

Estudio de diversidad y estructura genética de procedencias locales de *Eucalyptus sideroxylon* (A.Cunn.ex Woolls) del norte de la provincia de Buenos Aires (Argentina)

Gabriel Rivas¹, Pablo Pathauer², Natalia Aguirre³, Pamela Villalba³, Martín García³, Dino Palazzini⁴, Eduardo Cappa², Cintia Acuña³, Esteban Hopp³, Carolina Martínez³, Susana Marcucci Poltri³

Palabras clave: marcadores SSR, selección, mejoramiento

Introducción

Eucalyptus sideroxylon (A.Cunn. ex Woolls) posee una amplia distribución natural, tolera bien las heladas, sequías y suelos pobres, pudiendo crecer en ambientes con 400 mm de precipitación anual (Boland et al. 1992). Se lo ha introducido en regiones secas de Nueva Zelanda, Chile, México, Estados Unidos, Israel, España y Portugal (Prado et al. 1986, Foroughbakhch et al. 2017) como estrategia ante nuevos escenarios producto del cambio climático.

El duramen de *E. sideroxylon* presenta una madera de Tipo 1 (según Norma AS 5604 2005, Timber - Natural durability ratings, Australia) es decir, muy durable de manera natural (Bush & Walker 2011). Se utiliza para la producción de durmientes, postes y construcciones rurales, marítimas y diferentes tipos de estructuras que se encuentran expuestas a las inclemencias del tiempo.

En nuestro país, la demanda de madera con alta durabilidad natural actualmente es cubierta con especies de lento crecimiento provenientes de bosques nativos. Esto genera problemas de sustentabilidad y pone en riesgo a estas especies nativas. En este contexto, una alternativa para las necesidades de la región es promover el uso de especies durables, de rápido crecimiento, como *E. sideroxylon*. En virtud de ello, INTA ha iniciado un programa de mejoramiento genético de esta especie que incluye materiales salvajes de su zona de distribución natural, materiales mejorados de otros programas y familias locales obtenidas a partir de selecciones fenotípicas en rodales ubicados en distintas regiones del país. Siendo la información de estos rodales locales, escasa, se necesita conocer la diversidad genética del material de partida. En ese sentido, los

marcadores moleculares tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*, Repeticiones de Secuencias Simples) o Microsatélites son herramientas muy útiles para este fin. Con el objetivo de estudiar la diversidad genética de estas poblaciones se evaluaron dos ensayos de progenies locales, instalados en la Provincia de Buenos Aires (Argentina).

Materiales y Métodos

Se seleccionó un conjunto de 78 individuos pertenecientes a un ensayo de campo ubicado en la localidad de Jáuregui, partido de Luján (34°36'32''S; 59°12'03''O), integrado por progenies provenientes de semillas de Villa Bosch (Tres de Febrero) y de Del Valle (25 de Mayo). Se obtuvo ADN genómico total a partir de hojas jóvenes previamente liofilizadas mediante la utilización del método CTAB (Doyle & Doyle 1987), con modificaciones. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1%, para establecer su calidad y cantidad. Para el análisis genómico se utilizaron 24 marcadores SSR desarrollados en *E. grandis* (Brondani et al. 2006) y *E. globulus* (Acuña et al. 2020) marcados fluorescentemente. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en formato multiplexado mediante el kit comercial *Type-it* (Qiagen). Todos los productos de PCR se diluyeron 20 veces y se resolvieron mediante electroforesis capilar en secuenciador automático (ABI 3500). Los tamaños alélicos fueron asignados mediante el programa Genemapper 4.0 (Applied Biosystems). Como estimadores de la diversidad genética se calcularon para la población total y las dos subpoblaciones principales, los siguientes parámetros: número medio por marcador (Na), heterocigosis observada (Ho), heterocigosis esperada insesgada (uHe) y distancia genética promedio (GDP) entre pares de individuos, usando GENALEX 6.5 (Peakall & Smouse 2012). Para el aná-

