

***Eucalyptus globulus* Labill. ssp *globulus*: UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y DE FORMA.**

***Eucalyptus globulus* Labill. ssp *globulus*: THE USE OF MOLECULAR MARKERS FOR STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND FORM**

Gabriela Senisterra¹
Raúl M. Marlats²

¹ Departamento de Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. CC 31 1900 La Plata, Buenos Aires.

² Departamento de Ambiente y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. CC 31 1900 La Plata, Buenos Aires. Investigador Comisión Investigaciones Científicas Provincia de Buenos Aires. Avenida Antártida Argentina y 526. 1900 La Plata, Buenos Aires. rmarlats@netverk.com.ar

SUMMARY

The aim of this work was the identification by isozyme and RAPD's of dominant, codominant and suppresses trees with his corresponding characters of form, from stand of *Eucalyptus globulus* Labill. ssp *globulus* in Miramar, Buenos Aires, Argentina (35° 10` S; 59° 07` W; 29 m snm). The isozyme systems were SKDH (Shikimate dehydrogenase), MDH (Malate dehydrogenase), IDH (Isocitrate dehydrogenase), APH (Acid phosphatase) y 6-PGDH 6-phosphogluconate dehidrogenase). For RAPD's, we employed sequences of primer of Operon Technologies Inc. of 10 pairs of bases. From the results it's was generated one similitude matrix using the Jackard's coefficient of association. Isozyme systems were not sufficient to determine the different phenotypes. RAPD's allow define genotypes that were unique for any individual sampled. The clusters of individuals in their social categories and others characters didn't correspond with clusters generated.

Key words: *Eucalyptus globulus* Labill. ssp *globulus*, molecular markers, population characterization.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la identificación mediante técnicas isoenzimáticas y RAPD's de árboles dominantes, codominantes y suprimidos con sus correspondientes caracteres de forma, pertenecientes a un rodal de *Eucalyptus globulus ssp globulus* ubicado en Miramar, Buenos Aires, Argentina (35° 10` S; 59° 07` W; 29 m snm). Los sistemas isoenzimáticos fueron SKDH (Shikimate dehydrogenase), MDH (Malate dehydrogenase), IDH (Isocitrate dehydrogenase), APH (Acid phosphatase) y 6-PGDH 6-phosphogluconate dehidrogenase). Para los RAPD's se emplearon secuencias de primers generadas por Operon Technologies Inc. de 10 pares de bases, a partir de los resultados se generó una matriz de similitud empleando el coeficiente de asociación de Jaccard.

Los sistemas isoenzimáticos no alcanzaron para definir los diferentes fenotipos. Los RAPD's permitieron generar genotipos que fueron únicos para cada individuo ensayado. El agrupamiento de los individuos en sus categoría sociales y otros caracteres no se correspondió con el agrupamiento generado.

Palabras clave: *Eucalyptus globulus* Labill. ssp *globulus*, marcadores moleculares caracterización poblacional.

INTRODUCCIÓN

Los marcadores génicos isoenzimáticos y los marcadores moleculares son herramientas básicas para el estudio de la variación genética y son utilizados en cuestiones teóricas y prácticas de la genética forestal.

El conocimiento de la variación dentro de la población es importante para determinar la eficiencia de los diferentes métodos de selección

El objetivo del trabajo fue ejercitar técnicas bioquímicas y moleculares sobre material de un rodal de *Eucalyptus globulus* ssp *globulus* objeto para la detección genética de la variabilidad poblacional y de individuos genéticamente superiores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó sobre un rodal de *Eucalyptus globulus* ssp *globulus* ubicado en Miramar, Buenos Aires, Argentina (35° 10' S; 59° 07' W; 29 m snm). El material recolectado consistió en hojas jóvenes de árboles previamente seleccionados cuya caracterización fenotípica se detalla en la Tabla 1.

Los individuos de los cuales se extrajo el material de comparación fueron producto de un balance entre dominantes, codominantes y suprimidos. En la Tabla 1, se detallan las características fenotípicas de cada uno.

Tabla 1- Caracterización fenotípica estructural y de forma.
Phenotypical structural characterization and form.

