

EN PINOS Y EUCALIPTOS

Marcadores moleculares para el mejoramiento genético forestal

Foto 1

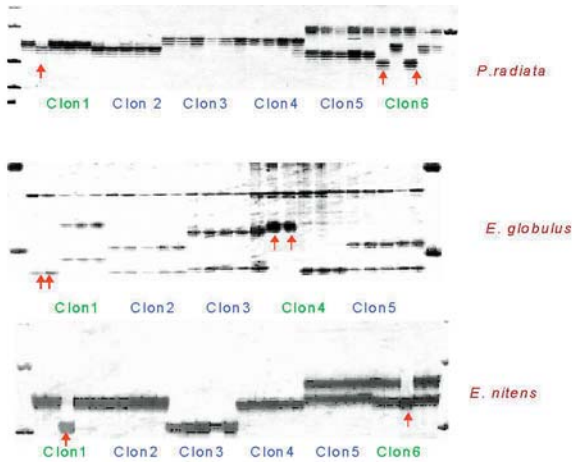


Foto 2

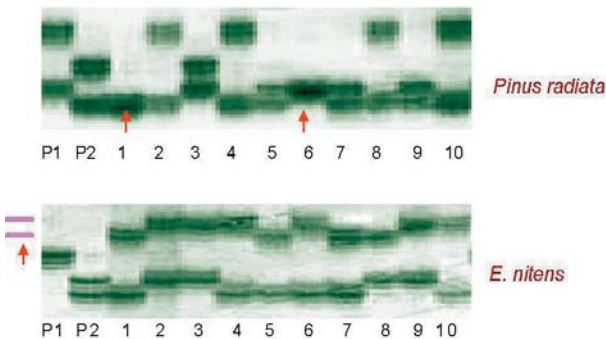


Foto 3

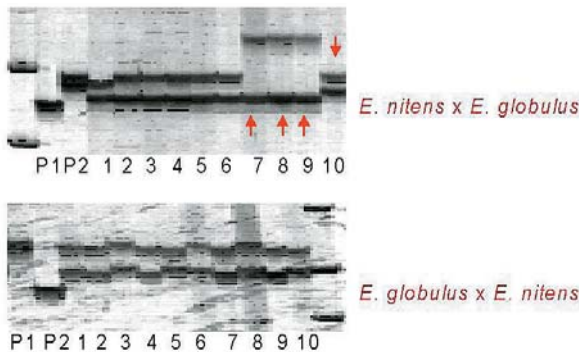


Foto 1. Identificación de clones en *Pinus radiata*, *Eucaliptus globulus* y *E. nitens* mediante microsatélites. Foto 2. Identificación de híbridos en cruzamientos controlados interespecíficos de *E. nitens* x *E. globulus* y de *E. globulus* x *E. nitens* mediante microsatélites. Foto 3. Identificación de híbridos en cruzamientos controlados de *Pinus radiata* y *E. nitens* mediante microsatélites.

Viviana Becerra V.
Ingeniera Agrónoma, M.Sc.
vbecerra@quilamapu.inia.cl

Marío Paredes C.
Ingeniero Agrónomo, Ph.D.

Carmen Rojo M.
Ingeniera Agrónoma

INIA Quilamapu

En los últimos 20 años el sector forestal chileno ha experimentado un crecimiento acelerado, lo que se ha traducido en una importante superficie plantada de bosques y una comercialización de diversos productos en el país y en el extranjero. Este desarrollo forestal está basado fundamentalmente en pino (*Pinus radiata*) y eucalipto (*E. globulus* y *E. nitens*) que poseen 1,4 millones y 330 mil hectáreas plantadas, respectivamente. El total de hectáreas plantadas de eucalipto se distribuye en un 70% de *E. globulus* y en un 30% de *E. nitens*. Ambas especies se complementan muy bien en sus requerimientos de sitio, rotaciones, productos generados y mercados.

A pesar de este buen pie, hay interés por mejorar el comportamiento silvícola de *E. globulus*, introduciéndole genes de interés de otras especies, tales como *E. nitens*, *E. gunni*, *E. viminalis* y *E. saligna*.

En la actualidad, en nuestro país existen varias empresas forestales con programas de mejoramiento genético, cada uno de los cuales tienen diferentes enfoques y grados de desarrollo. Desde el punto de vista técnico, una de las posibilidades de aumentar la productividad del rubro es lograr una mayor eficiencia de estos programas a través de diferentes estrategias. Por ejemplo, se estiman ganancias genéticas de un 8% al usar material generado en un área productora de semillas, 15% en huertos semilleros de polinización abierta, un 25% en cruzamientos

controlados y un 40% en la silvicultura clonal. Los programas de mejoramiento genético involucran decisiones de largo plazo y una gran inversión en recursos físicos, humanos y económicos que están asociadas a un riesgo. En este sentido, el empleo de algunas herramientas biotecnológicas, como el uso de los marcadores moleculares (microsatélites) en mejoramiento genético forestal, podría contribuir al logro de tan preciado objetivo.

