



**Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria**

**SAGPyA
Ministerio de la Producción
República Argentina**

**Guía para la conducción de ensayos
para determinar
Diferenciabilidad, Homogeneidad
y Estabilidad (DHE) de clones de
Eucalyptus grandis e híbridos interespecíficos.**

**Ing. Forestal M. Elisa DE LAS HERAS
Ing. Forestal Leonel HARRAND**

- 2003 -

Estación Experimental Agropecuaria Concordia
Centro Regional Entre Ríos

1. Especificidad de las directrices:

- Se aplicarán estas directrices para la ejecución de los exámenes de DHE a clones de *Eucalyptus grandis* e híbridos interespecíficos que incluyan esta especie.

2. Material necesario:

- Las autoridades competentes decidirán cuándo, dónde y cuánto material vegetal será necesario para el examen de DHE de los clones de *Eucalyptus grandis* e híbridos a evaluar.
- Las autoridades competentes fijarán las formas de envío a fin de asegurar un buen estado de conservación en destino.
- El material que ha de presentarse para el examen de DHE deberá ser representativo de los clones candidatos.
- El material presentado deberá hallarse visiblemente sano, vigoroso, no estando afectado por plagas y/o enfermedades importantes.
- El material deberá estar exento de todo tratamiento, salvo autorización en contrario o solicitud de las autoridades competentes. Si ha sido tratado se deberá indicar en detalle el tratamiento aplicado.

3. Ejecución del examen:

- Se deberán efectuar los exámenes con material de ensayos que aseguren un desarrollo normal para la especie. Los ensayos deben ser conducidos dentro de las condiciones habituales de cultivo y preferiblemente en un solo sitio.
- Solamente se podrán utilizar parcelas separadas para observación y medición si han estado sometidas a condiciones ambientales similares.
- Se podrán efectuar ensayos adicionales con fines particulares.
- Los caracteres seleccionados deberán satisfacer los requisitos básicos para su utilización en el examen de DHE, para elaborar la descripción de los clones en que su expresión:
 - Resulta de un cierto genotipo.
 - Es lo suficientemente consistente y repetible en un ambiente particular.
 - Muestra una variación suficiente con los demás clones que permite establecer la distinción.
 - Puede definirse y reconocerse con precisión.
 - Permite que se cumplan los requisitos sobre la homogeneidad.
 - Permite que se cumplan los requisitos sobre la estabilidad, es decir, produce resultados consistentes y repetibles después de cada multiplicación asexual para esa calidad de sitio.

4. Obtención de datos.

4.1. Métodos y observaciones:

- Los caracteres seleccionados para el desarrollo del descriptor fueron aquellos que se consideraron describían mejor las diferencias y similitudes entre los clones.
- Los caracteres cualitativos elegidos fueron observados a simple vista, por comparación directa con dibujos o imágenes de referencia.
- Los caracteres cuantitativos fueron evaluados a través de conteo o por mediciones con instrumento de precisión.
- Los exámenes se realizaron sobre 5 – 10 ramets, de edades a definir según los órganos caracterizados en la evaluación, a considerar:

4.2. Caracteres seleccionados por órganos.

- **Hojas juveniles:** Se toman dos (2) hojas de diez (10) plantines, ubicadas entre el quinto y séptimo entrenudo contados a partir del cuello de la planta. Las plantas seleccionadas para este carácter tienen de tres (3) a cuatro (4) meses de edad y presentan altura uniforme de 25 a 35 cm.

Se evalúan los siguientes caracteres: Presencia y Longitud de pecíolo; Forma, Longitud, Ancho de la lámina y Relación entre estas dos últimas; Forma del ápice y de la base; disposición de las hojas en la rama.

- **Hojas intermedias:** Se consideran hojas intermedias a las provenientes de plantas de alrededor de ocho (8) meses de plantadas, obtenidas de ramas del tercio medio de la copa. Se toman diez (10) hojas de cinco (5) plantas ubicadas en el tercio medio de la rama.

Se evalúan los siguientes caracteres: Presencia y Longitud de pecíolo; Forma, Longitud, Ancho de la lámina y Relación entre estas dos últimas; Forma del ápice y de la base, Posición y Disposición de las hojas en la rama.

- **Hojas adultas:** Se consideran hojas adultas las provenientes de plantas de cinco (5) años de plantadas, obtenidas del tercio central de la copa. Se toman diez (10) hojas de cinco (5) plantas, en el tercio medio de las ramas.

