podido transferir desde especies afines 4 marcadores SSR. Los resultados parciales mostraron una diversidad genética moderada a baja, visualizando patrones que la relacionarían con actividades de manejo poblacional, no obstante, para considerarlos concluyentes aún faltan incrementar el número de nuevos marcadores SSRs.

Palabras clave: Conservación, *Schinopsis balansae*, variabilidad genética.

Abstract

The “quebracho colorado chaqueño” (*Schinopsis balansae* Engl.) is one of the most important forest resources in Argentina and, however, currently does not have molecular tools that can study its population genetics. In order to know the state of genetic conservation and to evaluate future recovery strategies, 8 populations from the argentinian Humid Chaco were analyzed. These populations were subject to different management systems such as conservationist closures, silvopastoral activities, afforestation or logging. To date, 4 SSR markers have been transferred from related species. The partial results showed a moderate to low genetic diversity, visualizing patterns that would be relating it to the population management activity, however, to consider them conclusive, the number of new SSRs markers still need to be increased.

Key words: Conservation, *Schinopsis balansae*, genetic variability.

Introducción

El quebracho colorado chaqueño (*Schinopsis balansae* Engl.) por la calidad del tanino que contiene la madera es una de las especies foresto-industriales más importantes del país. La utilidad es conocida en curtiembres, y también por su dureza y resistencia a la putrefacción para construcción (vigas, horcones, postes) y durmientes en la expansión del ferrocarril (Bitlloch & Sormani, 1997). A mediados del siglo XX, los quebrachales remanentes de procesos de degradación y fragmentación de hábitat fueron destinándose a la ganadería silvopastoril, si bien se continuó con tala selectiva para extracción de tanino, carbón y leña (Carnevale et al., 2007). Actualmente, la producción industrial de tanino proviene de poblaciones del sur de Formosa y en el norte de la provincia del Chaco, en una superficie de aprox. 50.000 ha. (Estadísticas Chaco, 2012). Según relevamientos e inventarios forestales del Ministerio de Producción del Chaco (2005, 2007) el quebracho colorado chaqueño se encontró en menos del 20% de las parcelas estudiadas, y con pocos ejemplares de más de 30 centímetros de

diámetro. Por otro lado, se conoce que la aplicación de diferentes prácticas y manejos silvícolas pueden reducir la diversidad genética de una población de árboles o de una comunidad (Sola et al., 2016). En la región del Chaco Húmedo argentino contrastan grandes áreas protegidas, como los Parques Nacionales Chaco, Río Pilcomayo y Mburucuyá, con regiones sin protección como el noroeste de Santa Fé, en donde las poblaciones remanentes se encuentran fragmentadas y dispersas (Fontana, 2018).

Aunque existen estudios sobre la capacidad de regeneración poblacional del quebracho colorado chaqueño (Dieringer, 2003), hasta el momento no se conoce información sobre su diversidad genética (Vesprini et al., 2011). Los tipos de manejo silvícolas, como la tala selectiva, tienen antecedentes negativos en la variabilidad poblacional de otros grupos (Lusini et al., 2014), por lo que generar un análisis poblacional permitirá efectuar evaluaciones importantes a nivel económico-productivo y ecológico; no obstante, para realizarlo en el Quebracho es requerido previamente el desarrollo de herramientas genómicas. Sobre esta base, se presentan resultados preliminares de la caracterización de la variabilidad genética de poblaciones de *Schinopsis balansae* del Chaco Húmedo argentino bajo diferentes manejos silvícolas mediante la aplicación de marcadores SSRs neutros transferidos de especies filogenéticamente cercanas.

Materiales y Métodos

Se realizó la colecta de material vegetal (hojas) de quebracho colorado chaqueño (*Schinopsis balansae* Engl.) relevando ocho poblaciones en Santa Fé, Chaco y Corrientes. Las mismas fueron seleccionadas representando diversas situaciones de conservación y uso. En Santa Fé, se colectaron muestras de una explotación silvopastoril en las cercanías de Reconquista. En Chaco se colectaron muestras en un predio de clausura estricta de la EEA Colonia Benítez. Además, se muestrearon dos poblaciones implantadas, otra perteneciente a un establecimiento de ganadería silvopastoril y, por último, una población natural no protegida. En la provincia de Corrientes se colectaron muestras de un remanente intervenido y de una población protegida en el PN Mburucuyá. En total se colectaron 167 muestras que fueron identificadas y asociadas a una georreferenciación individual.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de hojas jóvenes deshidratadas y finamente molidas siguiendo la metodología de CTAB (Bromuro de cetil trimetil amonio) de Doyle & Doyle (1990) y modificaciones (Mogni et al., 2016). Se ensayó la transferencia de 31 marcadores SSRs de *Pistacia* (Zaloglu et al., 2015), *Astronium* (Sanchez-Gomez et al., 2020) y *Myracrodruon* (Lemos Souza et al., 2017). Mediante PCR se amplificaron los segmentos de ADN utilizando los cebadores transferidos utilizando 10 ng de templado por reacción, las condiciones de amplificación se encuentran en la Tabla N°1. La visualización de los productos amplificados se realizó en geles de poliacrilamida, teñidos con nitrato de plata. Los alelos identificados para cada individuo y SSR fueron genotipificados manualmente, codificados y transferidos a matrices de datos para el desarrollo de los análisis estadísticos mediante GenAlEx versión 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Se caracterizaron 154 individuos pertenecientes a 8 poblaciones (Tabla 2). Se estimó la variabilidad genética de las poblaciones a partir de la heterocigocidad esperada (H_e), heterocigocidad observada (H_o), número de alelos (N_a), número de alelos exclusivos (A_e), nivel de endogamia (F_{is}) y diferenciación genética (Φ_{PT} , AMOVA).

Resultados

Se seleccionaron, hasta el momento, 4 marcadores polimórficos de buenos perfiles (Ast1b, Ast38, Ast45 y Aro18) amplificados en las condiciones descritas en la Tabla 1. En total se detectaron 25 alelos, de los cuales 8 son de Aro,18, 7 de Ast1b, 5 de Ast38 y 5 de Ast45; la población FO la que más alelos presentó (17) siendo ESC la de menor número de alelos (11). La diversidad genética de la especie fue moderada a baja ($H_e=0.438$), siendo la población NAT la de valor más alto ($H_e=0.564$) y la población CO1 la de más bajo ($H_e=0.369$) (Tabla 2). Las tres poblaciones con cierto nivel de protección frente a la actividad antrópica (COLB, NAT y MBU) presentaron una diversidad genética dispar, siendo la de NAT la de máxima diversidad, mientras que las de COLB y MBU presentaron bajos valores. Las poblaciones presentes en sistemas silvopastoriles mostraron valores moderados a bajos de heterocigocidad, mientras que la población fragmentada CO1 presentó los valores más bajos, mientras que las poblaciones forestadas (FO y ESC) presentaron valores intermedios, a pesar del número bajo de muestras analizadas en el caso de ESC. Los resultados de los FIS fueron bajos para todas las poblaciones. Los resultados del AMOVA muestran una mayor proporción de variabilidad genética dentro de las poblaciones (94%), y una baja diferenciación entre poblaciones ($\Phi_{PT}=0.059$).

Tabla 1. Condiciones de amplificación para 4 SSR transferidos. PM: peso molecular observado (pb), Ta: temperatura de annealing.**Table 1.** Conditions of amplification for 4 transferred SSR. PM: molecular weight (pb), Ta: temperature of annealing.

SSR	Ast1b	Ast38	Ast45	Aro18
PM (pb)	146-166	100-112	116-130	214-238
Ta (°C)	57	56	56	59
MgCl ₂ (mM)	2,5	3,5	3,0	2,5
Ciclos de PCR	35	36	38	45
ul siembra	3,5	4,5	3,5	3,5

Tabla 2. Caracterización de diversidad genética de 8 poblaciones de *S. balansae*. Ho: heterocigosidad observada, Na: número de alelos, Ae: número de alelos exclusivos y F_{ST}: índice de endogamia en la población.**Table 2.** Characterization of genetic diversity of 8 populations of *S. balansae*. Ho: observed heterozygosity, Na: number of alleles, Ae: number of exclusive alleles and F_{ST}: rate of inbreeding in the population.

Población	Código	Situación de Manejo	Provincia	N	He	Ho	Na	Ae	FIS
Reconquista	REC	Silvopastoril con extracción	Santa Fé	20	0.452	0.301	13	0	0.055
EEA Colonia Benítez	COLB	Clausura conservacionista	Chaco	20	0.397	0.314	15	0	0.125
Forestación	FO	Forestación desde vivero	Chaco	21	0.449	0.313	17	1	0.077
Estancia El Nacional	EN	Silvopastoril extensivo	Chaco	20	0.411	0.439	13	0	0.023
Arbolado La Escondida	ESC	Forestación arbolado urbano	Chaco	11	0.438	0.500	11	0	0.061
Lindero al PN Chaco	NAT	Población natural conservada	Chaco	20	0.564	0.649	16	0	-0.020
Remanente Corrientes	CO1	Remanentes en zona urbanizada	Corrientes	17	0.369	0.426	16	0	0.003
PN Mburucuyá	MBU	Conservación estricta	Corrientes	25	0.424	0.365	15	1	0.011

Conclusiones

Los resultados preliminares muestran moderada a baja diversidad genética en las poblaciones estudiadas del quebracho colorado chaqueño en el Chaco Húmedo argentino. No se observaron valores relevantes de endogamia en las poblaciones. A pesar de no observarse patrones esperables que relacionen el estatus de conservación de las poblaciones con la diversidad, sí se puede destacar que la población con mayor diversidad sea una que ha estado conservada (NAT, lindera al parque nacional Chaco), mientras que la población con los valores más bajos se trate de un remanente de un proceso extractivo (REC). Sin embargo, debe considerarse que las poblaciones correntinas analizadas (CO1 y MBU) pertenecen al extremo sureste de la distribución de la especie, por lo que es esperable que tengan una menor diversidad. Para obtener resultados más precisos y conocer las implicancias del ambiente y de los manejos silvícolas en la estructura y diversidad genética de esta especie es necesario ampliar el número de marcadores utilizados.

Bibliografía

- Bitlloch, E. & Sormani, H. A. 1997. "Los enclaves forestales de la región chaqueño-misionera", Ciencia Hoy, 1997, 7: pp. 41-52.
- Carnevale N. J., C. Alzugaray & Di Leo, N. 2007. Estudio de la deforestación en la Cuña Boscosa santafesina mediante teledetección espacial. Quebracho 14: 47-56.
- Dieringer E. E. 2003. Estudio de la regeneración natural de *Schinopsis balansae* Engler, quebracho colorado chaqueño. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.

- Estadísticas Chaco, Ministerio de Planificación, Ambiente e Innovación Tecnológica, Gobierno del Chaco. 2012. Chaco en Cifras, 2012. <http://estadisticas.chaco.gov.ar/wp-content/uploads/2017/10/Chaco-en-cifras-2012.pdf>
- Fontana, J. L. 2018. Una introducción al tapiz verde del noroeste de Corrientes y este de Chaco. Serie "Publicaciones Didácticas de la Cátedra de Ecología Vegetal" Vol.3: La vegetación del nordeste argentino. 1.Las Comunidades vegetales del NW de Corrientes y E del Chaco. UNNE, Argentina.
- Lemos Souza, D. C., Rossini, B. C., de Souza, F. B., Sebbenn, A. M., Marino, C. L. & Texeira de Moraes, M. L. 2017. Development of microsatellite markers for *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão), a highly endangered species from tropical forest based on next-generation sequencing. *Molecular Biology Reports* (2018) 45:71–75. <https://doi.org/10.1007/s11033-017-4142-z>
- Lusini, I., Velichkov, I., Pollegioni, P., Chiocchini, F., Hinkov, G., Zlatanov, T., Cherubini, M. & Mattioni, C. 2014. Estimación de la diversidad genética y la estructura espacial de las poblaciones de *Castanea sativa* búlgara por SSR: implicaciones para la conservación. *Conserv Genet* 15, p. 283–293. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0537-0>
- Ministerio de la Producción del Chaco. 2006. Inventario forestal 2005. 1ra. Ed. Resistencia. Librería de la Paz. pp 148
- Ministerio de la Producción del Chaco. 2007. Manual de manejo forestal sustentable de la provincia del Chaco.
- Mogni, V. Y., Kahan, M. A., de Queiroz, L. P., Vesprini, J. L., Ortiz, J. P. A. & Prado, D. A. 2016. Optimization of DNA extraction and PCR protocols for phylogenetic analysis in *Schinopsis* spp. and related Anacardiaceae. *SpringerPlus* 5, 477 (2016). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2118-4>
- Peakall, R. and Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Sanchez-Gomez, K. F., Cristóbal-Pérez, E. J., Harvey, N. 2020. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Astronium graveolens* (Anacardiaceae) and cross amplification in related species. *Mol Biol Rep* 47, 4003–4007 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05397-4>
- Sola, G., El Mujtar, V., Tsuda, Y., Vendramin, G. G. & Gallo, L. 2016. The effect of silvicultural management on the genetic diversity of a mixed *Nothofagus* forest in Lanín Natural Reserve, Argentina. *Forest Ecology and Management*. Volume 363, 1 March 2016, Pages 11-20.
- Vesprini J. L., Kahan, M. A. & Ortiz, J. P. 2006. Selección de cebadores de RAPDS y análisis de progenies en quebracho colorado (*Schinopsis balansae* Engl). XXII Reunión Argentina de Ecología, Córdoba.
- Zaloglu, S., Kafkas, S., Doğan Y. & M. Güney, 2015. Development and characterization of SSR markers from pistachio (*Pistacia vera* L.) and their transferability to eight *Pistacia* species. *Scientia Horticulturae* 189, pp 94– 103.

***Prosopis flexuosa*-rizobacterias en salares del Chaco Árido:
diversidad genética, simbiosis y promoción del crecimiento.**

Prosopis flexuosa-rhizobacteria in Arid Chaco salt flats: genetic diversity,
symbiosis and growth promotion.

Espinosa, Herlein Maria de los Angeles²; González, Pablo¹; López Lauenstein,
Diego¹; Melchiorre, Mariana^{1,2}

¹ Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales, Unidad de Estudios
Agropecuarios (INTA-CONICET) ² Fac. Ciencias Exactas Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba.

melchiorre.mariana@inta.gob.ar

Resumen

Plantas de *Prosopis flexuosa* crecieron en suelos colectados de los salares La Antigua y Pipanaco en invernadero. De nódulos de estas "plantas trampa" se aislaron las rizobacterias y se obtuvieron patrones de amplificación por rep-PCR_BoxA1 para analizar la diversidad genética por sitio. Se evaluó además la capacidad de algunos aislamientos seleccionados (con alta tolerancia a NaCl) de promover el crecimiento en *P. flexuosa*. Las rizobacterias recuperadas de nódulos procedentes La Antigua_1 mostraron la mayor variabilidad genética y aportes al crecimiento. De sitios con salinidad extrema como La Antigua_2 (CE 62,5 dS/m) no se recuperaron rizobacterias y las plantas mostraron el menor desarrollo. Tres aislamientos rizobianos fueron capaces de promover el crecimiento de *P. flexuosa* por encima de la media de todos los tratamientos inoculados y no inoculados. Esto evidencia la importancia del estudio de la diversidad genética microbiana del suelo y el valor de la inoculación con aislamientos seleccionados para el desarrollo de plantines con fines productivos o de restauración para el Chaco Árido.

Palabras clave: *Prosopis flexuosa*, simbiosis, rizobacterias, Chaco Árido.