En los últimos años, la utilización de los marcadores bioquímicos y moleculares ha adquirido una gran importancia en los programas de mejoramiento y producción de semillas de especies forestales, en aspectos tales como estimación de diversidad genética, diferenciación entre clones, híbridos, determinación de parentesco en cruzamientos controlados, construcción de mapas genéticos, localización de genes de importancia silvícola, intercambio de genes entre especies y otras.

Actualmente, los programas de mejoramiento genético forestal en Chile no utilizan los marcadores bioquímicos y/o marcadores moleculares (Paredes y otros, 1999, Tierra Adentro 25: 26-28). Sin embargo, la aplicación de esta herramienta podría potenciar el incremento de la eficiencia en los procesos de selección de los programas de mejoramiento, incrementando el control y la calidad de los productos generados.

Beneficios de los marcadores

En una primera etapa, la aplicación de los marcadores moleculares en un programa de mejoramiento genético puede ayudar en:

- La identificación genética-molecular de clones producidos por los programas de mejoramiento. Esta información es de gran utilidad en el proceso de propagación clonal,

La identificación inadecuada del material genético puede traer serias consecuencias en el cumplimiento de las metas de los programas de mejoramiento.

planificación de las plantaciones operacionales (plantación de un clon en forma masiva, del que será el bosque) y selección de clones para plantaciones en mosaico (corresponde a la plantación operacional de varios clones, separados entre ellos, pero dentro de un mismo sector). Además favorece y controla el intercambio de material genético entre las empresas nacionales y extranjeras (con lo que se evitan duplicidades), estimula la apropiación de clones elites generados por las diversas empresas, e impulsa la certificación de calidad del material genético producido por los programas de mejoramiento forestal.

• La identificación de híbridos provenientes de programas de cruzamientos controlados, intra (pino y eucalipto) e interespecíficos (eucalipto). La no-discriminación o identificación inadecuada del material genético puede traer serias consecuencias en el cumplimiento de las metas planteadas en los programas de mejoramiento genético, con las consiguientes pérdidas económicas para las empresas. Por ejemplo, si se identifica material autofecundado significa que el cruzamiento dirigido no fue exitoso, y estaremos seleccionando o usando algo que no es un híbrido. También la presencia de material polen contaminante y errores en el etiquetado son problemas comunes en diferentes programas de cruza controladas, que resultan difíciles de detectar mediante la inspección visual de los árboles. La aplicación de marcadores moleculares podría permitir la eliminación temprana del material no deseado, y la intensificación del trabajo en el material adecuado, para, de esta manera, ahorrar importantes recursos.

Estimaciones realizadas por algunas empresas forestales indican pérdidas en: a) volúmenes de madera (m^3) al final de

la rotación por mala identificación de material del mismo tipo; b) ganancia genética por el uso de material de inferior calidad producto de contaminación, que puede variar de un 5 a un 15%; c) ganancia para híbridos (10% en productividad de m^3) por mortalidad y mal crecimiento de los que no son híbridos; y d) pérdidas importantes de recursos por la mantención en jardines de materiales genéticamente vinculados o duplicados (5 a 10%).

Proyecto en ejecución

Actualmente se encuentra en ejecución el proyecto "Desarrollo e implementación de herramientas morfológicas, bioquímicas y moleculares para la caracterización y certificación de material genético forestal" (FDI-INIA-BIOFOREST-CMGF). Su objetivo general es definir bases técnicas metodológicas para el desarrollo e implementación de herramientas moleculares para la caracterización de material genético forestal que podría ser usado en un programa de certificación de semillas.

Los objetivos específicos son:

- Evaluar marcadores moleculares que permitan discriminar el material genético generado en los programas de mejoramiento: clones y familias de cruzamientos intra (pino y eucaliptos) e interespecíficos (eucaliptos).
- Evaluar el costo/beneficio de los diferentes tipos de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento y certificación genética de las empresas.
- Validar la identidad genética del material establecido de pino y eucalipto.
- Transferir la tecnología a las empresas del sector.

Resultados

Entre los resultados más significativos destacan:



En la actualidad, en nuestro país existen varias empresas forestales con programas de mejoramiento genético.