1 Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), UEDD INTA-CONICET, Argentina. Contacto: rivas.juan@inta.gob.ar.
 2 Instituto de Recursos Biológicos, INTA, Argentina.
 3 Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), UEDD INTA-CONICET, Argentina.
 4 Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP, Argentina.

lisis de diferenciación se estimó el valor FST (Weir & Goudet 2017) (paquete *hierfstat*, R). Finalmente, para el análisis de la estructura poblacional se utilizó el enfoque de agrupamiento bayesiano, asumiendo un modelo de mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas mediante el programa *Structure 2.3.4* (Pritchard 2010) (“*burn-in*” de 500 mil y 1 millón de post- “*burn in*”). Para definir el número más probable de grupos genéticos se aplicó el modelo desarrollado por Evanno et al. (2005). Se consideró la pertenencia a un grupo genético cuando la probabilidad fue mayor a 0,6.

Resultados

Para el conjunto completo de individuos, los 24 marcadores mostraron 174 alelos diferentes con un alto número promedio de alelos por marcador ($N_a = 7,25$) y un nivel moderado de uHe . El número total de alelos fue de 149 y 159, con valores promedio por marcador N_a de 6,63 y 6,21 para cada una de las subpoblaciones de Villa Bosch y de Del Valle, respectivamente. Ambas subpoblaciones presentaron niveles similares de diversidad genética (Tabla 1).

Tabla 1. Valores medios de estadísticos descriptivos para el conjunto de individuos y ambas subpoblaciones. N = tamaño muestral promedio; N_a = número promedio de alelos; H_o = heterocigosis observada; uHe = heterocigosis esperada insesgada. Desvío estándar en paréntesis

	N	N_a	H_o	uHe
Total	76,21 (0,62)	7,25 (0,73)	0,62 (0,05)	0,66 (0,04)
Villa Bosch	33,21 (0,63)	6,63 (0,66)	0,59 (0,06)	0,66 (0,04)
Del Valle	43,00 (0)	6,21 (0,57)	0,64 (0,06)	0,67 (0,04)

El análisis de diferenciación reveló que la variación entre subpoblaciones constituye el 3,2% de la diferenciación total, siendo ésta de grado moderado (Nybom et. al 2004) pero significativa ($F_{ST} = 0,032$; intervalo de confianza al 95% = 0,022-0,042). El cálculo de la GDP mostró que la subpoblación proveniente de semillas de Villa Bosch fue más diversa que la subpoblación proveniente de semillas de Del Valle (0,344 y 0,313 respectivamente).

El análisis de agrupamiento bayesiano a partir de los 78 individuos mostró al valor $K=3$ (Figura 1) como el valor más probable de grupos genéticos, asignando al 95% de los individuos de forma inequívoca a un grupo genético. El 5% de individuos restantes mostró altos niveles de mezcla genética.

La composición del grupo genético 1 (color rojo) mostró un 75% de individuos provenientes de Villa Bosch y 25% de Del Valle. El grupo genético 2 (color

azul) un 85% de Villa Bosch y un 15% de Del Valle. Mientras que, el grupo genético 3 (color verde) estuvo compuesto 100% por individuos de Del Valle.

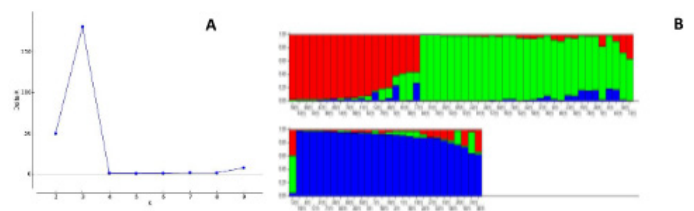


Figura 1. Estimación del número de grupos genéticos en una muestra de *E. sideroxylon* sin información de clasificación a priori. A: Número de grupos genéticos más probables. B: asignación de los individuos a cada grupo genético, colores diferentes muestran grupos genéticos diferentes.

Al realizar el análisis por separado para cada subpoblación se evidenció la existencia de diferentes grupos genéticos dentro de las mismas.

Para los individuos provenientes de Del Valle el análisis mostró $K=2$ (Figura 2) asignando de forma muy clara al 95,5% de los individuos a uno de los grupos genéticos, mientras que los restantes individuos presentan un genoma con alta mezcla.