Árbol nº	Posición sociológica	DAP (cm)	Ht (m)	Hflr (m)	Rectitud de fuste	Grosor de ramas	Abundancia de ramas	Angulo Inserción de ramas
1	S	8.12	10.26	4.22	3	2	2	3
2	D	33.10	30.28	4.68	2	2	2	1
3	S	22.44	15.31	2.39	3	2	1	2
4	D	37.88	31.10	10.19	1	2	2	1
8	D	40.70	31.50	15.60	1	1	2	1
10	S	17.24	8.00	4.60	2	2	2	2
11	S	12.01	10.00	6.00	1	1	1	1
12	D	26.26	32.00	16.00	2	1	1	1
13	D	33.90	29.99	11.46	2	2	1	2
14	D	35.33	33.61	2.58	1	2	1	1
15	D	30.88	33.37	13.94	1	1	1	3

Referencias: D= dominante; S= Suprimido

Los materiales de análisis (hojas) se colocaron en bolsas plásticas debidamente identificadas y se mantuvieron en hielo en el campo hasta su envío, ese mismo día, al laboratorio de la cátedra de Silvicultura; allí el material fue almacenado de la siguiente forma: una parte fue congelada con nitrógeno líquido y colocada a -70° en bolsas plásticas y otra parte fue conservada a 4° C durante la semana en la cual se llevaron a cabo los análisis.

a) Isoenzimas

De los buffers utilizados para la extracción de las enzimas el más adecuado para este tipo de tejidos. Se consideró que el Tris/Cl fue el más apropiado. Como sustancias acomplejantes se utilizaron el B-mercaptoetanol, Polivinil pirrolidona (PVP), Etilen diamino tetracético (EDTA). Dados los resultados obtenidos se debería seguir investigando la forma de lograr un homogenato apropiado para una mejor resolución de los zimogramas, tratando de reducir el efecto de las sustancias que interfieren en la separación de las proteínas como los fenoles y quinonas.

Para la preparación del homogenato se mezclaron aproximadamente, 30 mg de tejido foliar fresco con unas pocas gotas del buffer de extracción (100 ml Tris/HCl pH 7.5, 1% w/v PVP soluble (PM 25.000), 0.5 mM EDTA, 1 ml b-mercaptoethanol). La homogeneización se llevó a cabo en policubetas de vidrio. Para mantener el homogenato refrigerado la policubeta se colocó sobre hielo. Para la siembra se prepararon mechas de papel Whatman n° 3 (4 x 8 mm).

Para la realización de la electroforesis se realizaron ensayos con diferentes sistemas buffers, sistemas isoenzimáticos, concentraciones de almidón y condiciones de corrida optándose con la metodología que se detalla a continuación.

Para las isoenzimas SKDH (Shikimate dehydrogenase), MDH (Malate dehydrogenase) e IDH (Isocitrate dehydrogenase) se utilizó el sistema continuo Tris Cítrico de pH 7,2 (Soltis, 1983), y para la separación de APH (Acid phosphatase) y 6-PGDH 6-phosphogluconate dehydrogenase) se utilizó el sistema discontinuo Acido bórico-Hidróxido de Litio de pH 8,3 (Soltis, 1983).

Los geles fueron preparados con almidón con una concentración del 11%. La electroforesis fue conducida durante 4 horas a 75 mA constantes en refrigerador. También se ensayaron otras concentraciones de almidón y condiciones de corrida que no presentaron mejores resultados. Las soluciones de tinción fueron preparadas según protocolos de Cheliak & Pitel. Se fijaron en una solución de glicerol, ácido acético, agua y etanol.

En los ensayos se utilizó material almacenado bajo diferentes condiciones, en heladera a 4°C y en freezer a -70°C.

b) Marcadores moleculares RAPD.

Se procedió a amplificar a partir de ADN genómico diversos fragmento que luego se separaron en geles de agarosa al 2 % por electroforesis sumergida y tinción con bromuro de etidio bajo luz UV (FERREYRA & GRATAPAGLIA, 1996)

La extracción de ADN se realizó a partir de tejido foliar de plantas seleccionadas empleando el método CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987) modificado (CTBA buffer, lavado con cloroformo isoamilacohol, precipitación con isopropanolacetato.

La amplificación se efectuó con una termocicladora Thermolyne Temptronic con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 92 °C durante 5'; 45 ciclos a 92 °C por 1 ' y 72 °C por 2', finalizando con una extensión a 72° C por 5'.

Los productos de amplificación se resolvieron en presencia de un marcador de peso molecular Promega Biotech en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV.

La estimación de los fragmentos de ADN se realizó con el programa SigmaGel.

Para el procesamiento informático de los datos se recurrió al programa NTSyS.

A partir de los resultados se generó una matriz de similitud empleando el coeficiente de asociación de Simple Matching.

A partir de los resultados se generó una matriz de similitud empleando el coeficiente de asociación de Jaccard. Mediante el método UPGMA se generaron los correspondientes fenogramas y también se realizó un análisis de escalas multidimensionales (MDS).

