



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Forestales-Programa de Magister en Ciencias Forestales

**ANÁLISIS BAYESIANO DE *LOCI* DE CARACTERÍSTICAS
CUANTITATIVAS EN FAMILIAS DE *Eucalyptus cladocalyx*, BAJO
CONDICIONES ÁRIDAS DEL NORTE DE CHILE**



PAULINA ANDREA BALLESTA MUÑOZ

CONCEPCIÓN-CHILE

2013

Profesor Guía: Dr. Freddy Mora Poblete
Instituto de Biología y Biotecnología vegetal,
Universidad de Talca

Análisis Bayesiano de *loci* de características cuantitativas en familias de *Eucalyptus cladocalyx*, bajo condiciones áridas del norte de Chile

Comisión Evaluadora:

Freddy Mora Poblete (Profesor guía)
Ingeniero Forestal, Dr.

Eduardo Ruiz Ponce (Profesor co-guía)
Biólogo, Dr.

Fidelina González Muñoz (Profesor Asesor Externo)
Bióloga, Dra.



Director(a) de Postgrado:

Darcy Ríos Leal
Prof. Biología y Química, Dra.

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Manuel Sánchez Olate
Ingeniero Forestal, Dr.

AGRADECIMIENTOS

En este apartado, quiero dar mis más sinceros agradecimientos a las personas que me apoyaron en el desarrollo de este trabajo. A mi profesor guía, el Sr. Freddy Mora Poblete, quién después de acompañarme en mi pregrado, se aventuró a apoyarme en esta segunda etapa de estudios, le agradezco su calidad de persona y profesional.

A mi otro profesor guía, el Sr. Eduardo Ruiz Ponce por su excelente disposición para ayudarme a estructurar mi trabajo, y proporcionarme los espacios físicos que me permitieron obtener resultados. A la profesora, la Sra. Fidelina González, quién gustosamente accedió a participar como una de mis tutoras en este proyecto. Al equipo del Laboratorio de Sistemática Molecular, de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, en especial a las Srtas. María Graciela Torres y Glenda Fuentes; por proporcionarme todos los medios posibles para realizar mis actividades, y en particular, por el excelente trato humano como equipo hacia las nuevas personas que nos incorporamos a trabajar.

A la Sra. Darcy Ríos, y a la Sra. Blanca Retamal, ambas de la Facultad de Ciencias Forestales, por todas las facilidades que me dieron para poder terminar mi trabajo, y su constante apoyo en el desarrollo de mi tesis, y a lo largo de mis años de estudio.

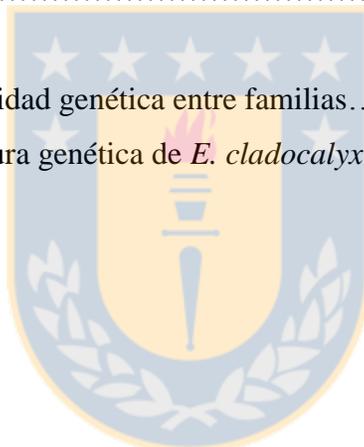
A mis padres, por una vez más apoyarme y comprender el significado de este fortalecimiento profesional. A mi hermana y a mis amigos, quienes me dieron confianza en mí misma para alcanzar mis metas en este trabajo, y en el desarrollo de toda mi carrera profesional. A mis compañeros y amigos Rodrigo Contreras y Felipe Vargas, por toda su ayuda en la ejecución de mi trabajo, y lo más importante todavía, por su apoyo emocional para no quebrarme ante las dificultades. A la Srta. Isabel Carrillo, compañera y amiga, quien me proporcionó su ayuda en la última etapa de ejecución de trabajo.

Por último, agradecer al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT; N° 1130306), el cual se adjudicó al Sr. Freddy Mora, por el financiamiento para este trabajo y mis estudios.

INDICE DE MATERIAS

CAPITULOS	PAGINA
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUCCION.....	10
II. REVISION DE LITERATURA.....	13
2.1 Género <i>Eucalyptus</i> en el sector forestal chileno.....	13
2.1.1 <i>Eucalyptus cladocalyx</i> F. Muell.....	14
2.2 Importancia de la diversidad genética en el mejoramiento vegetal.....	18
2.3 Relación entre variabilidad fenotípica y genética: Detección de <i>Loci</i> de caracteres cuantitativos (QTLs).....	19
2.4 El efecto de la estructuración genética de poblaciones en la detección de QTLs.....	21
2.5 Detección de QTLs en el género <i>Eucalyptus</i>	23
2.6 Planteamiento del problema a investigar y aspectos nuevos a tratar en la propuesta.....	24
III. HIPOTESIS DE ESTUDIO.....	26
IV. OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1 Ensayo y mediciones fenotípicas.....	28
5.2 Análisis de marcadores moleculares y estructura genética.....	29
5.3 Análisis de asociación fenotipo y genotipo.....	31
VI. RESULTADOS.....	34
6.1 Variabilidad fenotípica familiar.....	34

6.2	Patrones de variabilidad genética.....	35
6.3	Análisis de estructura genética de <i>E. cladocalyx</i>	35
6.4	Análisis de asociación de marcadores y características complejas.....	37
VII.	DISCUSION.....	40
7.1	Variabilidad fenotípica de <i>E. cladocalyx</i> para características complejas.....	40
7.2	Asociación de marcadores y caracteres de crecimiento.....	40
7.3	Asociación de marcadores y componentes de floración.....	42
7.4	Asociación de marcas moleculares y capacidad de sobrevivencia en condiciones áridas del norte de Chile.....	44
7.5	Efecto de la estructura genética de poblaciones en la detección QTLs.....	46
VIII.	CONCLUSIONES.....	47
IX.	BIBLIOGRAFIA.....	48
ANEXO I:	Patrones de variabilidad genética entre familias.....	70
ANEXO II:	Análisis de estructura genética de <i>E. cladocalyx</i>	71



INDICE DE TABLAS

TABLA N°		PAGINA
<u>En el texto</u>		
1.	Procedencias de <i>E. cladocalyx</i>	29
2.	Partidores ISSR, secuencias y temperaturas de alineamiento.....	31
3.	Cuadro de selección de modelo basado en criterio BIC.....	34
4.	Productos de amplificación para cada partidor ISSR.....	35
5.	Grados de pertenencia de cada procedencia a un determinado grupo.....	36
6.	Análisis de varianza molecular entre procedencias de <i>E. cladocalyx</i>	36
7.	Análisis pareado de índices de diferenciación entre procedencias.....	36
8.	<i>Loci</i> asociados a características fenotípicas de estudio.....	38-39
9.	Falsos positivos de asociación.....	39



RESUMEN

Eucalyptus cladocalyx F. Muell es una especie endémica del sur de Australia, la cual se introdujo en Chile con el fin de abastecer recursos madereros y melíferos en regiones de condiciones extremas para el cultivo de especies forestales. En Australia, la especie ha sido incorporada en programas de mejoramiento, dado que es sustentable en zonas con bajos régimen hídricos anuales (áridas y semiáridas), y medianamente tolerante a la salinidad. Varios estudios indican que diferentes procedencias naturales de la especie poseen un comportamiento fenotípico diferencial en cuanto a caracteres de crecimiento, componentes de la floración, y propiedades de la madera. Esta información es de suma relevancia ya que permite entender el potencial de los recursos genéticos que dispone Chile para el mejoramiento en la especie. En adicción, varios trabajos han reportado que las procedencias de *E. cladocalyx* están genéticamente diferenciadas y estructuradas. Por un lado, esto genera la oportunidad de entender que la variabilidad fenotípica de *E. cladocalyx* puede correlacionarse con su variabilidad genética. En este contexto, los marcadores moleculares y mapas genéticos ofrecen nuevas oportunidades para estudiar la genética de los caracteres cuantitativos e incrementar la eficiencia en la selección fenotípica. Sin embargo, se sabe que el efecto de estructura genética puede generar falsas asociaciones entre marcadores y fenotipo, lo cual representa una limitante para *E. cladocalyx*. En el presente estudio, cuarenta y cinco familias de medios hermanos de *Eucalyptus cladocalyx*, establecidas en la comunidad agrícola de Tunga Norte (Illapel, Chile), fueron usadas para detectar regiones genéticas asociadas a características fenotípicas (altura, DAP, rectitud de fuste, intensidad de floración, sobrevivencia, precocidad de floración, capacidad reproductiva, y floración tardía). La diversidad genética presente en el ensayo permitió encontrar veintidós *loci* asociados a los ocho caracteres estudiados, los cuales explicaron entre un 7 – 22 % de la variación fenotípica. Varios *loci* pudieron ser asociados para más de un carácter fenotípico. En particular, un fragmento de 450-500 pb generado por el partidor ISSR UBC810 fue asociado a cinco de los caracteres estudiados. Por otro lado, cuatro *loci* se reportaron como falsos positivos de asociación debido al efecto de estructura genética de *E. cladocalyx*. En conclusión, los resultados de este estudio indican que los recursos genéticos de *E. cladocalyx* disponibles en Chile son genética y fenotípicamente variables, por lo tanto es posible detectar *loci* candidatos que puedan asistir la

selección fenotípica en la especie. Por otro lado, la estructuración genética de *E. cladocalyx* es un factor a considerar en los futuros análisis de asociación fenotipo-genotipo.



ABSTRACT

Eucalyptus cladocalyx F. Muell is an endemic tree from southern Australia, which was introduced to Chile in order to supply wood and honey resources in regions of extreme conditions for growing of forest species. In Australia, the species has been incorporated into breeding programs, since it is sustainable in zones with low annual water regime (arid and semiarid), and moderately tolerant to salinity. Several studies indicate that different natural provenances have a differential phenotypic behavior in terms of growth traits, flowering components, and wood properties. This information is very important because it allows to understand the potential of genetic resources available in Chile for improve the species. In addition, several studies have reported that the provenances of *E. cladocalyx* are genetically differentiated and genetically structured. On one hand, this generates the opportunity to understand that the phenotypic variability of *E. cladocalyx* can be correlated with its genetic variability. In this context, molecular markers and genetic maps offer new opportunities to study the genetics of quantitative traits and increase the efficiency of phenotypic selection. However, it is known that the effect of the genetic structure can generate false associations between markers and phenotype, which is a limitation for *E. cladocalyx*. In this study, forty-five half-sib families of *E. cladocalyx*, established at the farming community of Tunga Norte (Illapel, Chile), were used to detect genetic regions associated to phenotypic characteristics (Height, DBH, stem straightness, flowering intensity, survival, early flowering, reproductive capacity and late flowering). The genetic diversity present in the assay allowed finding twenty two *loci* associated with eight traits studied, which explained a range of 7 – 22% of the phenotypic variation. Several *loci* could be associated for more than one phenotypic character. In particular, a 450 – 500 pb fragment generated by the ISSR UBC810 primer was associated with five phenotypic traits. Moreover, four *loci* were reported as false positives of association due to the effect of genetic structure of *E. cladocalyx*. In conclusion, the results of this study indicate that the genetic resources of *E. cladocalyx* available in Chile are genetically and phenotypically variables, therefore is possible to detect candidate *loci* that can assist the phenotypic selection in the species. Furthermore, the genetic structure of *E. cladocalyx* is a factor that must to be considered in the further analysis of phenotype-genotype association.

CAPÍTULO I: INTRODUCCION

Eucalyptus cladocalyx F. Muell es una especie endémica del sur de Australia, la cual se introdujo a Chile con fines madereros y melíferos (MORA et al., 2009) en regiones con baja ocurrencia de precipitaciones anuales. En Australia, la especie ha sido incorporada en programas de mejoramiento, dado que es sustentable para las zonas áridas y semiáridas (HARWOOD et al., 2007). Además, es reconocida en su género como la especie de mayor durabilidad natural de madera frente a la bio-deterioración (STANDARS AUSTRALIA, 2005), posee una densidad de madera en la madurez de 1.1 Kg m^{-3} (12 % de humedad; ROB, 2004), produce una excelente madera aserrada (CLARKE et al., 2009), y se ha visto que su floración es abundante y duradera, lo cual ha sido bien valorizado en la industria de la miel. Varios estudios indican que diferentes procedencias naturales de la especie poseen un comportamiento fenotípico diferencial en cuanto a caracteres cuantitativas complejas, como las relacionadas al crecimiento (MORA et al., 2009; MCDONALD et al., 2003), componentes de la floración (MORA et al., 2007, MORA et al., 2009, CANÉ-RETAMALES et al., 2011; CONTRERAS-SOTO et al., 2011), y propiedades de la madera (BUSH et al., 2011).

La selección de individuos basada en la información fenotípica de caracteres cuantitativos, que incluye informaciones de pedigrí, ha sido la estrategia más común en el mejoramiento genético forestal (TSAROUHAS et al., 2002). Una selección temprana podría ser una interesante oportunidad para el mejoramiento genético forestal debido a los largos periodos de espera entre generaciones de árboles (NEALE et al., 1992). En este contexto, los marcadores moleculares y mapas genéticos ofrecen nuevas oportunidades para estudiar la genética de los caracteres cuantitativos (TSAROUHAS et al., 2002). La selección asistida por marcadores (SAM) implica el uso de la presencia o ausencia de un marcador como un sustituto para asistir a una selección fenotípica, y de esta manera hacer la selección más eficaz, eficiente, confiable y rentable en comparación con estrategias convencionales de mejoramiento (COLLARD et al., 2005). Los marcadores moleculares podrían ser usados para incrementar la eficiencia en la selección fenotípica de características con baja heredabilidad, lo cual es común para características cuantitativas debido a la influencia del medioambiente. Los *loci* de características cuantitativas

(*Quantitative trait loci*; QTL) son regiones en el genoma responsables de la variación de una característica cuantitativa (DOERGE, 2002). En general, se asume que las características cuantitativas tienen herencia poligenética, y por tanto son más complejas de estudiar que caracteres oligogénicos. Diversos estudios han demostrado la aplicabilidad de la detección de QTLs asociados características de crecimiento y adaptación en especies arbóreas (BRADSHAW y STETTLER, 1995; GRATTAPAGLIA et al., 1995, 1996; HURME et al., 2000; ZHANG et al., 2006; RAE et al., 2008; DILLEN et al., 2009). En el género *Eucalyptus* se han reportado varios estudios de selección asistida por marcadores, incluyendo caracteres de crecimiento (GRATTAPAGLIA et al., 1996, VERHAEGEN et al., 1997, FREEMAN et al., 2009; FREEMAN et al., 2011, THUMMA et al., 2010a, VERHAEGEN et al., 1997, KULLAN et al., 2011), propiedades de la madera (THAMARUS et al., 2004; FREEMAN et al., 2009, FREEMAN et al., 2011, THUMMA et al., 2010b, KULLAN et al., 2011), propiedades de fibra celulosa (THAMARUS et al., 2004), resistencia a estrés abiótico (BYRNE et al., 1997), resistencia a enfermedades (JUNGHANS et al., 2003), y componentes de floración (MISSIAGGIA et al., 2005). La estrategia de análisis vía pseudo-testcross es el método que mayormente ha sido aplicado en especies forestales para mapeo y detección de QTL (GRATTAPAGLIA y SEDEROFF, 1994). Sin embargo, un factor importante que actualmente está siendo considerado es el efecto de la estructuración genética de poblaciones, el cual puede generar QTLs falsos positivos (BALDING, 2006; THUMMA et al., 2005). El mapeo asociativo o de desequilibrio de ligación (DL) permite disminuir los efectos de estructura y parentesco en la detección de QTL, y aprovecha las relaciones históricas entre fenotipo y marcas moleculares en base al DL (CARDON y BELL, 2001; FLINT-GARCIA et al., 2003). En contraste con los métodos de recombinación, el método DL puede reflejar el efecto de las recombinaciones que están ocurriendo entre individuos no relacionados, en varias generaciones (ARANZANA et al., 2005), y reduce el tiempo de investigación y seguimiento, ya que no necesita poblaciones de cruzamientos controlados o líneas puras (SIMKO et al., 2004). Esta metodología ha sido aprovechada en especies arbóreas como pináceas (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2007,2008), mirtáceas (THUMMA et al., 2005; KÜLHEIM et al., 2011), y *Populus tremula* (INGVARSSON, 2008).

En ensayos de progenie de *E. cladocalyx* establecidos en las zonas áridas de Chile, se ha observado que las características en crecimiento, componentes de floración y sobrevivencia han

sido moderada a altamente heredables (MORA et al., 2009; VARGAS-REEVE et al., 2013; CANE-RETAMALES et al., 2011; MORA et al., 2009), indicando altas posibilidades de encontrar regiones genómicas relacionadas con la variación fenotípica de la especie. Los trabajos de Bush y Thumma (2013), Steane et al. (2011), y McDonald et al. (2003), mediante SNPs (*Single-nucleotide polymorphism*), DArts (*Diversity Arrays Technology*) y marcadores isoenzimáticos, respectivamente, reportaron una significativa diferenciación y estructuración genética entre diferentes procedencias naturales y cultivadas de *E. cladocalyx*. Por un lado, esta variabilidad entre procedencias es un punto de partida para relacionar fenotipos y genotipos específicos, no obstante, como se mencionó anteriormente, el efecto de estructuración genética podría tener un rol importante al identificar regiones genéticas asociadas a un fenotipo en *E. cladocalyx*.

