



**SEMINARIO**

**AVANCES EN PROPAGACIÓN  
VEGETATIVA PARA EL GÉNERO  
EUCALYPTUS**

**22 de Setiembre de 2005**

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
- PROPAGACION VEGETATIVA DE <i>Eucalyptus grandis</i> .....	1
Ing. Agr. María Isabel Trujillo	
- OTRAS ACTIVIDADES VINCULADAS A LA PROPAGACION VEGETATIVA	
Evaluación del daño por frío mediante la técnica de conductividad relativa .....	11
María Isabel Trujillo	
Micropropagación de <i>Eucalyptus grandis</i> a partir de plántulas recién germinadas .....	13
María Isabel Trujillo	
Acuerdo de trabajo para la micropropagación de los clones de <i>Eucalyptus grandis</i> .....	14
María Isabel Trujillo	
Fingerprinting de los clones INIAFOR .....	14
Jorge Lemos	
- EL ENFOQUE GENÓMICO Y LAS ESTRATEGIAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE GENES EN <i>Eucalyptus grandis</i> : ¿EXISTEN OPORTUNIDADES PARA LA INVESTIGACIÓN EN URUGUAY? .....	19
Ing. Agr. Fabian Capdeville	

## PROPAGACION VEGETATIVA DE *Eucalyptus grandis*

María Isabel Trujillo<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

La importancia de la propagación vegetativa en los programas de mejoramiento genético y a nivel operativo avanza día a día a la luz de los buenos resultados obtenidos en plantaciones clonales comerciales.

La propagación vegetativa de individuos genéticamente seleccionados permite multiplicar exactamente todas las características de interés por las que son seleccionados. Si las técnicas de propagación son las adecuadas para permitir la producción de plantas a escala comercial, se logran plantaciones genéticamente superiores y con un grado de uniformidad que facilita y mejora todas las actividades de manejo y explotación.

El proceso de clonación involucra varias etapas hasta llegar a su utilización comercial; envuelve una fase de selección de individuos en el campo, rescate de genotipos selectos, producción de plantas clonales, evaluación mediante test clonal, plantaciones piloto y multiplicación comercial (Couto *et al*, 2004). El Programa Nacional Forestal de INIA esta llevando adelante este proceso desde 1992 habiendo logrado hasta la fecha estandarizar protocolos, liberar al mercado clones y mantener bancos de germoplasmas.

En este reporte se resumen las metodologías y resultados obtenidos para las diferentes etapas del proceso.

### SELECCIÓN FENOTÍPICA DE ÁRBOLES PLUS

Para la especie *Eucalyptus grandis* la primera selección de árboles plus se realizó en 1992 con la finalidad de incorporar al Programa de Mejoramiento Genético genotipos con cierta adaptación local. En esta oportunidad se trabajó en conjunto con la Facultad de Agronomía (Proyecto FPTA) y se seleccionaron 196 ejemplares. Los criterios de selección consistieron en superioridad volumétrica y características de forma y sanidad

Con semilla procedente de estos árboles plus y con accesiones procedentes de Australia se instalaron la Población Genética Base y una red de pruebas de progenie abarcando las zonas de prioridad forestal.

En el año 2000 se realiza la segunda selección de árboles plus para la especie, evaluándose y seleccionándose árboles en todas las pruebas de progenie. En esta oportunidad se seleccionan 521 árboles plus evaluándose además de los criterios anteriores, características de la madera como la densidad y tensiones de crecimiento. (De Mello *et al*. 2002).

### RESCATE DE GENOTIPOS SELECTOS

Una vez seleccionado los ejemplares en el campo, estos deben ser propagados vegetativamente con la finalidad de incorporar la totalidad de su información genética a los programas de mejoramiento y de liberar al mercado dicho material selecto. Para la propagación vegetativa se llevan adelante técnicas de macro y micropropagación.

#### Rescate de genotipos selectos mediante macropropagación

Dentro del término macropropagación se agrupan las técnicas de estacas, injertos y acodos. En todas ellas se parte de un segmento relativamente grande de material vegetativo del árbol seleccionado y se lo induce a enraizar o se le acopla el sistema radicular de otra planta.

En los años 2000 y 2001 se trabajo con la técnica de injerto lográndose injertar 182 árboles seleccionados,

<sup>1</sup>Ing. Agr. - Programa Nacional Forestal INIA Tacuarembó

lográndose un porcentaje de prendimiento del 94 % (De Mello *et al.* 2002).

Estos injertos se instalaron en la Estación Experimental del Norte y constituyen uno de los bancos de germoplasma del Programa Nacional Forestal. A su vez se utilizan como fuente de material para realizar introducciones *in vitro* y micropropagar dichos materiales.

A partir del año 2002 se decide trabajar con la técnica de estaca para el rescate de los genotipos selectos, lo que implica el tronchado de árboles para provocar el rebrote de material juvenil. Como al tronchar los árboles se corre el riesgo de perder las cepas se decide comenzar a tronchar aquellos que presenten alguna réplica en buen estado lograda por el método de injerto.

Debido a limitantes operativas y de personal se decide tronchar pocos árboles por vez, tratando de extremar los cuidados de las cepas a evaluar.

En primer lugar se procede a la verificación de la superioridad de los árboles seleccionados y luego a fines del mes de agosto se realiza el tronchado de los árboles. En el momento del tronchado se miden indicadores volumétricos del árbol, se troza en medidas estándar para el aserrado y se sacan discos a diferentes alturas para los cálculos de densidad y de porcentaje de corteza. Con las trozas aserrables se cortan tablonces de medidas convencionales y se analiza el porcentaje de rajado para el secado natural.

Los cuidados posteriores de la cepa consisten en: cercado con alambre de púa para impedir el daño por ganado, fertilización (100 gr de triple 15) y control periódico de hormigas cortadoras hasta el momento en que se cosechan los rebrotes.

Cuando los rebrotes de cepa alcanzan un grado de rustificación suficiente (aproximadamente a los 3 meses) se cosechan para realizar las estacas. La colecta del material se efectúa en las primeras horas de la mañana y las estacas se cortan en el campo, sumergiéndolas inmediatamente en agua para disminuir las pérdidas por evaporación durante el transporte.

Las estacas consisten en segmentos nodales de 6 a 8 cm de largo, con 2 o 4 yemas axilares y con la lámina foliar seccionada a la mitad transversalmente para reducir el área de transpiración. Cada estaca debidamente identificada es estaqueada en bandejas con sustrato. El sustrato consiste en 50% de corteza de pino compostada y 50 % cascara de arroz quemada. Las estacas se mantienen en invernáculo bajo riego por aspersión y temperaturas que promedian entre los 25°C y 35°C

Al cabo de dos meses se evalúa el porcentaje de estacas con raíz.