RESULTADOS

El material almacenado bajo diferentes condiciones, en heladera a 4°C y en freezer a -70°C no presentó diferencias.

Los sistemas de mejor resolución fueron:

SKDH: se observó una zona de actividad a los 2,5 cm de la siembra que no presentó diferencias entre los genotipos ensayados.

MDH: esta enzima no presentó diferencias entre los genotipos evaluados.

IDH: La zona de actividad no presentó polimorfismo y se localizó a los 2,4 cm de la siembra.

6- PGDH: se revelaron 2 zonas una claramente monomórfica a 1,5 cm de la partida y otra no tan clara a los 3,5 cm que no permitió identificar diferentes fenotipos isoenzimáticos

ACP: La zona de actividad se presentó entre 1 - 2 cm siendo la misma muy tenue no permitiendo diferenciar fenotipos isoenzimáticos.

Debido a la falta de resolución de los sistemas isoenzimáticos analizados bajo diferentes condiciones se procedió a la utilización de técnicas moleculares más complejas.

La síntesis de procedimientos rescatados del análisis de los árboles de *Eucalyptus globulus* con marcadores RAPD fueron:

Tabla 2- Marcadores RAPD's. Síntesis de procedimientos.
RAPD's markers. Procedure synthesis

Número Total de Primers	25
Número de Primers Polimórficos	9
Primers Polimórficos Seleccionados	6
Total de Bandas Polimórficas Analizadas	17
Promedio de Bandas Polimórficas por Primer	3
Tamaño de las Bandas Amplificadas	450- 1550
	pb
Porcentaje de Primers Polimórficos	35 %

Es importante aclarar que en el análisis de los datos no se incluyeron las bandas presentes en todos los individuos, esto lo único que altera en el análisis es el valor del índice de similitud que debido a lo expuesto fue menor. Sin embargo, el análisis del conjunto de las bandas generadas con los primers polimórficos, mostró que cada individuo tuvo un genotipo propio.

El análisis de los resultados se realizó utilizando dos índices: el Índice de Jaccard y el Índice de Single Matching.

La diferencia de estos dos índices es que el Índice de Single Matching le da igual peso a las dobles ausencias o a las dobles presencias, tomando a esto como una similitud entre individuos. El Índice de Jaccard no le da peso a las dobles ausencias, es decir las dobles ausencias no generan similitud.

Los agrupamientos generados con estos dos índices fueron distintos. Con el coeficiente de Jaccard el árbol que se generó tiene una menor distorsión puesto que su CCC fue de 0,72. Este árbol agrupó a los individuos en tres grandes clusters, un primer cluster que

incluyó a los individuos 1 y 12. Un segundo cluster contiene a los individuos 2, 8, 4, 15, 10 y 14 y, finalmente un tercer grupo con tres individuos 3, 13 y 11.

El agrupamiento realizado con el índice de Single Matching como era esperable, generó un coeficiente de similitud mas alto entre los individuos debido a que como se aclaró precedentemente debido a la consideración de las dobles ausencias.

El agrupamiento debido a este índice mostró una mayor distorsión entre la matriz y el fenograma, el CCC fue de 0,67. En relación a los agrupamientos se detectaron dos grupos, uno que incluyó los individuos 1, 3, 13, 10 y 14; otro grupo que incluyó a los individuos 2, 4, 8, 15 y 12 y un tercer grupo formado por un solo individuo el 11.

CONCLUSIONES

El material almacenado bajo diferentes condiciones, en heladera a 4°C y en freezer a -70°C no presentó diferencias.

Los sistemas isoenzimáticos analizados no permitieron establecer diferencias entre los individuos evaluados.

Los RAPD permitieron generar genotipos que fueron únicos para cada individuo ensayado.

El agrupamiento de los individuos en sus categorías sociales, dap, altura total, rectitud de fuste, grosor de rama, abundancia de rama y ángulo de inserción, no se correspondió con el agrupamiento de los marcadores moleculares.

BIBLIOGRAFÍA

CHELIAK, W. M.; Pitel, J.A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report PI-X-42. Petawawa National Forestry Institute. Canadian Forestry Service. Agriculture Canada. pp 49.

DOYLE, J. J.; Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, pp 13-15

FERREIRA, M. E.; Grattapaglia D. 1996. Introducao ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa. Brasilia, pp 221.

SOLTIS, D. E.; Hanfler H.; Darrow, D.C.; Gastony G.J. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and eletrode buffers and staining schedules. Amer. Fern. J. 73, pp 9-27.