Se evalúan los siguientes caracteres: Presencia y Longitud de pecíolo; Forma, Longitud, Ancho de la lámina y Relación entre estas dos últimas; Forma del ápice y de la base, Posición de las hojas en la rama.

- **Botón floral:** Se toman de cinco (5) inflorescencias por cada planta, de 5 plantas de cinco (5) años de plantadas. Se miden todos los botones florales presentes en las inflorescencias.

Se evalúan los siguientes caracteres: N° de Botones por umbela; Longitud de pedúnculo; Diámetro y Longitud del botón; Longitud de pedicelo central, Forma del botón floral; Forma y Altura del opérculo y relación entre Longitud de botón y Altura de opérculo.

- **Fruto:** Se toman de cinco (5) infrutescencias por cada planta, de 5 plantas de cinco (5) años de plantadas. Se miden todos los frutos presentes en las infrutescencias.

Se evalúan los siguientes caracteres: Presencia de infrutescencia apareada; Longitud y Sección de pedúnculo, Forma, Diámetro y Longitud del fruto; Posición y Número de valvas; Posición del disco; Tipo de dehiscencia de las valvas y Presencia de pedicelo.

- **Fuste y ramas:** Se estiman por observación y comparación a simple vista de diez (10) plantas por clon de cinco (5) años de plantadas.

Se evalúan los siguientes caracteres: Ángulo de inserción, Grosor de ramas (apreciación visual), Persistencia y abundancia de ramas (estimación por porcentaje de fuste ocupado con ellas) y Rectitud de fuste.

- **Corteza:** Se estiman por observación y comparación a simple vista de diez (10) plantas.

* En plantas de tres (3) años de plantadas:

Se evalúan los siguientes caracteres: Altura de persistencia, Forma de desprendimiento, Color del tronco por apreciación visual directa, antes y después del desprendimiento.

* En plantas de cinco (5) años de plantadas:

Se evalúan los siguientes caracteres: Altura de persistencia, Forma de desprendimiento, Color del tronco por apreciación visual, Espesor de corteza (Expresado en % del radio)

5. Instrucciones para completar el Descriptor Morfológico

Para facilitar la calificación de las diversas características, fue elaborada una escala de códigos con valores que normalmente varían de 1 a 9. Sin embargo, pueden ocurrir situaciones con más alternativas, en ese caso, la escala de códigos va hasta fuera necesario.

La interpretación de esta codificación es la siguiente:

1. Cuando las alternativas de código fueran secuenciales, esto es cuando no existieran espacios entre los diferentes valores, la escala comienza por el valor 1, y la identificación de la característica debe ser hecha con alguno de los valores listados. Ejemplo: Posición del Disco: Descendente (1), A nivel (2), Ascendente

- (3), solamente una de estas tres alternativas es aceptada. Para este tipo de clasificación, dos valores continuos (Ej: 2 y 3, 6 y 7), para distintos clones si se considera indicador de distinción.
2. Cuando las alternativas de código no fueran secuenciales, o sea existen espacios entre los valores propuestos, la descripción de la característica puede indicarse como un valor de los propuestos o algún valor intermedio. Ejemplo: Persistencia de ramas: Baja (3), Media (5), Alta (7), puede tomarse también un valor 6 para una persistencia Media/Alta, o un valor 1 o 2 para indicar Muy Baja. Para este tipo de clasificación, dos valores continuos (Ej: 2 y 3, 6 y 7), para distintos clones no se considera indicador de distinción, debe haber al menos un espacio para así hacerlo (Ej: 3 y 5, 6 y 9).
 3. La clase correspondiente a los caracteres cualitativos (Ej: Disposición de las Hojas, Forma del Fruto, Altura de desprendimiento de Corteza, etc) o los caracteres por conteo (Ej: Nro. de Botones, etc.), estará definida por la presencia en un porcentaje mínimo del 75% del total de las partes analizadas. De no cumplirse esta situación, podrá indicarse la característica, con dos clases, siempre que éstas cubran un porcentaje significativo del total (más del 75%), entre ambas y en fracciones semejantes. Al presentarse dos clases, el clon no diferencia con otros que presenten alguna de esas clases. De no cumplirse alguna de estas dos alternativas, la característica se considerará desierta.
 4. Un caso especial es el de la Característica 44. Nro. de Valvas, en donde existen clases que combinan dos alternativas. Para la selección de estas clases, debe darse la situación en que el 75% de los casos esté concentrado en estas dos categorías repartido en porcentajes semejantes.
 5. La clase correspondiente a caracteres medibles con instrumental, y de códigos no continuos, estará definida por el valor medio de todos los elementos analizados, dentro del rango indicado para la característica. Las clases tendrán una superposición del 25% hacia cada uno de los límites, es decir, a cada lado del valor indicado. O sea, como ejemplo explicativo, Ancho de Lámina (Hoja Juvenil) Clase 1: Menor a 10 mm, Clase 3: entre 10 y 20 mm. Un valor promedio de 7 mm clasificaría como Clase 1 (límite operativo de Clase : 7,5 mm) , un valor de 9 mm o uno de 12, clasifican como Clase 2, y un valor promedio de 13 clasifica como Clase 3 (límite operativo inferior: 12,5 mm). En este ejemplo la Clase 2 no diferencia de la Clase 1 ni de la Clase 3.