El presente estudio tuvo como objetivo detectar marcadores moleculares inter-microsatélites (ISSR) asociados con características fenotípicas complejas en cuarenta y cinco familias de *E. cladocalyx*, usando modelos de asociación Bayesiano que incluyen el efecto de la estructura genética. Las siguientes hipótesis fueron abordadas en el presente estudio: (1) La variabilidad fenotípica de *E. cladocalyx* está correlacionada con sus patrones de variabilidad genética, lo cual permite detectar *loci* asociados a características cuantitativas (2) La incorporación de la estructura genética poblacional en el modelo de asociación Bayesiano permite la eliminación de asociaciones falsas positivas.

CAPITULO II: REVISION DE LITERATURA

2.1 Género *Eucalyptus* en el sector forestal chileno.

Un importante número de especies del género *Eucalyptus* se caracterizan por ser de gran productividad, y proporcionan materiales de alta calidad pulpable, maderera, y energética (GRATTAPAGLIA y KIRST, 2008). Además, poseen gran adaptabilidad a varios tipos de ambientes, aunque poseen una reducida distribución en regiones de bajas temperaturas (PAINE et al., 2011). El género abarca más de 700 especies, incluyendo a los subgéneros *Corymbia* (70 spp aprox), *Eucalyptus* (110 spp) y *Symphyomyrtus* (500 spp) (MERCHANT et al., 2006). La mayoría de estas especies son nativas de Australia, Papua (Indonesia), y Filipinas (TURNBULL, 2000), pero también han sido establecidas como plantaciones comerciales y ornamentales en otros países como Nueva Zelanda, EE.UU (Hawaii, California, Florida), Sudáfrica, Etiopía, Brasil, Portugal, España y Chile (RUTHROF et al., 2003). El 13,5% de los bosques chilenos corresponden a plantaciones forestales, principalmente de *Pinus radiata* y *Eucalyptus* spp, (INFOR, 2009a). *E. globulus* es al especie de su género con mayor superficie plantada en Chile (471.743 ha), seguido por *E. nitens* (167.900 ha) a diciembre de 2008 (INFOR, 2009b). Otras especies de *Eucalyptus* (*E. delegatensis*, *E. viminalis*, *E. smithii*, *E. camaldulensis*, *E. sideroxylon*, y *E. cladocalyx*) se han establecido en sitios no aptos para el crecimiento de *E. globulus* (ej. zonas semi-áridas y frías), lo que corresponde a un total de 21.750 ha plantadas con estas especies (INFOR, 2009b).

En Chile, las principales limitantes climáticas para el establecimiento de plantaciones de *Eucalyptus* son el frío y la disponibilidad de agua (LANFRANCO y DUNGEY, 2001). Las bajas temperaturas inhiben la actividad fotosintética (STITT y HURRY, 2002, DAVIDSON et al., 2004), lo cual tiene un efecto en la productividad de las plantaciones (CANNELL, 1989). *E. nitens* es relativamente resistente al congelamiento (VOLKER et al., 1994), lo que ha permitido establecer plantaciones de esta especie en sitios no favorables para *E. globulus*. Por otra parte, la escasez de precipitaciones anuales en las regiones desérticas restringe el establecimiento de plantaciones de *E. globulus* por debajo de los 34° S (LANFRANCO y DUNGEY, 2001). Los

árboles de la especie son habitualmente encontrados cerca de ríos, quebradas o valles, ya que no muestran un buen desempeño en condiciones de baja disponibilidad hídrica (MORA, 2006). En contraste, las especies *E. camaldulensis* y *E. cladocalyx* han presentado buena adaptabilidad a condiciones de sequía y salinidad (DELARD et al., 2000; HARDWOOD et al., 2001), lo cual resulta importante ya que el 40% del territorio nacional puede clasificarse como árido o semiárido (ORMAZÁBAL, 2001). Por su parte, *E. camaldulensis* es quizás la especie más plantada en zonas áridas y semiáridas del mundo (ELDRIDGE et al., 1993). Los híbridos de *E. camaldulensis* y *E. globulus* han resultado ser exitosos y confieren mayor resistencia a sequía y salinidad en *E. globulus* (CLARKE et al., 2009). Sin embargo, *E. camaldulensis* tiene menor habilidad pulperable que *E. globulus* (MEDDINGS et al., 2001), no presenta buena forma, y al igual que *E. globulus* es muy susceptible a insectos defoliadores (eg *Gonipterus spp*; CLARKE et al., 2009). Cabe destacar, que *Gonipterus scutellatus* es una de las plagas más importantes que acoge al género *Eucalyptus* en Chile y Sudamérica (RICHARDSON y MEAKINS, 1986; ESTAY et al., 2002). *E. cladocalyx* se introdujo en Chile con el fin de abastecer recursos madereros y melíferos (MORA et al., 2009) y también destaca por ser sustentable en regiones con bajos regímenes hídricos al igual que *E. camaldulensis*. A diferencia de la segunda, es un árbol de buena forma (CLARKE et al., 2009) y raramente se ha visto atacada por *G. scutellatus* (HANKS et al., 2000). Es una especie altamente resistente a *P. semipunctata* (HANKS et al., 1995), produce una excelente madera aserrada (CLARKE et al., 2009), y se ha visto que la floración de la especie es abundante y duradera, siendo bien cotizada en la industria de la miel. Cabe destacar, que en las regiones áridas y semiáridas de Chile, la producción de miel significa una importante fuente de ingreso para los agricultores de la zona (MONTENEGRO et al., 2003). No obstante, actualmente la presencia de *E. cladocalyx* se reduce sólo a plantaciones en ensayos experimentales, siendo poco relevante en la industria forestal.

2.1.1 *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell

Eucalyptus cladocalyx F. Muell (2n=24, aneuploide; ATCHINSON, 1947), del subgénero *Symphyomyrtus* (BROOKER, 2000), es una especie alógama endémica del sur de Australia, que se distribuye en forma natural en cuatro áreas bien aisladas: una al sur de la Cordillera Flinders, próxima al Golfo Spencer, otra en Isla Kangaroo, y dos áreas hacia el oriente de la Península

Eyre (WOODROW et al., 2002). Es un árbol de mediana estatura (10-35 m), alcanzando en la madurez unos 20 m en promedio (HARDWOOD et al., 2001; CLARKE et al., 2009). El tronco es de buena forma, de corteza moteada color anarajando y crema, con partes incoloras. El diámetro promedio a la altura de pecho (DAP) es de 75 cm, en un rango entre 30 cm y 2 m (Clarke et al., 2009). Las hojas adultas son lanceoladas, pecioladas, descoloradas, y de borde liso. Las inflorescencias son de color blanco, y aparecen en grupos de 7-11 de flores. En Chile, la floración ocurre entre los meses de diciembre y abril, periodos que se caracterizan por carecer de precipitaciones (MORA et al., 2007). Los frutos son cápsulas venosas y pequeñas con forma de barril de 9-10 x 5.5-7 mm (KOKWARO, 1994), que contienen numerosas semillas (120.000 semillas viables/kg; Clarke et al., 2009). La generación de semillas ocurre 12 meses luego de la floración, y pueden mantenerse en el árbol 2-3 años. Su madera es bastante dura y de larga duración, de densidad en la madurez de 1.100kg/m³ (con 12 % de humedad; ROB, 2004). Si bien no existen antecedentes, se piensa que la especie puede tener habilidad pulpable dado la densidad de su madera (HARDWOOD et al., 2001). Entre las especies del género, se ha catalogado como una de las de mayor durabilidad natural de su madera frente a la biodeterioración (STANDARS AUSTRALIA, 2005).

La principal vía de propagación de *E. cladocalyx* es a partir de semillas. Hay alrededor de 120.000 semillas viables por kilogramo. Las semillas son ortodoxas y se secan a temperatura ambiente, para luego ser almacenadas en seco en recipientes herméticos refrigerados (3-5° C), así se mantiene la viabilidad durante varios años (CLARKE ET AL., 2009; MCMAHON et al., 2010). La semilla germina sin necesidad de tratamientos pre-germinativos (MCMAHON et al. 2010). En Chile, la especie se encuentra sólo en superficies reducidas o ensayos de campo, por lo que se recomienda recurrir a proveedores comerciales de Australia para obtener semillas. La propagación mediante estacas con la especie no ha tenido buenos resultados. Las tasas de enraizamiento de estacas ha sido considerablemente bajo con otras especies del género, por otro lado, solo han sido ensayadas solo algunas de sus procedencias, por lo que se espera promover estudios posteriores que ajusten los métodos de propagación (BRAMMALL y HARWOOD, 2000; MCMAHON et al., 2010).

E. cladocalyx es capaz de adaptarse a zonas con precipitaciones desde 200 a 300 mm (MORA et al., 2005). Es una de las especies prioritarias para estudios en regiones con escasas precipitaciones en el Sur de Australia, por lo que el *Australian Low Rainfall Tree Improvement Group* (ALRTIG) ha comenzado a desarrollar estudios en estrategias de mejoramiento de la especie (HARWOOD y BULMAN, 2000). El ALRTIG informó prometedores resultados en ensayos de campos de la especie, los cuales revelaron importantes diferencias en crecimiento y forma de los árboles (BUSH et al., 2009). Esta información permitió conocer cuáles son las mejores procedencias destinadas a producción. En Chile, se dispone de material recolectado de diferentes procedencias naturales en ensayos experimentales, los cuales han sido evaluados para caracteres de crecimiento (diámetro, altura y rectitud de fuste; MORA et al., 2009) y caracteres de floración (CANÉ-RETAMALES et al., 2011; CONTRERAS-SOTO ET AL., 2011). Para los caracteres de crecimiento en diámetro y altura, los mejores ejemplares provienen de La Cordillera Flinders, mientras que para caracteres de floración, valiosos para la industria de la miel, se obtienen de Cowell (Península Eyre). Debido a la débil relación entre *E. cladocalyx* y otras especies del subgénero *Symphyomyrtus*, no se tienen antecedentes de resultados positivos en la generación de híbridos.

En Australia, la especie se ha utilizado para producción de madera, polines, y remediación de ambientes (HARWOOD et al., 2007). Además, *E. cladocalyx* var. *nana* posee características morfológicas bien diferenciadas de otros ejemplares de la especie y tiene un importante valor comercial como producto ornamental (Vintage Red™) al tener un follaje color rojo violáceo. En el caso de Chile, la especie se estableció para producir madera y miel (MORA et al., 2009). A pesar del potencial que tiene la especie, aún no ha sido importantemente explotada en el país.

En poblaciones naturales, *Eucalyptus cladocalyx* ha registrado una baja diversidad genética, sin embargo debido a la particular distribución de la especie, se han registrado altos índices de diferenciación y estructuración genética entre procedencias (MCDONALD et al., 2003; STEANE et al., 2011; BUSH y THUMMA, 2013). En Chile, se dispone de material recolectado de diferentes procedencias naturales en ensayos experimentales, los cuales han sido evaluados para caracteres de crecimiento (diámetro, altura y rectitud de fuste; MORA et al., 2009; VARGAS-REEVE et al., 2013) y caracteres de floración (CANÉ-RETAMALES et al., 2011;

CONTRERAS-SOTO et al., 2011). Para los caracteres de crecimiento en diámetro y altura, los mejores ejemplares provienen de Montes Flinders, mientras que para caracteres de floración, valiosos para la industria de la miel, se obtiene de las procedencias Cowell (Península Eyre). Investigaciones australianas también evidencian que hay una importante variabilidad en el comportamiento de diferentes procedencias en propiedades de la madera, las cuales se relacionan estrechamente con la habilidad pulpable y la durabilidad de ésta frente a la biodeterioración (BUSH et al., 2011). *E. cladocalyx* var. *nana* posee características morfológicas bien diferenciadas de otros ejemplares de la especie. Esta variedad tiene un importante valor comercial como producto ornamental (Vintage Red™) al tener un follaje color rojo violáceo.

Estudios en *E. cladocalyx*, han comparado material proveniente desde diferentes puntos geográficos dentro de la distribución natural de la especie, de los cuales se tiene conocimiento de que existe variabilidad entre diferentes procedencias para caracteres morfológicos como intensidad y precocidad de floración (MORA et al., 2007; MORA et al., 2009; CANÉ-RETAMALES et al., 2011), en propiedades de la madera (BUSH et al., 2011), en altura y diámetro de árboles (MORA et al., 2009), en caracteres fisiológicos como el contenido de compuestos cianogénicos (GLEADOW y WOODROW, 2000), y en rectitud de fustes (VARGAS-REEVE et al., 2013). Cabe destacar, que aún no se conoce la base genética que estaría involucrada en esta variabilidad fenotípica que presenta la especie. No obstante, se rescata que en la mayoría de estos estudios se han determinado valores de heredabilidad moderados y altos, lo que estaría indicado un importante control genético para estos caracteres. Los trabajos de Bush y Thumma (2013), Steane et al. (2011), y McDonald et al. (2003), mediante SNPs (*Single-nucleotide polymorphism*), DArts (*Diversity Arrays Technology*) y marcadores isoenzimáticos, respectivamente, reportaron una significativa diferenciación y estructuración genética entre diferentes procedencias naturales y cultivadas de *E. cladocalyx*, lo cual podría sentar las bases para el entendimiento de la relación que existe entre la variabilidad fenotípica encontrada con la variabilidad genética en la especie.

2. 2. Importancia de la diversidad genética en el mejoramiento vegetal

El mejoramiento genético engloba un conjunto de operaciones que tiene como objetivo aumentar la frecuencia de genes deseables o combinaciones genéticas favorables en una población. En el ámbito forestal, involucra la identificación y desarrollo de poblaciones de especies forestales que producen árboles superiores en cuanto a una o más características relacionadas con la cantidad o calidad de un producto final. Los primeros estudios de genética que apoyaron al mejoramiento forestal, se concentraron en el crecimiento del árbol, su sobrevivencia, rectitud de fuste, y calidad de ramas (RAYMOND, 2002). Actualmente, los mejoradores persiguen objetivos más ambiciosos, como evaluar la capacidad para sobrevivir a condiciones medioambientales adversas, y que además se mantenga la calidad de los recursos que proporcionan. El conocimiento de la distribución de la variabilidad genética, entre y dentro de poblaciones, es crucial para el mejoramiento forestal, y para la conservación de los recursos genéticos vegetales (BROWN et al., 1990; ADAMS et al., 1992; HOUSE y BELL, 1994). Cuando no existe variabilidad, no es posible estructurar un programa de mejoramiento genético (ACQUAAH, 2007). Los mejoradores se preocupan periódicamente de explorar centros naturales de diversidad con el objeto de recolectar material (i.e. germoplasma), el cual representa una fuente de variación útil para el mejoramiento genético (ACQUAAH, 2007). Este material puede llevar consigo caracteres como resistencia a enfermedades, resistencia a estrés hídrico, entre otros. Al diversificar los cultivos se favorece la estabilidad en la producción y en los ingresos, dado que reduce el riesgo frente a fluctuaciones medioambientales y de mercado. Por lo tanto, la conservación y caracterización de la diversidad genética es importante ya que la variabilidad encontrada determinará la productividad, y a su vez la supervivencia de un cultivo (ACQUAAH 2007). El conocimiento la diversidad de una especie ha permitido la caracterización genética de germoplasma, e incluso, el desarrollo de estrategias de conservación en especies vulnerables (FAROOQ et al., 2002).

La diversidad puede ser detectada por variaciones en el fenotipo de un individuo, o bien en su genotipo. Las variaciones a nivel de fenotipo se conocen como marcadores morfológicos, los cuales son detectables visualmente, como por ejemplo, en variedad de colores, formas, dimensiones, entre otras; por lo tanto puede incluir variables cualitativas como cuantitativas. No requieren tecnología sofisticada ni mayores gastos (MONDINI et al., 2009), sin embargo dado

que sólo se basa en observaciones fenotípicas, la diferenciación bajo este criterio es muy baja dentro de una misma especie, por tanto hace muy limitado el número de marcadores disponibles, y la influencia medioambiental en el fenotipo hace que en pocas ocasiones sean caracteres heredables. Los marcadores moleculares permiten analizar diferencias a nivel del ADN, por lo tanto, son más precisos, y prácticamente ilimitados ya que están ampliamente distribuidos en el genoma (CHENG et al., 2010). Actualmente, diversas técnicas han sido desarrolladas para detectar polimorfismos a nivel de ADN (marcadores moleculares), los cuales pueden ser de herencia dominante como codominante; y para analizar un locus en específico como múltiples *loci* aleatoriamente (MONDINI et al., 2009). Las técnicas se basan principalmente en metodologías de hibridación de DNA y/o amplificación vía PCR (*Polymerase Chain Reaction*). En estudios de diversidad genética, los marcadores más comúnmente usados son SSR (del inglés *Simple Sequence Repeats*; CAGIGAS et al., 1999; RAYBOULD et al., 1999) y RAPD (*Random Amplification of Polymorphic of DNA*; FERGUSON et al., 1998; DÍAZ et al., 2000). Basados en los SSR, los marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) o Inter-Microsatélites también han sido ampliamente usados en estudios de diversidad (WU et al. 2005) y de asociación con caracteres fenotípicos (AMMIRAJU et al., 2001; HASHIZUME et al., 2003; RIPLEY y ROSLINSKY, 2005; SANTRA et al., 2000; KAR et al., 2008). El marcador ISSR es una tecnología basada en PCR, en la cual se amplifican regiones entre dos marcas SSR orientados inversamente, utilizando un solo partidor de unos 16-25 pb (PRADEEP-REDDY et al., 2002; ASSEFA et al., 2003). Este partidor puede estar constituido de cualquier motivo de SSR (di, tri, tetra o penta-nucleótido). Su ventaja sobre otros marcadores dominantes (ej. RAPD) es que sus resultados son más reproducibles (SALIMATH et al., 1995; CHENG y PENG, 2010), y son relativamente baratos.