Identificación de clones: por definición un clon es un grupo de individuos idénticos genéticamente. En la foto 1 (página 45) se muestra el resultado del análisis genético-molecular de seis clones en *Pinus radiata* y *Eucalyptus nitens*, y de cinco clones en el caso de *E. globulus*, con cinco individuos por clon mediante un microsatélite. Se pudo constatar que ciertos clones (en verde) presentan individuos con un patrón de bandas diferente (flecha roja) y que, por lo tanto, corresponden a contaminantes dentro de ese clon. Por ejemplo, en el caso de *P. radiata* los clones 1; 2; 5 y 6 presentan patrones de bandas diferentes, vale decir, se pueden diferenciar entre ellos, mientras que el clon 3 y el 4 son iguales. Sin embargo, con un segundo microsatélite se logró diferenciar genéticamente entre estos clones. La variación dentro y entre clones no puede ser analizada a través de la morfología de la planta.

Identificación de híbridos y posibles fuentes de error en el programa de cruzamientos controlados intraespecíficos.

Al conocer genéticamente los progenitores de un cruzamiento controlado, se puede constatar en la progenie (híbridos) si los individuos corresponden o no al cruzamiento dirigido. El híbrido, para que sea considerado como tal, debe contar con un alelo (banda única) de origen materno (P1) y otro paterno (P2). Por ejemplo, en la foto 2 (página 45) se observa en *P. radiata* que dentro de la progenie producto de un cruzamiento, el individuo 1 no tiene ningún alelo materno, es decir, no pertenece a la familia de estos dos progenitores. Por otro lado, el individuo 6 tiene el alelo materno, pero no contiene ningún alelo paterno; por lo tanto, hubo contaminación con polen de otro individuo.

El proyecto contribuirá a obtener mayores ganancias genéticas y evitar la vulnerabilidad del material genético producido.

En el caso de *E. nitens* se observa que la madre (P1) tiene una banda única (alelo), y el padre (P2) tiene dos bandas. El análisis de la progenie indica que ningún individuo tiene los alelos de los padres, por lo que no son producto de este cruzamiento. Sin embargo, en el análisis del clon madre (P1) se detectó un segundo patrón que presentó dos bandas (señalados en rosado). Si consideramos este segundo patrón como el correcto para la madre (P1), podríamos decir que la progenie analizada está correcta. En este caso, la técnica pudo detectar cuál es la madre correcta de esta progenie.

Identificación de híbridos y posibles fuentes de error en el programa de cruzamientos controlados interespecíficos de eucalipto.

El cruzamiento interespecífico está siendo usado en los programas de cruzamiento de eucalipto para la introducción de genes específicos. Sin embargo, la incompatibilidad entre las especies puede ser una barrera difícil de abordar para obtener una progenie fértil. Por ello, el determinar si una cruce fue efectiva entre

PARTICIPANTES Y FINANCIAMIENTO

En el proyecto participa un grupo interdisciplinario formado por Viviana Becerra, Mario Paredes, Carmen Rojo, Rodrigo Avilés (INIA); Claudio Balocchi, Jaime Zapata, Christian De Veer (Bioforest); y Fernando Droppelmann (Cooperativa de Mejoramiento Genético Forestal).


El Financiamiento responde a fondos FDI-Corfo, INIA, Bioforest y Cooperativa de Mejoramiento Genético Forestal (CMGF).

dos especies es un aspecto clave dentro de un programa de mejoramiento genético. En el caso de un cruzamiento de *E. nitens* x *E. globulus* (foto 3), se observa que los primeros seis individuos están correctamente asignados al cruzamiento, mientras que tres de ellos presentan el alelo materno y la intervención de polen foráneo (polen contaminante). El último individuo tiene un genotipo ajeno al grupo, considerando que la semilla se cosecha a partir de la madre. El individuo debiera tener a lo menos un alelo materno.

Por otro lado, en el cruzamiento recíproco entre *E. globulus* x *E. nitens* ninguno de los individuos considerados como progenie es tal. En todos ellos existe un alelo materno, pero el paterno indica que el polen es de otro individuo.

En resumen, el proyecto planteado contribuirá a:

- Incorporar nuevas herramientas tecnológicas que permitan mejorar la eficiencia y el control en la generación y venta de material de alta calidad.
- Seleccionar material diverso y adecuado a ser usado en los programas de mejoramiento genético.
- Obtener mayores ganancias genéticas y evitar la vulnerabilidad del material genético producido.
- Reducir los costos de mantención.
- Aumentar la rentabilidad de las empresas y del sector forestal.

El proyecto está en ejecución, por lo cual falta el estudio económico, que se dará a conocer en su oportunidad. 



Plantación de eucalipto con población heterogénea.