6. Información Adicional. Descriptores Moleculares.

- 6.1. **Definición:** la descripción molecular consiste en la determinación del perfil genético de la planta de *Eucalyptus* por el análisis de múltiples loci de ADN. Se recomendaron seis loci marcadores de secuencias microsatélites, también llamadas de secuencias simples repetitivas, como descriptores adicionales para la identificación de clones de *Eucalyptus* (Grattapaglia, comunicación personal). Estos loci han sido ampliamente utilizados y validados en diversos laboratorios en el mundo para la identificación individual de árboles del género *Eucalyptus* de prácticamente todas las especies relevantes de los

subgéneros *Symphyomyrtus*, *Corymbia* y *Monocalyptus*. (Brondani et al, 1998, 2002)

- 6.2. **Características de los Descriptores Moleculares:** los Descriptores Moleculares consisten en segmentos hipervariables (en la población), de ADN conocidos como loci microsatélites o repeticiones cortas en tandem. Estas regiones están distribuidas por todo el genoma y pueden ser genotipadas a través del análisis de productos de reacción de polimerasa en cadena (PCR) en geles de electroforesis de poliacrilamida de alta resolución. Estas regiones son altamente polimórficas, ricas en formas alélicas, posibilitando un análisis genético preciso y un elevado poder de resolución para test de DHE (distinguibilidad, homogeneidad y estabilidad). Para la determinación del perfil genético de la muestra, se utilizaron los seis loci microsatélites descriptos en la Cuadro 1. Estos loci son genéticamente independientes y fueron optimizados para la identificación genética de *Eucalyptus* (Brondani et al, 1998).
- 6.3. **Extracción y Cuantificación de ADN:** Se extrajo el ADN con el protocolo de CTAB (Hoisington et al, 1994, con modificaciones según Marcucci Poltri et al, 2003). El ADN se cuantificó en geles de electroforesis de agarosa 0,8% teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados con luz ultravioleta.
- 6.4. **Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR):** Se realizó la reacción de PCR para cada locus individualmente con 5 a 30 ng de ADN genómico total, 1,5 mM de Mg^{++} , 0,25 μM de iniciadores directos y reversos, 200 μM de cada nucleótido, 1x tampón PCR conteniendo 50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl pH 9,0, 0,1% Triton X-100, 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa en un volumen total de 12 μl . El programa de PCR fue de: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, enfriamiento a 56°C por 1 minuto y calentamiento a 72 °C por 1 minuto. El paso final fue de calentamiento a 72 °C por 10 minutos.
- 6.5. **Detección de polimorfismo y determinación de genotipos:** Se utilizó la metodología de electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes de alta resolución teñidos con nitrato de plata (Promega kit). Se utilizó el marcador de Peso Molecular de 10 pb (Life Technologies, 10 bp ladder), para el cálculo de los pesos moleculares de los alelos, y el método semilogarítmico para la determinación de los pesos moleculares. En caso de visualizar las dos cadenas de ADN por separado, se consideró el tamaño de la banda de mayor intensidad y mayor tamaño de ambas. Para mayor precisión, se alinearon los alelos por tamaño.

Cuadro 1. Descripción de seis locus microsatélites que constituyen seis descriptores moleculares para la determinación de perfiles genéticos de *Eucalyptus*. Se indican las secuencias de indicadores y grupo de ligamiento en mapa genético.