## **Resultados y discusión**

A partir del mes de efectuado el tronchado comienzan a apreciarse los primeros signos de rebrotes. Según la bibliografía la capacidad de rebrotar así como la cantidad y vigor de los rebrotes varía con el genotipo, época del año, luminosidad y fertilidad del árbol plus.

En el siguiente cuadro se aprecian los códigos de los árboles tronchados, la presencia o no de rebrote, la cantidad y el vigor de los mismos

Cuadro N° 1: Caracterización de los rebrotes

Código	Rebrotos	Cantidad*	Vigor*
27102	Si	Escaso	Vigoroso
27120	Si	Abundante	Vigoroso
27138	Si	Abundante	Poco Vigoroso
2785	No		
27100	Si	Escaso	Poco Vigoroso
27196	Si	Muy escaso	Poco Vigoroso
27127	No		
2425	No		
2416	No		
2470	No		
2116	Si	Abundante	Vigoroso
2114	Si	Abundante	Poco vigorosos
2133	Si	Escaso	Poco vigorosos
218	Si	Muy escaso	Poco vigorosos
1312	Si	Muy escaso	Poco vigorosos
135	No		
139	No		

- Se definió como abundante cuando la cepa rebrotó en más de dos sitios, escaso cuando rebrotó en dos y muy escaso cuando rebrotó en solo uno.
- El término vigor hace referencia a la apariencia en cuanto a grosor y consistencia de los rebrotes.

Del cuadro se concluye que del total de árboles tronchados un 40 % no rebrotó y a su vez de los que rebrotaron solo un 20 % presentaron rebrotes abundantes y vigorosos. Estos porcentajes se consideran bajos si nos referimos a talas rasas, pero como en este caso solo se troncha el árbol seleccionado se concluyó que el factor limitante era la poca incidencia de luz.

Además de esta limitante debe mencionarse los problemas de ramoneo por parte del ganado y ataques de hormigas que afectaron los rebrotes de cepas.

De todas las cepas que rebrotaron se cosechó material para hacer estacas variando la cantidad y el vigor de las mismas según las características del rebrote.

A continuación se presenta el cuadro con la cantidad de estacas cosechadas y enraizadas.

Cuadro N° 2: Estacas cosechadas y % de enraizamiento

Código	Estacas cosechadas	Estacas enraizadas	% de enraizamiento
27102	13	3	23
27120	80	45	56
27138	50	3	6
27100	20	0	0
27196	7	0	0
2116	30	13	43
2114	31	10	32
2133	6	3	50
218	5	2	40
1312	1	1	100

De los dos cuadros anteriores se concluye que la cantidad y el estado de los rebrotes son importantes determinantes de la cantidad de estacas enraizadas a obtener. En términos generales aquellos rebrotes con tallos finos y entrenudos largos caracterizados como de poco vigorosos sufren importantes problemas de deshidratación no llegando la mayoría de ellos a emitir raíces. Cuando los rebrotes eran vigorosos el factor limitante para el enraizamiento podría ser genético o de condiciones ambientales no adecuadas.

#### Rescate de genotipos selectos mediante micropropagación

El término micropropagación hace referencia a las técnicas de propagación donde se realiza el cultivo aséptico de una pequeña porción de material vegetal (explanto) en condiciones ambientales y nutricionales controladas. Como método para la propagación de genotipos superiores tiene algunas ventajas en relación con los métodos tradicionales ya que permite propagar árboles adultos sin necesidad de troncharlos, se obtienen cientos de réplicas en poco espacio e independientemente de la época del año y los propágulos son fácilmente almacenables e intercambiables entre programas de mejoramiento. Estas características han determinado que el INIA utilice estas técnicas en varios programas de mejoramiento genético. Para la especie *Eucalyptus grandis* en 1992 y 1993 mediante un proyecto FPTA llevado adelante por el Laboratorio de Biotecnología de Facultad de Agronomía se micropropagaron 35 árboles de los 196 seleccionados.

A partir del 1995 la tarea de micropropagación se ha llevado adelante por parte del Laboratorio de Biotecnología Forestal de INIA Tacuarembó lográndose el ajuste de los protocolos de micropropagación para la especie, la propagación de árboles selectos y la conservación en bancos de germoplasma.

Para la micropropagación de árboles adultos selectos se cosechan las ramas más bajas que presenten diámetros de 3 cm con el uso de escaleras o elevadores hidráulicos.

Estas ramas son desinfectadas con detergente y los extremos se sellan con parafina para luego acondicionarlas en el invernáculo en condiciones de humedad y temperatura adecuada (70% de HR y 25 °C) para provocar la brotación de yemas epicórmicas (foto1).



Estos brotes son cosechados utilizando tijeras o bisturí y se introducen en una solución preparada con 250 ml de agua destilada, 5 gotas de Tween 20 y 0.1 g de benomyl. En esta solución se llevan al Laboratorio donde comienzan el proceso de micropropagación.

Este proceso se ha estandarizado en:

*a) Etapa de introducción*

En primer lugar se realiza la desinfección del material según la siguiente secuencia:

- remojo durante 5 minutos en solución al 6 % de hipoclorito de sodio comercial
- 3 enjuagues con agua destilada estéril
- los brotes cosechados se cortan en segmentos nodales que posean 2 o 4 yemas axilares y 1 par de hojas seccionadas a la mitad.
- remojo de los segmentos nodales durante 3 minutos en solución al 6 % de hipoclorito de sodio comercial.
- 3 enjuagues con agua destilada estéril

Luego de la desinfección los segmentos nodales se introducen en tubos de ensayos conteniendo 20 ml de medio de cultivo estéril.

El medio de introducción consiste en: solución mineral + vitaminas De Fossard( De Fossard R. A *et al* 1974)+ 8.5 g/l agar + 10 g/l sacarosa + 0.2mg/l BAP

Como solución mineral se están utilizando tres formulaciones que se alternan según la respuesta observada en cada genotipo en particular, se utiliza la formulación de Murashige and Skoog (1962) a la mitad de su concentración, la formulación de Jads (citado por Correia *et al* , 1995) y el Wood Plant Medium.(Lloyd, G. and

McCown, B. 1980)

La etapa de introducción dura hasta que los segmentos nodales emitan nuevas yemas, en ese momento el material pasa a la etapa de multiplicación.

*b) Etapa de multiplicación*

El medio consiste en: solución mineral + vitaminas De Fossard+ 8.5 g/l agar + 10 g/l sacarosa + 0.2mg/l BAP + 0.2 mg/l ANA

En esta etapa se favorece la formación de yemas. Cuando los entre nudos de los nuevos brotes comienzan a elongar se pasa a la etapa de elongación y enraizamiento

*c) Etapa de elongación y enraizamiento*

El medio consiste en: solución mineral + vitaminas De Fossard+ 8.5 g/l agar + 10 g/l sacarosa + 0.2mg/l BAP + 0.2 mg/l ANA + 5 g/l Carbon activado

Luego que las plántulas emiten 2 o mas raíces de más de 3 cm y alcanzan una altura de 4 cm comienza el proceso de aclimatación.