2. 3. Relación entre variabilidad fenotípica y genética: Detección de Loci de caracteres cuantitativos (QTL).

La aplicación de la genética cuantitativa basada en la información fenotípica, es la estrategia más común en el mejoramiento forestal (TSAROUHAS et al., 2002). Una selección temprana podría ser una interesante oportunidad para en el mejoramiento genético forestal debido a los largos periodos de espera entre generaciones de árboles (NEALE et al., 1992). En este contexto, los

marcadores moleculares y mapas genéticos ofrecen nuevas oportunidades para estudiar la genética de los caracteres cuantitativos (TSAROUHAS et al., 2002). La selección asistida por marcadores (SAM) implica el uso de la presencia o ausencia de un marcador como un sustituto para asistir a una selección fenotípica, de esta manera hacer la selección más eficaz, eficiente, fiable y rentable en comparación con estrategias convencionales de mejoramiento (COLLARD et al., 2005). Los marcadores moleculares podrían ser usados para incrementar la eficiencia en la selección fenotípica de características con baja heredabilidad (O'MALLEY y MCKEAND, 1994), lo cual es común para características cuantitativas debido a la influencia del medioambiente. Los *loci* de características cuantitativas (*Quantitative trait locus, loci*; QTLs) son regiones en el genoma responsables de la variación de una característica cuantitativa (Doerge 2002). En general, se asume que las características cuantitativas tienen herencia poligenética (O'MALLEY y MCKEAND, 1994), y por tanto son más complejas de estudiar que caracteres discretos. Estudios anteriores han demostrado que es posible la detección de QTLs asociados características de crecimiento y adaptación en especies arbóreas (BRADSHAW y STETTLER, 1995; GRATTAPAGLIA et al., 1995, 1996; HURME et al., 2000; ZHANG et al., 2006; RAE et al., 2008; DILLEN et al., 2009), los cuales son de interés para la industria forestal.

Previamente, se han planteado numerosos métodos de cómo establecer la relación entre marcas moleculares y características cuantitativas. Los primeros procedimientos consistieron en regresiones simples entre las características y marcas moleculares, considerando una de éstas a la vez (SAX ,1923; SOLLER y BRODY, 1976). La desventaja de esta metodología es que puede ser subestimada la significancia del QTL en el carácter fenotípico, debido a que no se encuentran muy cercanos con el marcador por los eventos de recombinación (LANDER y BOTSTEIN, 1989; CUBERO, 2003). Además, se requieren de poblaciones de gran tamaño para una buena detección (LANDER y BOTSTEIN, 1989). En el método de marca simple, dado que es propenso a que se subestime el efecto del QTL, se recomienda trabajar con una mayor cantidad de marcadores (CUBERO, 2003) con el fin de chequear el mayor número de regiones en el genoma. Como solución a la poca cobertura del genoma que posee el método anterior, Lander y Botstein (1989), propusieron el método de mapeamiento por intervalo, el cual considera que un QTL puede estar entre dos marcas moleculares (KAO et al., 1999; CUBERO, 2003), por lo tanto incorpora la información del mapa genético de la especie para hacer la asociación entre QTL y marcas

moleculares. El mapa genético proporciona la posición relativa entre las marcas moleculares de acuerdo a sus distancias de recombinación, por tanto los QTL son detectados entre intervalos de marcadores (KAO et al., 1999; CUBERO, 2003; DOERGE, 2002). Una desventaja de este método es que estará limitado por el número de recombinaciones, dado que asume que no están ocurriendo, por ejemplo, doble recombinaciones (DOERGE, 2002), por lo tanto algunas ligaciones entre marcas podrían ser sobrestimadas. Una variante a este método es el propuesto por Fulker y Cardon (1994), el cual es una combinación del método de Lander y Botstein (1989), y el de Haseman y Elston (1972). La desventaja del mapeamiento por intervalo es que la estimación, de la localización y el efecto del QTL, puede estar sesgada cuando hay QTL que están ligados (HALEY y KNOTT, 1992; MARTINEZ y CURNOW, 1992; LI et al., 2007). Ambos modelos realizan una asociación simple, no obstante no consideran las posibles interacciones entre los QTL (DOERGE, 2002). Un método alternativo es el de marcador múltiple (JANSEN, 1993, JANSEN y STAM, 1994), el cual permite el estudio del efecto de más de una marca molecular a la vez (KNOTT et al., 1996). Además, es bastante útil cuando dos alelos están interaccionando para una respuesta (i.e epítasis), lo cual es un problema para los métodos anteriores (DOERGE, 2002) Zeng (1994) introdujo el concepto de mapeamiento por intervalo compuesto, el cual combina el mapeamiento por intervalo y el de marcador múltiple. Este permite detectar los efectos de QTL dentro de un mismo cromosoma, como entre diferentes cromosomas (LI et al., 2007). Modelos bayesianos también han sido implementados para la detección de QTL (SEN y CHURCHILL, 2001; YI et al., 2004; WANG et al., 2005; FANG et al., 2009). A pesar de que es una alternativa bastante satisfactoria para los análisis, en la práctica no ha sido ampliamente utilizada ya que es dificultoso elegir las distribuciones *a priori*, y el análisis computacional es bastante complejo (LI et al., 2007). De todas maneras, la estadística bayesiana ha realizado un gran aporte en el estudio de QTL (XU, 2010). Satagopan et al. (1996) plantearon uno de los primeros modelos bayesianos para la detección múltiple de QTL y sus efectos, demostrando un método ligeramente mejor que las regresiones paso a paso.

2. 4. El efecto de la estructuración genética de poblaciones en la detección de QTL.

La estructuración genética de poblaciones es un proceso que se genera como consecuencia de algunas desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg, es decir, en la aleatoriedad para los

cruzamientos entre individuos (YU y BUCKLER, 2006). En la estructuración, pueden distinguirse grupos de individuos que han adquirido una constitución genética muy diferenciada de otros (BRESSEGHELLO y SORELLS, 2006). Este fenómeno, en el cual se rompe el equilibrio, puede deberse a factores no genéticos como genéticos. En el primer caso, se puede hablar de que las barreras físicas que obstaculizan el flujo génico entre poblaciones (WRIGHT, 1943), el aislamiento por distancia (FRANCOIS y DURAND, 2011), los mecanismos reproductivos de la especie, la adaptación a gradientes medioambientales (HARTL y CLARK, 1997); son factores que pueden generar que las poblaciones recaigan en factores genéticos como los procesos de selección, deriva génica, cambios en los patrones de apareamiento (i.e tamaño efectivo poblacional), entre otros; que generan la estructuración (YU y BUCKLER, 2006). Las plantas leñosas que son capaces de dispersar sus semillas y/o polen fácilmente (ej. anemófilas), generalmente presentan menor estructuración genética entre poblaciones, al contrario de aquellas que se ven más restringidas en este aspecto (PERRY y KNOWLES, 1991; UENO et al., 2000; ASUKA et al., 2005). En el caso de *E. camaldulensis*, Butcher et al. (2009) utilizaron marcadores SSR y RFLP para evaluar el grado de variabilidad y diferenciación entre poblaciones naturales. Los autores encontraron que existe una concordancia entre la diferenciación genética de poblaciones con la distancia geográfica entre éstas. Además, existe una congruencia entre la variación genética y la variación morfológica. Cabe destacar que, al contrario que *E. cladocalyx*, *E. camaldulensis* tiene una de las distribuciones más amplias del género, la cual tiene una alta variación fenotípica (ELDRIGE et al., 1993). Teniendo en cuenta que la diversidad y estructura genética generalmente es estudiada en dos niveles jerárquicos, es decir, intra e inter poblacionalmente, el conocimiento de eventos de estructuración genética puede proveer mayor información de cómo se distribuye la diversidad genética de la especie. En la detección de QTL, se propone una asociación estadística significativa entre los patrones moleculares y regiones en el ADN involucrados en caracteres cuantitativos (HELENTJARIS et al., 1986; SMITH y SIMPSON, 1986; PATERSON et al., 1988; LANDER y BOTSTEIN, 1989). Se espera que mientras mayor información se incorpore al modelo estadístico, mejor será el entendimiento de esta asociación. Cuando las poblaciones están estructuradas pueden ocurrir falsos positivos en la detección de QTL, por lo tanto, la estrategia es incorporar esta información al modelo estadístico (PRITCHARD et al., 2000; BUCKLER y THORNSBERRY, 2002; SIMKO et al., 2004; BRADBURY et al., 2007). La metodología de mapeamiento asociativo o mapeamiento con

desequilibrio de ligación (*Linkage disequilibrium Mapping; LD mapping*) se ha propuesto como una alternativa para disminuir los efectos que genera la estructuración genética de poblaciones. En contraste con otros métodos, en el mapeamiento asociativo se realiza una genotipificación previa de los individuos para establecer relaciones genéticas entre ellos, y posteriormente se correlacionan fenotípicamente, lo cual puede ser más eficiente y certero para la detección de QTLs (XU y CROUCH, 2008). Las ventajas de este método sobre los tradicionales de ligación, son que incrementa la resolución del mapeamiento, ya que puede reflejar el efecto de las recombinaciones que están ocurriendo entre individuos no relacionados, en varias generaciones (ARANZANA et al., 2005). Otra ventaja importante es que reduce el tiempo de investigación y seguimiento, ya que no necesita de poblaciones de mapeamiento como cruzamientos controlados y líneas puras (SIMKO et al., 2004), lo cual puede ser aprovechado por poblaciones de polinización abierta con rotaciones largas, como en el caso de las especies forestales. THUMMA et al (2005) realizaron el primer estudio utilizando esta metodología en especies forestales, en el cual detectaron regiones genéticas asociadas con la variación en el ángulo de la microfibrilla de celulosa en *Eucalyptus spp.* Posteriormente, surgieron trabajos en otras especies arbóreas como pináceas (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2007, 2008), mirtáceas (KÜLHEIM et al., 2011), y *Populus tremula* (INGVARSSON, 2008).

2. 5. Detección de QTLs en el género *Eucalyptus*

Existen varios estudios de detección de QTL en especie de *Eucalyptus*, los cuales han sido asociados a diferentes caracteres. La principal especie estudiada ha sido *E. globulus*, dada su relevancia a nivel mundial para la industria forestal. Algunos de los estudios en *E. globulus* incluyen la detección de QTL para caracteres de crecimiento (FREEMAN et al., 2009; FREEMAN et al., 2011), propiedades de la madera (THAMARUS et al., 2004; FREEMAN et al., 2009, FREEMAN et al., 2011), y propiedades de fibra celulosa (THAMARUS et al., 2004). En *E. nitens* se han descrito QTL para resistencia a estrés por frío (BYRNE et al., 1997), propiedades de la madera (THUMMA et al., 2010a), y caracteres de crecimiento (THUMMA et al., 2010b). En *E. grandis*, existen registros de detección de QTL para caracteres de crecimiento (GRATTAPAGLIA et al., 1996), en resistencia a enfermedades como *Puccinia psidii* (JUNGHANS et al., 2003), y en precocidad de floración (MISSIAGGIA et al., 2005). Además, se

han detectado QTLs utilizando híbridos de las especies *E. grandis* y *E. urophylla* para caracteres de crecimiento (VERHAEGEN et al., 1997, KULLAN et al., 2011), densidad de la madera (KULLAN et al., 2011), y para conicidad de fustes, medido en función de la proporción entre DAP y altura (VERHAEGEN et al., 1997). Los estudios mencionados han utilizado métodos de intervalo, de intervalo compuesto, análisis de varianza de una y dos vías, y métodos de BSA (*Bulked segregant Analysis*; MICHELMORE et al., 1991). Los estudios anteriormente mencionados no consideraron el efecto de estructuración genética para la detección de QTLs, a pesar de que es una condición particularmente común para el género (e.g. STEANE et al., 2006; PAYN et al., 2008; MCDONALD et al., 2003). El primer estudio de mapeamiento DL en el género *Eucalyptus* fue realizado por Thumma et al. (2005), el cual determinó QTL asociados a propiedades de la madera. En este análisis, se utilizó un modelo simple de asociación entre marca molecular y carácter fenotípico, en el cual previamente se clasificó a los individuos en grupos homogéneos de acuerdo a la estructura genética de *E. nitens*. Posteriormente, Külheim et al. (2011) realizaron detección de QTLs implicados en el contenido de metabolitos secundarios en hojas en *E. globulus*, y Sexton et al (2010) estudiaron polimorfismos asociados a propiedades de la madera en *E. pilularis*.

2. 6 Planteamiento del problema a investigar y aspectos nuevos a tratar en la propuesta

El conocimiento de la relación entre la variabilidad genética y fenotípica, permite optimizar el uso de los recursos en los programas de mejoramiento. En las especies del género *Eucalyptus*, existen numerosos trabajos que han permitido determinar el control genético de caracteres relacionados con las propiedades de la madera, crecimiento en diámetro, altura, entre otros. De la revisión bibliográfica realizada, se desprenden los siguientes puntos: (1) En las especies *E. globulus* y *E. nitens* se tiene un buen entendimiento de la relación entre genotipo y fenotipo para varios caracteres, no obstante en otras especies estas investigaciones aún no han sido acabadas (2) *E. cladocalyx* es una especie que puede ser interesante para la industria forestal debido a sus cualidades de adaptación a ambientes áridos y semiáridos, y a sus propiedades madereras (3) Chile posee recursos genéticos de la especie, los cuales pueden ser potencialmente utilizables en programas de mejoramiento (i.e en industria de la madera), dado que se dispone de material diverso para diferentes caracteres fenotípicos. (4) Existe un desconocimiento de la variabilidad

genética asociada a la variabilidad fenotípica en esta última especie (5) Tomar en consideración la estructuración genética de las poblaciones, permite un mejor entendimiento de la base genética que está asociada a la variabilidad fenotípica.

En base a estos antecedentes, se concluye que *E. cladocalyx* es una especie con potencial para la industria forestal, la cual presenta variabilidad en caracteres fenotípicos importantes para la industria, por lo tanto es candidata para ser incorporada en programas de mejoramiento. Estos últimos, requieren del conocimiento de la base genética detrás de la variabilidad fenotípica encontrada, la cual no ha sido reportada previamente en la especie. De esto se desprende que los recursos genéticos que dispone Chile, no están siendo bien aprovechados.



CAPITULO III: HIPOTESIS DE ESTUDIO

En el presente estudio, se plantearon dos hipótesis:

1.- La variabilidad fenotípica de caracteres de crecimiento, componentes de floración, y sobrevivencia de árboles de *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell reportada en Chile, puede ser correlacionada con sus patrones de variabilidad genética para detectar regiones en el genoma que proporcionan un control genético sobre las características.

2.- La estructura genética de *E. cladocalyx* tiene un efecto significativo en la detección de regiones genéticas asociadas a características fenotípicas. El efecto de la estructura genética genera falsos positivos en la asociación marcador-fenotipo.



CAPITULO IV: OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar *loci* de características cuantitativas, relacionados a características de crecimiento, floración y sobrevivencia en diferentes familias de medios hermanos de procedencias australianas de *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell establecidas en Chile. En adicción, determinar si la estructura genética de *E. cladocalyx* influye en la detección de *loci* de características cuantitativas.

Objetivos específicos

1.- Determinar *loci* variables entre familias de medios hermanos de procedencias australianas establecidas en Chile de *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell en base a sus polimorfismos a nivel molecular.

2.- Correlacionar la variabilidad genética de *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell con características de crecimiento, floración y sobrevivencia, para detectar *loci* de características cuantitativas.

3.- Definir la estructura genética de *E. cladocalyx* y determinar si la estructura genética afecta en la detección de *loci* asociados a las características de crecimiento, floración y sobrevivencia.