Abstract

Prosopis flexuosa plants grew in a greenhouse in soils collected in the La Antigua and Pipanaco salt flats. Rhizobacteria were isolated from these "trap plants" nodules. Genetic diversity from each site was analyzed by amplification patterns obtained by rep-PCR_BoxA1. The ability of some selected isolates (with high tolerance to NaCl) to promote *P. flexuosa* growth was also evaluated. The rhizobacteria recovered from nodules from La Antigua_1 showed the highest genetic variability and major growth contributions. No rhizobacteria were recovered from sites with extreme salinity such as La Antigua_2 (EC 62.5 dS/m), additionally its plants showed the least development. Three rhizobial isolates promoted *P. flexuosa* growth above average of all inoculated and non-inoculated treatments. This evidences the significance of studying microbial soil genetic diversity and the value of inoculation using selected isolates for seedlings production for both productive and restoration purposes to be used in the Arid Chaco.

Keywords: *Prosopis flexuosa*, symbiosis, rhizobacteria, Arid Chaco.

Introducción

Prosopis flexuosa está presente en los salares de Pipanaco en Catamarca y La Antigua en La Rioja en la subregión del Chaco Árido argentino. Provee importantes servicios ecosistémicos y, a través de asociaciones simbióticas con rizobacterias del suelo contribuye con la fertilidad a través de la fijación biológica de N₂. En estos ambientes limitantes, el fluctuante pero siempre elevado nivel de salinidad, condiciona la diversidad de rizobacterias presentes y su capacidad de establecer relaciones mutualistas benéficas con *P. flexuosa*, desarrollar nódulos, promover el crecimiento vegetal y fijar nitrógeno.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética de rizobacterias en los salares de Pipanaco y La Antigua, que se asocian en simbiosis con *P. flexuosa* y seleccionar microorganismos con potencial

de promover su crecimiento para su desarrollo como bioinsumo.

Materiales y Métodos

Se recolectaron muestras de suelo en dos sitios de los salares bajo las copas de árboles de *P. flexuosa* en Pipanaco en Catamarca y La Antigua en La Rioja. Figura 1. En invernadero, se sembraron semillas de *P. flexuosa* usando esos suelos para obtener “plantas trampa” noduladas con las rizobacterias presentes. A los 90 días, se cosecharon los nódulos y evaluaron parámetros de crecimiento en plantas. De aproximadamente el 10% del total de nódulos, se aislaron y cultivaron rizobacterias en medio LMA (Vincent, 1970). Se extrajo el ADN total de los aislamientos para analizar polimorfismos genéticos por medio de rep-PCR con primer BOX A1R (Chávez-Díaz et al, 2013). Los polimorfismos, a partir de los patrones de amplificación se evaluaron por UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic mean* o método aritmético usando promedio no ponderado de pares de agrupamientos), en base a una matriz de similitud calculada con el coeficiente de Dice. La variabilidad se determinó con análisis de coordenadas principales (PCoA) (Di Rienzo et al, 2008). Los individuos con mayor variabilidad se cultivaron en LMA adicionado con NaCl hasta 500 mM. Las rizobacterias sobrevivientes, se emplearon para inocular semillas de *P. flexuosa* que se mantuvieron en invernadero. En plantines de 30 d se evaluó la promoción de crecimiento respecto de controles no inoculados.

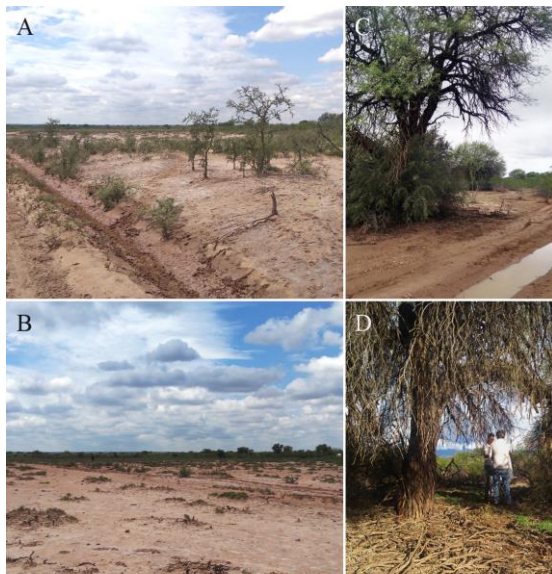


Figura 1. Sitios de colección de suelos para recuperación de rizobacterias: A-La Antigua_1, B-La Antigua_2, La Rioja; C-Pipanaco_1, D-Pipanaco_2, Catamarca.

Figure 1. Soil collection sites to rhizobacteria recovery: A-La Antigua_1, B-La Antigua_2, La Rioja; C-Pipanaco_1, D-Pipanaco_2, Catamarca.

Resultados y Conclusiones

Los sitios de colecta de suelo presentaron niveles variables de conductividad: Pipanaco_1 (25.1 dS/m), Pipanaco_2 (20 dS/m) en Catamarca y La Antigua_1 (9.7 dS/m) y La Antigua_2, (62.5 dS/m) en La Rioja.

Las variables de crecimiento evaluadas en plantas trampa de *P. flexuosa* a los 90 días, crecidas en suelos de diferentes procedencias, mostraron que no se recuperaron nódulos de las plantas crecidas en suelos de LaAntigua_2 (Ce 62.5 dS/m). Estas plantas además mostraron la menor altura promedio con diferencias significativas ($p > 0.05$) respecto de las desarrolladas en suelos de LaAntigua_1 y de Pipanaco Para número de hojas y número de nudos, los valores en plantas de Pipanaco_1 y Pipanaco_2 fueron significativamente mayores que las de La Antigua Tabla1

<i>P. flexuosa</i> (90d)	La Antigua_1	La Antigua_2	Pipanaco_1	Pipanaco_2
Altura (cm)	16,5 ± 2,92 C	7,45 ± 1,77 D	33,18 ± 7,14 A	28,71 ± 5,80 B
Hojas (N°)	10,05 ± 1,8 B	3,62 ± 1,77 C	13,72 ± 3,14 A	13,62 ± 2,82 A
Nudos (N°)	14,86 ± 3,7 B	7,33 ± 2,21 C	22,32 ± 3,40 A	21,17 ± 3,65 A
Nódulos (N°)	639	0	31	25

Tabla 1. *Prosopis flexuosa* (90 d) crecidas en suelos de La Antigua y Pipanaco. Altura, N° hojas N° nudos, N° nódulos. Letras indican diferencias significativas en test DGC ($p > 0.05$).

Table 1. *Proopis flexuosa* plants (90 d) grown in soils from La Antigua and Pipanaco: Height, leaves N°, nodes, and N° nodules. Letters indicate significant differences with DGC test ($p \leq 0.05$)

El análisis de coordenadas principales (PCoA) mostró que las rizobacterias aisladas de nódulos de plantas trampa de La Antigua_1 poseen la mayor diversidad en los patrones moleculares (bandas en geles a partir de los amplificadas por rep-PCR _BoxA1R) (Figura 2). Las plantas de este sitio además desarrollaron la mayor cantidad de nódulos totales (Tabla 1). Los resultados de la comparación (UPGMA-Dice) se organizaron en un dendrograma a partir del que se seleccionar 21 aislamientos de

rizobacterias que mostraron un nivel de similaridad menor (distancia de Dice) menor a 60%. De estos 21 aislamientos, 14 fueron recuperados de nódulos LaAntigua_1, 6 de Pipanaco_1 y 1 de Pipanaco_2. Estos aislamientos fueron ensayados en su capacidad de crecer en vida libre en medio LMA adicionado con 500mM y se observó una sobrevivencia del 71.2% (15/21) de los individuos. Estas rizobacterias tolerantes a NaCl se usaron para inocular semillas *P. flexuosa* sembradas en sustrato inerte estéril para evaluar la capacidad de recolonización y formación de nódulos y promoción de crecimiento. Los valores promedio de las variables de crecimiento en *P. flexuosa* de 60 días tomando en conjunto todos aislamientos ensayados, fueron superiores a los de plantas no inoculadas. Plantines inoculados con los aislamientos N° 13 y 10 de Pipanaco_1 y N° 27 de LaAntigua_1, mostraron los valores más altos y diferencialmente significativos respecto de los controles no inoculados (Tabla 2).

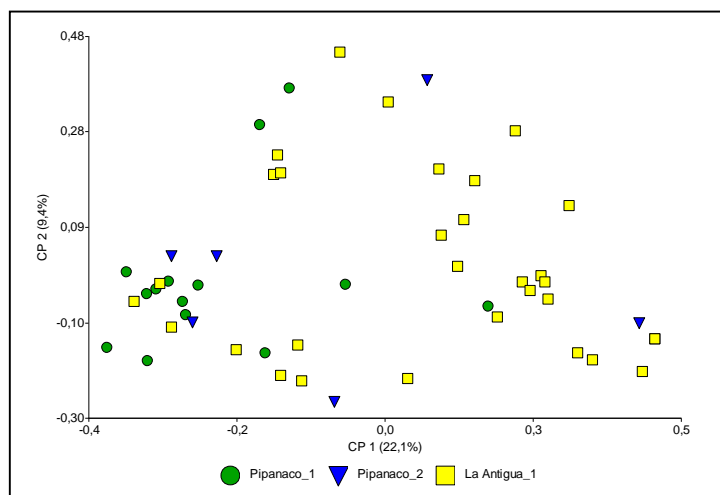


Figura 2. Análisis de Coordenadas principales (ACoP) basado en la matriz binaria generada por UPGMA y coeficiente de Dice de los productos de amplificación rep-PCR (primer BoxA1) de rizobacterias aisladas de nódulos de *P. flexuosa* crecidos en suelos de Pipanaco y La Antigua.

Figure 2. Principal Coordinate Analysis of the rep-PCR (primer BOXA1R) products of rhizobial isolates obtained from *P. flexuosa* nodules grown in La Antigua and Pipanaco soils, based on similarity matrix generated by UPGMA and Dice coefficient.

Aislamientos	Altura (cm)	Largo Raíz (cm)	Nudos con Hojas (N°)	Peso Fresco Aereo (mg)	Peso Fresco Raíces (mg)	Peso seco Aereo (mg)	Peso Seco Raíces (mg)	Nodos/plant (N°)	Peso Nodulo (mg)
27 LaAnt_1	18,5 ± 3,0	20,50 ± 3,3	12,67 ± 1,7	434,33 ± 120,5	370,67 ± 239	188,33 ± 74,0	107,67 ± 46,3	21,17 ± 8,1	43,33 ± 23,7
10 Pip_1	22,60 ± 3,2	20,33 ± 0,5	11,67 ± 4,0	494,00 ± 88,1	250 ± 90,2	199,67 ± 55,2	82,67 ± 18,5	12,7 ± 9	90,33 ± 41,0
13 Pip_1	20,33 ± 1,9	20,50 ± 1,4	12,00 ± 2,3	460,17 ± 150,9	411,00 ± 91,2	199,50 ± 50,2	115,83 ± 33,0	10,67 ± 5,43	73,50 ± 55,6
No_Inoculados	11,62 ± 2,0	19,92 ± 1,8	6,60 ± 1,5	205 ± 40,8	349,25 ± 148,3	82,1 ± 26,5	60,75 ± 25,1	0	0

Tabla 2: Parámetros de crecimiento (Media ± DST) en plantas de *P. flexuosa* (60 d) inoculadas con rizobacterias seleccionadas de La Antigua y Pipanaco.

Table 2. Growth parameters (Mean ± DST) in *P. flexuosa* plants (60 d) inoculated with selected rhizobacteria from La Antigua and Pipanaco

En este trabajo se observó que el nivel de polimorfismos de las rizobacterias nodulantes de *P. flexuosa* disminuye con el aumento de la salinidad, no obstante, algunos microsimbiontes fueron capaces de aportar significativamente al crecimiento por encima del promedio de los aislamientos ensayados, altamente tolerantes a NaCl y más aún en relación plantines sin inocular. Genes específicos de estos aislamientos están siendo secuenciados a fin de determinar su género y especie.

Los datos aportados en este trabajo permiten postular que la simbiosis de *P. flexuosa* con estos aislamientos seleccionados contribuye a la tolerancia en estos ambientes salinos restrictivos y que la inoculación con estos organismos benéficos es una estrategia efectiva para obtener plantas adaptados para su incorporación en estos ambientes, tanto para uso en programas de restauración como en instalaciones productivas con fines diversos.

Agradecimientos

Financiamiento: INTA Prospección y caracterización de microorganismos benéficos (2019-PD-E4-I069); Sub-red de RRG microbianos. SeCyT UNC 411/18

Bibliografía

- Chávez-Díaz, L.; González, P.; Rubio, E.; Melchiorre, M. 2013. Diversity and stress tolerance in rhizobia from Parque Chaqueño region of Argentina nodulating *Prosopis alba*. *M Biol Fert Soil* 49:1153-1165 (doi:10.1007/s00374-013-0814-6).
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Vincent, J.M. 1970. *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. Blackwell, Oxford.

Evidencia citogenética de hibridación entre *Prosopis alba* Griseb. y el complejo *P. hassleri* Harms. - *P. fiebrigii* Harms.

Cytogenetic evidence of hybridization between *Prosopis alba* Griseb. and the *P. hassleri* Harms complex. - *P. fiebrigii* Harms.

Vega, Carmen^{1,2}; Cosacov, Andrea³; Acosta, M. Cristina^{3,4}

¹ Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV-INTA). ² Unidad de Estudios Agropecuarios. INTA-CONICET; ³ Laboratorio de Ecología Evolutiva - Biología Floral, IMBIV (UNC-CONICET) ⁴ Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.

vega.carmen@inta.gob.ar

Resumen

La hibridación interespecífica ha sido ampliamente documentada en *Prosopis*, un género clave del Gran Chaco Americano. Aquí realizamos un estudio citogenético en una zona híbrida de *Prosopis alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* en la provincia de Formosa. Caracterizamos los cariotipos de especies puras y los híbridos putativos utilizando bandeo de fluorescencia. Se identificaron dos citotipos, uno correspondiente a *P. alba* y otro correspondiente a *P. hassleri* y *P. fiebrigii*; los individuos híbridos presentaron citotipos de *P. alba* ó *P. hassleri/fiebrigii*. Todos los morfotipos estudiados presentaron la misma fórmula cariotípica y el mismo número de regiones organizadoras nucleolares. La alta similitud cromosómica entre diferentes especies del género refuerza la idea de una diversificación relativamente reciente de *Prosopis*, lo que permitiría la continua hibridación e introgresión entre las especies.

Palabras clave: algarrobos, bandeo cromosómico, cariotipos, hibridación.

Abstract

Interspecific hybridization has been widely recorded in *Prosopis*, a key genus of the Gran Chaco Americano. Here, we performed a cytogenetic study in a hybrid zone of *Prosopis alba*, *P. hassleri*, and *P. fiebrigii* in Formosa province. We characterized pure species karyotypes and putative hybrids using fluorescence banding. Two cytotypes were identified, one corresponding to *P. alba* and another corresponding to *P. hassleri* and *P. fiebrigii*; the hybrids presented cytotypes of *P. alba* or *P. hassleri/fiebrigii*. All the studied morphotypes presented the same karyotypic formula and the same number of nucleolar organizing regions. The high chromosomal similarity among different species of the genus reinforces the idea of a relatively recent diversification of *Prosopis*, which would allow continuous hybridization and introgression between species.

Keywords: algarrobos trees, chromosome banding, karyotypes, hybridization.