*d) Etapa de aclimatación*

Esta etapa es de fundamental importancia ya que prepara a la microplanta para que pueda sobrevivir en condiciones normales. Las plantas micropropagadas son difíciles de aclimatar ya que no tienen suficiente pared epicuticular y tienen estomas anormales, lo que lleva a una excesiva deshidratación y pobre control del intercambio gaseoso. En el transcurso de la aclimatación las yemas forman nuevas hojas funcionales que reemplazan a las anteriores y que soportan condiciones ambientales normales. Cuando esto ocurre las plántulas pueden ser llevadas al campo sin cuidados especiales.

El medio de aclimatación consiste en: sustrato formado por 50 % corteza de pino compostada y 50 % de cascara de arroz quemada + 35 ml de solución mineral Wood Plant Medium.

Aproximadamente a los 2 meses de estar en estas condiciones o cuando la planta ha emitido 2 pares de hojas nuevas se comienza a perforar el parafilm que cubre los tubos con las plantas. Al cabo de una semana se retira totalmente la cubierta de parafilm, se riega con benomyl y se deja 2 días en estas condiciones. Luego se transplanta a maceta y se lleva a invernáculo con riego por aspersión y temperatura controlada.

**Resultados y conclusiones**

- La respuesta a cada una de las etapas del cultivo *in vitro* es altamente dependiente del genotipo que se quiere propagar.
- Al trabajar con árboles creciendo en el campo, la contaminación del material con que se inicia el cultivo es una limitante de consideración.
- La propagación de árboles adultos donde los tejidos han perdido plasticidad para formar nuevas estructuras determina ciclos de producción mas prolongados para retomar el estado de juvenilidad de los tejidos.
- Del total de ramas que se cosechan de los árboles selectos y se acondicionan en el invernáculo, se han obtenido brotes viables (que crecen mas de 1.5 cm de altura) en el 50 % de ellas.
- De todos los segmentos nodales que se introducen el 88 %, se pierde por contaminación y oxidación de los tejidos.



- En la etapa de multiplicación las pérdidas han oscilado entre 10 y 30 % debido a contaminación, formación de callo y vitrificación de los tejidos. Estas pérdidas varían ampliamente según el genotipo con el que se trabaja.
- El tiempo que permanecen los cultivos en esta etapa hasta que las rosetas elongan es también muy dependiente del clon. Para la micropropagación de árboles adultos, los clones que han mostrado etapas de multiplicación mas cortas han logrado la elongación luego de cinco meses de cultivo. En aquellos brotes que presentan una buena elongación luego de aproximadamente 2 meses se observa la emisión de raíces.
- Para la etapa de aclimatación las pérdidas están directamente relacionadas con un pobre control de las condiciones ambientales. Es preciso comenzar con condiciones de humedad relativa muy alta y paulatinamente disminuirla a los valores de humedad relativa ambiente normales. Si se da un buen control de este factor las pérdidas en esta etapa son muy reducidas.

## **PRODUCCIÓN DE PLANTAS CLONALES**

Luego que se logran rescatar los genotipos selectos ya sea por técnicas de macro o micropropagación, se deben producir las plantas clonales para instalar los jardines, bancos y test clonales.

En esta etapa la producción de plantas se hace por estaquilla y se evalúa principalmente la capacidad de enraizamiento de cada clon.

Las plantas para producir estacas (pies madres) se manejan con fertilizaciones y podas frecuentes ( cada 15 días en los meses de producción) para favorecer la emisión de brotes que puedan ser cosechados como estacas.

Se ha evaluado la diferencia entre mantener los pies madres en maceta o instalarlos en el campo con las ventajas y desventajas que cada manejo presenta.

Trabajando con pies madres instalados en macetas se logra tener una producción de brotes más estables en el tiempo y los pies madres son fácilmente sustituibles por otros. La desventaja que hemos encontrado para este método, ha sido lograr brotes con rusticidad suficiente que no se pierdan luego por deshidratación.

Con pies madres instalados a campo se tiene una producción de estacas muy estacional y los pies madres son difíciles de sustituir por otros. Como ventaja se ha observado que en los períodos de primavera y otoño los brotes obtenidos de estos pies madres se encuentran más rustificados y resisten mejor las condiciones de estaquillado que los brotes obtenidos de pies madres en maceta.

En el siguiente cuadro se observan ejemplos de los porcentajes de enraizamiento obtenidos con clones INIA.

Cuadro N° 3: Porcentaje de enraizamiento de estacas cosechadas de pies madres

Código	Cantidad	Fecha	% en raiz.
378B	58	Feb-03	61
INIAFOR031	28	"	55
INIAFOR032	39	"	51
INIAFOR033	52	"	53
INIAFOR034	45	"	50
INIAFOR035	36	"	53
INIAFOR036	27	"	52
INIAFOR037	55	"	55
INIAFOR038	43	"	57
INIAFOR039	19	"	50
VS13	20	"	38
H	14	"	22
JL13	18	"	14
JL1	23	"	8
378B	15	Ene-05	67
JL28	32	"	50
JL28	40	"	48
JL28	192	"	46
V	12	"	42
2133	88	"	38
5	48	"	35
218	12	"	33
378B	116	"	28
2116	145	"	20

En general se observa que los porcentajes de enraizamiento son bajos, destacándose el clon 378B el cual es un clon que proviene de semilla.

El bajo porcentaje de enraizamiento observado puede deberse a que las condiciones del invernáculo no se lograron ajustar para las temperaturas requeridas. A pesar de que se instaló una cortina de agua, un aire acondicionado y se cambió el sistema de riego, en los meses de verano alcanza temperaturas máximas muy elevadas que provocan importantes problemas en las estacas.

### EVALUACIÓN MEDIANTE TEST CLONAL

Una vez que los genotipos selectos han logrado multiplicarse vegetativamente en cantidades suficientes como para evaluarlos, se procede a la instalación de los test clonales.

Con los test clonales se logran obtener datos reales del comportamiento de cada clon en condiciones de plantación en diferentes zonas.