CAPITULO V: MATERIALES Y MÉTODOS

5. 1 Ensayo y mediciones fenotípicas

Se utilizó material de un ensayo de progenie de *Eucalyptus cladocalyx*, el cual está localizado en la Provincia de Choapa, Región de Coquimbo, Chile (31°08'S, 71°19'O; 297 m altitud). Para detalles del ensayo ver Cané-Retamales et al. (2011) y Vargas-Reeve et al. (2013). Ocho características cuantitativas se consideraron en el análisis genético: altura (HT), diámetro a la altura de pecho (DAP) y rectitud del fuste (REC), medido en árboles de 10 años de edad, intensidad de floración (IF), floración tardía (FT), capacidad de reproducción (CR), y sobrevivencia de los árboles (SV) medido a los 12 años, y finalmente, la precocidad de floración medida a los 2 años de edad (PF). En tabla 1, se muestran los detalles ambientales del origen de las procedencias y familias estudiadas.

Las variables REC, IF, PF, FT, CP y SV se consideraron como variables discretas. La rectitud se clasificó en cuatro niveles (VARGAS-REEVE et al., 2013): valor 0 para árboles severamente torcidos, valor 1 para árboles con niveles de curvatura moderados, valor 2 para árboles ligeramente curvados y valor 3 para árboles de troncos rectos. La IF se clasificó en forma similar a lo propuesto por Hudson et al. (2009) en cuatro niveles: valor 0 cuando no había presencia de flores, valor 1 si pequeñas partes de la copa presentaba flores, valor 2 si presentaba flores cubriendo hasta la mitad de la copa, y valor 3 si se presentaban flores en toda la copa. La PF se consideró como una variable binaria, de valor 0 cuando no presentaban flores, yemas o cápsulas a los dos años de edad, y valor 1 en caso contrario (MORA et al., 2009). La FT se midió a fines de la temporada de floración de 2013 (mayo-junio). Se asignó un valor de 0 si al final de la temporada los árboles no presentaban flores, y valor 1 en caso contrario. La variable CR se consideró como una variable binaria, tomando valor de 0 si los árboles nunca han presentado floración dentro de un periodo de 12 años, y valor de 1 en caso contrario. Finalmente, SV se consideró como una variable binaria, con valor 0 para árboles que no sobrevivieron tras 12 años de la plantación, y valor de 1 en caso contrario (sobrevivientes).

Tabla 1. Procedencias de *E. cladocalyx* evaluadas en el ensayo Tunga Norte, Illapel, Región de Coquimbo, Chile.

Procedencias	Familias (n)	Latitud (S)	Longitud (E)	Ppt ann (mm a ⁻¹)
Flinders Chase				
National Park (Isla Kangaroo)	8	35°57'	136°42'	637.9
Marble Range (Península Eyre)	4	34°30'	135°30'	485.1
Mt. Remarkable (Cordillera Flinders)	15	32°43'	138°06'	242.8
Cowell (Península Eyre)	10	33°38'	136°40'	405
Wirrabara (Cordillera Flinders)	8	33°06'	138°14'	256.6

Ppt ann: Precipitaciones anuales (mm a⁻¹).

5. 2. Análisis de marcadores moleculares y estructura genética

Se recolectaron hojas de cinco árboles por familia (de un total de 45 familias), las cuales se seleccionaron en forma aleatoria de diferentes bloques del ensayo. Se transportaron en bolsas plásticas, para luego ser almacenadas a -80°C durante dos meses. Se utilizó el método CTAB de extracción de ADN, para tejidos vegetales de acuerdo con Doyle y Doyle (1987) con algunas modificaciones. El pellet resultante de la extracción contenía el ADN de los cinco individuos, por tanto cada muestra constituyó un grupo familiar. Se observó la integridad y concentración de los ADNs en geles de agarosa al 0,8%, comparados con un estándar ProMega-Markers® Lambda Ladder 50-8000 kb (Promega Corporation). Los geles se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador *Vilbert Loumart Super-Bright UV transilluminator*, y una cámara fotográfica Nikon coopix 4300. Dada la gran cantidad de interferentes de amplificación, que son comunes en

los tejidos de las especies de *Eucalyptus* (SHEPHERD et al., 2002), los ADN se trabajaron en diluciones 1:100 en Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0).

Se seleccionaron ocho partidores ISSR, previamente usados con buenos resultados en otras especies de *Eucalyptus* (Tabla 2). Se utilizó un volumen de reacción de 20 μ L, el cual contenía 2 μ L de ADN templado en dilución (1:100), Buffer de reacción al 1X (5X Green Go Taq Flexi Buffer, Promega Madison USA), partidores a una concentración de 0,6 μ M, dNTPs (Promega) a 200 μ M, MgCl₂ (Promega) a 1,5 mM, y 0,625 U mL⁻¹ de Taq Pol (Promega). Se realizaron dos diferentes programas de amplificación en un termociclador Axygen Maxygen PCR Therm-1000. Para los partidores (RCA)₇, T(GT)₉, TA(CAG)₄, RA(GCT)₆, GA₈, y UBC810 se utilizó el siguiente programa de amplificación: una denaturación inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, con las respectivas temperaturas de alineamiento para cada partidor (Tabla 2) durante 30 s, una extensión a 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C durante 10 min. En el caso de los partidores ISO₁ e ISO₂, se utilizó el siguiente programa: denaturación inicial a 94°C durante 7 min, seguido de 45 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, un alineamiento a la temperatura propia del partidor (Tabla 2) durante 45 s, una extensión a 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C durante 7 min. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% con tinción de Bromuro de Etidio, mientras que el tamaño de los fragmento se compararon con marcadores de peso Axygen® de 100 - 3000 pb. Los geles se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador *Vilbert Loumart Super-Bright UV transilluminator*, y una cámara fotográfica Nikon coopix 4300.

La estructura genética se infirió usando los datos obtenidos de los marcadores ISSR. Se utilizó el programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER y LISCHER, 2010) para discriminar *loci* que no cumplieran con los supuestos de neutralidad (puntos *outlier*), según lo propuesto por Excoffier et al. (2009). Posteriormente, los *loci* neutrales se utilizaron para el análisis de estructura genética, usando el programa STRUCTURE 2.2 (PRITCHARD et al., 2000). Se estableció la hipótesis de un posible número de grupos o *clusters* (K) entre 1 y 8, según un modelo *no-admixture* y de frecuencias de alelos independientes entre poblaciones. Se estimó el valor de K desde 20 repeticiones independientes para cada posible valor de K (1-8), un periodo de descarte (*Burn-in*) de 500 y número de cadenas de Gibbs de 20000. El K óptimo fue calculado según lo propuesto

por Evanno et al. (2005). En adicción, se realizó un análisis de varianza (AMOVA) entre procedencias y familias para corroborar su consistencia con STRUCTURE, mediante el programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER y LISCHER, 2010). Se determinó el índice de fijación de Wright (Φ_{st} ; Wright 1931) entre las procedencias, y los valores de Φ_{st} entre cada una de las procedencias.

Tabla 2. Partidores ISSR, secuencias y temperaturas de alineamiento utilizadas. Al pie de tabla, se entregan antecedentes de especies que han sido estudiadas previamente con estos partidores.

Nombre	Secuencia partidor	T°a
¹ R(CA) ₇	5'-GATACTGATACACACACACACA-3'	55°C
¹ T(GT) ₉	5'-CATATGTGTGTGTGTGTGTGTGT-3'	50°C
¹ TA(CAG) ₄	5'-AGATTCAGCAGCAGCAG-3'	55°C
¹ RA(GCT) ₆	5'-ATAAAGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3'	55°C
¹ (GA) ₈ R	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAAGT-3'	45°C
¹ UBC810	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3 • '	48°C
² ISO ₁	5'-CACACACACACAGG-3'	45°C
² ISO ₂	5'-CTCTCTCTCTCTCTAAC-3'	50°C

¹*E. tereticornis* (CHEZHIAN et al., 2010); *E. camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. pellita*, y *E. urophylla* (BALASAVARAVAN et al., 2005); *E. camaldulensis*, *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. pellita*, *E. tereticornis*, y *E. urophylla* (BALASAVARAVAN et al., 2006); ² *E. grandis* (OKUN et al., 2008); T°a: Temperatura de alineamiento.

5. 3. Análisis de asociación fenotipo y genotipo

Se utilizó el Criterio de Información Bayesiano (BIC) o criterio de Schwarz para corroborar la significancia del efecto familiar para todas las características fenotípicas estudiadas, mediante el método de Laplace de aproximación de probabilidad en el programa SAS (1996), para las características discretas, en un modelo lineal generalizado mixto (GLMM). Se asumió distribución multinomial para REC y IF (Función de ligación: *cumulative logit*) y distribución binomial (Función de ligación: *logit*) para SV, FT, PF y CR. Para el caso de las características de altura y DAP, se utilizó un modelo lineal mixto.

Se obtuvieron los valores genéticos (VG: *breeding values*) de las 45 familias estudiadas, utilizando un análisis Bayesiano en el programa SAS (1996). La predicción de los valores

genéticos se basaron en el valor promedio de cada muestra *a posteriori* de tamaño 50000, generada por el algoritmo de Cadenas Independientes, una variante de los métodos de Monte Carlo Cadenas de Markov (MCMC: Markov Chain Monte Carlo). Se eliminaron las primeras 5000 muestras de cada cadena. Para el caso de las características discretas, se usó un Modelo Lineal Generalizado Mixto Bayesiano (macro %GLIMMIX, opción PRIOR), y para las variables continuas un Modelo Lineal Mixto Bayesiano (PROC MIXED, opción PRIOR). El modelo general asociado al experimento se definió como:

$$y = X\beta + Z\gamma + \varepsilon$$

Donde y es el vector de las respuestas observadas, X es la matriz de delineamiento que corresponde al vector de parámetros del efecto bloque y procedencia (β); Z es la matriz de incidencia que corresponde al vector de parámetros del efecto genotípico (γ); y ε es el vector de residuos. Se asume que γ y ε son independientes y con distribución normal univariada, de promedio cero y matriz de varianza G y R , respectivamente.

Se define a θ como el vector de componentes de varianza. La función de densidad conjunta de (β, γ, θ) es dado por

$$f(\beta, \gamma, \theta | \gamma) = f(\beta, \gamma | \theta, \gamma) f(\theta | \gamma)$$

La especificación de cada distribución *a priori* de los elementos del modelo es dado por (RODOVALHO *et al.*, 2008; MORA *et al.*, 2007):

$$f(\gamma | \beta, \gamma, \sigma_e^2, \sigma_f^2) \sim N(X\beta + Z\gamma, R)$$

$$f(\beta) \propto 1$$

$$f(\gamma | \sigma_f^2) \sim N(0, G)$$

$$f(\sigma_f^2) \sim IG(a, b)$$

$$f(\sigma_e^2) \sim IG(c, d)$$

Los componentes de varianzas tienen distribución *a priori* Gama Inversa (~IG). La función de densidad *a priori* del parámetro de efecto de Bloque fue asumida como uniforme.

La distribución *a posteriori* conjunta es definida como:

$$f(\beta, \gamma, \sigma_e^2, \sigma_f^2 | y) \propto f(\beta) f(\gamma | \sigma_f^2) f(\sigma_f^2) f(\sigma_e^2) f(y | \beta, \gamma, \sigma_e^2, \sigma_f^2)$$

Posteriormente, se evaluó la asociación entre los perfiles genéticos familiares obtenidos por los marcadores ISSR y los valores genéticos familiares determinados por el análisis Bayesiano. El análisis de asociación bayesiana se basó en el siguiente modelo

$$y_{ijk} = X_j + Z_k + \varepsilon_{ijk}$$

donde y_{ijk} corresponde al i -ésimo valor de VG con $y_{ijk} \sim N(0; \sigma^2)$; X_j es el efecto del j -ésimo marca molecular, Z_k es el efecto del k -ésimo *cluster* determinado con el software STRUCTURE, y ε_{ijk} corresponde al efecto residual de la ijk -ésima asociación que depende de la k -ésimo *cluster* y del j -ésimo marca con $\varepsilon \sim N(0; \sigma_e^2)$.

Se evaluó el efecto de cada marca molecular (*loci* ISSR) mediante un Modelo Bayesiano que toma en consideración el efecto de la estructura genética. Para ello se utilizó el procedimiento GENDOD con la opción BAYES, con periodo de descarte (*Burn in*) de 5000 muestras y un tamaño de cadenas de 100000. El algoritmo de Gibbs, una variante de los Métodos de Monte Carlo, vía Cadenas de Markov, se utilizó para la conformación de la distribución *a posteriori* paramétrica. Por último, el efecto del marcador sobre la característica (r^2) fue calculado mediante un modelo lineal general (GLM), implementado en el programa SAS (1996).

CAPITULO VI: RESULTADOS

6.1 Variabilidad fenotípica familiar

El efecto familiar fue significativo para todas las características de estudio (Tabla 3). De acuerdo al criterio de información bayesiano (BIC), el modelo que contempla el efecto familiar explicó mejor la variabilidad de las características de estudio, en contraste con el modelo reducido. La selección del modelo adecuado se basa en elegir el valor mínimo de BIC, el cual corresponde a la mayor probabilidad posterior bayesiana (NEATH y CAVANAUGH, 2012). Todos los diferenciales de BIC (Δ BIC) fueron superiores a 10, lo cual indica una fuerte evidencia de que existen diferencias entre las familias.

Tabla 3. Cuadro de selección de modelo basado en Criterio de Información Bayesiano (BIC) para las características de IF, SV, HT, DAP, FT, PF, CR y REC en *E. cladocalyx*. El modelo nulo (1) corresponde al modelo reducido, mientras que el modelo (2) considera el efecto familiar.

Modelo	IF	SV	HT	DAP	FT	PF	CR	REC
Modelo nulo (1)								
2 Log Likelihood	3501	778	4557	5547	1177	1354	1428	2523
BIC	3767	1033	4564	5554	1427	1606	1680	2789
Modelo familiar (2)								
2 Log Likelihood	3432	757	4511	5514	1160	1334	1390	2477
BIC	3580	897	4519	5522	1300	1474	1530	2625
Δ BIC (1 - 2)	188	136	46	32	127	132	150	163

6.2. Patrones de variabilidad genética

Los partidores ISSR utilizados generaron un total de 93 *loci*, que fluctuaron entre los 100 y 2.500 pb, mientras que en forma individual cada partidor amplificó entre nueve y 15 *loci* (Tabla 4). Los niveles de polimorfismos de los ocho partidores ISSR fluctuaron entre 44,4% y 100%. Los partidores que resultaron ser más polimórficos fueron ISO₁, RCA₇, y UBC810 (Anexo I, Figura A. 1); mientras que el de menor polimorfismo fue RA(CGT) (Anexo I, Figura A. 2). Los resultados indicaron que el 83.87 % del total de los *loci* (78 *loci*) se identificaron como *loci* neutrales y fueron considerados en posteriores análisis.

Tabla 4. Tabla resumen de los productos de amplificación para cada partidor ISSR. *N*: Número de *loci* totales; *Nn*: Número de *loci* neutrales; *Nnp*: Número de *loci* polimórficos neutrales; %*P*: Porcentaje de *loci* polimórficos neutrales.

Partidor	<i>N</i>	<i>Nn</i>	<i>Nnp</i>	% <i>P</i>
RA(CGT)	9	9	4	44.4
ISO ₁	14	14	14	100.0
ISO ₂	15	12	10	83.3
TA(CAG) ₄	11	8	7	87.5
T(GT) ₉	11	9	8	88.9
GA ₈	8	6	5	83.3
R(CA) ₇	12	9	9	100.0
UBC810	13	11	11	100.0
Total	93	78	68	87.2

6.3 Análisis de estructura genética de *E. cladocalyx*

El análisis de estructura genética mediante el programa STRUCTURE determinó dos posibles grupos genéticamente homogéneos para *E. cladocalyx* (Tabla 5; Anexo II Tabla A.1; Figura A. 3; Figura A. 4). Las procedencias de Flinders Ranges (Mt. Remarkable y Wirrabara) y de Península Eyre (Cowell y Marble Range) fueron agrupadas en un mismo *cluster*, mientras que Flinders Chase (Isla Kangaroo) obtuvo mayor grado de pertenencia hacia un *cluster* diferente. El AMOVA reveló las procedencias están significativamente diferenciadas ($\Phi_{st} = 0.14$; Tabla 6).

Consistente con los resultados de STRUCTURE, en el análisis pareado de Φ_{st} (Tabla 7) se registró que en promedio Flinders Chase está mayormente diferenciada de las demás procedencias, a excepción de Wirrabara.

Tabla 5. Cuadro resumen de los grados de pertenencia de cada procedencia a un determinado grupo o *cluster*.

Procedencia	<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 2</i>
Mt. Remarkable	0.8	0.2
Cowell	0.984	0.016
Marble Range	1	0
Wirrabara	0.62	0.38
Flinders Chase	0.294	0.706

Tabla 6. Análisis de varianza molecular entre procedencias de *E. cladocalyx*.