Introducción

La hibridación es un fenómeno común y generalizado en las plantas vasculares y puede dar lugar a un intercambio genético entre especies relacionadas. La hibridación ocurre cuando las barreras reproductivas entre especies son incompletas o débiles (Baack *et al.*, 2015). Estos procesos podrían generar nuevas especies o promover la introgresión de alelos favorecidos selectivamente de una especie a otra (Abbott *et al.*, 2013). *Prosopis* es el componente más importante de los ambientes áridos y semiáridos del sur de América del Sur. La sección Algarobia comprende un complejo taxonómico compuesto por especies que se diversificaron recientemente, adaptadas a diferentes condiciones ambientales, pero con múltiples puntos de contacto. La identificación de muchas especies de este clado suele ser confusa, a veces sin diferencias morfológicas marcadas, siendo frecuentes las formas de transición de una especie a otra (Verga 2014). Amplios trabajos en el género revelan la ocurrencia de híbridos interespecíficos (Palacios y Bravo 1981; Naranjo *et al.*, 1984; Verga 1995; Vega y Hernandez 2005; Joseau *et al.*, 2013; Mottura 2006; Ferreyra *et al.*, 2013; Vega *et al.*, 2020). Interesantemente, Hunziker y colaboradores (1975), realizaron un estudio citogenético en híbridos interespecíficos: *P. vinalillo* (*P. ruscifolia* x *P. alba*), *P. alba* x *P. nigra* y *P. ruscifolia* x *P. hassleri* que contribuyó al conocimiento del aislamiento reproductivo, hibridación y modos de especiación en *Prosopis*. Los

estudios citológicos revelaron igual número cromosómico entre los taxones estudiados y un comportamiento meiótico normal (Hunziker et al., 1975; Naranjo et al. 1984). Así, los autores mostraron gran evidencia de alta homología cromosómica en los híbridos lo que explicaría su fertilidad y la tendencia a la hibridación interespecífica e introgresión en el género. Sin embargo, hasta el momento no se han descrito los cariotipos en ninguna especie del género. Aquí, realizamos un estudio citológico detallado en *P. alba*, *P. hassleri* y *P. fiebrigii* y sus presuntos híbridos, siendo el primer estudio citogenético en el género realizado con bandeos de fluorescencia. Nuestros objetivos fueron describir la distribución de heterocromatina en especies puras, localizar marcadores cromosómicos y analizar las características cromosómicas de sus presuntos híbridos. Presumimos que estas especies comparten una fórmula cariotípica similar que permitiría la hibridación.

Materiales y Métodos

El estudio fue realizado en el noroeste de Formosa. Se seleccionaron tres individuos por morfotipo (*P. alba*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y *P. alba* x *P. hassleri*). En capsulas de Petri, se germinaron un pool de 25 semillas pertenecientes a cinco frutos por cada individuo. Las raíces primarias obtenidas fueron pretratadas con 8-hidroxiquinolina 2 mM durante 3 horas a temperatura ambiente y 3 horas a 4 °C, y luego se fijaron en una mezcla de etanol: ácido acético 3:1 durante un mínimo de 12 h. Los ápices radicales se maceraron con una solución enzimática de celulasa al 2 % (p/v) más pectinasa al 2 % (v/v) a 37 °C durante 2 h y se trituraron en una gota de ácido acético al 45 %; el cubreobjetos se retiró con nitrógeno líquido. El baneo cromosómico fluorescente se realizó mediante la técnica de triple tinción con los fluorocromos cromomicina A3, distamicina A y 4'-6-diamidino-2-fenilindol (CMA/DA/DAPI). La fluorescencia aumentada o reducida de un segmento cromosómico se indica en el texto añadiendo +ó- al fluorocromo, respectivamente. Los cromosomas en metafase y los núcleos en interfase se observaron y fotografiaron usando un microscopio Leica DMLB equipado con los conjuntos de filtros apropiados, y se obtuvieron microfotografías usando una cámara digital Axiocam. Las imágenes digitales se importaron a Photoshop 7.0 (Adobe, San José, CA, EE. UU.) para el pseudocoloreado y el procesamiento final. Se analizaron tres ápices radiculares por morfotipo y se midieron de tres a diez metafases somáticas (Tabla 1).

Se efectuaron mediciones a los cromosomas referidas a la longitud del brazo corto (s), largo (l) y total (c), y largo de banda heterocromática; se calculó en cada caso la media y la desviación estándar, datos con los que se elaboraron los idiogramas respectivos de cada morfotipo analizado (Fig. 1). Según su índice braquial, los cromosomas fueron ubicados dentro de las siguientes categorías: metacéntricos ($r = 1-1,70$) o submetacéntricos ($r = 1,71-3,00$). Además, se calculó el largo total del complemento haploide (LTCH), sumando la medida del largo total de cada par cromosómico, el largo cromosómico promedio (c), el índice braquial medio (r) y la razón entre el cromosoma más largo y el más corto (R). Finalmente, la asimetría de los cariotipos fue estimada usando los índices de asimetría intracromosómica A_1 e intercromosómica A_2 propuestos por Romero Zarco (1986). Cuando A_1 tiende a cero indica que los cromosomas son en su mayoría metacéntricos, y cuando A_2 es próximo a cero, indica que los cromosomas tienen un tamaño similar. Las longitudes de los satélites se agregaron a la longitud de los brazos correspondientes y no se consideraron las longitudes de las constricciones secundarias [regiones organizadoras nucleolares (NOR)]. Los idiogramas se construyeron utilizando los valores medios de cada especie. En los idiogramas, los cromosomas se dispusieron primero en grupos de acuerdo con su relación de brazo creciente (de m a sm) y luego de acuerdo con la longitud decreciente dentro de cada grupo. Los cromosomas con marcadores moleculares (es decir, bandas de heterocromatina) que mostraban una gran similitud se establecieron tentativamente como homólogos. Finalmente, los morfotipos también se categorizaron siguiendo la clasificación de Stebbins (1971).

Resultados y Conclusiones

Todos los taxones analizados presentaron un número somático de $2n = 2x = 28$ y la fórmula cariotípica de $7m + 7sm$ (Tabla 1 y Fig. 1). Los tamaños cromosómicos oscilaron entre 1,93 μm en *P. hassleri* y 0,76 μm en *P. alba*. El LTCH varió entre un mínimo de 14,24 μm , observado en *P. alba*, y un máximo de 17,17 μm , correspondiente a *P. hassleri*. Así, el valor más bajo de c correspondió a *P. alba* (1,02) mientras que *P. hassleri* presentó el valor más alto (1,23) (Tabla 1). En cuanto a la asimetría cariotípica, los valores más bajos para el índice r y A_1 (indicativos de asimetría intracromosómica) se registraron en el morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* (1,57 y 0,29, respectivamente) mientras que los valores más altos (1,63 y 0,31) se observaron en *P. hassleri*. Los índices R y A_2 (indicativos de asimetría intercromosómica), variaron entre 1,51 y 0,13 para *P. fiebrigii*, respectivamente, y 2,03 y 0,18 para *P. hassleri* (Tabla 1). Finalmente, tanto las especies puras como los morfotipos intermedios analizados se clasificaron como 2A según la clasificación de Stebbins.

Todos los individuos examinados presentaron un par de cromosomas con regiones organizadoras nucleolares (NOR) y satélites asociados, todos ubicados en los brazos cortos del primer par cromosómico metacéntrico (Figs. 1 y 2). Los individuos analizados presentaron heterocromatina constitutiva CMA+/DAPI- (cromomicina positiva y DAPI negativa), indicativa de ADN satélite rico en pares de nucleótidos GC. La cantidad de heterocromatina (expresada como porcentaje de la longitud del cariotipo) varió entre los taxones examinados, desde 0,43 en *P. alba* hasta 0,75 en *P. hassleri* (Tabla 1). Las regiones organizadoras nucleolares siempre mostraron bandas heterocromáticas CMA+ DAPI- asociadas, que son terminales en todos los casos (Figs. 2). Adicionalmente se observó una banda CMA+/DAPI- pericentromérica (es decir que ocupa el centrómero y regiones adyacentes de ambos brazos cromosómicos) en 1 o 2 cromosomas submetacéntricos del complemento que diferencia los taxones estudiados. En el caso de *P. hassleri* (Fig. 2 B) y *P. fiebrigii* (Fig. 2 C) siempre se observaron dos cromosomas (par n°13 submetacéntrico) con bandas CMA+/DAPI- pericentroméricas, mientras que en *P. alba* siempre se encontró un sólo cromosoma con 1 banda CMA+/DAPI- pericentromérica (cromosoma n°11 submetacéntrico) (Fig. 2 A). Por último, en el morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* se encontraron tres individuos con un solo cromosoma con banda pericentromérica (Citotipo 1, Fig. 3 A) (32 metafases analizadas) y dos individuos con dos cromosomas con bandas pericentroméricas (Citotipo 2, Fig. 3 B) (24 metafases analizadas).

El número cromosómico $2n=2x=28$ resultó consistente con el número de cromosomas reportados en *Prosopis* para todas las especies estudiadas hasta el momento (revisado en Trenchard et al. 2008). Se confirman los números cromosómicos para *P. alba* y *P. hassleri*, (Hunziker et al.1975; Bukhari 1997b), mientras que los del morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* y de *P. fiebrigii* se informan por primera vez. Además, este es el primer estudio cariotípico detallado en el género realizado con bandeado de fluorescencia.

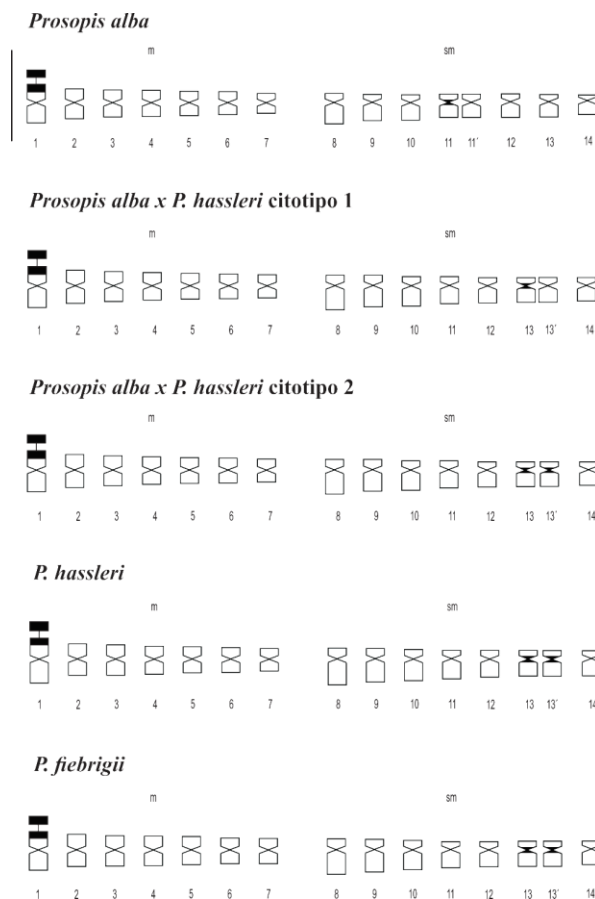


Figura 1. Idiogramas de *P. alba*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* y *P. alba* x *P. hassleri*. Los bloques negros indican la heterocromatina CMA+/DAPI-. En cada idiograma los cromosomas están acomodados en categorías según el índice braquial creciente y, dentro de cada grupo, de acuerdo a su longitud decreciente. La escala vale 4 μ m. m=metacéntrico; sm: submetacéntrico.

Figure 1. Idiograms of *P. alba*, *P. hassleri*, *P. fiebrigii* and *P. alba* x *P. hassleri*. Black blocks indicate CMA+/DAPI- heterochromatin. In each idiogram, the chromosomes are arranged in categories according to the increasing brachial index and, within each group, according to their decreasing length. The scale is 4 μ m. m=metacentric; sm: submetacentric.

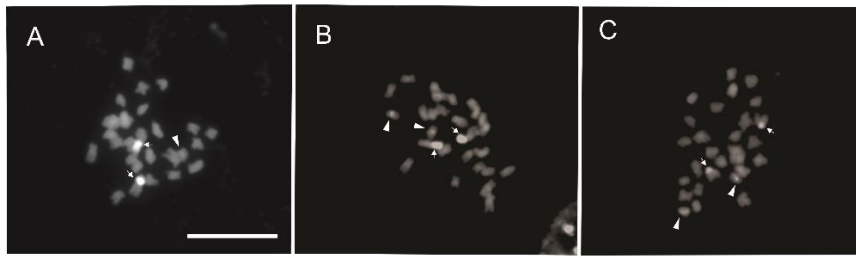


Figura 2. Metafases mitóticas de las tres especies puras ($2n=2x=28$) teñidas con CMA. A) *P. alba* B) *P. hassleri*. C) *P. fiebrigii*. La escala representa 10 μm .

Figure 2. Mitotic metaphases of the three pure species ($2n=2x=28$) stained with CMA. A) *P. alba* B) *P. hassleri* C) *P. fiebrigii*. The scale represents 10 μm .

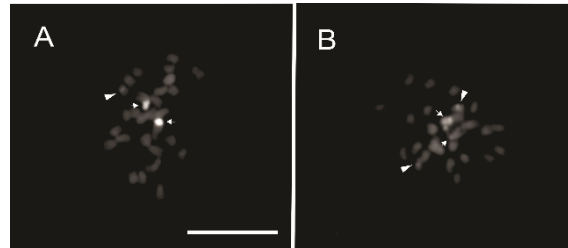


Figura 3. Metafases mitóticas del morfotipo intermedio *P. alba* x *P. hassleri* ($2n=2x=28$) teñidas con CMA. A) *P. alba* x *P. hassleri* Citotipo 1. B) *P. alba* x *P. hassleri* Citotipo 2. La escala representa 10 μm .

Figure 3. Mitotic metaphases of the intermediate morphotype *P. alba* x *P. hassleri* ($2n=2x=28$) stained with CMA. A) *P. alba* x *P. hassleri* Cytotype 1. B) *P. alba* x *P. hassleri* Cytotype 2. The scale represents 10 μm .

Bibliografía

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, Butlin RK, Dieckmann U, Eroukhmanoff F, Grill A, Cahan SH, Hermansen JS, Hewitt G, Hudson AG, Jiggins C, Jones J, Keller B, Marczewski T, Mallet J, Martínez-Rodríguez P, Möst M, Mullen S, Nichols R, Nolte AW, Parisod C, Pfennig K, Rice AM, Ritchie MG, Seifert B, Smadja CM, Stelkens R, Szymura JM, Väinölä R, Wolf JBW, Zinner D (2013) Hybrid and speciation. *J. Evol. Biol.*, 26: 229-246.
- Baack E, Melo MC, Rieseberg LH, Ortiz-Barrientos D (2015) The origins of reproductive isolation in plants. *The New Phytologist* 207: 968–984.
- Bukhari YM (1997b) Nuclear DNA amounts in *Acacia* and *Prosopis* (Mimosaceae) and their evolutionary implications. *Hereditas* 126: 45–51.
- Ferreyra L, Vilardi, J, Verga A, López V, Saidman B (2013) Genetic and morphometric markers are able to differentiate three morphotypes belonging to Section Algarobia of genus *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae). *Plant Syst. Evol.* 299,1157-1173.
- Hunziker JH, Poggio L, Naranjo C, Palacios, RA (1975) Cytogenetics of some species and natural hybrids in *Prosopis* (Leguminosae). *Can. J. Genet. Cytol.*, 17, 253:262.
- Joseau J, Verga A, Díaz M, Julio N (2013) Morphological Diversity of Populations of the Genus *Prosopis* in the Semiárid Chaco of Northern Córdoba and Southern Santiago Del Estero. *Am. J. Plant Sci.* 4 (November): 2092–2111.
- Mottura M (2006) Development of microsatellites in *Prosopis* spp. and their application to study the reproduction system. Dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Forestry Science at the Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology, Georg-August University of Göttingen.
- Naranjo CA.; Poggio L, Enus Zeiger S. 1984. Phenol chromatography, morphology and cytogenetics in three species and natural hybrids of *Prosopis* (Leguminosae-Mimosoideae). *PL Syst. Evol.* 144: 257- 276.
- Palacios R, Bravo L (1981) Hibridación natural en *Prosopis* (Leguminosae) en la región chaqueña argentina. *Evidencias morfológicas y cromatográficas.* *Darwiniana.* 23: 3-35.
- Romero Zarco C. (1986) A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526–53.
- Stebbins, GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. E. Arnold Publ., London.
- Vega C, Teich I, Acosta MC, Lopez Lauenstein D, Verga A, Cosacov A (2020) Morphological and molecular characterization of a hybrid zone between *Prosopis alba* and *P. nigra* in the Chaco region of northwestern Argentina. *Silvae Genet.* 69, 44 – 55.
- Vega M, Hernandez P (2005) Molecular evidence for natural interspecific hybridization in *Prosopis*. *Agrofor Syst* 64:197–202.
- Verga A (1995) Genetic study of *Prosopis chilensis* y *Prosopis flexuosa* (Mimosaceae) in the dry Chaco of Argentina. Tesis Doctoral. Göttingen Research Notes in Forest Genetics. Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen.
- Verga A (2014) Rodales semilleros de *Prosopis* a partir del bosque nativo. *Quebracho* Vol.19(1,2):125-138.