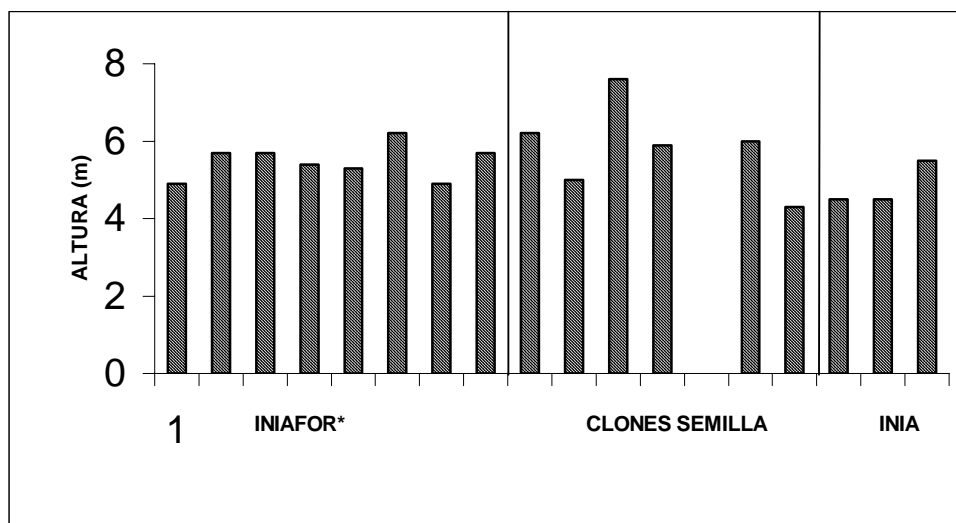
Debido principalmente a limitantes de infraestructura para la producción de plantas, el INIA no ha podido realizar

por si misma los test clonales los cuales se han instalado y se continuaran instalando en convenio con empresas forestales.

En convenio con la empresa COLONVADE S.A en noviembre del 2004 se instaló un test clonal con los clones INIA y otros clones propiedad de COLONVADE. Datos de crecimiento a los 10 meses se encuentran publicados en la Actividad de Difusión N° 416.

En el predio de INIA de la Estación Experimental del Norte en abril del 2003 se instaló un ensayo clonal con fines demostrativos que cuenta con 18 clones en evaluación, 8 clones INIAFOR , 7 clones de semilla de árboles plus y 3 clones INIA con baja capacidad de enraizamiento.

En la siguiente gráfica se observan los promedios de altura por clon a los 2 años.



\*Se llama clones INIAFOR a los clones INIA que salieron a la venta en el 2003

**Gráfica N°1:** Promedios de altura por clon a los 2 años

En la gráfica se observa que los clones que provienen de plántulas de semilla tienen una mayor variación en comportamiento ya que al provenir de semilla de polinización abierta solo se tiene información sobre la superioridad del árbol madre. Los restantes clones INIA todos provienen de árboles adultos seleccionados por su superioridad fenotípica por lo cual tienen un comportamiento más homogéneo.

### CONCLUSIONES FINALES

La propagación vegetativa de árboles seleccionados es una herramienta muy valiosa para los programas de mejoramiento genético, permitiendo avanzar muy rápidamente en la mejora de características que tienen un importante control genético. Sin embargo como fue expresado, son necesarias condiciones de infraestructura y manejo adecuados para llevar adelante con éxito dicha propagación. También hay que destacar que existen genotipos que presentan limitaciones genéticas para lograr el enraizamiento y por lo tanto no son aptas para plantaciones clonales a escala comercial.

El INIA cuenta con un amplio pool genético en evaluación que permitirá continuar seleccionando individuos que se destaquen por características de interés productivo o industrial para las diferentes zonas del país, sin embargo las limitantes de infraestructura y personal para llevar adelante las tareas de propagación vegetativa son bien reconocidas siendo por lo tanto necesario un estrecho trabajo en conjunto entre el INIA y las empresas forestales para alcanzar logros significativos.

### Bibliografía

- Couto Alfenas, .A.; Valverde Zauza, E.; Gonçalves Mafia, R.; Francisco de Assis, T. 2004. Clonagem do Eucalipto. En: Clonagem e Doenças do Eucalipto. UFV, Viçosa. pp 19-152.
- Correia, d.; Gonçalves, A.N.; Zarate do Couto, H.T.; Ribeiro, M.C. 1995. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. IPEF n48/n49, p. 107-116, 1995.
- De Mello, J.C.; Balmelli, G.; Bennadjii, Z.; García, R.; Uetsuki, Y.; Maruyama, T. 2002. Metodología para la selección de árboles plus de *Eucalyptus grandis* por crecimiento, forma y características de la madera. Serie Aftercare Forestal INIA-JICA Nº 2. 13p.
- De Mello, J.C.; Tabuchi, K.; Bennadjii, Z.; Maruyama, T. 2002. Macropropagación de *Eucalyptus grandis*. Serie Aftercare Forestal INIA-JICA Nº 10. 13p.
- De Fossard, R.A.; Nitsch, C.; Cresswell, R.J ; Lee, E.C.M. 1974. Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. N.Z.J. For. Sci.4:267-278.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Lloyd, G. and McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip. *Comb.Proc. Intern. Plant Propagator's Soc.* 30:421-427.1980.

## OTRAS ACTIVIDADES VINCULADAS A LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA

### 1) EVALUACIÓN DE DAÑO POR FRÍO MEDIANTE LA TÉCNICA DE CONDUCTIVIDAD RELATIVA

Ma. Isabel Trujillo

En junio de 2003 se realizó para los clones INIAFOR los estudios para evaluar el daño por frío mediante la técnica de conductividad relativa.

El método se basa en que la conductividad eléctrica es mayor cuanto mayor es el daño de las paredes celulares. Se evalúa la conductividad eléctrica (ct) de discos de lamina foliar sometidos durante 50 minutos a temperaturas de -5 °C y se compara dicho valor con la conductividad eléctrica (ck) del mismo disco sometido a valores de extremos de temperatura que aseguren la destrucción celular (80 °C durante 15 minutos). De la comparación de ambos valores se calcula la conductividad relativa (cr %) que es un indicador del daño producido por el frío. Cuanto mayor es el valor de Cr % mayor es el daño por el frío.

#### *Metodología*

- Tomar muestras de lámina foliar. Las muestras consistieron en discos de 5 mm de diámetro que se tomaban de dos hojas bien desarrolladas. Por clon se evaluaron 3 plantas por lo que el n° de muestras por clon fue de 6.
- Introducir las muestras en tubos de ensayo y tapar con papel aluminio. Llevar a baño María conteniendo etilen glicol como anticongelante a temperatura de -5 °C
- A los 10 minutos agregar cristales de hielo por encima de los discos y dejar 50 minutos más.
- Sacar los tubos del baño María y a los 20 minutos agregar 3.5 cc de agua destilada por tubo.
- Dejar tapado a temperatura ambiente durante 24 horas
- Medir la conductividad eléctrica en cada tubo (ct)
- Poner nuevamente los tubos en baño María a temperatura de 80 °C durante 15 minutos
- Sacar del baño María y dejar a temperatura ambiente durante 24 horas
- Medir la conductividad en cada tubo (ck)
- Calcular la conductividad relativa (cr)
- $Cr\% = (Ct - Cad) / (CK - Cad) \times 100$  siendo Cad la conductividad del agua destilada

#### *Resultados y Conclusiones*

En el siguiente cuadro se observan los valores de Ct, Ck y Cr % para todas las muestras evaluadas.