Fuente de variación	d.f	CV	% PV
Entre procedencias	4	1.0078	14.05
Entre familias	40	6.167	85.95
Total	44	7.131	
Φ_{st}	0.14		
<i>P</i> -value	< 0.000		

$p < 0.05$; d.f : grados de libertad; CV: Componentes de varianza; %PV: Porcentaje de variación.

Tabla 7. Análisis pareado de índices de diferenciación (Φ_{st}) entre procedencias de *E. cladocalyx*.

Procedencia	Mt. Remarkable	Cowell	Marble Range	Wirrabara	Flinders Chase
Mt. Remarkable	-				
Cowell	0.19*	-			
Marble Range	0.17*	0.11*	-		
Wirrabara	0.11*	0.17*	0.19*	-	
Flinders Chase	0.16*	0.25*	0.19*	0.06	-

* $p < 0.05$

6. 4 Análisis de asociación de marcadores y características complejas.

Veintidós *loci* amplificados de los partidores T(GT)₉ (2), ISO₂ (4), ISO₁ (3), R(CA)₇ (6), UBC810 (4) y TA(CAG)₄ (3), pudieron ser asociados con alguno de los caracteres estudiados (Tabla 6), los cuales representan un 28.2 % de total de los *loci* testeados. Los 22 *loci* asociados explicaron entre un 7 y 22 % de la variación fenotípica. Los intervalos de credibilidad Bayesianos revelaron 16 asociaciones entre marcador y característica que tienen un efecto positivo, y 19 que tienen un efecto negativo en el fenotipo de los árboles. En forma individual, se encontraron cinco *loci* asociados a HT (explicando entre 8-15 % de la variación), siete *loci* asociados a DAP (7-11 %), un *locus* asociado a rectitud (10%), siete *loci* asociados a IF (8-16 %), cuatro *loci* asociados a SV (9-10 %), dos *loci* asociados a FT (13-14%), tres *loci* asociados a PF (9-13 %), y seis *loci* asociados a CR (9-22 %).

Varios *loci* están en asociación con más de un carácter (Tabla 8). Tres *loci* fueron asociados a HT y a DAP. Además, los tres *loci* aportaron los mismos efectos para ambos caracteres (dos de efecto positivo y uno de efecto negativo). Un fragmento de 450-500 pb amplificado a partir de UBC810 se asoció a cinco caracteres a la vez (DAP, IF, SV, PF y CR), mientras que la mayoría fueron asociados a uno o dos caracteres.

Los *loci* amplificados de GA₈ y RA(CGT) no pudieron ser adecuadamente asociados a ninguno de los caracteres estudiados. Un *locus* de 1500 pb aprox., amplificado a partir de RA(CGT), fue asociado con CR, no obstante sólo fue significativo al discriminar el efecto de estructura genética en el modelo de análisis, indicando un falso positivo (Tabla 9). Similarmente, los *loci* de 550-600 pb, 200-220 pb y 1700-1800 pb; amplificados por R(CA)₇, ISO₁, e ISO₂, respectivamente, también fueron erradamente asociados a características.

Tabla 8. Cuadro resumen de *loci* asociados a las variables en estudio de *E. cladocalyx*. Todos los *loci* mostrados fueron significativos para las características fenotípicas, considerando la estructura genética en el modelo Bayesiano de asociación.

Característica	Partidor	TM (pb)	Media	IC (95%)		r ²
				Inferior	Superior	
HT	ISO2	1500-1700	0.559	0.091	1.040	0.087
	ISO2	600 pb	-0.405	-0.687	-0.126	0.128
	TACAG	350-370	-0.181	-0.351	-0.009	0.073
	T(GT)9	780-800	0.305	0.115	0.495	0.152
	R(CA)7	550-600	0.320	0.000	0.646	0.082
DAP	ISO1	600-630 pb	0.312	0.078	0.544	0.111
	ISO2	1500-1700	0.744	0.136	1.369	0.091
	ISO2	350	-0.487	-0.031	-0.935	0.077
	TACAG	350-370	-0.276	-0.499	-0.050	0.094
	T(GT)9	1200	-0.344	-0.657	-0.035	0.077
	T(GT)9	780-800	-0.286	0.026	0.547	0.077
	UBC810	450-500	-0.294	-0.564	-0.022	0.082
REC	ISO2	350	-0.729	-1.314	-0.155	0.103
IF	ISO1	450-470	-0.411	-0.687	-0.132	0.141
	ISO2	360-380	0.378	0.073	0.678	0.108
	TACAG	760-780	0.328	0.028	0.620	0.094
	R(CA)7	2300-2500	-0.427	-0.760	-0.095	0.117
	R(CA)7	1800-1900	0.450	0.124	0.768	0.137
SV	R(CA)7	300-330	-0.405	-0.794	-0.020	0.085
	UBC810	450-500	0.477	0.181	0.775	0.166
	R(CA)	1300-1400	0.340	0.051	0.632	0.101
	UBC810	1000-1100	-0.340	-0.625	-0.050	0.095
	UBC810	450-500	-0.391	-0.713	-0.067	0.106
FT	UBC810	400	0.351	0.046	0.650	0.097
	R(CA)7	450-470	-0.402	-0.687	-0.115	0.140

Tabla 8. (Continuación)

Característica	Partidor	TM	Media	IC (95 %)		r ²
				Inferior	Superior	
PF	UBC810	400	0.307	0.080	0.530	0.137
	ISO1	1100-1200	-0.648	-1.091	-0.203	0.130
	ISO1	450-470	0.241	0.041	0.444	0.094
CR	UBC810	450-500	-0.335	-0.566	-0.101	0.135
	TACAG	900-1000	-0.550	-1.033	-0.078	0.118
	TACAG	760-780	-0.317	-0.623	-0.018	0.108
	R(CA)7	1800-1900	-0.374	-0.711	-0.045	0.113
	R(CA)7	300-330	0.459	0.070	0.843	0.123
	UBC810	510-520	-0.388	-0.723	-0.042	0.114
	UBC810	450-500	-0.534	-0.831	-0.236	0.219

IC: Intervalo de Credibilidad; TM: Tamaño de fragmento.

Tabla 9. Falsos positivos de asociación. En esta tabla, se muestran los *loci* que fueron asociados a características debido al desconsiderar o ignorar estructura genética de *E. cladocalyx*.

Tipo de análisis	Característica	Partidor	TM (pb)	Media	IC (95%)		r ²
					Inferior	Superior	
SES	DAP	R(CA)7	550-600	0.424	0.002	0.847	0.077
	REC	ISO1	200-220	0.249	0.007	0.489	0.068
	CR	RACGT	1500	-0.409	-0.790	-0.033	0.075
		ISO2	1700-1800	-0.940	-1.860	-0.026	0.069
IES	DAP	R(CA)7	550-600	0.419	-0.007	0.853	0.077
					-		
	REC	ISO1	200-220	0.240	0.0004	0.479	0.071
	CR	RACGT	1500	-0.363	-0.761	0.024	0.093
ISO2		1700-1800	-0.886	-1.762	0.015	0.095	

SES: Análisis ignorando la estructura genética; IES: Análisis considerando la estructura genética en el modelo Bayesiano. IC: Intervalo de Credibilidad. TM: Tamaño de marcador.

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN

7.1 Variabilidad fenotípica de *E. cladocalyx* para características complejas.

La variabilidad fenotípica es la primera aproximación para encontrar variabilidad genética, la cual puede ser aprovechada en los programas de selección. La aplicación de la genética cuantitativa basada en la información fenotípica y de pedigrí, es la estrategia más común en el mejoramiento forestal (TSAROUHAS et al., 2002). De acuerdo con Collard et al. (2005) la variabilidad genética encontrada en una población de mejoramiento puede ser evaluada mediante marcadores moleculares para asistir la selección de árboles de forma eficaz, eficiente, fiable y rentable. En el presente estudio, se corroboró que las familias difieren significativamente en los ocho caracteres estudiados, lo cual sienta las bases para generar análisis de asociación fenotipo-genotipo. Estos resultados están en concordancia con varios estudios que determinaron que el crecimiento en altura, diámetro, rectitud de fuste, intensidad de floración y precocidad de floración de árboles de *E. cladocalyx*, poseen de altos a moderados grados de control genético aditivo (MORA, 2006; CANÉ-RETAMALES et al., 2011; MORA et al., 2009). Cabe destacar, que en este trabajo se evidencia que otras variables como la floración tardía y la capacidad reproductiva de árboles también son significativamente diferentes entre familias. En el caso de la sobrevivencia, Mora et al. (2009) habían determinado que el control genético aditivo era relativamente bajo a los cinco años de edad. No obstante, en este estudio el criterio de información bayesiano (BIC) evidenció que el efecto familiar fue altamente significativo ($\Delta BIC = 136$) en un periodo de 12 años. En *E. globulus* se ha demostrado que en edades tempranas (4-5 años) la heredabilidad de la sobrevivencia a estrés por sequía también puede ser relativamente baja (CHAMBERS et al., 1996).

7.2. Asociación de marcadores y caracteres de crecimiento

A pesar de que el crecimiento se considera una variable de herencia poligénica y de baja heredabilidad, en el género *Eucalyptus* y en otras especies forestales existen una serie de trabajos que reportan regiones genéticas asociadas a altura, diámetro, crecimiento radicular (FREEMAN et al., 2009; BYRNE et al., 1997; THUMMA et al., 2010a; MARQUES et al., 1999; BUNDOCK

et al., 2008). En general los caracteres de diámetro y altura en *Eucalyptus spp* poseen heredabilidades bajas y moderadas (VOLKER et al., 2008; HAMILTON et al., 2009). En el presente trabajo, se detectaron 14 *loci* que podrían relacionarse con el crecimiento en altura, diámetro a la altura de pecho y rectitud de fuste de *E. cladocalyx*. Tres *loci* fueron asociados en forma positiva a altura y DAP, lo cual es esperado ya que se ha documentado que para *Eucalyptus* existe una correlación genética positiva entre ambas variables. Por ejemplo, Vargas-Reeve et al. (2013) determinaron que el diámetro y la altura de árboles de *E. cladocalyx* tienen una alta correlación genética ($r = 0.81$), lo cual podría indicar un posible efecto pleiotrópico de los *loci* mencionados. Previamente, en los géneros *Populus* y *Corymbia* ya se han reportado *loci* pleiotrópicos para caracteres de crecimiento (WU y STETTLER; 1998; RAE et al., 2008; DILLEN et al., 2009; SHEPHERD et al., 2008). Este tipo de *loci* podrían ser importantes para el mejoramiento genético, ya que son buenos candidatos para la selección asistida por marcadores (QUARRIE, 1996; MANGIN et al., 1998).

En el análisis de asociación de marcadores con la rectitud de los árboles se encontró sólo un *locus* asociado, el cual tuvo un efecto negativo sobre la característica. Este mismo *locus* también fue asociado al diámetro en forma negativa. Vargas-Reeve et al (2013) reportaron una baja correlación entre las variables de diámetro y rectitud en *E. cladocalyx*. No obstante, Callister et al. (2008) pudieron determinar un positivo coeficiente de correlación entre crecimiento y rectitud en la misma especie. Cabe destacar que Cappa et al (2010) encontraron un importante efecto del sitio para establecer correlación entre crecimiento y rectitud en *E. viminalis*, por lo tanto podría aun no ser bien entendida la relación entre ambas variables. En el caso de rectitud de fuste, existen pocos estudios de asociación con marcas moleculares en especies forestales. Por ejemplo, Kumar et al. (2004) detectaron dos *loci* de efecto positivo justificando un 41.2 % de la variación fenotípica en *Pinus radiata*.

En general, de acuerdo con Grattapaglia et al. (2009) el efecto de un QTL de crecimiento explicaría entre un 10-30 % de la variación fenotípica. En este trabajo, se detectó que los *loci* asociados a crecimiento justificaron entre un 7-22 % de la variación fenotípica, los cuales están en concordancia con otros estudios (GRATTAPAGLIA et al., 1996; BYRNE et al., 1997). En teoría, la presencia de un QTL de crecimiento incrementaría el mérito genético de un árbol, no

obstante éste también podría tratarse de un gen semi-letal frecuente en una población (REMINGTON y O' MALLEY, 2000). En este estudio, dos *loci* tuvieron un efecto negativo para altura de árboles, mientras que para DAP se encontraron tres QTLs con efecto negativo. Los QTL de efecto negativo también han sido reportados en otras especies para características de crecimiento (BRADSHAW y STETTLER, 1995; REMINGTON y O' MALLEY, 2000). Cabe destacar, que los QTL de efecto negativo también podrían tratarse como criterio de selección en el mejoramiento. Por ejemplo, la resistencia al quiste de la soya en *Glycine max* es medida en una escala de daño, por lo tanto los QTLs que confieren resistencia tendrán un efecto negativo sobre la característica (ARRIAGADA et al., 2012).

7.3. Asociación de marcadores y componentes de floración.

Uno de los propósitos de la introducción de *E. cladocalyx* a Chile fue apoyar la producción de miel en regiones con déficit hídrico (MORA et al., 2009; CANÉ-RETAMALES et al., 2011), por lo tanto es importante comprender el comportamiento de los componentes de floración en la especie. En los ensayos experimentales de *E. cladocalyx* en Chile se ha determinado que la intensidad y precocidad del floración son altamente heredables, lo que sugiere que estas variables están sujetas a un alto grado de control genético aditivo (MORA et al., 2009; CANÉ-RETAMALES et al., 2011). En el presente estudio, la intensidad pudo ser asociada a siete *loci*, de los cuales cuatro tuvieron un efecto positivo en la característica y tres un efecto negativo, mientras que la precocidad fue asociada sólo con tres *loci* (dos *loci* de efecto negativo y un locus de efecto positivo). Dos *loci* fueron asociados a ambas variables (ISO₁₍₄₅₀₋₄₀₀₎; UBC810₍₄₅₀₋₅₀₀₎), no obstante los efectos de los *loci* fueron inversos, es decir ISO₁₍₄₅₀₋₄₀₀₎ tuvo un efecto positivo para precocidad y negativo para intensidad, mientras que UBC810₍₄₅₀₋₅₀₀₎ tuvo un efecto positivo para intensidad y un efecto negativo para precocidad. Cané- Retamales et al. (2011) determinaron que existe una correlación positiva entre las variables de intensidad y precocidad de floración, destacando el impacto que tendría la selección de árboles en fase reproductiva a temprana edad y de alta intensidad de floración en años posteriores. Los resultados podrían indicar que los *loci* no son estables a diferentes edades de los árboles, y cambien su participación en la expresión de los caracteres. La estabilidad de un QTL en el tiempo y a diferentes condiciones medioambientales, es fundamental para su aplicación (BRADSHAW y GRATAPAGLIA, 1994). La estabilidad de

un QTL ha sido mayormente estudiada para caracteres de crecimiento ya que se sabe que la heredabilidad de los caracteres de crecimiento varía en el tiempo debido a que es un proceso dinámico y de alta interacción con el medio ambiente.

La variable de capacidad de reproducción medida desde el establecimiento del ensayo a árboles de 12 años de edad (CR) fue asociada a seis *loci* (explicando entre un 9-19% de la variación fenotípica), de los cuales tres también fueron asociados a las intensidad de floración. Este resultado puede indicar que los *loci* envueltos en una mayor intensidad de floración (dependiendo del efecto del *locus*) también pueden condicionar la iniciación a estado reproductivo de un árbol, lo cual no necesariamente está relacionado a una edad en específico. En adicción, ninguno de los *loci* de efecto significativo para CR fue asociado con precocidad de floración, probablemente debido a que los árboles mayormente precoces de *E. cladocalyx* florecen desde los 2-3 años de edad (MORA et al., 2009). Contreras-Soto et al. (2011) encontraron que la interacción procedencia-sitio no tiene un efecto significativo para la característica de presencia o ausencia de eventos florales a los ocho años de edad, por lo tanto los *loci* asociados a CR encontrados en el presente estudio podrían mantener su estabilidad en diferentes sitios.