Injerto de púa como procedimiento de propagación vegetativa para preservar poblaciones naturales de *Prosopis alba* Griseb.

Cleft grafting as a vegetative propagation method to preserve natural populations of *Prosopis alba* Griseb.

Carlóni Edgardo¹; Vega Carmen¹; Lopez Lauenstein Diego¹ y Verga Anibal².

¹ Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV) - CIAP – INTA. ² AER La Rioja - Estación Experimental Agropecuaria Chamental – INTA.

carloni.edgardo@inta.gob.ar

Resumen

Prosopis alba es la especie de mayor distribución geográfica del género y componente principal en los bosques del Parque Chaqueño. Los bosques naturales de la especie están siendo explotados sin prestar atención a la conservación. El objetivo del presente trabajo es poner a punto la técnica de injerto como procedimiento de propagación vegetativa para el rescate, la conservación y multiplicación de poblaciones naturales de *P. alba*. El material vegetal consta de árboles adultos de una población de *P. alba* que se encuentra ubicado en la localidad de Campo Duran, Salta. El injerto de púa fue utilizado como método inicial de captura y propagación vegetativa. Los resultados del presente trabajo demuestran que la técnica de injerto ha permitido el rescate, la conservación y multiplicación de *P. alba* de un ambiente natural.

Palabras clave: algarrobo, banco de germoplasma, conservación

Abstract

Prosopis alba is the species with the greatest geographical distribution of the genus and the main component in the Parque Chaqueño forest region. The natural forests of the species are being exploited without paying attention to conservation. The objective of this study is to adjust grafting as a vegetative propagation method for the rescue, conservation and multiplication of natural populations of *P. alba*. The vegetal material consists of adult trees from a population of *P. alba* located in the town of Campo Duran, Salta. Scion grafting was used as the initial method of capture and vegetative propagation. The results of this work show that the grafting technique has allowed the rescue, conservation and multiplication of *P. alba* in a natural environment.

Keywords: algarrobo, germplasm bank, conservation.

Introducción

Prosopis alba, el algarrobo blanco, es la especie de mayor distribución geográfica del género y componente principal en los bosques del Parque Chaqueño. Los bosques naturales de la especie, conocidos como algarrobales, están siendo explotados sin prestar atención a la conservación. Como medida de contrarrestar la pérdida del Recurso Genético Forestal (RGF), a partir de la información obtenida del programa de mejoramiento genético de algarrobo blanco surge la posibilidad de establecer un banco de germoplasma (Verga A. com. pers.), constituido por los individuos adultos que se encuentran en el rodal, con el objetivo rescatar, preservar y conservar estos los RGF de interés (Joseau et al., 2021).

Una herramienta indispensable para poder rescatar a los individuos de sus ambientes naturales es contar con procedimientos que nos permitan propagar vegetativa a la especie (*clonación*). En algarrobos adultos, el rescate *vía* clonal mediante técnicas de propagación vegetativa que implican enraizamiento de estacas o de explantes cultivados *in vitro* presenta cierta dificultad, a diferencia de lo observado de materiales provenientes de un árbol joven (Felker y Clark 1981; Jordan, 1987; Caro et al., 2002). Esta característica es aún más marcada en aquellas especies de *Prosopis* que se comportan como recalcitrantes (Harris, 1992). En *P. alba* se menciona este comportamiento (Felker et al., 2005; Oberschelp y Marcó, 2010), y se encuentra relacionado con el grado de lignificación de los brotes utilizados como esquejes a propagar (de Souza et al., 2021).

El injerto de árboles adultos es una alternativa de propagación vegetativa utilizada como método inicial de rescate *vía* clonal en *Prosopis* sp. (Alban *et al.*, 2002; Felker *et al.*, 2001). La técnica consiste en la capacidad de unir dos fragmentos de tejido vegetal de manera tal que se fusionen, crezcan y se desarrollen como una planta compuesta (Hartmann *et al.*, 2011). La planta injertada queda constituida por el injerto propiamente en sí y por el patrón o porta injerto. El primero va a formar parte de la copa del árbol, siendo este el responsable de mantener las características genéticas de la planta madre que se busca propagar (*clon*). Mientras que el segundo es el sistema radical de la planta, siendo el responsable de conferir vigor y anclaje del árbol. En *Prosopis* sp., de los diferentes tipos de injertos que se mencionan, el de púa es la que mejor funciona. (Wojtusik y Felker, 1993; Felker *et al.*, 2000). El objetivo del presente trabajo es poner a punto la técnica de injerto como procedimiento de propagación vegetativa para el rescate, la conservación y multiplicación de poblaciones naturales de *P. alba*.

Materiales y Métodos

La población de *P. alba* se encuentra ubicada en la localidad de Campo Duran, Salta, constituida en un rodal semillero y certificada como productora de semilla de calidad "Seleccionada". Es una pequeña población de no más de 70 árboles. Los árboles están ubicados en una comunidad originaria de la cultura Chané y forman parte del arbolado semiurbano de la comunidad. No existe información sobre el uso que le daban al algarrobo y actualmente no lo utilizan para alimentación. Sin embargo, podría existir la posibilidad de que se trate de una población de *Prosopis* con cierto grado de domesticación producto de su uso ancestral (Verga A. com. pers.).

La colecta del material vegetal se realizó en cuatro fechas diferentes (Tabla 1). En la primera de ellas, 14 de febrero de 2017, 14 árboles se injertaron en el mismo día de colecta de material vegetal (Fig. 1.a). Además, se trasladó material vegetal (ramas) al IFRGV (Córdoba) donde se realizaron injertos de 7 árboles más. En las otras fechas, las ramas utilizadas para realizar los injertos fueron trasladados al IFRGV (04/03/2017, 06/12/2018 y 20/02/2018). Para el traslado, las ramas de cada árbol se identificaron, se envolvieron en papel de diario y se colocaron dentro de bolsas de *nylon* en conservadoras con hielo. El hielo se colocó sobre cartón para evitar el contacto directo con las ramas.

El injerto de púa fue utilizado como método inicial de captura y propagación del material adulto (Fig. 1.b). Las púas se confeccionaron a partir de ramas con crecimiento del año, constituidas por 3 a 5 nudos. Las plantas utilizadas como patrones se obtuvieron de semillas de algarrobos de la misma población. Para ello, las semillas se sembraron en tubetes y se mantuvieron en vivero durante 4 a 12 meses. Con el objetivo de obtener patrones de mayor diámetro, algunos árboles se trasplantaron en macetas plásticas de 1 litro de capacidad. Los patrones tenían aproximadamente entre 4 a 10 mm de diámetro. Las uniones entre las púas y el patrón se ligaron con *parafilm* y los injertos se cubrieron con bolsa de *nylon* durante 21 días (Fig.1). A los 30 días (aproximadamente) de realizar el injerto se determinó el número y el porcentaje de prendimiento (Fig. 1.c y d).

En cada fecha de colecta de material vegetal se recogieron ramas de entre 21 a 28 árboles adultos, aproximadamente (Tabla 1.). Los árboles injertados que no brotaron o no fueron seleccionados en las fechas anteriores, fueron colectados nuevamente para injertar. Se realizaron entre 6 a 7 injertos por cada árbol seleccionado (tratamiento). El porcentaje de prendimiento de los injertos se analizó mediante tablas de contingencia, cuyos marginales se utilizaron para estimar la independencia de la variable mediante la prueba X^2 con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012). Cabe aclarar que para el análisis correspondiente no se utilizaron los valores obtenidos en la fecha 20/02/2018.

Resultados y Conclusiones

Los resultados demuestran que los injertos realizados a partir de árboles adultos de una población de *P. alba* ubicada en la localidad de Campo Durán tuvieron la capacidad de brotar a los 21 días de realizado el injerto (Fig. 1.e). No obstante, los análisis mediante tablas de contingencias indican que hay diferencias significativas en el porcentaje de prendimiento según la fecha en la que fue realizado el injerto (X^2 , $p < 0,0001$). Por un lado, los porcentajes máximos de prendimiento se observan en el mes de febrero del 2017, cercanos al 60% (Tabla 1). Si bien estos valores se encuentran por debajo de los mencionado para la especie (Wojtusik y Felker, 1993, Ewens *et al.*, 2003), la metodología de trabajo permitió rescatar a 20 individuos adultos de los 21 seleccionados (resultados no mostrados).

Por otro lado, y teniendo en cuenta que la metodología de trabajo, el material y el operador no variaron, es llamativo observar disminuciones en el porcentaje de prendimiento en los meses posteriores a la primera fecha. Una posible explicación puede estar relacionada con la temperatura media de los meses en que se realizó el injerto. Al respecto, los mejores valores de prendimiento se observan en el mes de febrero de 2017 y, estos valores decaen al 1.3% en abril del mismo año. En *Prosopis* sp. se menciona

que la época del año en que se debe realizar el injerto es cuando la rama se encuentra en crecimiento (Wojtusik y Felker, 1993; Alban *et al.*, 2002; Felker *et al.*, 2000). Sin embargo, una de las variables a tener en cuenta es la temperatura ambiente, ya que influye en la formación del callo y en los procesos de cicatrización del injerto (Hartmann *et al.*, 2011). En algarrobos los mejores porcentajes de prendimiento se observan con temperaturas diarias por debajo de los 30°C (Felker *et al.*, 2000), temperaturas por debajo de los 20°C generan una disminución. Por lo tanto, como los injertos realizados en la fecha 4/4/2017 fueron inferiores a las mencionadas como óptimas, es probable que las bajas temperaturas registradas durante el mes de abril hayan afectado el porcentaje de prendimiento.

Tabla 1. Número de árboles injertados, árboles con brotes y porcentaje de prendimiento en injertos de púas realizados para el rescate clonal de una población de *P. alba*.

Table 1. Number of grafted trees, trees with sprouts and percentage of cleft grafting sprouts for the clonal rescue of a population of *P. alba*.

Fecha de colecta	N° de árboles	N° de injertos	N° árboles con brotes	Porcentaje (%) ^(*) ^(**)	T.max. °C	T.med. °C	T.min. °C
14/2/2017	21	132	78	59,09	29	22	16
4/4/2017	22	154	2	1,30	23	16	10
20/2/2018	24	121	0	0,00	30	22	14
6/12/2018	28	115	7	6,09	31	23	16

(*) N° de árboles con brotes*100/N° de injertos; (**) (X^2 , $p < 0,0001$); Temperatura máxima, media y mínima del mes (T.max., T.med. y T.min, respectivamente). (*) No. of trees with sprouts *100/No. of grafts; (**) (X^2 , $p < 0.0001$); Maximum, average and minimum temperature of the month (T.max., T.med. and T.min, respectively).



Figura 1. Injertos de árboles adultos en una población de *P. alba*. a) Selección de ramas para confeccionar las púas para los injertos. b, c y d) Injertos de púa. e, f y g) Brotes de injertos, manutención de los recursos genéticos forestales en invernadero y a campo.

Figure 1. Grafts of adult trees in a population of *P. alba*. a) Selection of branches to make the spikes for the grafts. b, c and d) Cleft grafts. e, f and g) Graft shoots, maintenance of forest genetic resources in the greenhouse and in the field.

En cuanto a las fechas 20/12/2018 y 08/02/2018, las temperaturas medias diarias fueron similares a las registradas en el mes que se observó un 60% de prendimiento. Estos valores sugieren que las temperaturas registradas durante estos meses no son las responsables de la disminución en la eficiencia observada en la técnica del injerto. Por lo tanto, sería de gran utilidad realizar estudios complementarios para comprobar el posible rol de otras variables, como, por ejemplo, las condiciones ambientales de donde se encuentra el árbol previo a realizar el injerto, estado del material vegetal de que se dispone, condición fenológico, condiciones de almacenamiento y traslado del material vegetal, entre otras, que no fueron tenidas en cuenta en el presente estudio y también se mencionan como factores que afectan la correcta unión del injerto (Hartmann *et al.*, 2011).

El presente trabajo demuestra que la técnica de injerto, como procedimiento de propagación vegetativa, ha permitido el rescate, la conservación y multiplicación de *P. alba* de un ambiente natural. En la actualidad, se encuentran 28 árboles *clonados* procedentes de la población de Campo Duran. Los diferentes materiales genéticos se hallan con 2 a 3 réplicas en invernadero y/o umbráculo (Fig. 1.f). Además, cada uno de ellos se encuentra campo en una parcela experimental (Fig. 1.g).

Bibliografía

- Alban, L., Matorel, M., Romero, J., Grados, N., Cruz, G., & Felker, P. (2002). Cloning of elite, multipurpose trees of the *Prosopis juliflora/pallida* complex in Piura, Peru. *Agroforestry systems*, 54(3), 173-182.
- Caro, L. A., Polci, P. A., Lindström, L. I., Echenique, C. V., & Hernandez, L. F. (2002). Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from young and mature plants.
- de Souza, A. V., Cristina, J., Bender, A. G., Reutemann Arnolfo, A. G., Perreta, M. G., Córdoba, M. S., ... & Vegetti, A. C. (2021). Influencia del grado de lignificación de los propágulos de jardín y minijardín clonal en el enraizamiento de estacas y miniestacas de *Prosopis alba* Griseb.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. and Robledo C. W. 2012. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (<http://www.infostat.com.ar>).
- Ewens, M., & Felker, P. (2003). The potential of mini-grafting for large-scale production of *Prosopis alba* clones. *Journal of Arid Environments*, 55(2), 379-387.
- Felker, P., & Clark, P. R. (1981). Rooting of mesquite (*Prosopis*) cuttings. *Journal of Range Management*, 34(6), 466-468.
- Felker, P., Ewens, M., & Ochoa, H. (2000). Environmental influences on grafting success of *Prosopis ruscifolia* (vinal) onto *Prosopis alba* (algarrobo blanco). *Journal of Arid Environments*, 46(4), 433-439.
- Felker, P., Lopez, C., Soulier, C., Ochoa, J., Abdala, R., & Ewens, M. (2001). Genetic evaluation of *Prosopis alba* (algarrobo) in Argentina for cloning elite trees. *Agroforestry Systems*, 53(1), 65-76.
- Felker, P., Medina, D., Soulier, C., Velicce, G., Velarde, M., & Gonzalez, C. (2005). A survey of environmental and biological factors (*Azospirillum spp*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas aurantiaca*) for their influence in rooting cuttings of *Prosopis alba* clones. *Journal of arid environments*, 61(2), 227-247.
- Harris, P. J. (1992). Vegetative propagation of *Prosopis*. In *Prosopis species: aspects of their value, research and development*. Proceedings of the Symposium University of Durham, UK (pp. 175-191).
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., & Geneve, R. L. (2011). *Hartmann & Kester's plant propagation principles and practices* (No. 631.53 H2555p Ej. 1 025385). Prentice Hall.
- Joseau, M. J., Frassoni, J. E., Verzino, G. E., Rodriguez Reartes, S., Verga, A., & Lopez Lauenstein, D. (2021). *Avances en la conservación y obtención de material selecto del Banco Nacional de Germoplasma de Prosopis, Córdoba, Argentina*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral
- Oberschelp, G. P. J., & Marcó, M. A. (2010). Efecto del ácido 3-indolbutírico sobre el enraizamiento adventicio y la altura de plantines clonales de *Prosopis alba* Grisebach. *Quebracho-Revista de Ciencias Forestales*, 18(1-2), 112-119.
- Wojtusik, T., & Felker, P. (1993). Interspecific graft incompatibility in *Prosopis*. *Forest Ecology and Management*, 59(3-4), 329-340.

