
**MAPEO ASOCIATIVO PARA CARACTERES DE CRECIMIENTO, FLORACIÓN
Y FORMA DEL FUSTE EN *EUCALYPTUS CLADOCALYX* F. MUELL: 13 AÑOS
EN CONDICIONES ÁRIDAS**

**OSVIN ALEJANDRO ARRIAGADA LAGOS
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN EN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

En Chile, cerca del 50% del territorio continental es considerado como árido y semiárido, y se espera que este porcentaje aumente debido al calentamiento global. Por lo tanto, resulta cada vez más importante identificar y estudiar especies capaces de tolerar estos ambientes. *Eucalyptus cladocalyx* es una especie que tolera ambientes con baja precipitación (< 300 mm/año-1), la cual está siendo considerada en diferentes programas de mejoramiento genético (ej. Chile, Australia), donde se ha observado variaciones significativas en características como el crecimiento, eventos de floración y la forma del fuste. Sin embargo, poco se conoce acerca de la base genética involucrada en esta variabilidad fenotípica. Considerando principalmente que: i) los marcadores moleculares microsatélites han sido transferidos con éxito entre diferentes especies de *Eucalyptus*, ii) el germoplasma de *E. cladocalyx* disponible en Chile abarca la distribución natural de la especie y iii) estudios previos han reportado significativas heredabilidades para caracteres de crecimiento, eventos de floración y forma del fuste en *E. cladocalyx*; en la presente tesis se formularon las siguientes hipótesis: a) una alta tasa de transferencia de marcadores microsatélites es obtenida desde el mapa consenso de *Eucalyptus* a *E. cladocalyx*, b) la diversidad genética presente en las poblaciones F₁ creciendo *ex situ* en Chile es adecuada para estudios genéticos de asociación y para la selección asistida por marcadores, y c) a pesar de que las precipitaciones en el norte de Chile son significativamente más bajas que las encontradas en el sur de Australia, la especie *E. cladocalyx* mantiene los patrones de variabilidad fenotípica observados en caracteres como el crecimiento, eventos de floración y forma del fuste, los cuales permiten localizar regiones genómicas que controlan estas características mediante el uso de marcadores microsatélites.

Para comprobar las hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos: 1) evaluar la transferibilidad de marcadores microsatélites desde *Eucalyptus* spp. a *E. cladocalyx*, 2) determinar la diversidad y estructura genética en las poblaciones de *E. cladocalyx* establecidas en Chile y 3) analizar el desequilibrio de ligamiento y detectar asociaciones marcador-característica en *E. cladocalyx* mediante el uso de un modelo lineal mixto. Para ello, se utilizó un ensayo de progenie-procedencia de largo plazo

(13 años) establecido en la comunidad de Tunga Norte (31°38' de latitud S, 71°19' de Longitud O; 297 msnm), localizado al sur del Desierto de Atacama en la Región de Coquimbo. El ensayo consta de cuarenta y siete familias de medios hermanos provenientes de cinco localidades australianas (procedencias), las cuales abarcan la distribución natural de la especie, y dos familias de medios hermanos provenientes de una fuente de semilla local ubicada en Illapel, Provincia de Choapa. El diseño experimental del ensayo fue de bloques completos al azar con 30 bloques y un árbol por parcela, dando un total de 1470 árboles individuales. Ciento treinta marcadores, de un total de 220 SSR evaluados, se transfirieron exitosamente desde el mapa consenso de *Eucalyptus* hacia *E. cladocalyx*, los cuales se utilizaron para genotipificar una muestra de 245 árboles, de 13 años de edad, para efectos de estudio de asociación. La heterocigosidad esperada (H_e) varió de 0,422 a 0,538, con una media de 0,492, indicando un moderado nivel de diversidad genética en la población evaluada, lo cual es primordial para implementar un programa de mejoramiento genético. Además, la población se dividió en tres grupos genéticamente diferenciados, los que coinciden con el patrón geográfico de las procedencias evaluadas. El desequilibrio de ligamiento declinó rápidamente de $r_2 = 0,391$ a 0,060 en tan sólo 1 cM, y se detectó un total de 23 asociaciones significativas para los siete caracteres evaluados: floración temprana (FT), intensidad de floración (IF), capacidad reproductiva (CR), rectitud del fuste (RF), bifurcación del fuste (BF), altura del árbol (ALT) y el diámetro a la altura del pecho (DAP). La varianza fenotípica explicada por cada marcador asociado varió entre un 5,9 y 23,7% para BF y ALT, respectivamente. El marcador EMBRA101 localizado en el grupo de ligación 10 a 56,5 cM se asoció conjuntamente con DBH y ALT. Nueve marcadores SSR se asociaron con SF y STR, los que explicaron entre el 5,9 y 14,8% de la variación fenotípica. Se presenta una evaluación inicial y preliminar del grado de desequilibrio de ligamiento dentro del genoma de *E. cladocalyx*. Además, se reporta el primer estudio de asociación en el género *Eucalyptus* que considera marcadores SSR y la forma del fuste. Con todo, esta tesis entrega información novedosa y valiosa para comprender la base genética de caracteres complejos en *E. cladocalyx* con fines de mejoramiento genético en condiciones áridas.