Cuadro N° 1: Valores de conductividad por clon

CLON	Ct	Ct-Cad	Ck	Ck-Cad	Cr %	Cr %promedio
<b>INIAFOR037</b>	3.93	3.637	?	?	?	
	2.61	2.317	4.8	4.47	51.87	
	3.44	3.147	4.3	3.99	78.93	
	3.85	3.557	4.9	4.61	77.21	
	3.65	3.357	4.3	4.01	83.78	
	3.55	3.257	4.3	4.00	81.49	<b>74.65</b>
<b>INIAFOR032</b>	2.04	1.747	2.8	2.50	69.96	
	1.13	0.841	2.7	2.36	35.68	
	1.8	1.511	2.8	2.52	60.03	
	1.72	1.43	2.3	2.00	71.61	
	1.29	1.001	2.4	2.12	47.28	
	2.18	1.887	3	2.69	70.23	<b>59.13</b>
<b>INIAFOR036</b>	2.31	2.017	3.8	3.46	58.35	
	3.33	3.037	4.2	3.90	77.93	
	2.72	2.427	3.6	3.33	72.95	
	3.85	3.557	4.6	4.26	83.56	
	3.32	3.027	3.8	3.49	86.81	
	2.14	1.847	2.6	2.34	79.03	<b>76.44</b>
<b>INIAFOR039</b>	0.77	0.474				
	2.41	2.117	3.1	2.80	75.69	
	2.29	1.997	3	2.69	74.32	
	2.04	1.747	3.1	2.76	63.37	
	2.11	1.817	2.5	2.18	83.46	
	1.68	1.386	2.7	2.45	56.64	<b>70.70</b>
<b>INIAFOR038</b>	2.44	2.147	3	2.68	80.20	
	2.66	2.367	3.1	2.79	84.93	
	2.58	2.287	3.1	2.78	82.36	
	3.08	2.787	3.6	3.27	85.31	
	2.89	2.597	3.5	3.22	80.73	
	3.11	2.817	3.5	3.16	89.23	<b>83.79</b>
<b>INIAFOR033</b>	1.74	1.445	2.2	1.91	75.77	
	1.25	0.961	2.4	2.10	45.83	
	2.38	2.087	3.2	2.94	71.06	
	1.86	1.567	3	2.71	57.89	
	1.79	1.496	2.5	2.25	66.58	
	1.69	1.395	2.3	2.00	69.85	<b>64.50</b>
<b>JL28</b>	0.82	0.523	2	1.69	30.89	
	1.8	1.502	2.2	1.92	78.35	

CLON	Ct	Ct-Cad	Ck	Ck-Cad	Cr %	Cr %promedio
	1.41	1.112	2	1.71	65.14	
	1.66	1.37	2.1	1.83	74.99	
	1.69	1.398	2.2	1.93	72.55	
	1.79	1.495	2.3	1.99	75.24	73.25
<b>INIAFOR031</b>	1.17	0.876	2.3	2.02	43.43	
	2.65	2.357	3.2	2.94	80.25	
	1.97	1.675	2.4	2.13	78.75	
	1.55	1.252	1.9	1.60	78.25	
	1.7	1.41	2.3	1.97	71.68	
	2.37	2.077	3.1	2.83	73.47	70.97
<b>INIAFOR034</b>	3.14	2.847	3.8	3.54	80.49	
	3.11	2.817	3.5	3.23	87.29	
	2.57	2.277	3	2.75	82.89	
	2.77	2.477	2.8	2.52	98.41	
	2.77	2.477	3.8	3.52	70.43	83.90

Como se observa en el cuadro el clon que sufrió menores daños por frío es el INIAFOR 032 y el que experimentó los mayores daños el clon INIAFOR034. Sin embargo cuando se tomaron las medidas de Ct y Ck con el conductímetro se observó una gran sensibilidad del instrumento que no logró estabilizar los valores de conductividad. Por esta razón el ensayo fue repetido y nuevamente se encontró la misma dificultad no resultando confiables los valores obtenidos.

Se concluyó que la metodología se realizó sin dificultades pero debe mejorarse la exactitud de las mediciones.

## 2) MICROPROPAGACIÓN DE *Eucalyptus grandis* A PARTIR PLANTULAS RECIÉN GERMINADAS

Ma. Isabel Trujillo

En el año 2003 se evaluó la técnica de micropropagación partiendo de plántulas recién germinadas.

El objetivo del estudio fue evaluar las diferentes etapas del proceso en cuanto a contaminación, velocidad de obtención plantas y facilidad para la emisión de raíces.

Los genotipos que presentaron los mejores resultados se instalaron en un ensayo clonal para continuar evaluando su comportamiento.

### *Materiales y métodos*

Se evaluaron 32 procedencias, 15 australianas y 17 de árboles plus seleccionados localmente.

De cada procedencia se tomaron muestras de 10 semillas. Las semillas se esterilizaron durante 5 minutos en hipoclorito de sodio comercial al 10 %. Luego fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril y sembradas en placa de petri conteniendo solución mineral MS, 8 g/l de agar y 10 gr/l de sacarosa.

Luego de 13 días se evaluó la germinación y se eligieron las 2 mejores plántulas por procedencia. A cada plántula se les cortó la raíz y se repicó a un tubo de ensayo conteniendo medio de introducción.

Las siguientes etapas del proceso se realizaron con la misma metodología ya publicada para micropropagación de *Eucalyptus grandis*.

### *Resultados y discusión*

- El porcentaje de contaminación fue extremadamente bajo (3 %)
- La respuesta al crecimiento *in vitro* fue bueno en la mayoría de los genotipos evaluados. En el 70 % de los genotipos se logró obtener plántulas enraizadas
- El proceso completo hasta la obtención de plántulas enraizadas duró entre 4 y 7 meses

Al comparar estos resultados con los obtenidos cuando se propagan árboles adultos, se aprecia una respuesta muy rápida al trabajar con material juvenil explicada por la gran plasticidad morfogénica que presentan los tejidos juveniles.

De todas maneras se observaron algunos genotipos que no lograron enraizar lo cual se debería principalmente a limitantes genéticos.

### 3) ACUERDO DE TRABAJO PARA LA MICROPROPAGACION DE CLONES DE *Eucalyptus grandis*

Ma. Isabel Trujillo

En marzo de 2004 se firmó un acuerdo de trabajo por un año con una empresa forestal con el objetivo de micropropagar 30 clones de *Eucalyptus grandis*. En marzo del 2005 se prorrogó dicho acuerdo por un nuevo año incorporándose 30 nuevos clones.

A partir del material recibido en etapa de multiplicación se acordó entregar 30 plantas aclimatadas por clon. Se procedió con la metodología ya enumerada para la micropropagación de *Eucalyptus grandis*. Los principales problemas encontrados fueron contaminación, clones con marcada facilidad para la vitrificación y clones con dificultades para la emisión de raíces.