Potencial actividad antioxidante de extractos de hojas de *Cedrela balansae*, *Toona ciliata* y *Cedrela odorata*.

Potential antioxidant activity of leaf extracts from *Cedrela balansae*, *Toona ciliata* and *Cedrela odorata*.

Grignola, Josefina¹; Bejarano Gabriela²; Marcinkevicius, Karenina¹; Salomón, Virginia¹; Maldonado, Luis¹; Vera, Nancy²

¹ INTA-EEA Famaillá, Ruta 301–Km 32, C.P.:4132 Famaillá, Tucumán; ² Cátedra de Farmacoquímica. FBQF. UNT;
grignola.josefina@correo.inta.gob.ar

Resumen

La familia *Meliaceae*, incluye arboles de un alto valor comercial además de ser prometedoras fuentes de compuestos bioactivos. Basándonos en estudios previos en *Toona ciliata* y *Cedrela odorata*, el objetivo de este trabajo es el de comparar el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y la actividad depuradora de radicales libres de extractos clorofórmicos (EC) y metanólicos (EM) de *C. balansae* (nativa) contra *C. odorata* y *T. ciliata* (exóticas). Se utilizó 50g de polvo de hojas seco y se extrajo primero con cloroformo y posteriormente con metanol. Se concentró y se determinó fenólicos totales, flavonoides y actividad depuradora del radical DPPH. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las especies para fenólicos totales y flavonoides, destacándose los EM de *C. balansae* y *T. ciliata*. Además, todos los extractos presentaron actividad antioxidante, resaltando los EM de *T. ciliata* y *C. balansae*. En este sentido, *C. balansae* podría ser una excelente fuente natural de compuestos antioxidantes.

Palabras clave: *Meliaceae*, actividad antioxidante, flavonoides, fenoles.

Abstract

The *Meliaceae* family includes trees of high commercial value as well as being promising sources of bioactive compounds. Based on previous studies in *Toona ciliata* and *Cedrela odorata*, the goal of this work is to compare the content of total phenolic compounds, flavonoids and the free radical scavenging activity of chloroformic (EC) and methanolic (EM) extracts of *C. balansae* (native) against *C. odorata* and *T. ciliata* (exotic). 50g of dried leaf powder was used and extracted first with chloroform and later with methanol. Total phenolics, flavonoids and DPPH radical scavenger activity were concentrated and determined. Statistically significant differences were obtained between the species for total phenolics and flavonoids, highlighting the EM of *C. balansae* and *T. ciliata*. In addition, all the extracts presented antioxidant activity, highlighting the EM of *T. ciliata* and *C. balansae*. In this sense, *C. balansae* could be an excellent natural source of antioxidant compounds.

Key words: *Meliaceae*, antioxidant activity, flavonoids, phenols.

Introducción

Las plantas, son consideradas como verdaderas fábricas bioquímicas donde se sintetizan los metabolitos necesarios para su supervivencia. Los metabolitos primarios que son comunes a todas las plantas y desempeñan las mismas funciones (aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos) y los **metabolitos secundarios (MS)** que se sintetizan en pequeñas cantidades, ante determinadas situaciones y a menudo su producción está restringida a una determinada familia, género, o incluso a algunas especies de plantas. Son importantes para la supervivencia (contra herbívoros, microorganismos, virus o plantas competidoras) y la aptitud reproductiva de la planta (animales polinizadores o dispersadores de semillas) (Wink, 2003). Dos grandes grupos de MS se destacan por su comprobada actividad biológica, ellos son los compuestos fenólicos y los terpenos, los cuales resultan de mucho interés por tener implicancias favorables a la salud humana (anticancerígeno o protectores cardiovasculares) y tener actividad antioxidante y por lo tanto ser capaces de captar radicales libres y especies reactivas de oxígeno potencialmente dañinas (Taiz & Zeiger, 2010). En este sentido, la familia *Meliaceae* desde hace muchos años vienen siendo investigadas porque a partir de ellas se lograron identificar y aislar diversos MS del grupo de los polifenoles y triterpenos del tipo de los

limonoides. Muchos de ellos con propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas contra diversos patógenos humanos, animales y/o vegetales (Villanueva et al., 2011); insecticidas, reguladores del crecimiento o antialimentarios de insectos (Fang et al., 2011; Taylor, 1984). Además, algunos presentan actividad antipalúdica (Pereira et al., 2014). Por último, se están explorando las posibles propiedades anti-inflamatorias, anti-ulcerosas, digestivas y anticancerígenas de extractos obtenidos a partir de estas plantas (Fu et al., 2020).

La familia *Meliaceae* incluye árboles tropicales y sub-tropicales con especies productoras de maderas valiosas principalmente las especies de los géneros *Cedrela*, *Swietenia* y *Toona* (Pennington & Styles, 1975). Todas ellas han demostrado tener un interesante comportamiento en la producción forestal por su rápido crecimiento, especialmente *Cedrela odorata* y *Toona ciliata*, que más hectáreas de cultivo presentan en América. En el Noroeste de Argentina esta familia de plantas está representado por el género *Cedrela* el cual incluye diferentes especies, una de ellas es *Cedrela balansae* C. DC. (Zapater et al., 2004).

A partir de esto y basándonos en las propiedades antioxidantes reportadas para *C. odorata* y *T. ciliata*, el propósito de este estudio es la comparación de la especie nativa *C. balansae* contra *C. odorata* y *T. ciliata*, en su contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y la actividad depuradora de radicales libres (antioxidante) de extractos clorofórmicos y metanólicos de hojas.

Materiales y métodos

Material vegetal y preparación de los extractos vegetales

Se colectaron foliolos de individuos de *C. balansae* (EEA INTA Famaillá) y de *T. ciliata* y *C. odorata* (FAZ, UNT). Se secaron a 30°C y se trituró hasta obtener un polvillo. A 50g de polvo de hojas se dejó macerando con cloroformo durante 3 días con agitación ocasional a temperatura ambiente. Se filtró al vacío y se efectuaron dos extracciones más. Los extractos obtenidos se reunieron y concentraron a presión reducida a 40°C. El material vegetal recuperado se le realizó otra extracción, pero utilizando metanol. El procedimiento fue el mismo que para el cloroformo. Los extractos se secaron completamente (ES) y se pesaron. Se obtuvieron dos extractos para cada especie un Extracto Clorofórmico (EC seco) y un Extracto Metanólico (EM seco).

Cuantificación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Las mediciones se realizaron por duplicado y los cálculos se basaron en una curva de calibración obtenida con ácido gálico. Los compuestos fenólicos totales se expresaron como µg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/mg de ES.

Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó con el método de tricloruro de aluminio (Lamaison & Carnart, 1991). Las mediciones se realizaron por duplicado y los cálculos se basaron en una curva de calibración obtenida con quercetina. Los resultados son expresados como mg equivalentes a Quercetina/ g de ES.

Determinación de actividad antioxidante. Ensayo de depuración de DPPH

Para medir la actividad antioxidante de los ES se utilizó el método basado en el reactivo DPPH (Brand-Williams et al., 1995). Como control negativo se utilizó etanol 96° y como control positivo una solución de quercetina, de origen natural y BHT (hidroxi tolueno butilado), sintético. Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante (%AA) y la concentración (mg/ml) capaz de depurar el 50% de los radicales libres (CD50%).

Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía, utilizando el software InfoStat (versión 2017.1.2). Además, para determinar si existen diferencias significativas entre las especies se realizó un test de comparación de medias mediante la prueba de comparaciones múltiples DGC con un nivel de significancia del 0,05 (Di Rienzo et al., 2002). Este análisis se realizó para las determinaciones de compuestos fenólicos y flavonoides.

Resultados

Para el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las especies estudiadas (Figura 1 A y B).

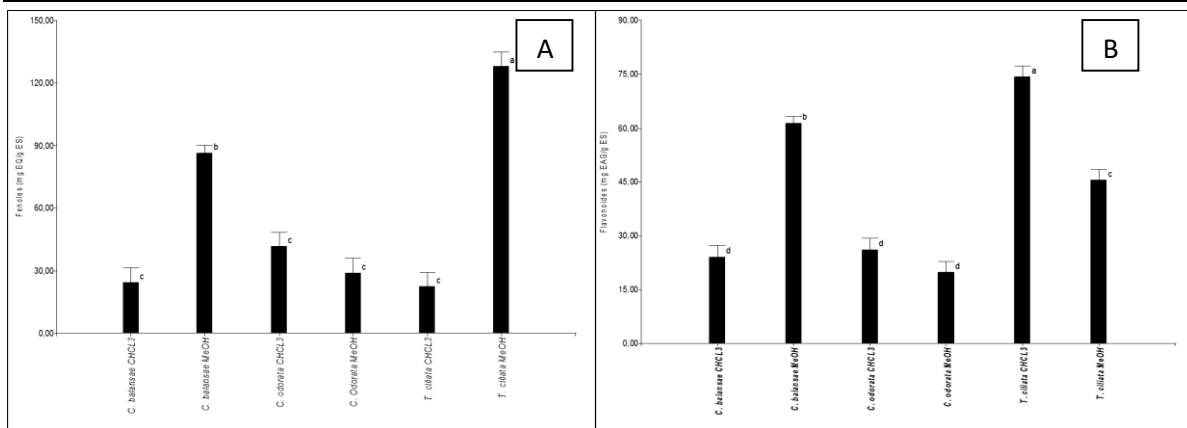


Figura 3: Contenido de compuestos fenólicos totales (A) y Flavonoides (B) para los EC y EM de las diferentes especies estudiadas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Figure 1: Content of total phenolic compounds (A) and Flavonoids (B) for the EC and EM of the different species studied. Means with a common letter are not significantly different ($p>0.05$)

Los EM de *T. ciliata* (128,17 mg EQ/g ES) y *C. balansae* (86,40 mg EQ/g ES) tienen mayor cantidad de compuestos fenólicos totales diferenciándose estadísticamente del resto de los extractos, destacándose el EM de *T. ciliata*. El EC de *T. ciliata* se diferencia estadísticamente del resto de los extractos por tener el mayor contenido de flavonoides (74,33 mg EAG/g ES) y en segundo lugar se encuentran los EM de *C. balansae* (61,46 mg EAG/g ES) y *T. ciliata* (45,49 mg EAG/g ES). Tanto los EC como los EM de la especie *C. odorata* presentaron los menores contenido de compuestos fenólicos totales flavonoides.

Por otro lado, todos los extractos, tanto los clorofórmicos como metanólicos, presentaron actividad depuradora de radicales libres. Sin embargo, se destaca los EM de *T. ciliata* y *C. odorata* por presentar el mayor porcentaje de depuración a menores concentraciones. Para el caso del EM de *T. ciliata* para alcanzar el 50% de depuración se necesita solo 44,18 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados son muchos más prometedores a los reportados por Kavitha and Satish (2013) donde encontraron que los extractos de éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y metanol de hojas de *Toona ciliata* mostraron una actividad significativa de DPPH con un valor CD_{50} de 150, 135,5, 105 y 92,5 $\mu\text{g/ml}$. Estos datos son similares a los que nosotros encontramos para el IC_{50} del EM la especie nativa *C. balansae* cuyo valor fue 128 $\mu\text{g/ml}$.

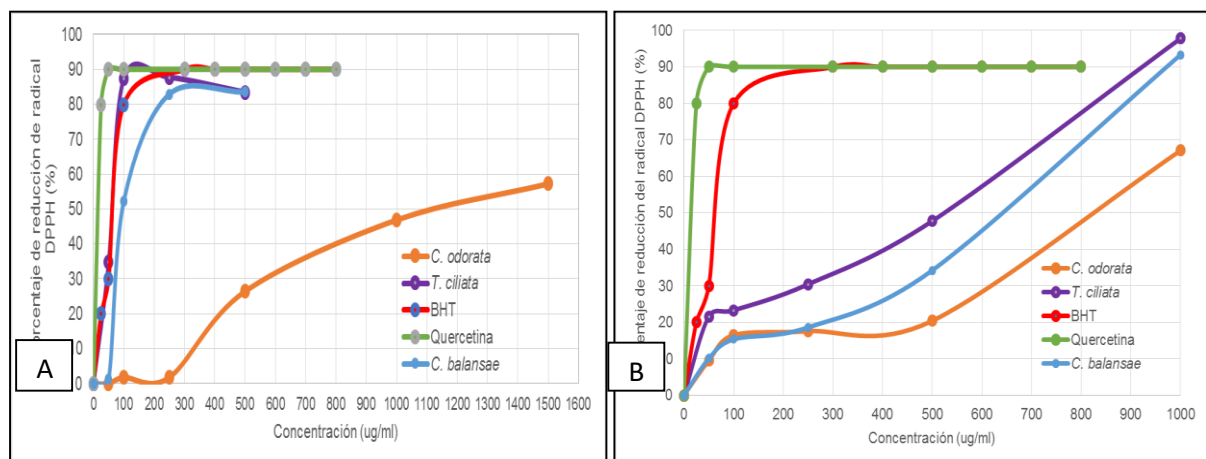


Figura 4: Porcentaje de actividad depuradora de los EM (A) y EC (B) de *C. odorata*, *T. ciliata* y *C. balansae* en función de la concentración

Figure 2: Percentage of purifying activity of EMs (A) and ECs (B) from *C. odorata*, *T. ciliata* and *C. balansae* as a function of concentration

Las curvas de depuración de radicales libres de los EM de *T. ciliata* y *C. odorata* son muy similares a la obtenida para los antioxidantes que se utilizaron como patrones (Quercetina y al BHT) (figura 2A). Ambos son dos antioxidantes muy utilizados en la industria alimenticia y cosmética para conservación

de productos. El EM de *C. odorata* presento la menor actividad depuradora, ya que 1212,5 µg/ml (CD50) son necesarios para depurar el 50% del radical DPPH.

Para los EC se necesitan mayores concentraciones para obtener el CD50% (figura 2B). Los valores para *T. ciliata*, *C. balansa* y *C. odorata* fueron 460, 566 y 801 µg/ml respectivamente. Como se puede ver *C. balansa* presento una concentración intermedia entre *C. odorata* y *T. ciliata*.

Es probable que la actividad depuradora de radicales libres observada en los EC y EM obtenidos de hojas de *C. balansa*, *T. ciliata* y *C. odorata* de deba a la presencia de compuestos fenólicos del tipo de los flavonoides detectados en los mismos.