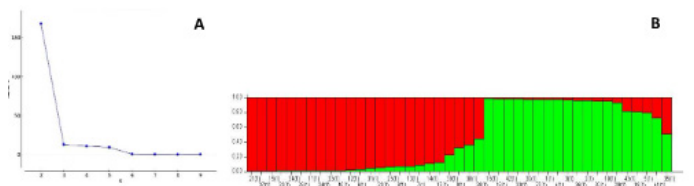


Figura 2. Estimación del número de grupos genéticos presentes en la subpoblación de *E. sideroxylon* (Del Valle) sin información de clasificación a priori. A: Número de grupos genéticos más probables. B: asignación de los individuos a cada grupo genético, colores diferentes muestran grupos genéticos diferentes.

La subpoblación de *E. sideroxylon* de procedencia Villa Bosch mostró mayor diversidad, formada por $K=4$ (Figura 3) grupos genéticos diferentes, Asimismo, el análisis asignó al 83% de los individuos dentro algún grupo, mostrando un mayor porcentaje de individuos con alto grados de mezcla genética.

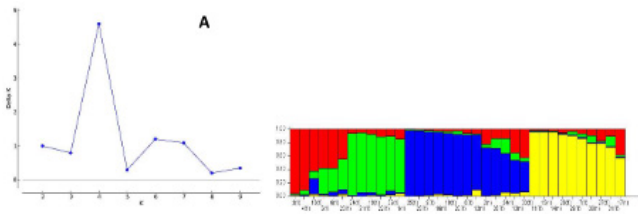


Figura 3. Estimación del número de grupos genéticos presentes en la subpoblación de *E. sideroxylon* (Villa Bosch) sin información de clasificación a priori. A: Número de grupos genéticos más probables. B: asignación de los individuos a cada grupo genético, colores diferentes muestran grupos genéticos diferentes.

Discusión

El análisis de diversidad mostró la existencia de niveles altos a moderados de N_a y u_{He} para la población completa y para las subpoblaciones de *E. sideroxylon* de ambas procedencias.

La subestructuración observada en las semillas implantadas en Jáuregui sugiere que las bases genéticas provienen de distintas procedencias/orígenes geográficos y/o distinto grado de selección.

Conclusión

La existencia de diversidad y diferenciación genética en los materiales estudiados es un insumo valioso para la selección de germoplasma dirigido al desarrollo del programa de mejoramiento de *E. sideroxylon*. El mismo apuntará a generar madera de alta durabilidad disminuyendo indirectamente la presión que ocurre sobre los bosques nativos.

Bibliografía Citada

Acuña CV, Rivas JG, Aguirre NC, Villalba PV, Martínez MC, et al. 2020. New validated Eucalyptus SSR markers located in candidate genes involved in growth and plant development. *Forest Systems* 29(3): eSC08-eSC08.

Brondani RP, Williams ER, 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.

Bush D, Walker J. 2011. Selecting and breeding eucalypts for natural durability. In: John Walker, editor/s. *Developing a Eucalypt resource – learning from Australia and elsewhere*; 3-4 November 2011; Blenheim New Zealand. Christchurch, New Zealand: University of Canterbury; 125-136.

- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Foroughbakhch R, Carrillo-Parra A, Hernández-Piñero J, Guzmán-Lucio M. 2017. Growth and yield of an eucalyptus subtropical plantation in a Northeastern Mexico degraded land soil. *Madera y Bosques* 23(3): 71-85.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13(5): 1143-1155.
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Prado J, Aguirre S, Barros S, Barros D, Rojas P, Wrann J. 1986. *Especies forestales exóticas de interés económico para Chile*. Editorial INFOR: CORFO. Chile. <https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/1293>
- Pritchard J. 2010. Documentation for structure software: Version 2.3. pritchardlab.stanford.edu/structure_software/release_versions/v2.3.4/structure_doc.pdf
- Weir BS, Goudet J. 2017. A unified characterization of population structure and relatedness. *Genetics* 206(4): 2085-2103.