A la fecha se han logrado enraizar el 52 % de los clones y se han entregado 425 plantas aclimatadas.

### 4) FINGERPRINTING DE LOS CLONES INIAFOR.

Jorge Lemos<sup>2</sup>

Con el objetivo de tener identificados genéticamente los clones INIAFOR, se procedió a realizar los estudios de ADN correspondientes.

EXTRACION ADN: Se realizaron las extracciones de ADN a 2 individuos por clon según la metodología Wash Buffer (Lemos, J. *et al.* 2002)

Dicha extracción se cuantificó mediante el uso del espectrofotómetro arrojando resultados en el rango de 200-900 ng/ul lo cual permite comprobar la presencia de ADN en todas las muestras extraídas.

---

<sup>2</sup> Ayudante Laboratorio Biotecnología INIA Tacuarembó



SCREENING: De los 50 primer probados en trabajos anteriores se eligieron los 7 que se detallan por haber presentado las mejores bandas polimorf (presencia y ausencia de banda)

- OPA 08
- OPA 12
- OPB 03
- OPB 13
- OPB 14
- OPB 19
- OPC 06

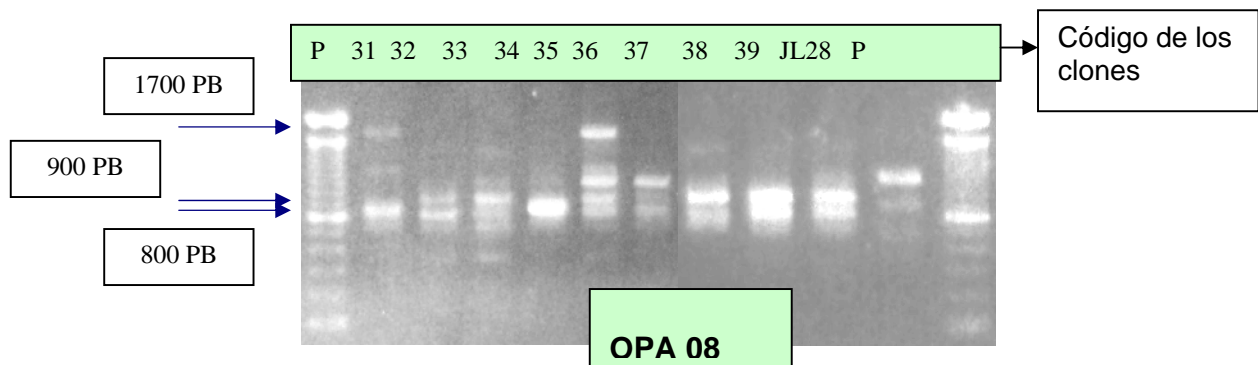
PCR Y ELECTROFORESIS: Luego de extraer el ADN este debe ser amplificado utilizando el PCR.

### Resultados

La electroforesis y la fotografía de los geles obtenidos permitieron obtener los siguientes resultados preliminares:

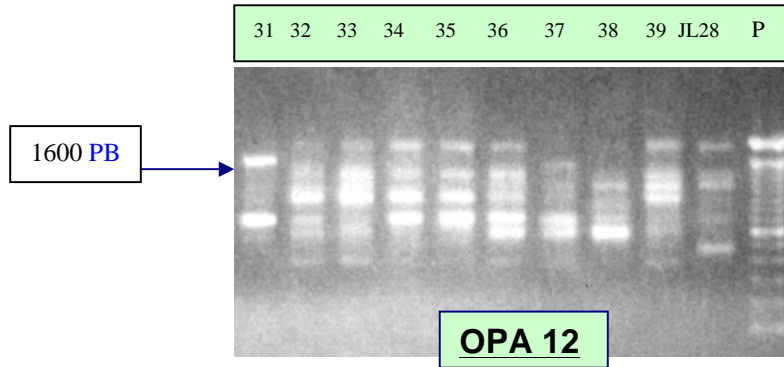
*A modo de ejemplo se presentan las fotografías de los geles obtenidos con 4 primers y los resultados que de ellos se obtienen.*

#### A) PRIMER OPA 08



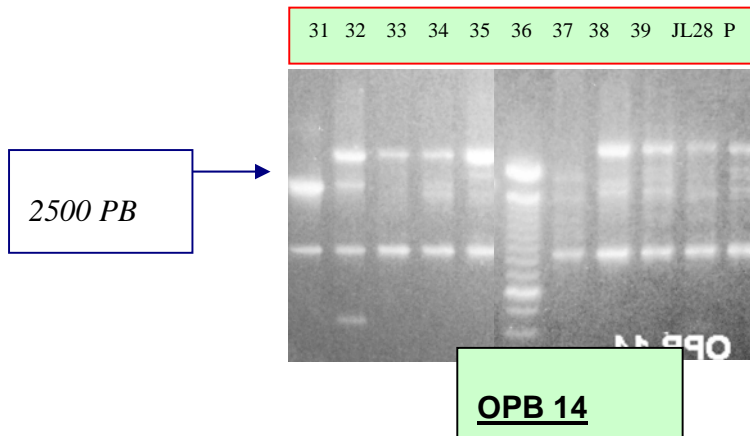
1700 PARES BASES BANDAS CARRIL 31 Y 35 AUSENCIA EN OTROS CARRILES  
 900 PARES BASE BANDAS EN CARRILES 32,33,34,35,36 Y 39 AUSENCIA EN OTROS CARRILES.  
 800 PARES BASE BANDAS CARRIL 32,33,35,36,37,38 Y 39 AUSENCIA EN OTROS CARRILES.

B) PRIMER OPA 12



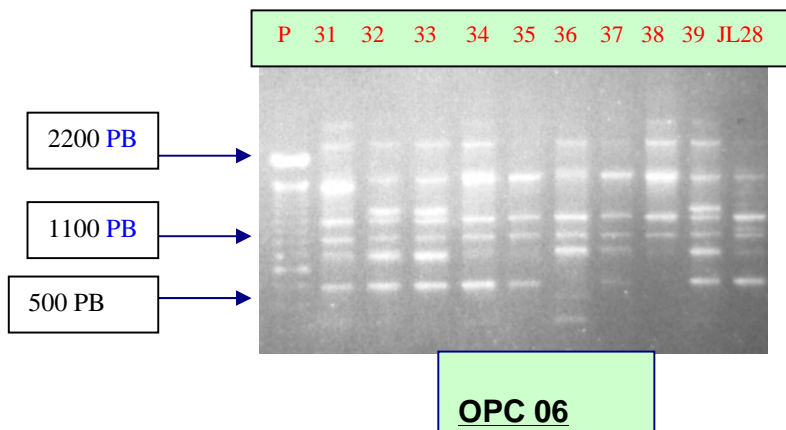
1600 PB: BANDA EN CARRIL 31 Y AUSENCIA EN OTROS CARRILES.