Conclusiones

Estas especies podrían ser una excelente fuente natural de compuestos antioxidantes que podrían utilizarse en la prevención de enfermedades asociadas a la presencia de radicales libres y especies reactivas no radicalarias que en exceso conducen a un estado de estrés oxidativo provocando daños en moléculas biológicas, membranas y tejidos, llevando a diferentes enfermedades como puede ser cáncer, enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis, alzhéimer, etc. Por estos motivos, el estudio de fuentes vegetales de sustancias antioxidantes, como las especies arbóreas nativas entre las que se encuentra *C. balansa*, coincide con las tendencias actuales que plantean el uso de sustancias antioxidantes de orígenes naturales como una alternativa en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Además, muchos de los compuestos fenólicos poseen actividad antimicrobiana contra fitopatógenos y podrían ser probadas en el manejo de plagas y enfermedades de diferentes cultivos, favoreciendo la sustentabilidad de la producción agrícola. Por lo tanto, estas sustancias orgánicas, que se biosintetizan y acumulan en cantidades suficientes en las plantas, presentan un interesante potencial para ser utilizadas como materia de partida para aplicaciones científicas, tecnológicas y comerciales.

Bibliografía

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Di Rienzo, J. A., Guzman, A. W., & Casanoves, F. (2002). A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 7(2), 129–142.
- Fang, X., Di, Y. T., & Hao, X. J. (2011). The Advances in the Limonoid Chemistry of the *Meliaceae* Family. *Current Organic Chemistry*, 15(9), 1363–1391.
- Fu, Y. H., Xie, Y. T., Guo, J. M., Wang, X. P., Jiang, B., Zhang, W., Qiang, L., Kong, L. Y., & Liu, Y. P. (2020). Limonoids from the Fresh Young Leaves and Buds of *Toona sinensis* and Their Potential Neuroprotective Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(44), 12326–12335.
- Kavitha, K. S., & Satish, S. (2013). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities from *Toona ciliata* Roemer. *Journal of Analytical Science and Technology*, 4(1), 1–7.
- Lamaison, J. L., & Carnat, A. (1991). Teneurs en principaux falvonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. en fonction de la période de végétation. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 25(1), 12–16.
- Pennington, T. D., & Styles, B. T. (1975). A generic monograph of the *Meliaceae*. *Blumea*, 22, 419–540.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3).
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Secondary Metabolites and Plant Defense. In *Plant Physiology* (Vol. 1, pp. 305–308).
- Taylor, D. A. H. (1984). The Chemistry of the Limonoids from *Meliaceae*. In W. Herz, H. Grisebach, & G. Kirby (Eds.), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*.
- Villanueva, H. E., Tuten, J. A., Haber, W. A., & Setzer, W. N. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the bark essential oil of *Cedrela odorata* from Monteverde, Costa Rica Heather. *Der Pharma Chemica*, 2(4), 373–383.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3–19
- Zapater, M. A., del Castillo, E. M., & Pennington, T. D. (2004). El genero *Cedrela* (*Meliaceae*) en la Argentina. *Darwiniana*, 42(1–4), 347–356.

Evaluación al quinto año del primer ensayo en campo de orígenes argentinos de lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser).

Evaluation at the 5th year of the first field trial of Argentine origins of lenga, *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser.

Pastorino, Mario¹; Azpilicueta María Marta¹; Aparicio Alejandro¹; Huentú, Mario¹; Jaque, Fabián¹; Mondino, Víctor²; Schinelli, Teresa².

¹ INTA EEA Bariloche – IFAB (INTA-CONICET); ² INTA EEA Esquel
pastorino.mario@inta.gob.ar

Resumen

En 2017 se instaló un ensayo de 10 orígenes argentinos de lenga en Bariloche, con 3 repeticiones de 9 plantas (N= 270) en DBCA. En 2022 se midió la altura y el diámetro al cuello de cada planta, y se registró la mortalidad. Por medio de modelos lineales mixtos y generalizados se probaron diferencias significativas para las tres variables, utilizando el programa R. La altura media del origen más alto fue de 226,4 cm \pm 70,1 (Cerro Otto, Río Negro), mientras que la supervivencia media general del ensayo fue del 74 %. El ensayo reveló adicionalmente una buena adaptabilidad inicial de algunos orígenes a una altitud de cultivo 400 m inferior a la del hábitat de la especie en sus inmediaciones, lo que se espera confirmar con la evaluación de otros dos ensayos de la red. El próximo paso será poner a prueba en el campo progenies de los mejores orígenes.

Palabras clave: *Nothofagus*, domesticación, restauración.

Abstract

In 2017, a trial of 10 Argentine provenances of lenga was installed in Bariloche, with 3 repetitions of 9 plants (N= 270) in RCBD. In 2022, the height and collar diameter of each plant were measured, and mortality was recorded. By means of mixed and generalized linear models, significant differences were shown for the three variables, using the R program. The average height of the tallest origin was 226.4 \pm 70.1 cm (Cerro Otto, Río Negro), while the overall mean survival of the trial was 74 %. The trial also revealed a good initial adaptability of some origins to a cultivation altitude 400 m lower than that of the species habitat in its vicinity, which is expected to be confirmed with the evaluation of the other two trials of the network. The next step will be to test progenies from the best origins in the field.

Keywords: *Nothofagus*, domestication, restoration.

Introducción

La lenga es una especie forestal latifoliada del emblemático género *Nothofagus* del hemisferio sur, que ocupa más de 1,5 millones de ha del Bosque Andino-Patagónico en Argentina (MAyDS 2020). Es una de las especies más productivas de nuestro país, dando cuenta del 8 % del total anual de los rollizos provenientes de bosques naturales según las estadísticas oficiales para 2018 (MAyDS 2021). Dos tesis doctorales desarrolladas dentro del INTA (y sus consecuentes publicaciones científicas), una con marcadores genéticos (Soliani 2012) y otra con caracteres cuantitativos (Mondino 2014), sentaron las bases genéticas para desarrollar un programa de domesticación de la especie. Más allá de su potencialidad productiva reflejada en el uso de sus masas naturales, la especie ha comenzado a plantarse en escala de paisaje en los últimos diez años para restaurar bosques destruidos por incendios. En Argentina pueden citarse proyectos de restauración con plantación de lenga en las cinco provincias patagónicas: en Tierra del Fuego, Reserva Forestal Lote 93 (110 ha, Parodi & Paredes 2022) y Reserva Corazón de la Isla (53 ha, Loekemeyer et al. 2019); en Santa Cruz, Río Turbio (5 ha, Mattenet et al. 2019); en Chubut, Cholila (2 ha, Gianolini et al. 2022) y Trevelin (50 ha, Mondino, informe interno INTA); en Río Negro, Cerro Otto (20 ha, Pastorino et al. 2018), en Neuquén, Lote 39 CORFONE (2 ha, Calvi, com. pers.), entre otros.

Entre los primeros pasos para la domesticación de una especie está el desarrollo tecnológico de la producción de propágulos a escala industrial. En este sentido, el INTA también ha avanzado en la

viverización de plantines (Schinelli 2012) logrando un protocolo de alta efectividad con fertirriego que permite alcanzar los tamaños adecuados para la plantación en una temporada de 8 meses.

Fuera de algunos ensayos de la especie a pequeña escala (incluso en países europeos, Sondergaard 1997, Mason et al. 2018), el primer ensayo genético de lenga fue plantado en la Reserva Forestal de Coyhaique (Chile) en el año 2000 (Ipinza & Gutierrez 2015). Se pusieron a prueba 111 familias de polinización abierta correspondientes a tres regiones de procedencia chilenas, logrando una supervivencia del 58,5 % y una altura media de 2,14 m a los 11 años de edad, con heredabilidades de $h^2 = 0,18$ y $h^2 = 0,27$ respectivamente.

En el marco del desarrollo de un programa de domesticación de la especie, y con el propósito de evaluar diversos materiales genéticos, recientemente hemos comenzado a ensayar en plantación distintos orígenes de Argentina. En este breve reporte presentamos la primera evaluación.

Materiales y Métodos

El 2015 fue un año de *masting* para la lenga en toda su distribución argentina, que aprovechamos para hacer un muestreo extensivo cosechando semillas de 12 poblaciones naturales desde el sur de Tierra del Fuego hasta el norte de Neuquén, a lo largo de 18 grados latitudinales y más de 2000 km.

Con ese material produjimos plantines en el vivero del Campo Experimental Forestal de Trevelin INTA (CEAFT), con los cuales establecimos una pequeña red de cuatro ensayos, uno de los cuales se perdió por fallas en la protección contra herbivoría. Los tres ensayos hoy vigentes se ubican en 1.- CEAFT (43° 05' 29" S, 71° 32' 21" O; 450 m snm; N= 900; supervivencia año 1= 97 %), 2.- Arroyo del Medio, Bariloche (propiedad privada, 41°13'38.86"S, 71°14'32.85"O; 1060 m snm; N= 480; supervivencia año 2= 51 %), y 3.- EEA Bariloche INTA. Presentamos aquí los resultados del tercer ensayo.

El ensayo fue instalado en la Estación Experimental Agropecuaria Bariloche del INTA (41° 7' 21,17" S, 71°14' 56,95" O; 795 m snm) en junio de 2017 con plantines 1 + 1 (1 año en tubetes en invernáculo con fertirriego y 1 año en cancha de cría a la intemperie). Se ensayaron 10 orígenes de toda la distribución argentina de la especie (Tabla 1). Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados, con tres repeticiones en parcelas de 9 plantas (N= 270). El bloqueo buscó controlar el efecto de una cortina de pinos en el borde NE del ensayo. Se aplicaron cinco riegos puntuales en las canículas (uno por año), y se desmalezó anualmente toda la superficie del ensayo.

En julio de 2022 (a cinco años de la plantación) se midió la altura total (h) y el diámetro al cuello (DAC) de cada planta, y se registró la supervivencia. Para evaluar la significancia de las diferencias entre las medias poblacionales de las dos variables continuas se utilizó el paquete estadístico *lmer.test* del programa R (versión 4.1.0; R Core Team 2021), poniendo a prueba el siguiente modelo lineal mixto:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + B_j + \varepsilon_{ijk}$$

donde μ es la media general, P_i es el efecto fijo de la i -ésima población, B_j es el efecto aleatorio del j -ésimo bloque y ε_{ijk} es el error $NID(0, \sigma^2_\varepsilon)$.

Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se probaron visualmente con los gráficos QQ-plot y de residuales vs. valores ajustados, respectivamente. Para identificar grupos de poblaciones homogéneas se llevaron a cabo tests de comparaciones múltiples LSD de Fisher.

También se analizaron diferencias en supervivencia, por medio de un modelo lineal mixto generalizado de igual expresión simbólica.

Resultados

La altura y DAC promedios de todo el ensayo fueron 191 cm \pm 59 y 36,1 mm \pm 9,4 respectivamente. Asimismo, la supervivencia media general fue del 74 %.

Se probaron diferencias significativas entre los orígenes para las tres variables consideradas ($p < 0,001$; Tabla 1, Fig. 1). Con el test LSD se identificaron grupos homogéneos para las dos variables cuantitativas. Los resultados de las tres variables son mayormente consistentes, de modo que los orígenes con menores crecimientos fueron también los de mayor mortalidad. Se destacan por su mayor crecimiento y supervivencia los orígenes Cerro Otto y Challhuaco (indiferenciados para las tres variables), y en el extremo contrario el origen Lago Azul, con una mortalidad superior al 50 %.

Tabla 1. Orígenes de lenga evaluados: ubicación geográfica, altura media (h) y máxima (h máx), diámetro medio del cuello (DAC) y supervivencia resultantes del ensayo. Desvío estándar entre paréntesis. Letras mayúsculas iguales significan sin diferencias significativas resultantes del test LSD.

Table 1. Evaluated lenga origins: geographic location, mean height (h) and maximum height (h max), mean collar diameter (DAC) and survival resulting from the trial. Standard deviation in parentheses. Same capital letters mean no significant differences resulting from the LSD test.

Población	Latitud S	Long. O	Altitud m snm	h [cm] (SD)	h máx. [cm]	DAC [mm] (SD)	Superv [%]
Epulauquen	36°49'	71° 04'	1500	147,6 (38,2) C	223	35,0 (9,7) CDE	89
Batea Mahuida	38° 50'	71° 06'	1575	174,8 (43,1) BC	275	34,4 (6,7) DE	89
Co. Otto	41° 08'	71° 20'	1200	226,4 (70,1) A	323	40,5 (9,2) AB	81
Co. Challhuaco	41° 14'	71° 17'	1100	222,2 (45,7) A	302	43,7 (6,4) A	89
Huemules	41° 14'	71° 17'	1100	217,8 (54,7) A	323	39,0 (5,5) BC	81
La Hoya	42° 51'	71° 16'	1200	206,9 (50,1) A	286	36,9 (6,6) BCD	74
Trevelin	43° 03'	71° 34'	1100	209,9 (37,4) A	277	33,4 (7,7) DE	70
Lago Guacho	43° 49'	71° 27'	1150	162,2 (42,2) C	225	31,4 (9,4) E	74
Lago Azul	44° 25'	71° 18'	1200	109,3 (38,6) D	214	21,8 (7,5) F	48
Bahía Lapataia	54° 50'	68° 27'	180	201,3 (42,1) AB	266	40,7 (8,9) AB	41

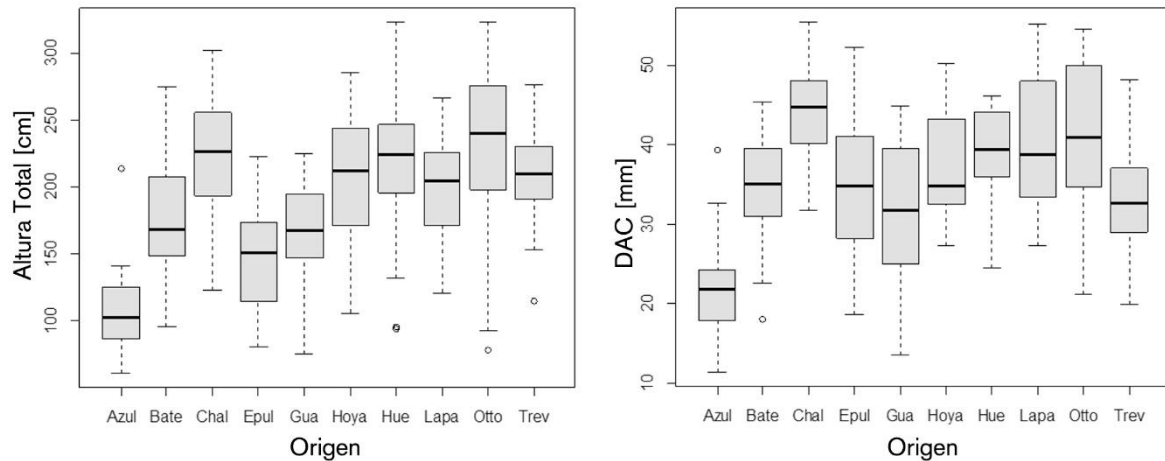


Figura 1. Diagramas de cajas y bigotes para las variables altura y DAC de los orígenes de lenga ensayados.

Figure 1. Box-and-whisker plots for height (Altura Total) and collar diameter (DAC) of the lenga origins assayed.

Conclusiones

Los orígenes de lenga ensayados en Bariloche se diferencian entre sí a los cinco años de plantados, tanto por su nivel de supervivencia como por su crecimiento, con valores medios y absolutos contrastantes (e.g. la altura media del origen más alto duplica la del origen de menor performance, y la supervivencia varía entre orígenes del 41 % al 89 %). Entre los orígenes más destacados tenemos a Cerro Otto, un bosque con excelente accesibilidad, en medio de la ciudad de Bariloche y con buena productividad seminal. Para avanzar hacia propósitos productivos, sería conveniente establecer una prueba de progenies de polinización abierta que incluyera a este origen y otros destacados.