ABSTRACT

In Chile, about 50% of the continental territory is considered as arid and semi-arid, and this percentage is expected to increase due to global warming. Therefore, it is increasingly important to identify and study species capable of tolerating these environments. *Eucalyptus cladocalyx* is a species that tolerates environments with low precipitation ($< 300 \text{ mm} \cdot \text{year}^{-1}$), and it is being considered in different breeding programs (e.g. Chile, Australia). Significant phenotypic variation in growth, flowering events and stem form has been reported in provenance trials. However, little is known about the genetic basis involved in this phenotypic variability. Given that, (i) microsatellite molecular markers have been successfully transferred among different species of *Eucalyptus*, (ii) the Germplasm of *E. cladocalyx* available in Chile covers the natural distribution of the species, and (iii) previous studies have found significant heritabilities for growth, flowering and stem form traits in *E. cladocalyx*. In the current study, the purpose is to verify the following hypotheses: (a) a high rate of transfer of microsatellite markers is obtained from the consensus map of *Eucalyptus* to *E. cladocalyx*, (b) the genetic diversity present in F_1 populations growing *ex situ* in Chile is suitable for genetic association studies and markers assisted selection, and (c) the phenotypic variability observed in traits such as growth, flowering events and stem form in *E. cladocalyx*, is associated with SSR markers, which allow to identify genomic regions that control these traits in a site with significant lower precipitation than Australia's natural conditions. For that, the following objectives were proposed: 1) to evaluate the transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *E. cladocalyx*, 2) to determine the diversity and genetic structure of *E. cladocalyx* populations established in Chile and 3) to analyze the linkage disequilibrium and detect marker-trait associations in *E. cladocalyx* using a mixed linear model. A long-term progeny-provenance trial (13 years) situated in the community of Tunga Norte ($31^\circ 38'$ latitude S, $71^\circ 19'$ longitude O, 297 masl), southern Atacama Desert, administrative Region of Coquimbo was used. The trial consists of 47 half-sib families of *E. cladocalyx* from five Australian localities (provenances) covering the natural range of the species, and two half-sib families from a local seed source (Illapel, Choapa Province). A randomized complete block design (RCBD), with 30 replicates or blocks, in singletree plots, was used ($N = 1470$ trees). One hundred and thirty markers, out of a total of 220 SSR evaluated, were successfully transferred from the consensus map of *Eucalyptus* to *E. cladocalyx*, which were used to genotype a sample of 245 trees, 13 years of age, for association study purposes. The expected

heterozygosity (H_e) varied from 0.422 to 0.538, with an average of 0.492, indicating a moderate level of genetic diversity in the population evaluated, which is essential to implement a breeding program. In addition, the population was divided into three different genetic groups, which coincide with the geographical pattern of provenances studied. Linkage disequilibrium declined rapidly from $r_2 = 0.391$ to 0.060 after only 1.0 cM, and a total of 23 significant associations were detected for the seven traits under study: early flowering (EF), flowering intensity (FI), reproductive capacity (RC), stem straightness (STR), stem forking (SF), diameter at breast height (DBH) and tree height (HT). The phenotypic variance explained by each marker-trait association varied between 5.9 and 23.7% for SF and HT, respectively. The marker EMBRA101 located on linkage group 10 at 56.5 cM was concomitantly associated with DBH and HT. Nine SSR markers were associated with SF and STR, which explain the 5.9 to 14.8% of the phenotypic variation. An initial and preliminary evaluation of the degree of linkage disequilibrium within the genome of *E. cladocalyx* is presented. In addition, this is the first association study of SSR markers and stem form traits in the genus *Eucalyptus*. Therefore, this thesis provides new and valuable information to understand the genetic basis of complex traits in *E. cladocalyx*, which can be useful in breeding programs in arid conditions.