La floración de *E. cladocalyx* se ha considerado como abundante y duradera (RIEKS, 2009). En Chile, se ha registrado que el periodo de floración de *E. cladocalyx* ocurre fundamentalmente entre los meses de diciembre y abril, periodos que son críticos debido a las bajas precipitaciones (MORA et al., 2007), lo cual es negativo para la producción de miel. No obstante, en los ensayos ubicados en el Norte de Chile se ha observado que algunos individuos florecen o mantienen su estado reproductivo posterior al periodo de floración. En el presente estudio, la variable de floración tardía pudo ser asociada a dos *loci*, uno de efecto positivo (UBC810₍₄₀₀₎) y otro de efecto negativo (R(CA)₇₍₄₅₀₋₄₇₀₎) sobre la característica. Los *loci* explicaron entre un 11-13 % de la variación fenotípica. Adicionalmente, el locus de 400 pb amplificado a partir de UBC810 también fue asociado con la sobrevivencia a condiciones de estrés hídrico. La floración es un proceso particularmente sensible al estrés abiótico, por lo tanto las plantas modulan los tiempos de floración y la producción de flores en respuesta al estrés (JENKS et al., 2007). En general, la inducción de la floración se asocia a un mecanismo de evasión al estrés por sequía y no de tolerancia (LEVITT, 1980; STATON et al., 2000), no obstante en plantas tolerantes pequeños

grupos de genes tales como los que controlan los tiempos de floración, altura de plantas, y ajuste osmótico pueden cumplir un rol importante en la adaptación a ambientes propensos a sequía (FORSTER et al., 2004)

7. 4. Asociación de marcas moleculares y capacidad de sobrevivencia en condiciones áridas del norte de Chile

El estrés por sequía es una de las principales causas de pérdida a nivel mundial para la agricultura. Los efectos negativos incluyen la dificultad de establecimiento de plántulas, menor crecimiento y desarrollo, generar mayor susceptibilidad a patógenos y ataque de insectos, y mayor susceptibilidad a incendios (HOGG y WEIN, 2005; ZHAO y RUNNING, 2010). Todos estos puntos se relacionan estrechamente con la productividad económica de un cultivo, por lo tanto la selección de material altamente eficiente en el uso de agua, podría minimizar los efectos de la sequía, e incrementar la productividad en áreas con baja disponibilidad de agua (RONNBERG-WASTLJUNG et al., 2005). Particularmente en Chile, cerca de 30 millones ha (40% del territorio nacional) se clasifican como zonas áridas o semiáridas (ORMÁZABAL, 1991). *Eucalyptus cladocalyx* se presenta como una importante oportunidad, en contraste con otras especies forestales (eg. *E. globulus*) ya que es sustentable en regiones con escasez de precipitaciones anuales y es moderadamente tolerante a la salinidad. En el presente estudio, se evaluó la asociación de marcadores moleculares con la capacidad de sobrevivencia en condiciones de limitaciones hídricas de *E. cladocalyx*. El análisis permitió detectar cuatro marcadores asociados a sobrevivencia, los cuales explicaron entre un 9-10 % de la variación fenotípica. Dos *loci* tuvieron un efecto positivo en la característica, mientras que el resto mostró un efecto negativo sobre el carácter. Una serie de cambios moleculares, bioquímicos fisiológicos y morfológicos actúan en respuesta frente al estrés en plantas (HAMANISHI et al., 2011). Una de las respuestas más comunes es reducir el potencial hídrico celular, y de esta manera reducir la pérdida de agua vía transpiración (JARVIS y JARVIS, 1963; TSCHAPLINSKI et al., 2006). Se han determinado varios criterios para medir la capacidad de tolerancia/resistencia frente a déficit hídrico. Brendel et al. (2008) detectaron 10 regiones genéticas asociadas a una mejor eficiencia en el uso de agua, (expresado en función de la composición isotópica de carbono 13), los cuales explicaron una gran porción de la variación fenotípica de *Quercus robur*. Ronnberg-Wastljung et

al (2005) detectaron cuatro regiones relacionadas al uso eficiente de agua en *Salix dasyclados* x *Salix viminalis*, los cuales explicaron hasta un 11% de la variación. Tschaplinski et al (2006) además de reportar 12 regiones genómicas asociadas a la eficiencia de agua en *Populus* (que explicaron entre un 5.5 – 19.1 % de la variación fenotípica), reportaron que varias de ellas fueron consistentes al ser evaluadas en diferentes sitios. En el presente estudio la sobrevivencia fue medida de acuerdo a la capacidad de establecimiento (muere o sobrevive) en condiciones de aridez, por lo tanto podrían relacionarse los *loci* detectados con cualquiera de los criterios utilizados en los estudios previamente expuestos. En adicción, el efecto de los marcadores asociados a sobrevivencia (9-10 %) está dentro de un rango esperado de acuerdo a los estudios mencionados.

7. 5. Efecto de la estructura genética de poblaciones en la detección QTLs.

Cuando las poblaciones se encuentran estructuradas aumenta la probabilidad de realizar falsas asociaciones entre *loci* y las características cuantitativas (BALDING, 2006; THUMMA et al., 2005; GRATTAPAGLIA y KIRST, 2008). En poblaciones naturales de *Eucalyptus spp.*, es común encontrar bajos índice de diversidad y altos índices de diferenciación genética entre poblaciones (MCDONALD et al., 2003), lo cual favorece a que se genere estructuración poblacional. Estudios previos han indicado que *E. cladocalyx* presenta esta condición (BUSH y THUMMA, 2013; STEANE et al., 2011; MCDONALD et al., 2003), por tanto se espera encontrar que la estructuración de poblaciones tenga un efecto sobre la detección de marcas moleculares asociadas a caracteres fenotípicos. En el presente estudio, se determinó que la estructura genética de *E. cladocalyx* se conformó de dos principales grupos. En un mismo *cluster* se agruparon las procedencias Mt. Remarkable, Wirrabara, Cowell y Marbe Range, mientras que la procedencia Flinders Chase fue ubicada en un *cluster* independiente, lo cual es consistente con lo encontrado por otros autores (BUSH y THUMMA, 2013; STEANE et al., 2011). En adicción, el análisis de varianza reveló altos índices de diferenciación de Flinders Chase con la mayoría de las procedencias. Los resultados indicaron que cuatro *loci* fueron falsos positivos de asociación. Esto pudo ser corroborado debido a que para todo análisis de asociación se probaron dos diferentes modelos, uno que contempló la estructura genética, y otro que sólo consideró al *locus* como el único factor explicativo de la característica. Los resultados encontrados son de

relevancia para posteriores estudios de asociación marcador- fenotipo, debido a que demuestran que el efecto de estructura genética, en algunos casos, tiene un efecto en la detección de marcadores asociados a caracteres, por lo tanto debe ser previamente definida e incluida en los modelos estadísticos. Previamente se ha evidenciado que *E. cladocalyx* posee niveles de endogamia y coancestridad relativamente altos (MCDONALD et al., 2003), lo cual tiene un efecto importante en el mérito genético de los árboles (BUSH y THUMMA, 2013). Por lo tanto, el efecto de estructura no es el único factor a considerar en posteriores análisis de asociación (CAPPA et al., 2011). Cuando se presentan índices de endogamia relativamente altos, es común encontrar alelos fijados en una población, los cuales pueden ser propensos a ser asociados a fenotipos (GRATTAPAGLIA y KIRST, 2008). En este estudio, un fragmento de 450-500 pb amplificado a partir de UBC810 fue asociado a cinco caracteres, el cual no se presentó como un falso positivo debido al efecto de estructura, sin embargo podría tratarse de un *locus* lo suficientemente frecuente en una población para ser asociado con varios caracteres a la vez.

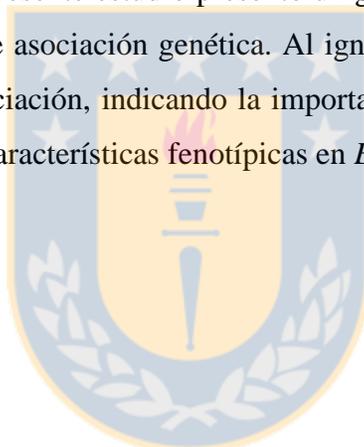


Capítulo VIII: CONCLUSIONES

La diversidad genética disponible en Chile de *E. cladoclayx* permitió detectar regiones genéticas asociadas a características complejas, las cuales pueden contribuir al mejoramiento genético en la especie.

Diez regiones detectadas podrían ser utilizadas como criterio de selección para obtener mejores méritos genéticos para más de un carácter a la vez (caracteres de crecimiento, componentes de floración y sobrevivencia a sequía), debido a posibles efectos pleiotrópicos.

Similar a estudios anteriores, el presente estudio presentó un grado de estructuración genética, el cual fue incluido en el modelo de asociación genética. Al ignorar la estructura genética, pueden generarse falsos positivos de asociación, indicando la importancia de considerar tal efecto en la detección de *loci* relacionados a características fenotípicas en *E. cladocalyx*.



CAPITULO IX: BIBLIOGRAFIA

ACQUAAH, G. **Principles of plant genetics and breeding**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.

ADAMS, W. T.; STRAUSS, S. H.; COPES, D. L.; GRIFIN, A. R. **Population genetics of forest trees**. Dordrecht and Boston: Kluwer Academic, 1992.

AMMIRAJU, J. S. S.; DHOLAKIA, B. B.; SANTRA, D. K.; SINGH, H.; LAGU, M. D.; TAMHANKAR, S. A.; RANJEKAR, P. K. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 5, p. 726-732, 2001.

ARANZANA, M.J.; KIM, S.; ZHAO, K.; BAKKE, E.; HORTON; JAKOB, K.; LISTER, C.; MOLITOR, J.; SHINDO, C.; TANG, C.; TOOMAJIAN, C.; TRAW, B.; ZHENG, H.; BERGELSON, J.; DEAN, C.; MARJORAM, P.; NORDBORG, M. Genome-Wide Association Mapping in Arabidopsis Identifies Previously Known Flowering Time and Pathogen Resistance Genes. **Plas genetics**, v. 1, n. 5, p. 532-539, 2005.

ARRIAGADA, O.; MORA, F.; DELLAROSSA, J. C.; FERREIRA, M. F.; CERVIGNI, G. D.; SCHUSTER, I. Bayesian mapping of quantitative trait loci (QTL) controlling soybean cyst nematode resistant. **Euphytica**, v. 186, n. 3, p. 907-917, 2012.

ASSEFA, K.; MERKER, A. H.; TEFERA, H. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. **Hereditas**, v. 139, p. 174-183, 2003.

ASUKA, Y; TOMARU, N.; MUNEHARA, Y.; TANI, N.; TSUMURA, Y.; YAMATO, S. Half-sib family structure of *Fagus crenata* saplings in an old-growth beech-dwarf bamboo forest. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2565-2575, 2005.

- ATCHISON, E. Chromosome numbers in the Myrtaceae. **American Journal of Botany**, p. 159-164, 1947.
- BALASARAVANAN, T; CHEZIAN, P.; KAMALAKANNAN, R.; YASODHA, R.; VARGHESE, M.; GURUMURTHI, K.; GHOSH, M. Identification of Species-Diagnostic ISSR Markers for Six *Eucalyptus* Species. **Silvae Genetica**, v. 55, n. 3, p. 119-122, 2006.
- BALASARAVANAN, T.; CHEZHIAN, P.; KAMALAKANNAN, R.; GHOSH, M.; YASODHA, R.; VARGHESE, M.; GURUMURTHI, K. Determination of inter- and intra-species genetic relationships among six *Eucalyptus* species based on inter-simple sequence repeats (ISSR). **Tree Physiology**, v. 25, p. 1295–1302, 2005.
- BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 10, p. 781-791, 2006.
- BRADBURY, P. J.; ZHANG, Z.; KROON, D. E.; CASSTEVENS, T. M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER, E. S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, v. 23, n. 19, p. 2633-2635, 2007.
- BRADSHAW, H. D.; STETTLER, R. F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form, and phenology traits in a forest tree. **Genetics**, v. 139, n. 2, p. 963-973, 1995.
- BRADSHAW, H. D.; GRATTAPAGLIA, D. QTL mapping in interspecific hybrids of forest trees. **Forest Genetics**, n. 1, p. 191–196, 1994.
- BRAMMALL, B; HARWOOD, C.E. Vegetative propagation by rooted cuttings of *Eucalyptus* species from temperate low-rainfall environments. Poster to IUFRO *Eucalyptus* Symposium, Chile, September 2001. Canberra: CSIRO Forestry and Forest Products, 2000.

- BRENDEL, O.; LE THIEC, D.; SCOTTI-SAINTAGNE, C.; BODÉNES, C.; KREMER, A.; GUEHL, J-M. Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. **Tree Genetics and Genomes**, v. 4, p. 263-278, 2008.
- BRESSEGHELLO, F.; SORELLS, M. Association Mapping of Kernel Size and Milling Quality in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. **Genetics**, v. 172, p. 1165–1177, 2006.
- BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 13, p. 79–148, 2000.
- BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1990.
- BUCKLER, E.S.; THORNSBERRY, J. M. Plant molecular diversity and applications to genomics. **Current Opinion of Plant Biology**, v. 5, p. 107–111, 2002.
- BUNDOCK, P. C.; POTTS, B. M.; VAILLANCOURT, R. E. Detection and stability of quantitative trait loci (QTL) in *Eucalyptus globulus*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 1, p. 85-95, 2008.
- BUSH, D.; MCCARTHY, K.; MEDER, R. Genetic variation of natural durability traits in *Eucalyptus cladocalyx* (sugar gum). **Annals of Forest Science**, v. 68, n. 6, p. 1057-1066, 2011.
- BUSH, D.; THUMMA, B. Characterising a *Eucalyptus cladocalyx* breeding population using SNP markers. **Tree Genetics & Genomes**, DOI 10.1007/s11295-012-0589-1, 2013
- BUSH, D; JACKSON, T; DRISCOLL, J; HARWOOD, C. **Australian low rainfall tree improvement group: metadata from erasures of hardwood tree improvement trials in southern Australia**. Canberra: CSIRO for the Rural Industries Research and Development Corporation, 2009.

- BUTCHER, P.; MCDONALD, M.; BELL, J. Congruence between environmental parameters, morphology and genetic structure in Australia's most widely distributed eucalypt, *Eucalyptus camaldulensis*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, p. 189–210, 2009.
- BYRNE, M.; MURRELL, J. C.; OWEN, J. V.; KRIEDEMANN, P.; WILLIAMS, E. R.; MORAN, G. F. Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height and leaf area in *Eucalyptus nitens*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 5, p. 674-681, 1997.
- CAGIGAS, M. E.; VAZQUEZ, E.; BLANCO, G.; SANCHEZ, J. A. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites, and rapid markers. **Marine Biotechnology**, v. 1, p. 286-296, 1999.
- CALLISTER, A.; BUSH, D. J.; COLLINS, S.; DAVIS, W. Prospects for genetic improvement of *Eucalyptus cladocalyx* in Western Australia. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 38, p. 211-226, 2008.
- CANNELL, M. G. R. Physiological basis of wood production: a review. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 4, n. 1-4, p. 459-490, 1989.
- CANÉ-RETAMALES, C.; MORA, F.; VARGAS-REEVE, F.; PERRET, S.; CONTRERAS-SOTO, R. Bayesian threshold analysis of breeding values, genetic correlation and heritability of flowering intensity in *Eucalyptus cladocalyx* under arid conditions. **Euphytica**, v. 178, p. 177-183, 2011.
- CAPPA, E.; MARTÍNEZ, M.; GARCIA, M.; VILLALBA, P.; POLTRI, S. M. Effect of population structure and kinship relationships on the results of association mapping tests of growth and wood quality traits in four *Eucalyptus* populations. **BMC Proceedings**, v. 5, n. Suppl 7, 2011.

- CAPPA, E. P.; PATHAUER, P.S.; LÓPEZ, G. A. Provenance variation and genetic parameters of *Eucalyptus viminalis* in Argentina. **Tree Genetics and Genomes**, v. 6, p. 981-994, 2010.
- CARDON, L. R.; BELL, J. I. Association study designs for complex diseases. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 2, p. 91-99, 2001.
- CHAMBERS, P. G. S.; POTTS, B. M.; BORRALHO, N. M. G. Genetic analysis of survival in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*. **Silvae genetica**, v. 45, n. (2-3), p. 107-112, 1996.
- CHENG, C. Y.; PENG, H. Differentiation and phylogenetic relationship among different cultivars of asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) assessed using ISSR markers. **Nordic Journal of Botany**, v. 28, p. 251-256, 2010.
- CHEZHIAN, P.; YASODHA, R.; GOSH, M. Genetic diversity analysis in a seed orchard of *Eucalyptus tereticornis*. **New Forests**, v. 40, p. 85-99, 2010.
- CLARKE, B.; MCLEOD, I.; VERCOE, T. **Trees for farm Forestry: 22 Promising Species**. Canberra: RIRDC Press, 2009.
- COLLARD, B. C. Y.; JAHUFER, M. Z. Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v. 142, p. 169-196, 2005.
- CONTRERAS-SOTO, R.; MORA, F.; PERRET, S.; VARGAS-REEVE, F.; CANÉ-RETAMALES, C. Predicción bayesiana del comportamiento poblacional de *Eucalyptus cladocalyx* para características binarias de componentes de florecimiento y supervivencia en zonas áridas de Chile. **Interciencia**, v. 36, n. 9, p. 644-649, 2011.
- CUBERO, J. I. **Introducción a la Mejora genética vegetal**. Ediciones Mundi-Prensa, 2003.