Debe señalarse que la altitud del sitio de ensayo es 400 m inferior a la del hábitat de la lenga en sus inmediaciones, lo cual implica diferencias significativas en temperatura. Esto podría tener como efecto una mortalidad superior a la esperada en plantaciones a su altitud natural, pero también un mayor crecimiento en los individuos supervivientes. La evaluación conjunta con los otros dos ensayos de la red permitirá ser más concluyentes al respecto, pero de manera preliminar vemos evidencias de la posibilidad de cultivar la especie en altitudes más bajas que las de su hábitat natural, en procura de mayores crecimientos.

Bibliografía

- Ipinza R, Gutierrez B (2015) Evaluación genética a los 8 y 11 años de un ensayo de progenies de lenga (*Nothofagus pumilio*) en la Reserva Nacional Coyhaique, Región de Aysén, Chile. In: Gutierrez B, Ipinza R & Barros S (eds.), Conservación de Recursos Genéticos Forestales, principios y práctica. Instituto Forestal, Chile, Santiago, 320 p.
- Loekemeyer N, Méndez AP, Fernandez Marchesi N (2019) Acciones de restauración del bosque quemado en la Reserva Corazón de la Isla, Tierra del Fuego. IV Jornadas Forestales de Patagonia Sur. Ushuaia, 22-26/04/2019.
- Mason B, Jinks R, Savill P, Wilson SMcG (2018) Southern beeches (*Nothofagus* species). Quarterly Journal of Forestry 112: 30-43.
- Mattenet F, Monelos L, Monaco M, Peri PL (2019) Restauración de bosque nativo en la zona de Río Turbio (Santa Cruz): una oportunidad de aprendizaje comunitario. IV Jornadas Forestales de Patagonia Sur. Ushuaia, 22-26/04/2019.
- MAyDS (2020) Segundo Inventario Nacional de Bosques Nativos (INBN2). Informe Región Forestal Bosque Andino Patagónico, segunda revisión. <https://www.argentina.gob.ar/ambiente/bosques/segundo-inventario-nacional-bosques-nativos>.
- MAyDS (2021) Anuario de Estadística Forestal. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2018/11/anuario_de_estadistica_forestal.pdf
- Mondino V (2014) Variación geográfica y genética en caracteres adaptativos iniciales de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser en una zona de alta heterogeneidad ambiental. Tesis Doctoral, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Parodi M & Paredes D (2022) Restauración en bosques de lenga afectados por incendios forestales en Tierra del Fuego. Argentina Forestal. <https://www.argentinaforestal.com/2022/07/09/restauracion-en-bosques-de-lenga-afectados-por-incendios-forestales-en-tierra-del-fuego/?fbclid=IwAR0KcFUQj63zYHuZbBc1olquOIJx-AQVt4nVShq4BmmfCeMCxKlzh1IQEVg>
- Pastorino MJ, Aparicio AG, Azpilicueta MM & Rusch V (2018) Restauración del bosque quemado del C° Otto, Bariloche: un compromiso de hoy con las generaciones futuras. Presencia 70: 14-17.
- R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Schinelli T (2012) Producción de *Nothofagus* bajo condiciones controladas. Ediciones INTA, Esquel, 56 pp
- Soliani C (2012) Estudios filogeográficos en relación con el uso y manejo de dos especies forestales nativas patagónicas. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.
- Sondergaard P (1997) Experiences with *Nothofagus* in West-Norway and East-Denmark. Dansk. Dendrologisk Arsskrift 15: 61-90.

Primeros cultivares de sauces-mimbre obtenidos por mejoramiento genético en Argentina.

First willow cultivars for basket making obtained by genetic improvement in Argentina.

Cerrillo, Teresa

INTA, EEA Delta del Paraná, Buenos Aires
cerrillo.teresa@inta.gob.ar

Resumen

Con el objetivo de ampliar la disponibilidad de cultivares de sauces-mimbre se desarrolló en INTA -EEA Delta una línea de mejoramiento genético, adaptando la experiencia del programa de mejoramiento de sauces arbóreos. Se generó una población de mejora, a través de cruzamientos controlados y selección fenotípica. Al final de cada ciclo vegetativo se midió la altura total y el número de tallos principales de todas las plantas de la población de mejora. Los tallos se cortaron anualmente y se registraron un conjunto de otras variables (supervivencia, forma y flexibilidad de las ramas; tolerancia a plagas y enfermedades y capacidad de rebrote después del corte). Como resultado final, se seleccionaron 5 genotipos; 3 de ellos (Don Patricio INTA, Sarmiento INTA y Marcos Sastre INTA) son híbridos interespecíficos: *S.viminalis* x *S.caprea*, mientras que Ave Fénix INTA y San Martín INTA están originados en el cruzamiento intraespecífico de dos individuos de *S. viminalis*.

Palabras clave: Salix, arbustos, cestería, cruzamientos controlados, selección

Abstract

In order to expand the availability of willow cultivars for basket making a genetic improvement line will be developed at INTA-EEA Delta, adapting the experience of the tree willow breeding program. A breeding population was developed through controlled crosses and phenotypic selection. At the end of each vegetative cycle, the total height and number of main stems of all the plants in the breeding population were measured. The stems were cut annually and a set of other variables were recorded (survival, shape and flexibility of the branches; tolerance to pests and diseases and regrowth capacity after cutting). Finally, 5 genotypes were selected; 3 of them (Don Patricio INTA, Sarmiento INTA and Marcos Sastre INTA) are *S.viminalis* x *S.caprea* interspecific hybrids, while Ave Fénix INTA and San Martín INTA are originated from the intraspecific crossing of two individuals of *S. viminalis*.

Key words: Salix, shrub, basketry, controlled crossings, selection.

Introducción

Parte de los sauces arbustivos (*Salix* spp), comúnmente denominados “sauces-mimbre” o “mimbres”, se caracterizan por su buena aptitud para la elaboración de productos de cestería y muebles livianos. En Argentina los sauces-mimbre se concentran casi exclusivamente en el delta del Río Paraná, donde encuentran condiciones ecológicas muy favorables para su desarrollo. Su cultivo en esta región alcanzó su mayor expansión en la primera mitad del siglo XX, en gran medida a la par de la fruticultura; por diversos factores, ambas declinaron a fines de la década de 1970 (Giraldez, 1992). A inicios del nuevo siglo comenzó a retomar auge como una oportunidad productiva sustentable para la diversificación de los pequeños productores (Álvarez, 2008). Según datos del último censo de productores mimbreros (Olemborg, 2019) la superficie de este cultivo en el Delta se concentra en 126 ha, siendo el 84 % productores de hasta 3 ha. El buen potencial de esta actividad también se apoya en la aptitud como materia prima para una amplia gama de usos, incluidos aquellos que incluyen diseño, lo cual quedó evidenciado en el primer workshop para la exploración del mimbre (CMD, 2005). Una de las necesidades identificadas para el sector es la de incrementar la disponibilidad de material mejorado, que en su mayoría se encuentra centrado en los cultivares tradicionales Macollado Verde y Macollado Amarillo. Para dar respuesta a ello, en la EEA Delta del Paraná del INTA se desarrolló una línea de mejoramiento genético, aplicando las bases metodológicas del programa de sauces arbóreos para la producción maderera. La línea comenzó en 2010 con la generación de una población de mejora, a

través de cruzamientos controlados, seguida por la selección fenotípica en diferentes etapas (Cerrillo, 2016). Como fase final del proceso, en 2021 se seleccionaron cinco genotipos con buenas características de adaptación y productividad.

Materiales y Métodos

Con el objetivo de lograr una población de mejora genética se aplicó una metodología clásica de cruzamientos controlados seguida de selección fenotípica en diferentes etapas (Figura 1) haciendo una adaptación de la experiencia del programa de mejoramiento de sauces para la producción de madera.

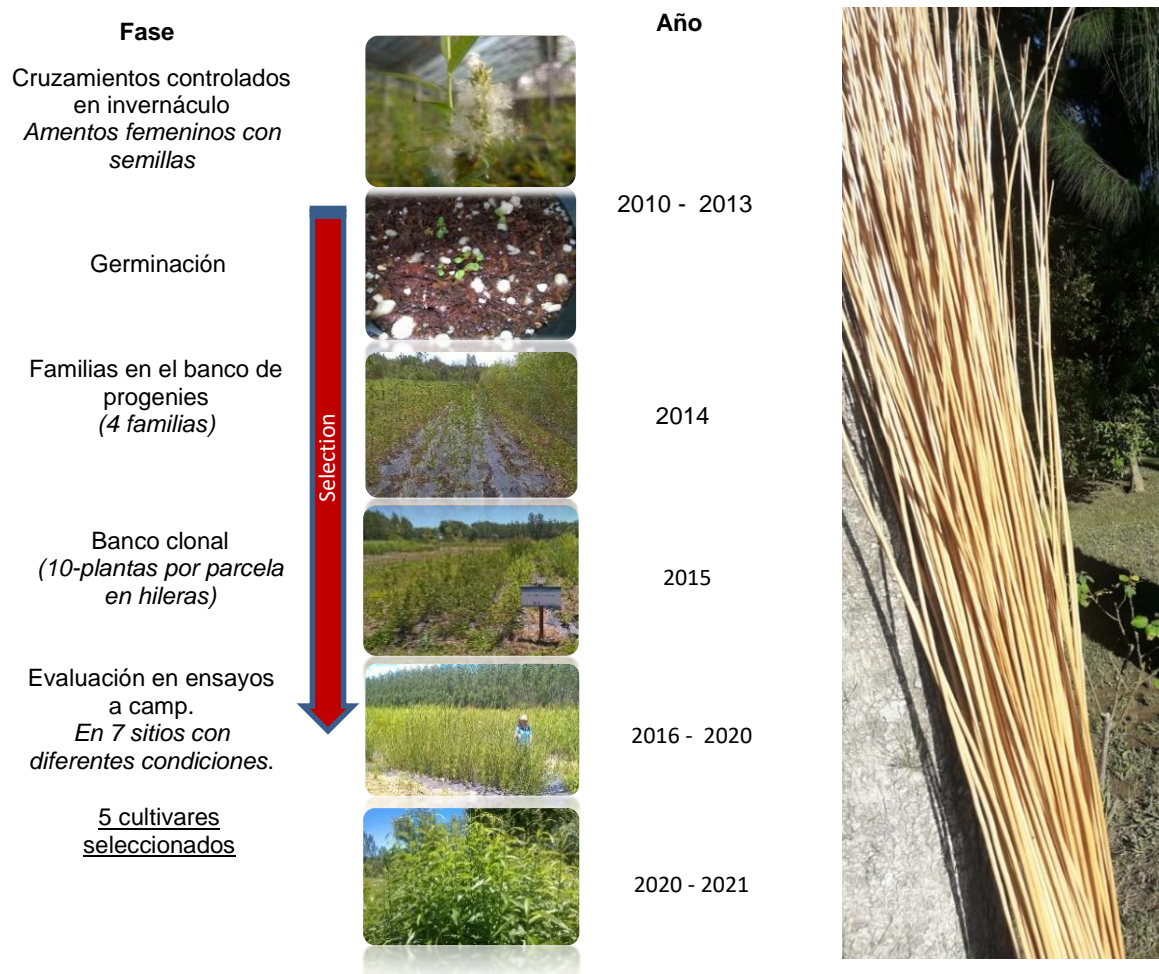


Figura 1: Desarrollo de la metodología aplicada
Figure 1: Development of the applied methodology

Como progenitores se utilizaron genotipos de las especies *Salix viminalis.*, *Salix caprea.*, *Salix triandra* y *Salix fragilis*. Como resultado de los cruzamientos realizados entre 2012 y 2013 se logró una población total para mejoramiento de 187 individuos (Tabla 1).

Al final de cada ciclo vegetativo se midió la altura total y el número de ramas de todas las plantas de la población de mejora. Las ramas se cosecharon anualmente y se registraron un conjunto de otras variables (supervivencia, forma y flexibilidad de las ramas; tolerancia a plagas y enfermedades y capacidad de rebrote después del corte). Sobre la base de esas variables, luego de sucesivas evaluaciones anuales considerando las variables señaladas, en 2016 se preseleccionaron 12 genotipos de las familias V y BL, que fueron establecidos en siete ensayos de campo en diferentes condiciones de disponibilidad de agua. Sobre esos 12 individuos se continuaron realizando registros y análisis de los rasgos de interés antes mencionados, concluyéndose en 2021 con la evaluación final.

Tabla 1. Población inicial de mejora**Table 1.** Initial population of improvement

Familia	Número de genotipos	cruzamiento
V	155	<i>Salix viminalis x Salix caprea</i>
AZ	20	<i>Salix viminalis x Salix viminalis</i>
BL	5	<i>Salix viminalis x Salix viminalis</i>
R	4	<i>Salix viminalis x Salix triandra</i>
N	3	<i>Salix fragilis x Salix viminalis</i>

Resultados y conclusiones

La evaluación final de los 12 genotipos realizada en 2021, dio como resultado un grupo de cinco clones más destacados en las características de crecimiento (Fig.2), supervivencia, adaptabilidad, tolerancia a enfermedades, forma de la planta y flexibilidad de las ramas.

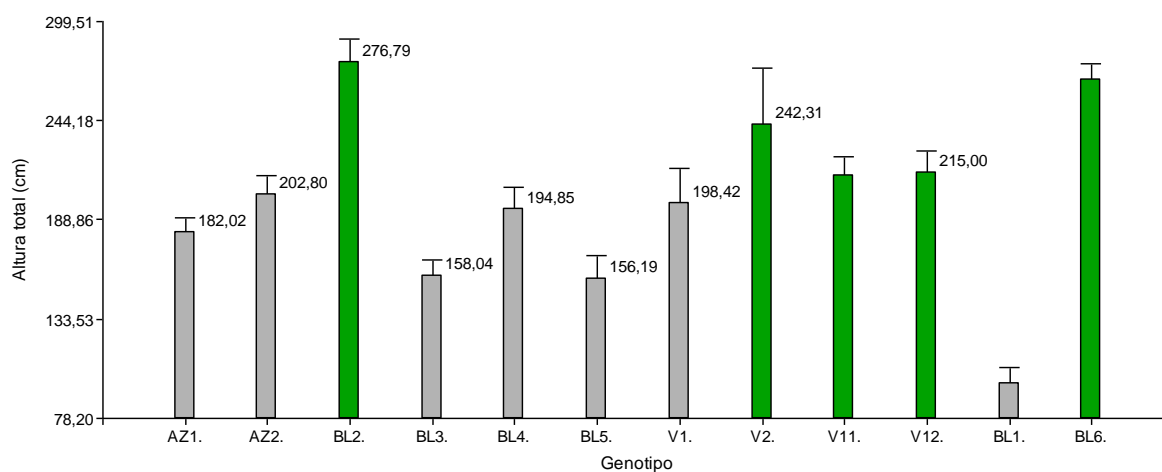


Figura 2. Altura total de los 12 genotipos pre-seleccionados al final del ciclo de crecimiento en tallos de un año de edad (en verde, los cinco selectos).

Figure 2. Total height of the 12 preselected genotypes at the end of the vegetative cycle on 1-year-old stems (in green, the selected five).

En la Tabla 2 se resumen las características principales de los 5 genotipos seleccionados, con sus códigos experimentales y los nombres con los que, una vez completados los descriptores, fueron presentados para la inscripción en el Registro Nacional de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas (INASE). Tres de estos cultivares (Don Patricio INTA, Sarmiento INTA y Marcos Sastre INTA) son híbridos interespecíficos, mientras que Ave Fénix INTA y San Martín INTA están originados en un cruzamiento intraespecífico.