C) PRIMER OPB 14



2500 PB: BANDAS EN CARRIL 31,32,33,34,36,37,38 Y 39 AUSENCIA EN OTROS CARRILES.

D) PRIMER OPC 06



2200 PARES BASES BANDAS CARRIL 31,32,33,34,36,37,38 Y 39 AUSENCIA EN OTROS CARRILES  
 1100 PARES BASE BANDAS EN CARRILES 32,33 Y 39 AUSENCIA EN OTROS CARRILES.  
 500 PARES BASE BANDAS CARRIL 31,32,33,34,35,37,39 Y JL28 AUSENCIA EN OTROS CARRILES.

Con los geles obtenidos para todos los primers utilizados se construyó la tabla de datos binarios que se presenta a continuación

Tabla de Datos binarios

PRIMER	OPA08	OPA08	OPA08	OPA12	OPB14	OPC06	OPC06	OPC06
ARBOL	1700	900	800	1600	2500	2200	1100	500
031	1	0	0	1	1	1	0	1
032	0	1	1	0	1	1	1	1
033	0	1	1	0	1	1	1	1
034	0	1	0	0	1	1	0	1
035	1	1	1	0	0	0	0	1
036	0	1	1	0	1	1	0	0
037	0	0	1	0	1	1	0	1
038	0	0	1	0	1	1	0	0
039	0	1	1	0	1	1	1	1
40	0	0	0	0	0	1	0	1

A partir del análisis binario se construye la Tabla 1 que permite visualizar la diferencia de ADN entre los árboles evaluados.

Tabla 1: Tabla binaria de presencia, ausencia de banda

ARBOL	BANDAS	
40	00000101	
38	00101100	
37	00101101	
34	01001101	
36	01101100	
32	01101111	igual*abajo
33	01101111	igual*abajoigual*arriba
39	01101111	igual*arriba
31	10011101	
35	11100001	

Analizando la tabla se observa que con los primeros utilizados es posible diferenciar los clones 31, 34, 35, 36, 37, 38 y 40 y no se pueden diferenciar los clones 32, 33 y 39. Es necesario por lo tanto continuar los estudios con otros primers para diferenciar estos tres clones.

### Bibliografía

Lemos, J.; Goto, Y.; Maruyama, T. 2002. Metodología para la identificación de clones de *Eucalyptus grandis* mediante el método RAPD (ADN polimórfico aplicado al azar). Serie Aftercare Forestal INIA-JICA N° 13. 22p.

## EL ENFOQUE GENÓMICO Y LAS ESTRATEGIAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE GENES EN *Eucalyptus*: ¿EXISTEN OPORTUNIDADES PARA LA INVESTIGACIÓN EN URUGUAY?

Fabián M. Capdevielle<sup>3</sup>

Considerando que el género *Eucalyptus* es plantado comercialmente para producción de pulpa de papel y productos aserrados en más de 10 millones de hectáreas a través de Asia, América del Sur, sur de Europa, Nueva Zelandia y Australia, el desarrollo de la investigación genómica ha sido considerado en forma creciente como un enfoque estratégico por numerosos programas públicos y privados, impulsado por los rápidos avances en tecnologías moleculares y bioinformáticas de alta performance. Existen numerosos laboratorios a nivel internacional realizando investigaciones con enfoque genómico utilizando un amplio rango de técnicas moleculares aplicadas en diferentes especies. Esto posibilita presentar una revisión sobre las áreas donde se dispone en la actualidad de mayor conocimiento, identificando oportunidades de aplicación para programas particulares, así como establecer donde se localizan las principales incógnitas en cuanto a la organización y funcionamiento de los genes que controlan los principales procesos metabólicos relacionados con caracteres de interés productivo en *Eucalyptus*.

Un estudio reciente sobre este tema ha sido presentado recientemente por el Consorcio internacional del Genoma de *Eucalyptus* – IEuGC – como aporte para consolidar múltiples fuentes de información disponibles en la literatura e identificar los laboratorios y organizaciones involucradas en la genómica de este género. De acuerdo a dicho estudio existen por lo menos 36 grupos (incluyendo universidades, institutos públicos y empresas) que realizan investigaciones en 11 países con enfoque genómico, destacándose la participación de Australia con 10 grupos, Estados Unidos y Japón con 6 grupos, seguidos por Brasil, China y Francia con 3 grupos cada uno, y completando la lista instituciones de Inglaterra, Israel, Nueva Zelandia, Portugal y Sudáfrica.

Desde la perspectiva regional, en 2002 se inició en Brasil el proyecto Genolyptus enfocado en la generación de conocimiento genómico estructural y funcional en *Eucalyptus*, así como el desarrollo de herramientas moleculares y bioinformáticas aplicables en identificación de genes asociados con caracteres productivos y selección asistida por marcadores. Este proyecto involucra a 12 empresas comerciales, 7 universidades, la institución de investigación agropecuaria de Brasil (EMBRAPA), y el grupo de investigación RAIZ de Portugal; dentro de los componentes genómicos del proyecto se destacan los siguientes:

- mapeo de QTL (loci asociados con caracteres cuantitativos) e identificación de genes completos y secuencias de promotores para resistencia a enfermedades, calidad de madera, crecimiento y floración, aplicando modelos estadísticos avanzados para analizar múltiples familias con más de 200 marcadores de tipo microsatélite
- construcción de una colección de más de 60.000 secuencias clonadas en vectores (BAC) que permiten realizar un mapeo físico preciso en el proceso de estudio y descubrimiento del genoma de *Eucalyptus*
- secuenciación del transcriptoma (fragmentos derivados de los genes expresados en determinado tejido,

---

<sup>3</sup> Coord. Unidad de Biotecnología - INIA Las Brujas

órgano ó estadio fisiológico) mediante generación de más de 200.000 ESTs (identificadores de secuencias expresadas)

- comparación de niveles de expresión génica entre fenotipos contrastantes para diferentes estadios de desarrollo utilizando tecnología de micromatrices de ADN ("gene chips") desarrollo y validación de plataformas y procedimientos bioinformáticos para búsqueda, integración y análisis de información genómica

Entre los productos biotecnológicos esperados se enfatiza la identificación de QTL en poblaciones seleccionadas como estrategia para apoyar el descubrimiento de variantes alélicas en genes candidatos asociados con vías metabólicas que controlan la división y expansión celular, la lignificación, y los procesos de respuesta a estreses de origen biótico ó abiótico. Desde el punto de vista de la caracterización de secuencias correspondientes a genes expresados, se han alcanzado más de 90.000 ESTs entre diferentes especies, tales como *E. grandis*, *E. globulus*, *E. pellita* y *E. urophylla*, disponiendo de evidencias sobre la existencia de 30.000 genes aproximadamente. Sin embargo, en el campo genómico no es suficiente con tener información preliminar sobre el conjunto de secuencias, sino que se requiere información precisa sobre los genes que podrían estar afectando un carácter en particular.