LOCUS	Secuencia 5'-3' de iniciador directo (forward primer)	Secuencia 5'-3' de iniciador reverso (reverse primer)	Grupo de ligamiento
EMBRA 02	gatagaactttcctattgatcg	gtaggattgatgtctgcaa	11
EMBRA 05	atgctggtccaactaagatt	tgagcctaaaagccaac	5
EMBRA 06	agagaattgctctcatgga	gaaaagtctgcaaagtctgc	1
EMBRA 10	gtaaagacatagtaagacattcc	agacagtacgttcttagctc	10
EMBRA 21	ggttgttcatctttccatg	agcgaaggcaatgtgttt	10
EMBRA 25	cacctctccaaactacacaa	ctctctctctcaccattc	6

7. Bibliografía.

7.1. Descriptores y directrices:

- Instrucoes para Execucao dos ensayos de Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade de Cultivares de EUCALIPTO. 1999.-
- Directrices para la ejecución del Examen de la Distinción, la Homogeneidad y la Estabilidad de *Ficus benjamina* L. TG/171/3 (S) UPOV– Ginebra.-
- R. I. Arreghini, N. E. Riu y J. A. Bustamante. 2000. Clones de Álamos Identificación en Vivero. Servicios Gráficos Mendoza S.R.L.. Mendoza. Arg. pp 171.-
- ANEXO II del Descriptor DE *Eucalyptus gunnii*. Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares y Registro Nacional de Cultivares.-
- ANEXO II del Descriptor de SAUCE *Salix* L. Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares y Registro Nacional de Cultivares.-
- ANEXO II del Descriptor de ÁLAMO *Populus* L. Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares y Registro nacional de Cultivares.-

7.2. Morfología vegetal:

- Mangieri, H.R y Dimitri, M.J. 1961. Los Eucaliptos en la silvicultura. Ed ACME S.A.C.I. Bs.As. Arg. pp 226.-
- Font Quer, P. 1963. Diccionario de Botánica. Ed. Labor S. A.- Barcelona España.-
- 1981. El Eucalipto en la repoblación forestal. FAO Roma.-
- Dimitri, M. J. y Orfila, E. N. 1985. Tratado de Morfología y Sistemática Vegetal. Editorial Acme S.A.C.I. Bs. As. Arg. pp 489.-
- 1998. Morfología Vegetal Complemento teórico. Escuela de Biología Fac. Exactas Física y Naturales. UNC. pp 160.-
- Banks, J. C. G. 2001. Trees y Forests. Dendrology Notes. Department of Forestry. School of Resource. The Australian National University. pp 167.-

7.3. Técnicas de propagación agámica:

- Marcó, M. A. y Sánchez Acosta M. 1986. Propagación agámica de Eucaliptos por estacas en Concordia. ISSN 0326-5013. Carpeta Forestal EEA INTA Concordia C.6.-
- Carpineti, L. 1986. Propagación agámica de Eucalyptus. XI Jornadas Forestales de Entre Ríos.-
- Plata, M. Inés. 1990. Micropropagación de Eucaliptos. SIN 0326-5013 Carpeta Forestal EEA INTA Concordia C.7.-
- Tesón, N. 1999. Propagación agámica de especies forestales. Avances y logros (1993 – 1999). SAGPyA EEA INTA Concordia. pp 8.-
- Trujillo, M. Isabel. Técnicas de Clonación en *Eucalyptus grandis*. Programa Nacional Forestal, INIA Tacuarembó. C:/Netforestal/edic34/campo.htm.-

7.4. Color:

- Villalobos-Domínguez, C. y Villalobos, J. 1947. Atlas de los colores. Ed El Ateneo, Bs.As. Argentina.
- Spanish Manual. Chroma Meter CR-300/CR-310/CR-331. Minolta

7.5. Marcadores moleculares:

- Boland, D.J. et al. 1984. Forest Trees of Australia. Ed Nelson-Csiro. Hong Kong. pp 687.-
- Hoisington, D., Khairallah, M. and González de León, D. 1994. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second Edition. Mexico, D.F.CIMMYT, pp 2-5.
- Brondani, R.P.V., Brondani, C., Tarchini, R. and Grattapaglia, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyotus urophylla*. Theor. Appl. Genet. 97:816-827.
- Brondani, R. P. V.; Brondani, C. and Grattapaglia, D. 2002. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. Mol Genet Genomic 267:338-347.
- Marcucci Poltri S., Zelener, N. Rodriguez Traverso, J; Gelid, P. and Hopp, H. E. Selection of a seed orchard of *Eucalyptus dunnii* based on genetic diversity criteria calculated using molecular markers. Tree Physiology 23:625-632.