Luego de un proceso de mejora genética que abarcó 10 años se cuenta con 5 genotipos de mimbre adaptados a las condiciones de cultivo en el delta del Paraná y con destacada aptitud para la elaboración de productos que utilizan al mimbre como principal materia prima. En 2020 - 2021 los materiales se comenzaron a testear en unidades más amplias en 8 sitios, en quintas de productores mimbrosos del delta del Paraná. En 2022 las parcelas experimentales se ampliaron a un total de 14 en distintos sitios de la región. Para llevar adelante esa validación a mayor escala en distintos ambientes se aplica la herramienta institucional de Acuerdo de Transferencia (ATM), desarrollada por el Área de Vinculación Tecnológica del INTA. Estos materiales son los primeros sauces-mimbre logrados en Argentina a partir de un programa de mejoramiento específico, que se diseñó adaptando la experiencia del PM de sauces para producción de madera del INTA.

Tabla 2. Características de los 5 genotipos obtenidos a través del proceso de mejora genética.**Table 2.** Characteristics of the 5 genotypes obtained from the genetic improvement process.

Nombre en el RNC del INASE	Código Experimental	Cruzamiento controlado	Sexo	Época de brotación	Época caída de hojas	Flexibilidad de las ramas verdes
Ave Fénix INTA	BL2	<i>S. viminalis</i> "Chileno" x	F	medio	tardía	3
San Martín INTA	BL6	<i>S. viminalis</i> "Amarillo"	F	temprana/ medio	medio/ tardía	3
Don Patricio INTA	V2		M	temprana/ medio	medio	2/3
Marcos Sastre INTA	V11	<i>S. viminalis</i> x <i>S. caprea</i>	F	medio/ tardía	medio/ tardía	3
Sarmiento INTA	V12		F	tardía	tardía	2

Flexibilidad, valoración empírica, considerando el % de ramas (en estado verde) que quiebran al doblarse en un ángulo de más de 360°: **1.** Quiebra más del 25%. **2.** Quiebra hasta el 25% (similar a lo observado en el clon tradicional *Salix viminalis* Macollado Amarillo). **3.** No quiebran y toleran la torsión (similar al clon tradicional *Salix fragilis* "Negro"). En los 5 cultivares seleccionados la flexibilidad se mantuvo luego del proceso de hervido en calderas.

Enfermedades, considerando las principales enfermedades causantes de daños foliares a "antracnosis" (*Marssonina salicicola*) y "roya" (*Melampsora* spp). Para la valoración de daños en hojas se aplicó una escala de seis grados, de Grado 0= sin síntomas ni signos a Grado 5= completamente afectadas, tomándose en consideración el grado más frecuente de cada clon.

Bibliografía

- Álvarez, J.L. (2008). Sustentabilidad de las empresas familiares como base del Desarrollo Local. El caso de las empresas familiares mimbreras del Delta Bonaerense del Río Paraná, luego de la crisis de 2001. Tesis de Maestría de la Universidad de San Martín - 85p. Bs.As.
- Cerrillo, T. (2016). Mejoramiento genético de sauce-mimbre para el Delta del Paraná. Genetic improvement program of basket willows for Delta of Paraná. VII Reunión GeMFO /Juan Adolfo López; Luis Fernando Fornes; compilado por Juan Adolfo López; Luis Fernando Fornes. 1a ed. - Bella Vista: Juan Adolfo López, 2016. Libro digital, DXReader. Archivo Digital: descarga y online ISBN 978-987-42-1792-9
- Centro Metropolitano de Diseño -CMD- Laboratorio de Materiales. (2005). Primer workshop de exploración del mimbre. <https://studylib.es/doc/7271717/descargar---buenos-aires-ciudad>
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2016) InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Giraldez, J. (1992). El mimbre en el Delta del Paraná. INTA, Estación Experimental Agropecuaria Delta del Paraná, Buenos Aires.
- Olemborg, D. J. (2019). Entre los mimbreros, con censo. XI Jornadas Interdisciplinarias de Estudios Agrarios y Agroindustriales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 5-8 noviembre 2019. Web URI: <http://hdl.handle.net/20.500.12123/6678>. ISSN: 1851-3794

Repetibilidad del peso de masa foliar en progenies de polinización abierta de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).

Leaf mass repeatability in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) half-sib progeny trials.

Schoffen, Vanesa Carolina¹; Gauchat, María Elena²; Belaber, Ector Cesar²

¹EAA Cerro Azul, ²EAA Montecarlo

schoffen.vanesa@inta.gob.ar

Resumen

Los objetivos de este trabajo fueron estimar el coeficiente de repetibilidad para el carácter peso de masa foliar (*PMF*) y el número de cosechas necesarias para seleccionar individuos con precisiones entre 80 y 95% en ensayos de progenies de polinización abierta de yerba mate pertenecientes al programa de mejoramiento del INTA. El *PMF* fue evaluado durante tres años consecutivos en 10 ensayos, de los cuales fueron utilizados 6 ya que presentaron una correlación genética alta. Los componentes de varianza se estimaron mediante modelos mixtos utilizando un modelo de medidas repetidas. La repetibilidad estimada fue alta ($>0,6$) en 5 de los 6 ensayos analizados. Estos ensayos requieren en promedio 2, 3 y 6 cosechas para seleccionar con un 80%, 90% y 95% de precisión respectivamente, en cambio, el ensayo que presentó repetibilidades moderadas necesita más años de evaluación en todos los casos para seleccionar con estos niveles de precisión.

Palabras clave: *Ilex paraguariensis*, mejoramiento genético, repetibilidad

Abstract

The objectives of this study were to estimate the repeatability coefficient for leaf mass weight (*PMF*) and the number of harvests necessary to select individuals with accuracies between 80 and 95% in trials of yerba mate open-pollinated progenies from the INTA breeding program. The *PMF* was evaluated for three consecutive years in 10 trials, of which 6 were used because they had a high genetic correlation. Variance components were estimated using mixed models using a model of repeated measurements. Estimated repeatability was high (>0.6) in 5 of the 6 trials analyzed. These tests require on average 2, 3 and 6 harvests to select with 80%, 90% and 95% accuracy respectively, whereas the trial that presented moderate repeatability needs more years of evaluation in all cases to select with these levels of precision.

keywords: *Ilex paraguariensis*, genetic improvement, repeatability

Introducción

En el mejoramiento de plantas perennes la selección puede basarse en mediciones repetidas sobre el mismo individuo a través del tiempo maximizando la eficiencia selectiva (Ferreira *et al.*, 2020). Las medidas repetidas hacen que la variación total se componga de las variaciones entre y dentro de individuos (Roberds y Strom, 2006). El coeficiente de repetibilidad es un parámetro poblacional que mide la capacidad de los organismos de repetir la expresión del carácter a través del tiempo. Este parámetro toma valores entre 0 y 1, 0 indica que la variación total se da dentro los individuos y 1 que dicha variación es entre los individuos (Roberds y Strom, 2006). Considerando el patrón de dos mediciones, Resende (2002) propone la siguiente clasificación para dicho coeficiente: alta repetibilidad ($r > 0,60$); repetibilidad media ($0,30 < r < 0,60$) y repetibilidad baja ($r < 0,30$). Valores altos de repetibilidad indican que es posible predecir el valor real de los individuos con un número relativamente pequeño de mediciones (Cornacchia *et al.*, 1995), lo que indica que habrá poca ganancia en precisión con el aumento del número de evaluaciones (Falconer, 1987). Sin embargo, cuando la repetibilidad es baja, será necesario repetir las evaluaciones para alcanzar un valor de precisión satisfactorio. En la bibliografía existen numerosos estudios de repetibilidad, por ejemplo, en pinus (Roberds y Strom, 2006), caucho (Gonsalves *et al.*, 1990), mango (Costa, 2003), yerba mate (Sturion y Resende 2001), acerola (Lopes *et al.*, 2001), coco (Farias Neto *et al.*, 2003), café (Mistro *et al.*, 2008) y en naranja dulce (Negreiros *et al.*, 2008). Conocer el coeficiente de repetibilidad de las características de interés nos permite evaluar el tiempo y el trabajo necesarios para que la selección de individuos genéticamente

superiores se realice con la precisión deseada por el investigador. Los objetivos de este trabajo fueron estimar el coeficiente de repetibilidad para el carácter peso de masa foliar (PMF) y el número de cosechas necesarias para seleccionar individuos con precisiones entre 80 y 95% en ensayos de progenies de polinización abierta de yerba mate pertenecientes al programa de mejoramiento del INTA.

Materiales y Métodos

El material genético corresponde a 241 familias de polinización abierta implantadas en 10 ensayos entre los años 1990 y 1996 en el Campo Anexo Cuartel Río Victoria perteneciente al INTA Cerro Azul, localizado en San Vicente, Misiones. Utilizando el método de cosecha de rama madura (Burtnik, 2003) se evaluó el carácter PMF de cada planta (kg.pl^{-1}) de los 10 ensayos durante los años 2017, 2018 y 2019. Según Resende (2002) una condición esencial para la estimación de la repetibilidad es que las mediciones repetidas presenten una correlación genética igual o cercana a 1 hecho que confirma que es el mismo carácter de una medición a otra. En consecuencia, este estudio abarcó 6 ensayos cuya correlación genética promedio fue mayor a 0,8 (Schoffen, 2021) quedando fuera de esta evaluación los restantes 4 ensayos. Los componentes de varianza se estimaron mediante la metodología de modelos mixtos REML/BLUP (Patterson y Thompson, 1971) utilizando el software R (R Core Team, 2019). El modelo de medidas repetidas incluyó efectos fijos de réplicas, procedencias, año de cosecha y efectos aleatorios de árbol, parcela y residuo. Las correlaciones entre las medidas repetidas de un mismo individuo no son constantes a través del tiempo. Las covarianzas de las mediciones más cercanas en el tiempo son más similares que las de los tiempos más distantes (Brady *et al.*, 2007). Sin embargo, como en este estudio se basó en tres años consecutivos, el modelo utilizado asumió una correlación constante entre las medidas repetidas de un mismo individuo. La repetibilidad (r) y el número de cosechas necesarias (m) para seleccionar con un determinado nivel de precisión se calcularon según las siguientes ecuaciones (Resende, 2002):

$$r = \frac{\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}_a^2 + \hat{\sigma}_w^2}$$

donde $\hat{\sigma}_a^2$ corresponde a la varianza entre individuos y $\hat{\sigma}_w^2$ la varianza dentro individuos;

$$m = \frac{f(1-r)}{(1-f)r}$$

donde m es el número de mediciones, f es el nivel de precisión utilizado y r es el coeficiente de repetibilidad.

Resultados y Conclusiones

El coeficiente de repetibilidad (r) estimado entre pares de años de cosecha fue alto ($>0,6$) en 5 de los 6 ensayos analizados (YM36, YM37, YM48, YM49 y YM63) para todas las combinaciones de mediciones, excepto en el ensayo YM63 para la combinación C1xC2 que presentó una repetibilidad media ($r = 0,55$). El único ensayo que presentó una repetibilidad media para todas las combinaciones de mediciones utilizadas fue el YM59 (Tabla 1), sobre todo para la combinación C1xC2, el cual probablemente necesitará un mayor número de evaluaciones para alcanzar un valor de precisión satisfactorio.

El nivel adecuado de precisión a ser adoptado depende de la finalidad de la selección, cuando un grupo mayor de individuos es seleccionado para integrar ensayos de progenies, una precisión del 80% sería adecuada (Resende, 2002), ya que con una precisión de esa magnitud habrá ciertos cambios en el ranking de los mejores individuos de una cosecha a otra, pero el grupo de los mejores individuos no debería ser alterado significativamente. En este sentido, para un 80% de precisión de selección, los ensayos YM36, YM37 y YM49 requerirían una cosecha, el ensayo YM48 requeriría de 2 cosechas, el ensayo YM63 entre 2 y 3 cosechas, y el ensayo YM59 requeriría entre 3 y 5 cosechas. Sin embargo, para el establecimiento de un huerto semillero clonal la selección de individuos demandan una precisión próxima al 100% (Resende, 2002).

En base a este estudio, la selección de individuos con un 95% de precisión requeriría 5 cosechas en los ensayos YM36, YM37 y YM49, entre 7 y 8 cosechas en el ensayo YM48, y más de 10 cosechas en los ensayos YM59 y YM63. Si necesitamos seleccionar individuos para huertos y para ensayos, un nivel de precisión del 90% sería adecuado. En este caso, se requerirían 2 cosechas en los ensayos YM36, YM37 y YM49; 4 cosechas en el ensayo YM48, y entre 5 a 7 cosechas en los ensayos YM59 y YM63. Si definiéramos el número de mediciones para todos los ensayos en base a un promedio,

necesitaríamos medirlos 4 veces para asegurarnos este nivel de precisión. En conclusión, los ensayos que presentaron repetibilidades altas, requieren en promedio 2, 3 y 6 cosechas para seleccionar con un 80%, 90% y 95% de precisión respectivamente, en cambio, el ensayo que presentó repetibilidades moderadas necesita más años de evaluación para seleccionar con estos niveles de precisión.

Tabla 1. Coeficiente de repetibilidad (r), número de cosechas necesarias (m) para seleccionar con un 80%, 90% y 95% de precisión (f).

Table 1. Repeatability coefficient (r), number of harvests required (m) to select with 80%, 90% and 95% accuracy (f).

Ensayos	Cosechas	r	$m (f=0,8)$	$m (f=0,9)$	$m (f=0,95)$
YM36	C1xC2	0,82	1	2	4
	C1xC3	0,78	1	3	5
	C2xC3	0,82	1	2	4
	C1xC2xC3	0,81	1	2	5
YM37	C1xC2	0,78	1	3	5
	C1xC3	0,79	1	2	5
	C2xC3	0,81	1	2	5
	C1xC2xC3	0,80	1	2	5
YM48	C1xC2	0,72	2	4	7
	C1xC3	0,69	2	4	8
	C2xC3	0,70	2	4	8
	C1xC2xC3	0,72	2	4	7
YM49	C1xC2	0,84	1	2	4
	C1xC3	0,82	1	2	4
	C2xC3	0,79	1	2	5
	C1xC2xC3	0,82	1	2	4
YM59	C1xC2	0,57	3	7	14
	C1xC3	0,47	5	10	21
	C2xC3	0,56	3	7	14
	C1xC2xC3	0,56	3	7	14
YM63	C1xC2	0,55	3	7	15
	C1xC3	0,66	2	5	10
	C2xC3	0,69	2	4	9
	C1xC2xC3	0,65	2	5	10

C1: PMF evaluado en 2017; C2: PMF evaluado en 2018 y C3: PMF evaluado en 2019

Bibliografía

- Brady T. West, Kathleen B. Welch and Andrzej T. Galecki 2007. *Linear Mixed Models: A Practical Guide Using Statistical Software*. Chapman & Hall/CRC, Taylor & Francis Group, LLC.
- Burtnik OJ. 2003. Manual del pequeño yerbatero correntino, INTA, AER Santo Tomé, Corrientes, Argentina, p, 58.
- Costa JG, Ledo AS, Oliveira MN. 1997. Estimativas de repetibilidade de características de frutos de cupuacuzeiro no estado do Acre, Revista Brasileira de Fruticultura, v,19, n 3, C, 313-318.
- Falconer DS. 1987. Introdução à genética quantitativa. Tradução de Silva MA, & Silva JC, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Imprensa Universitária, 279p.
- Farias Neto JT, Lins MC, Muller AA. 2003. Estimativa dos coeficientes de repetibilidade para producao de fruto e albumen sólido em coqueiro híbrido, pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasilia, DF, v, 38, n, 10, C 1237-1241.
- Ferreira FM, de Carvalho Rocha JRAS, Alves RS. 2020. Estimates of repeatability coefficients and optimum number of measures for genetic selection of *Cynodon sCC*, *Euphytica* **216**, 70.
- Gonsalves CS, Cardoso M, Saes LA, 1990. Estimativas de repetibilidade na selecao de árvores de seringueira, pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasilia, DF, v, 25, n, 7, C, 1031-1038.