- DAVIDSON, N.; BATTAGLIA, M.; CLOSE, D. Photosynthetic responses to overnight frost in *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Trees**, v. 18, p. 245–252, 2004.
- DELARD, C.; URQUIETA, E.; GONZALEZ, M. **Eucalyptus camaldulensis en Chile: Silvicultura, manejo, productividad y rentabilidad. Antecedentes generales**. Chile: Instituto Forestal, 2000
- DÍAZ, O.; SUN, G. L.; SALOMON, B.; VON BOTHMER, R. Levels and distribution of allozyme and RAPD variation in populations of *Elymus fibrosus* (Schrenk) Tzvel.(Poaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, n. 1, p. 11-24, 2000.
- DILLEN, S.; STORME, V.; MARRON, N.; BASTIEN, C.; NEYRINCK, S.; STEENACKERS, M.; CEULEMANS, R.; BOERJAN, W: Genomic regions involved in productivity of two interspecific poplar families in Europe. 1. Stem height, circumference and volume. **Tree Genet & Genomes**, v. 5, p. 147-164, 2009.
- DOERGE, R.W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature Reviews Genetics.**, v. 3, p. 43–52, 2002.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN-WYK, G. **Eucalypt Domestication and Breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1993.
- EVANNO, G. REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; HOFER, T.; FOLL, M. Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. **Heredity**, v. 103, p. 285–298, 2009.

GRATTAPAGLIA, D., BERTOLUCCI, F. L. G.; SEDEROFF, R. R. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Theoretical and applied genetics**, v. 144, p. 1205–1214, 1995.

FANG, M.; JIANG, D.; GAO, H.; SUN, D.; YANG, R.; ZHANG, Q. A new Bayesian automatic model selection approach for mapping quantitative trait loci under variance component model. **Genetica**, v. 135, n. 3, p. 429-437, 2009.

FAROOQ, S.; AZAM, F. Molecular Markers in Plant Breeding-II. Some Pre-requisites for Use. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 10, p. 1141-1147, 2002

FERGUSON, M. E.; NEWBURY, H. J.; MAXTED, N.; FORD-LLOYD, B. V.; ROBERTSON, L. D. Population genetic structure in *Lens* taxa revealed by isozyme and RAPD analysis. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 45, n. 6, p. 549-559, 1998.

FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, I. V. Structure of Linkage Disequilibrium in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 357-374, 2003.

FORSTER, B.P.; ELLIS, R.P.; MOIR, J.; TALAME, V.; SANGUINETI, M.C.; TUBEROSA, R.; THIS, D.; TEULAT-MERAH, B.; AHMED, I.; MARIY, S. A. E.; BAHRI, H.; EL OUAHABI, M.; ZOUMAROU-WALLIS, N.; EL-FELLAH, M.; BEN SALEM, M. Genotype and phenotype associations with drought tolerance in barley tested in North Africa. **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 157–168, 2004.

FRANÇOIS, O.; DURAND, E. Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 5, p. 773-784, 2010.

FREEMAN, J. S.; POTTS, B. M.; DOWNES, G. M.; THAVAMANIKUMAR, S.; PILBEAM, D. J.; HUDSON, C. J.; VAILLANCOURT, R. E. QTL analysis for growth and wood properties across multiple pedigrees and sites in *Eucalyptus globulus*. **BMC Proceedings**, 5(Suppl 7):08, 2011.

FREEMAN, J. S.; WHITTOCK, S. P.; POTTS, B. M.; VAILLANCOURT, R. E. QTL influencing growth and wood properties in *Eucalyptus globulus*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, n. 4, p. 713-722, 2009.

FULKER, D. W.; CARDON, L. R. A sib-pair approach to interval mapping of quantitative trait loci. **American journal of human genetics**, v. 54, p. 1092-1103, 1994.

GLEADOW, R. M.; WOODROW, I. E. Polymorphism in cyanogenic glycoside content and cyanogenic β -glucosidase activity in natural populations of *Eucalyptus cladocalyx*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 693–699, 2000.

GONZALEZ-MARTINEZ, S. C.; ERSOZ, E.; BROWN, G. R.; WHEELER, N. C.; NEALE, D. B. DNA sequence variation and selection of tag SNPs at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. **Genetics**, v. 172, p. 1915– 1926, 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; PLOMION, C.; KIRST, M.; SEDEROFF, R. R. Genomics of growth traits in forest trees. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 148-156, 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, v. 179, p. 911-929, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F. L. G.; PENCHEL, R.; SEDEROFF, R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. **Genetics**, v. 144, p. 1205–1214, 1996.

HALEY, C. S.; KNOTT, S. A. A simple regression method for mapping quantitative loci in line crosses using flanking markers. **Heredity**, v. 69, p. 315–324, 1992.

HAMANISHI, E. T.; CAMPBELL, M. M. Genome-wide responses to drought in forest trees. **Forestry**, v. 84, n. 3, p. 273-283, 2011.

HAMILTON, M.; RAYMOND, C.; HARWOOD, C.; POTTS, B. M. Genetic variation in *Eucalyptus nitens* pulpwood and wood shrinkage traits. **Tree Genetics & Genomes**, v. 5, p. 307-316, 2009.

HANKS, L. M.; MILLAR, J. G.; PAINE, T. D.; CAMPBELL, C. D. Classical biological control of the Australian weevil *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) in California. **Environmental Entomology**, v. 29, n. 2, p. 369-375, 2000.

HANKS, L. M.; PAINE, T. D.; MILLAR, J. G.; HOM, J. L. Variation among *Eucalyptus* species in resistance to eucalyptus longhorned borer in Southern California. **Entomol Exp Appl**, v. 74, p. 185–194, 1995.

HARTL, D; CLARK, A. **Principles of Population Genetics**, Third Edition. Sinauer Associates Inc, 1997.

HARWOOD, C.; BULMAN, P.; BUSH, D.; MAZANEC, R.; STACKPOLE, D. **Australian Low Rainfall Tree Improvement Group: Compendium of hardwood breeding strategies**. Kingston: RIRDC Press, 2001.

HARDWOOD, C. E.; BUSH, D. J.; BUTCHER, T.; BIRD, R.; HENSON, M.; LOTT, R.; SHAW, S. Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand. 4. Tree improvement for low-rainfall farm forestry. **Australian Forest**, v. 70, p. 23-27, 2007.

HASEMAN, J. K.; ELSTON, R. C. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. **Genetics**, v. 2, p. 3-19, 1972.

HASHIZUME, T.; SHIMAMOTO, I.; HIRAI, M. Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon [*Citrullus lanatus* (THUNB.) MATSUM & NAKAI] using RAPD, RFLP and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n. 5, p. 779-785, 2003.

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, A.; SHAEFFERA, A.; NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, p. 761-769, 1986.

HOGG, E.H; WEIN, R.W. Impacts of drought on forest growth and regeneration following fire in southwestern Yukon, Canada. **Canadian Journal Forest Research**, v. 35, p. 2141-2150, 2005.

HOUSE, A.; BELL, J. C. Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. **Silvae Genetica**, v. 43, p. 167-176, 1994.

HUDSON, I. L.; KIM, S. W.; KEATLEY, M. R. **Climatic influences on the flowering phenology of four Eucalypts: a GMLSS approach.** In: 18th world IMACS/MODSIM Congress, Cairns, Australia, 13-17 july, 2009.

HURME, P.; SILLANPÄÄ, M. J.; ARJAS, E.; REPO, T.; SAVOLAINEN, O. Genetic basis of climatic adaptation in Scots pine by Bayesian quantitative trait locus analysis. **Genetics**, v. 156, n. 3, p. 1309-1322, 2000.

INFOR. **Chile País Forestal.** Concepción: Instituto Forestal, 2009a. Disponible en http://www.prochile.cl/regiones_pro/archivos/region_VIII/CHILE%20PAIS%20FORESTAL.pdf

INFOR. **Estimación de la superficie de bosques plantados por especie según región (a Diciembre de 2008).** 2009b. Disponible en http://www.infor.cl/archivos/series_estadisticas/recurso3.pdf

INGVARSSON, P. K.; GARCIA, M. V.; LUQUEZ, V.; HALL, D.; JANSSON, S: Nucleotide polymorphism and phenotypic associations within and around the phytochrome B2 Locus in European aspen (*Populus tremula*, Salicaceae). **Genetics**, v. 178, p. 2217-2226, 2008.

JANSEN, R. C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v. 136, n. 4, p. 1447-1455, 1994.

JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, v. 135, n. 1, p. 205-211, 1993.

JARVIS, P. G.; JARVIS, M. S. The water relations of tree seedlings.: IV. Some aspects of tissue water relations and drought resistance. **Physiology Plant**, v. 16, p. 501-516, 1963.

Jenks, M. A.; Hasegawa, P. M.; Jain, S. M. **Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops**. Helsinki: University of Helsinki Eds, 2007.

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A. C.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; ODA, S; MELLO, E. J.; GRATTAPAGLIA, D. Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in Eucalyptus: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 175–80, 2003.

KAO, C. H.; ZENG, Z. B.; TEASDALE, R. D. Multiple Interval Mapping for Quantitative Trait Loci. **Genetics**, v. 152, p. 1203–1216, 1999.

KAR, P. K.; SRIVASTAVA, P. P.; AWASTHI, A. K.; URS, S. R. Genetic variability and association of ISSR markers with some biochemical traits in mulberry (*Morus* spp.) genetic resources available in India. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 1, p. 75-83, 2008.

KNOTT, S. A.; ELSEEN, J. M.; HALEY, C. S. Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 71-80, 1996.

KOKWARO, J. **Flowering Plant Families of East Africa: An Introduction to Plant Taxonomy**. East African Publishers, 1994.

KÜLHEIM, C; YEOH, S. H.; WALLIS, R. R.; LAFFAN, S.; MORAN, G. F.; FOLEY, W. J. The molecular basis of quantitative variation in foliar secondary metabolites in *Eucalyptus globulus*. **New Phytologist**, v. 191, p. 1041–1053, 2011.

- KULLAN, A.R.K; VAN DYK, M.M.; JONES, N.; KANZLER; A.; BAYLEY, A; MYBURG, A.
A. Quantitative trait locus analysis of growth and wood density in an interspecific pseudobackcross population of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **BMC Proceedings**, 5(Suppl 7): 30, 2011.
- KUMAR, S.; ECHT, C.; WILCOX, P. L.; RICHARDSON, T. E. Testing for linkage disequilibrium in the New Zealand radiata pine breeding population. **Theoretical and applied genetics**, v. 108, n. 2, p. 292-298, 2004.
- LANDER, S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, p. 185-199, 1989.
- LANFRANCO, D; DUNGEY, H. Insect damage in *Eucalyptus*: A review of plantations in Chile. **Austral Ecology**, v. 26, p. 477–481, 2001.
- LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stress**. New York: Academic Press, 1980
- LI, H.; YE, G.; WANG, J. A Modified Algorithm for the Improvement of Composite Interval Mapping. **Genetics**, v. 175, p. 361–374, 2007.
- MANGIN, B.; THOQUET, P.; GRIMSLEY, N. Pleiotropic QTL analysis. **Biometrics**, p. 88-99, 1998.
- MARQUES, C. M.; VASQUEZ-KOOL, J.; CAROCHA, V. J.; FERREIRA, J. G.; O'MALLEY, D. M.; LIU, B. H.; SEDEROFF, R. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. **Theoretical and applied genetics**, v. 99, n. 6, p. 936-946, 1999.
- MARTINEZ, O; CURNOW, R. N. Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. **Theoretical and applied genetics**, v. 85, p. 480–488, 1992.

- MCDONALD, M. W.; RAWLINS, M.; BUTCHET, P. A.; Bell, J. C. Regional divergence and inbreeding in *Eucalyptus cladocalyx* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 51, p. 393–403, 2003.
- MCCMAHON, L.; GEORGE, B.; HEAN, R. **Eucalyptus cladocalyx**. A treesmart factsheet, Primefacts N° 1077, 2010.
- MEDDINGS, R. L. A.; MCCOMB, J. A.; BELL, D. T. The salt–waterlogging tolerance of *Eucalyptus camaldulensis* x *E. globulus* hybrids. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, p. 787–792, 2001.
- MERCHANT, A.; TAUSZ, M.; ARDNT, S.; ADAMS, M. Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 2017–2029, 2006.
- MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease resistant genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.
- MISSIAGGIA, A. A.; PIACEZZI, A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic mapping of Eef1, a major effect QTL for early flowering in *Eucalyptus grandis*. **Tree Genetics and Genomes**, v. 1, p. 79-84, 2005.
- MONTENEGRO, G.; PIZARRO, R.; AVILA, G.; CASTRO, R.; RÍOS, C.; MUÑOZ, O.; BAS, F.; GÓMEZ, M. Origen botánico y propiedades químicas de las mieles de la región mediterránea árida de Chile. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 30, p. 161–174, 2003.
- MONDINI, L., NOORANI, A.; PAGNOTTA, M. A. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. **Diversity**, v. 1, p. 19-35, 2009.

MORA, F.; GLEADOW, R.; PERRET, S.; SCAPIM, C.A. Genetic variation for early flowering, survival and growth in sugar gum (*Eucalyptus cladocalyx* F. Muell) in southern Atacama Desert. **Euphytica**, v. 169, p. 335-344, 2009.

MORA, F.; PERRET, S.; SCAPIM, C. A.; MARTINS, E. N.; MOLINA, M. P. Variabilidad en el florecimiento de procedencias de *Eucalyptus cladocalyx* en la Región de Coquimbo. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 34, n. 2, p. 131-139, 2007.

MORA, F. Heredabilidad y valor genético (reml/blup) en genotipos de un eucalipto tolerante a la sequía, en el norte de Chile. **Ciencia Florestal**, v. 16, n. 2, 2006.

MORA, F.; PALMA-ROJAS, C.; JARA-SEGUEL, P. Comparación del cariotipo de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus cladocalyx* (Myrtaceae). **Agricultura Técnica**, v. 65, n. 1, p. 20-25, 2005.

NEALE, D. B.; DEVEY, M. E.; JERMSTAD, K. D.; AHUJA, M. R.; ALOSI, M.C.; MARSHALL, K. A. **Use of DNA markers in forest tree improvement research**. Springer Netherlands, 1992.

NEATH, A. A.; CAVANAUGH, J. E. The Bayesian information criterion: background, derivation, and applications. **Computational Statistics**, v. 4, p. 199–203, 2012.

O'MALLEY, D. M.; MCKEAND, S.E. Marker assisted selection for breeding value in forest tree. **Forest genetics**, v. 1, n. 4, p. 207-218, 1994.

ORMAZABAL, C.S. Silvopastoral systems in arid and semiarid zones of northern Chile. **Agroforestry Systems**, v. 14, p. 207–217, 1991.

- PAINÉ, T.; STEINBAUER, M.; LAWSON, S. Native and Exotic Pests of *Eucalyptus*: A Worldwide Perspective. **Annu. Rev. Entomol**, v. 56, p. 181-201, 2011.
- PATERSON, A. H.; LANDER, E. S.; HEWITT, J. D.; PETERSONS, S.; LINCOLN, S. E.; TANKSLEY, S. D. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphism. **Nature**, v. 335, p. 721-726, 1988.
- PAYN, K. G.; DVORAK, W. S.; JANSE, B. J.; MYBURG, A. A Microsatellite diversity and genetic structure of the commercially important tropical tree species *Eucalyptus urophylla*, endemic to seven islands in eastern Indonesia. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 3, p. 519-530, 2008.
- PERRY, D. J.; KNOWLES, P. Spatial genetic structure within three sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) stands. **Heredity**, v. 66, p. 137-142, 1991.
- PRADEEP-REDDY, M.; SARLA, N.; SIDIQQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; ROSENBERG, N.A.; DONNELLY, P. Association Mapping in Structured Populations. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 67, p. 170-181, 2000.
- QUARRIE, S. A. New molecular tools to improve the efficiency of breeding for increased drought resistance. **Plant Growth Reg**, v. 20, p. 167-178, 1996.
- RAE, A. M.; PINEL, M. P. C.; BASTIEN, C.; SABATTI, M.; STREET, N. R.; TUCKER, J.; DIXON, C.; MARRON, N.; DILLEN, S. Y.; TAYLOR, G. QTL for yield in bioenergy *Populus*: identifying G×E interactions from growth at three contrasting sites. **Tree Genetics and Genomes**, v. 4, p. 97-112, 2008.

- RAYBOULD, A. F.; CLARKE, R. T.; GLIDDON, C. J.; GRAY, A. J. Variation and population structure at microsatellite and isozyme loci in wild cabbage (*Brassica oleracea* L.) in Dorset (UK). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 46, p. 351-360, 1999.
- RAYMOND, C. Genetics of Eucalyptus wood properties. **Annals of Forestry Sciences.**, v. 59, p. 525-531, 2002.
- REMINGTON, D. L.; O'MALLEY, D. M. Evaluation of major genetic loci contributing to inbreeding depression for survival and early growth in a selfed family of *Pinus taeda*. **Evolution**, v. 54, n. 5, p. 1580-1589, 2000.
- RICHARDSON, K. F.; MEAKINS, R. H. Inter- and intra-specific variation in the susceptibility of eucalypts to the snout beetle (*Gonipterus scutellatus* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae). **S. Afr. For. J.**, v. 139, p. 21-31, 1986.
- RIPLEY, V. L.; ROSLINSKY, V. Identification of an ISSR marker for 2-propenyl glucosinolate content in *Brassica juncea* L. and conversion to a SCAR marker. **Molecular breeding**, v. 16, n. 1, p. 57-66, 2005.
- ROB, C. 2004. **Sugar gum (*Eucalyptus cladocalyx*) for sawlogs in the 450-650 mm rainfall zone**. Department of Agricultura.Government of Western Australia.
- RODOVALHO, M. A.; MORA, F.; DOS SANTOS, E. M.; SCAPIM, C. A.; ARNHOLD, E. Survival heritability in 169 families of white grain popcorn: a Bayesian approach. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 35, n. 3, p. 303-309, 2008.
- RONNBERG-WASTLJUNG, A. C.; GLYNN, C.; WEIH, M. QTL analyses of drought tolerance and growth for *Salix dasyclados* x *Salix viminalis* hybrid in contrasting water regimes. **Theor. Appl. Genet.**, v. 110, p. 537-549, 2005.