Desde un punto de vista aplicado, el número de genes para los que se dispone de validaciones experimentales sobre su estructura y función es aún limitado, por lo que existen varias propuestas dentro del proyecto Genolyptus para la identificación de genes, funciones y sistemas de regulación para el metabolismo de lignina y polisacáridos, análisis comparativo con los genomas de especies vegetales utilizadas como modelo (*Arabidopsis* y *Populus*), y análisis secuencial de expresión de genes para interacción con patógenos y lignificación. Algunos genes (CCR y CAD) esenciales en la regulación de esas vía metabólicas han sido clonados en *E. saligna* por la Universidad Federal de Río Grande del Sur. Por otra parte, un consorcio integrado por la fundación FAPESP y cuatro empresas brasileras de pulpa y papel ha impulsado el proyecto FORESTs, cuyos productos incluyen más de 120.000 ESTs que están siendo analizados para identificar genes relacionados con tolerancia a estrés (ambiental, insectos, patógenos, herbicidas), regulación hormonal del crecimiento y síntesis de diferentes compuestos del metabolismo secundario.

La posibilidad de realizar selección temprana utilizando marcadores moleculares como indicadores de genes que afectan caracteres de alto valor, como rendimiento en pulpa y densidad de madera, ha sido considerada como la principal justificación de los enfoques genómicos a nivel de programas prácticos de mejoramiento. El concepto más relevante en ese caso sería la identificación de genes candidatos para los diferentes caracteres, los cuales pueden definirse a través de su localización en las mismas regiones cromosómicas donde se detectaron QTL, o debido a que corresponden a vías metabólicas involucradas en la expresión funcional de determinada característica. Por ejemplo, Moran y colaboradores presentaron información sobre 32 genes candidatos en relación con características evaluadas en fibra y madera (2002, Ann. For. Sci. 59: 645–650), de los cuales la mitad estarían asociados con la biosíntesis de lignina y celulosa. La comparación de poblaciones de mapeo en diferentes ambientes (en particular los más diferenciados) permitiría estimar la factibilidad de transferir combinaciones de caracteres mediante programas de cruzamiento controlado asistidos por marcadores genómicos.

Las condiciones para aplicación de información de marcadores moleculares en el mejoramiento de *Eucalyptus* parecen prometedoras debido a la creciente disponibilidad de técnicas de análisis genómico de alta productividad, las cuales han posibilitado generar bases de datos de un modo más rápido y con una mejor relación costo-efectividad. Varios métodos para análisis de los datos moleculares han sido desarrollados para identificación de genes que afectan caracteres cualitativos y cuantitativos. Sin embargo, a pesar del gran potencial de los procedimientos de mapeo genético para identificar y utilizar alelos positivos provenientes de

genotipos parentales utilizados en cruzamientos utilizados por fitomejoradores, los mismos no son aún una herramienta aplicada por la mayoría de los programas de mejoramiento en el mundo. Esto podría ser debido fundamentalmente a limitantes asociadas con la generación y manejo de poblaciones para mapeo, lo cual es requerido como paso previo a desarrollar una colección de datos consistente con los métodos de análisis estadístico generalmente utilizado tanto a nivel molecular como agronómico.

En nuestro análisis consideramos la proliferación de datos fenotípicos disponibles, característica de la mayoría de los programas de mejoramiento, como una oportunidad para la aplicación de procedimientos analíticos relacionados a técnicas exploratorias para inferencia de patrones, generalmente denominadas "data mining" (DM). Como una consecuencia, las aproximaciones de DM basadas en técnicas tales como análisis de conglomerados, clasificación y asociación podrían ser aplicadas para ayudar a los investigadores a descubrir patrones útiles en sus datos, y ayudaría a implementar una estrategia para la incorporación de marcadores en programas prácticos de fitomejoramiento. Una vía posible para incorporar el enfoque genómico en los programas de investigación desarrollados por INIA es evaluar la aplicabilidad de procedimientos bioinformáticos para asignar genotipos seleccionados en grupos que reflejan diferencias en comportamiento agronómico. Nuestra hipótesis es que el uso de marcadores seleccionados utilizando un procedimiento de selección discriminante puede ser usado para construir un modelo predictivo para la clasificación de genotipos en grupos asociados con extremos de variación para cada rasgo entre y dentro de clases (orígenes, cruzamientos, etc.) definidas en el germoplasma disponible.

Usualmente, la evaluación y selección de poblaciones y clones mejorados se basa exclusivamente en información agronómica, requiriendo una examinación cuidadosa de datos fenotípicos replicados para identificar las líneas que superan el promedio o líneas "extremas" con valores contrastantes para diferentes caracteres cuantitativos. Los procedimientos de análisis discriminante basados en información molecular han sido propuestos como una herramienta complementaria de los estudios de asociación marcador-fenotipo basados en cruzamientos (análisis de cosegregación e identificación de QTLs) y en colecciones de germoplasma (análisis de desequilibrio genético y genética asociativa), y podría ser útil para detectar diferencias significativas en patrones moleculares de grupos basados en criterios de selección de los mejoradores, como técnica de decisión para clasificar nuevas genotipos en grupos pre-definidos, y como una técnica exploratoria para seleccionar marcadores para futuros análisis de asociación con rasgos agronómicos.

A medida que avanzan los diferentes proyectos de investigación sobre *Eucalyptus* con enfoque genómico, es importante recordar que estas tecnologías son una excelente herramienta para generar información a gran escala, pero por sí mismas no proporcionan las respuestas a preguntas básicas y aplicadas sobre la organización y funcionamiento interdependiente de todos los genes de un árbol seleccionado en particular. Sin embargo, a través del enfoque genómico es posible que los genetistas y mejoradores forestales integren más eficientemente las múltiples fuentes de información fenotípica que habitualmente manejan (ensayos de orígenes, evaluaciones clonales, pruebas de progenie, etc.) con información molecular para algunas regiones del genoma donde existe mayor probabilidad de encontrar genes cuyas variaciones se reflejan a nivel fenotípico en caracteres de alto valor productivo.

En ese sentido se orientó una reciente actividad sobre aplicación de tecnología computacional para integrar y explorar bancos de información genómica, en el marco del convenio de colaboración sobre ingeniería de software aplicada al campo bioinformático, establecido entre INIA y la Universidad Católica del Uruguay en 2004. Este proyecto permitió evaluar la factibilidad de sistemas basados en agentes "inteligentes" para modelar las complejas interacciones que son necesarias para que un investigador pueda acceder a consultas específicas ("a la medida" para resolver problemas predefinidos) sobre múltiples fuentes de información genómica (bancos de ESTs, secuencias genómicas, vías metabólicas, etc.) para especies forestales.