RUTHROF, K. X.; LONERAGAN, W. A.; YATES, C. J. Comparative population dynamics of *Eucalyptus cladocalyx* in its native habitat and as an invasive species in an urban bushland in south-western Australia. **Diversity and Distributions**, v. 9, p. 469–484, 2003.

SALIMATH, S.S.; DE OLIVEIRA, A. C.; GODWIN, I. D.; BENNETZEN, J. L. Assessment of genomic origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, v. 38, p. 757–763, 1995.

SANTRA, D. K.; TEKEOGLU, M.; RATNAPARKHE, M.; KAISER, W. J.; MUEHLBAUER, F. J. Identification and mapping of QTLs conferring resistance to ascochyta blight in chickpea. **Crop Science**, v. 40, n. 6, p. 1606-1612, 2000.

SAS-Institute. **Statistical analysis system: user's guide**. Cary: SAS Institute, 1996.

SATAGOPAN, J. M.; YANDELL, B. S.; NEWTON, M. A.; OSBORN, T. C. A Bayesian approach to detect quantitative trait loci using Markov Chain Monte Carlo. **Genetics**, v. 144, p. 805–816, 1996.

SAX, K. The association of sizes differences with seedcoat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v. 8, p. 552-560, 1923.

SEN, S.; CHURCHILL, G. A. A statistical framework for quantitative trait mapping. **Genetics**, v. 159, p. 371–387, 2001.

SEXTON, T. R.; HENRY, R. J.; MCMANUS, L. J.; HENSON, M.; THOMAS, D. S.; SHEPHERD, M. Genetic association studies in *Eucalyptus pilularis* Smith (blackbutt). **Australian Forestry**, v. 73, n. 4, p. 254-258, 2010.

SHEPHERD, M.; KASEM, S.; LEE, D. J.; HENRY, R. Mapping species differences for adventitious rooting in a *Corymbia torelliana* × *Corymbia citriodora* subspecies *variegata* hybrid. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 4, p. 715-725, 2008.

- SHEPHERD, M.; CROSS, M.; STOKOE, R.; SCOTT, L. J.; JONES, M. E. High-throughput DNA extraction from forest trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, n. 4, p. 425a-425j, 2002.
- SIMKO, I; COSTANZO, S.; HAYNES, K. G.; CHRIST, B. J.; JONES, R. W. Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach. **Theor Appl Genet**, v. 108, p. 217–224, 2004.
- SMITH, C; SIMPSON, S. P. The use of genetic polymorphisms in livestock improvement. **J. Anim. Breed. Genet.**, v. 103, p. 205-217, 1986.
- SOLLER, M.; BRODY, T. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. **Theor. Appl. Genet.**, v. 47, p. 35-39, 1976.
- STANDARDS AUSTRALIA. **Timber-natural durability ratings**. Homebush, New South Wales: Standards Australia, 2005.
- STANTON, M. L.; ROY, B. A.; THIEDE, D. A. Evolution in stressful environments. Phenotypic variability, phenotypic selection, and response to selection in five distinct environmental stresses. **Evolution**, v, 54, n. 1, p. 93-111, 2000..
- STEANE, D. A.; NICOLLE, D.; SANSALONI, C. P.; PETROLI, C. D.; CARLING, J.; KILIAN, A.; VAILLANCOURT, R. E. Population genetic analysis and phylogeny reconstruction in *Eucalyptus* (Myrtaceae) using high-throughput, genome-wide genotyping. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 59, n. 1, p. 206-224, 2011.

- STEANE, D. A.; CONOD, N.; JONES, R. C.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M. A comparative analysis of population structure of a forest tree, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), using microsatellite markers and quantitative traits. **Tree Genetics & Genomes**, v. 2, p. 30–38, 2006.
- STITT M; HURRY, V. A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. **Curr. Opinion Plant Biol**, v. 5, p. 199–206, 2002.
- THAMARUS, K.A; GROOM, K.; BRADLEY, A.; RAYMOND, C. A.; SCHIMLECK; L. R.; WILLIAMS, E. R.; MORAN, G. F. Identification of quantitative trait loci for wood and fibre properties in two full-sib pedigrees of *Eucalyptus globulus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 856–864, 2004.
- THUMMA, B. R.; BALTUNIS, B. S.; BELL, J. C.; EMEBIRI, L. C.; MORAN, G. F.; SOUTHERTON, S. G. Quantitative trait locus (QTL) analysis of growth and vegetative propagation traits in *Eucalyptus nitens* full-sib families. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, n. 6, p. 877-889, 2010a.
- THUMMA, B.R.; SOUTHERTOR, S. G.; BELL, J. C.; OWEN, J. V.; HENERY, M. L.; MORAN, G. F. Quantitative trait locus (QTL) analysis of wood quality traits in *Eucalyptus nitens*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, p. 305–317, 2010b.
- THUMMA, B.R; NOLAN, M. F.; EVANS, R.; MORAN, G. Polymorphisms in Cinnamoyl CoA Reductase (CCR) Are Associated With Variation in Microfibril Angle in *Eucalyptus* spp. **Genetics**, v. 171, p. 1257–1265, 2005.
- TSAROUHAS, V.; GULLBERG, U.; LAGERCRANTZ, U. An AFLP and RFLP linkage map and quantitative trait locus (QTL) analysis of growth traits in *Salix*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, n. 2, p. 277-288, 2002.

- TSCHAPLINSKI, T. J.; TUSKAN, G. A.; SEWELL, M. M.; GEBRE, G. M.; TODD, D. E.; PENDLEY, C. D. Phenotypic variation and quantitative trait locus identification for osmotic potential in an interspecific hybrid inbred F2 poplar pedigree grown in contrasting environments. **Tree physiology**, v, 26, n. 5, p. 595-604, 2006.
- TURNBULL, J. W. **Economic and social importance of eucalypts**. CSIRO Publishing, 2000.
- UENO, S.; TOMARU, N.; YOSHIMARU, H.; MANABE, T.; YAMAMOTO, S. Genetic structure of *Camellia japonica* L. in an old-growth evergreen forest, Tsushima, Japan. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 647– 656, 2000.
- VARGAS-REEVE, F; MORA, F; PERRET, S; SCAPIM, C.A. Heritability of stem straightness and genetic correlations in *Eucalyptus cladocalyx* in the semi-arid region of Chile. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, p. 107-112, 2013.
- VERHAEGEN, D.; PLOMION, C.; GION, J. M.; POITEL, M.; COSTA, P.; KREMER, A. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 4, p. 597-608, 1997.
- VOLKER, P.W.; OWEN, J.V.; BORRALHO, N. M. G. Genetic variances and covariances for frost tolerance in *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. **Silvae Genet.**, v. 43, p. 366-372, 1994.
- WANG, H; ZHANG, Y-M.; LI, X.; MASINDE, G. L.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J.; XU, S. Bayesian shrinkage estimation of quantitative trait loci parameters. **Genetics**, v. 170, p. 465–480, 2005.
- WOODROW, I. E.; SLOCUM, D. J.; GLEADOW, R. M. Influence of water stress on cyanogenic capacity in *Eucalyptus cladocalyx*. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 103–110, 2002.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p.114–138, 1943.

WU, R.; STETTLER, R. F. Quantitative genetics of growth and development in Populus. II. The partitioning in genotype \times environment interaction in stem growth. **Heredity**, v. 78, p. 124–134, 1997.

WU, W; ZHENG, Y. L.; CHEN, L.; WEI, Y. M.; YANG, R. W.; YAN, Z. H. Evaluation of genetic relationships in the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAPD and ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 1141-1157, 2005.

Xu, Y. Molecular Plant Breeding. Oxfordshire: CAB International, 2010.

XU, Y; CROUCH, J. H. Marker-Assisted Selection in Plant Breeding: From Publications to Practice. **Crop Science**, v. 48, p. 391-407, 2008.

Yi, N. A unified Markov chain Monte Carlo framework for mapping multiple quantitative trait loci. **Genetics**, v. 167, p. 967–975, 2004.

YU, J.; BUCKLER, E. S. Genetic association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 155–160, 2006

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v. 136, n. 4, p. 1457-1468, 1994.

ZHANG D.; ZHANG, Z.; YANG, K: QTL analysis of growth and wood chemical content traits in an interspecific backcross family of white poplar (*Populus tomentosa* x *P. bolleana*) x *P. tomentosa*. **Can J Forest Res**, v. 36, p. :2015-2023, 2006.

ZHAO, M.; RUNNING, S.W. Drought-induced reduction in global terrestrial net primary production from 2000 through 2009. **Science**, v. 329, p. 940-943, 2010.

ANEXO I

Patrones de variabilidad genética entre familias.

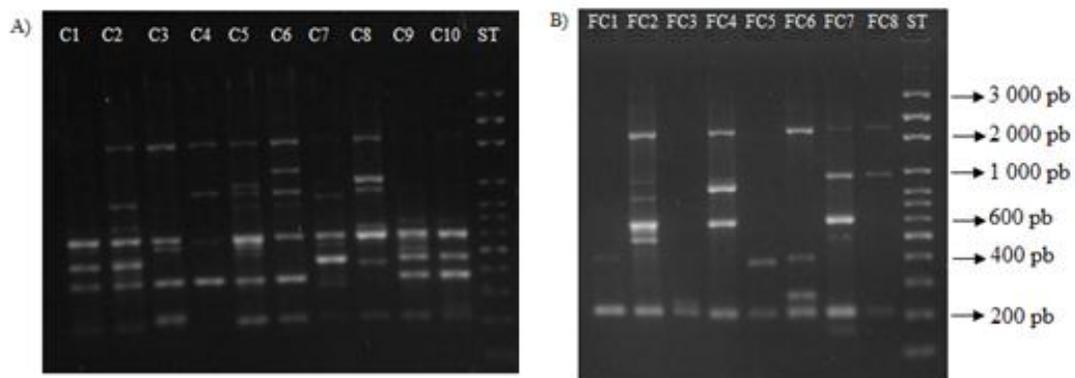


Figura A.1. Patrones de fragmentos amplificados con partidor ISO₁, para las procedencias Cowell, y Flinders Chase. A) C1-C10: Familias de procedencia Cowell; ST: Marcadores de peso molecular 100-3.000 pb B) FC1-FC8: Familias de procedencia Flinders Chase; ST: Marcador de peso molecular 100- 3.000 pb.

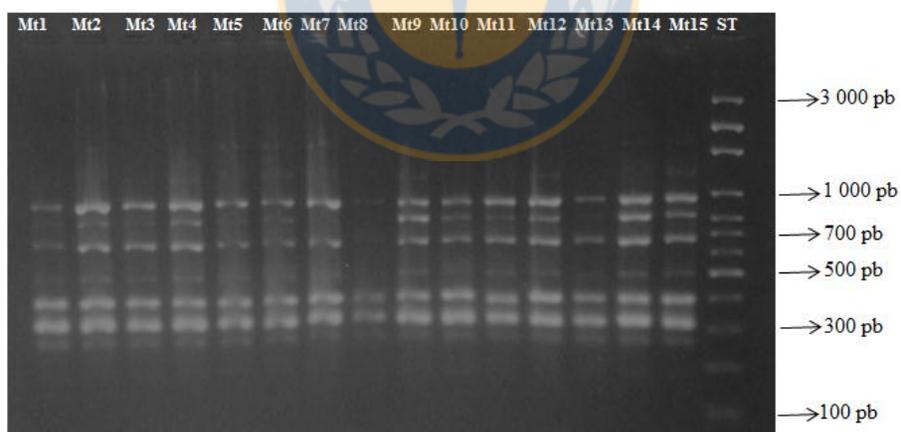


Figura A. 2. Patrones de fragmentos amplificados con partidor RA(CGT), para las procedencias Mt. Remarkable, y Marble Range. Mt1-Mt15: Familias de procedencia Mt. Remarkable; ST: Marcadores de peso molecular 100-3.000 pb.

ANEXO II:
Análisis de estructura genética de *E. cladocalyx*

Tabla A. 1. Cuadro resumen de probabilidades de pertenencia de cada familia.

N° Familia	Procedencia	Matriz Q	
		Cluster 1	Cluster 2
F2	1	0	1
F3	1	1	0
F4	1	1	0
F5	1	1	0
F6	1	1	0
F7	1	1	0
F8	1	1	0
F10	1	0	1
F11	1	1	0
F12	1	1	0
F13	1	0.998	0.002
F14	1	1	0
F15	1	0	1
F16	1	1	0
F17	1	1	0
F18	2	0.226	0.774
F19	2	1	0
F20	2	1	0
F21	2	1	0
F22	2	1	0
F24	2	1	0
F28	2	1	0

(Tabla A.1)

F29	2	1	0
F30	2	1	0
F31	2	1	0
F23	3	1	0
F25	3	1	0
F26	3	1	0
F27	3	1	0
F32	4	1	0
F33	4	0	1
F35	4	0.903	0.097
F36	4	0	1
F37	4	1	0
F38	4	1	0
F39	4	1	0
F40	4	0	1
F41	5	0	1
F42	5	1	0
F43	5	0	1
F44	5	0.948	0.052
F45	5	0	1
F46	5	0.992	0.008
F47	5	0.947	0.053
F48	5	0	1



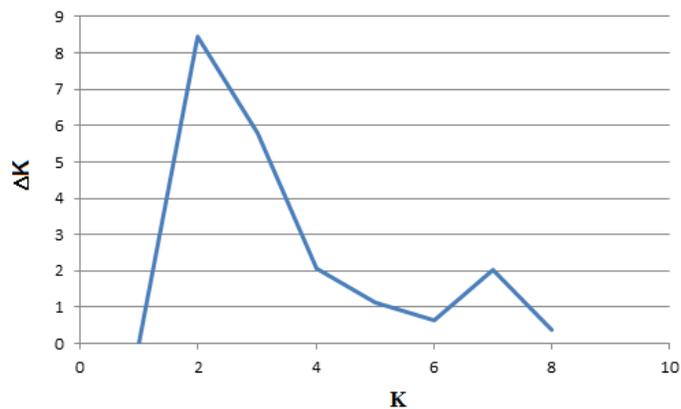


Figura A. 3. Determinación del número de grupos genéticamente diferenciados ($K=2$), usando el método de Evanno et al. (2005). En el análisis se asumió un *no-admixture model*, con frecuencias de alelos independientes.

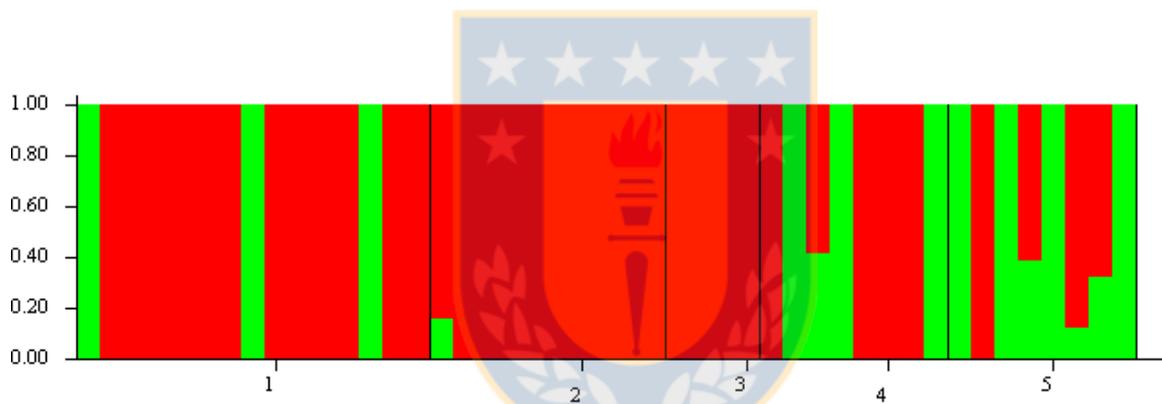


Figura A. 4. *Bar plot* de las probabilidades de pertenencia de las 45 familias de *E. cladocalyx*. Cada procedencia y familia está representada por una línea vertical, donde cada grupo (*cluster*) está representado por un color diferente.