

# USO DE RAPDs Y cpMICROSATÉLITES COMO MARCADORES EN *PINUS HALEPENSIS* MILL.: ESTUDIOS PRELIMINARES

A. Gómez<sup>\*</sup>, M.A. Bueno<sup>\*</sup>, R. Alía<sup>\*</sup> & G. G. Vendramin<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Área de Selvicultura y Mejora. CIFOR-INIA. Ctra. de La Coruña Km 7,5. 28040 MADRID

<sup>\*\*</sup> Ito. Miglioramento Piante Forestali, CNR. Via Atto Vannucci 13. 50134 FLORENCIA

## RESUMEN

Los estudios con marcadores de ADN en *Pinus halepensis* se están llevando a cabo en poblaciones españolas representativas de diferentes regiones de procedencia dentro de su área natural de distribución y que presentan claras diferencias entre si tanto por sus características ecológicas como fenotípicas.

La amplificación mediante la técnica de PCR para dos sistemas: Random Amplified Polymorphic DNA, RAPDs, e Hypervariable Chloroplast Simple Sequence Repeats, cpMicrosatélites, ha detectado polimorfismos que permiten estudiar la variabilidad genética en esta especie.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Pinus halepensis* Mill., es una especie mediterránea que presenta claras ventajas para su uso en repoblación. Un prerrequisito para optimizar las estrategias a seguir es el conocimiento de la variabilidad intra e inter-poblacional.

Las diferencias geográficas y ecológicas son factores importantes que influyen en la mejora y selección de los árboles. Tradicionalmente los recursos genéticos se han caracterizado por aspectos morfológicos y de explotación cuya efectividad ha sido cuestionada por numerosos autores (BROWN;1979).

En los últimos años, las técnicas moleculares han ido complementando las estrategias clásicas de evaluación de la variabilidad genética. Por su parte, los marcadores de ADN permiten analizar las regiones codificantes y no codificantes del genoma por lo que son detectables incluso las mutaciones silenciosas, incrementándose de este modo el número de polimorfismos.

En particular la técnica RAPD de amplificación al azar de marcadores de ADN (WILLIAMS & *al.*; 1990; WELSH & MCCLELLAND; 1990) es un sistema capaz de detectar un alto grado de polimorfismo con una buena resolución, permitiendo la detección de sustituciones de hasta un único nucleótido, requiriéndose además una pequeña cantidad de ADN de la muestra. Los marcadores RAPD tienen diversas aplicaciones en coníferas, destacando entre otras el mapeo genético, el estudio de la diversidad genética o la elaboración rápida de sondas de hibridación. Los RAPDs han demostrado su eficacia en el estudio de la variación genética en numerosas especies (MOSSELER & *al.*; 1992) y han resultado ser muy útiles en la identificación de áreas de máxima diversidad pudiendo emplearse para estimar niveles de variabilidad genética en especies naturales.

La otra técnica propuesta para este estudio son los Microsatélites, basados en la presencia de repeticiones de secuencias simples

que tiene lugar frecuentemente en los genomas de eucariotas, y algunos procariotas y eubacterias, y que son amplificables individualmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, (SAIKI & al., 1988), empleando como cebadores el par de oligonucleótidos que los enmarcan, mostrándose así polimorfismos debidos a la longitud del fragmento amplificado, como consecuencia del distinto número de repeticiones.

De este modo, los microsatélites se pueden emplear, por ejemplo, en identificación (a nivel individual, clonal varietal), estudios poblacionales o mapeo genético.

Recientemente se han empleado en el análisis genético de especies vegetales y su hipervariabilidad los hace marcadores ideales para estudios de genética de poblaciones (MORGANTE & OLIVIERI; 1993), detectándose un nivel de variación intra e interpoblacional superior al que previamente habían mostrado otros marcadores. Considerando el genoma plastidial, que está muy conservado y presenta una tasa de mutación mucho menor que el nuclear, se han realizado estudios interespecíficos y en algunos casos la variación intraespecífica ha resultado ser lo suficientemente elevada como para permitir estudios poblacionales.

En especies del género *Pinus*, POWELL & al.; 1995, han demostrado que las repeticiones de mononucleótidos en el cloroplasto son altamente polimórficas. La universalidad de este sistema y su eficiencia en detectar variabilidad inter e intraespecífica hacen de él una herramienta muy útil en el estudio de la variabilidad citoplásmica.

La secuenciación completa del genoma del cloroplasto realizada por WAKASUGI & al. (1994), ha detectado 19 repeticiones de 10 ó más unidades del tipo A/T y una del tipo G/T que VENDRAMIN & al.; 1996, han empleado para el diseño de 20 pares de cebadores que enmarcan estas regiones. Estos cebadores han demostrado ser útiles en la amplificación de microsatélites del cloroplasto en diferentes especies del género *Pinus*.

En el presente estudio se presentan los resultados preliminares obtenidos con las

técnicas RAPDs y cpMicrosatélites de poblaciones españolas de *Pinus halepensis*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de cinco poblaciones naturales españolas, Guardiola (Barcelona), Cucalón (Castellón), Ricote (Murcia), Vélez (Almería) y Carratraca (Málaga), se realizó la germinación en condiciones estándar de embriones, de una muestra de piñones obtenida de 30 árboles seleccionados al azar dentro de cada población.

El método empleado para la obtención del ADN total de las plántulas está basado en el procedimiento del CTAB (DOYLE & DOYLE; 1990). Se consigue así un ADN de calidad de una forma rápida. Para su conservación a largo plazo el ADN se ha congelado a -20 °C y para su uso inmediato se mantiene a 4 °C.

La amplificación de los RAPD se ha realizado mediante técnica PCR en un termociclador personal Biometra, según las siguientes temperaturas: desnaturalización a 94 °C, seguida de 45 ciclos de 94 °C, 35 °C y 72 °C para terminar con una extensión a 72 °C. La mezcla empleada ha sido la siguiente: tampón Taq-DNA polimerasa (Boehringer), Taq-DNA polimerasa (Boehringer), dNTPs (Boehringer), cebador (Operon) y ADN pool población.

La amplificación de los cpMicrosatélites se ha llevado a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9600. La mezcla de la reacción fue: tampón (10x Pharmacia), MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Taq-DNA polimerasa (Pharmacia), dNTPs (Pharmacia), cebadores y DNA muestra. La amplificación del ADN se realizó siguiendo el siguiente programa: primero un paso de desnaturalización a 95°C, segundo un paso para la adición del enzima a 80 °C y 25 ciclos de 94 °C, 55 °C y 72 °C. El último ciclo se continúa con un paso de extensión a 72 °C.

La visualización de las amplificaciones se ha realizado en geles de agarosa 1% con tinción de bromuro de etidio 1% empleándose como marcador Lambda/Pst1. Los

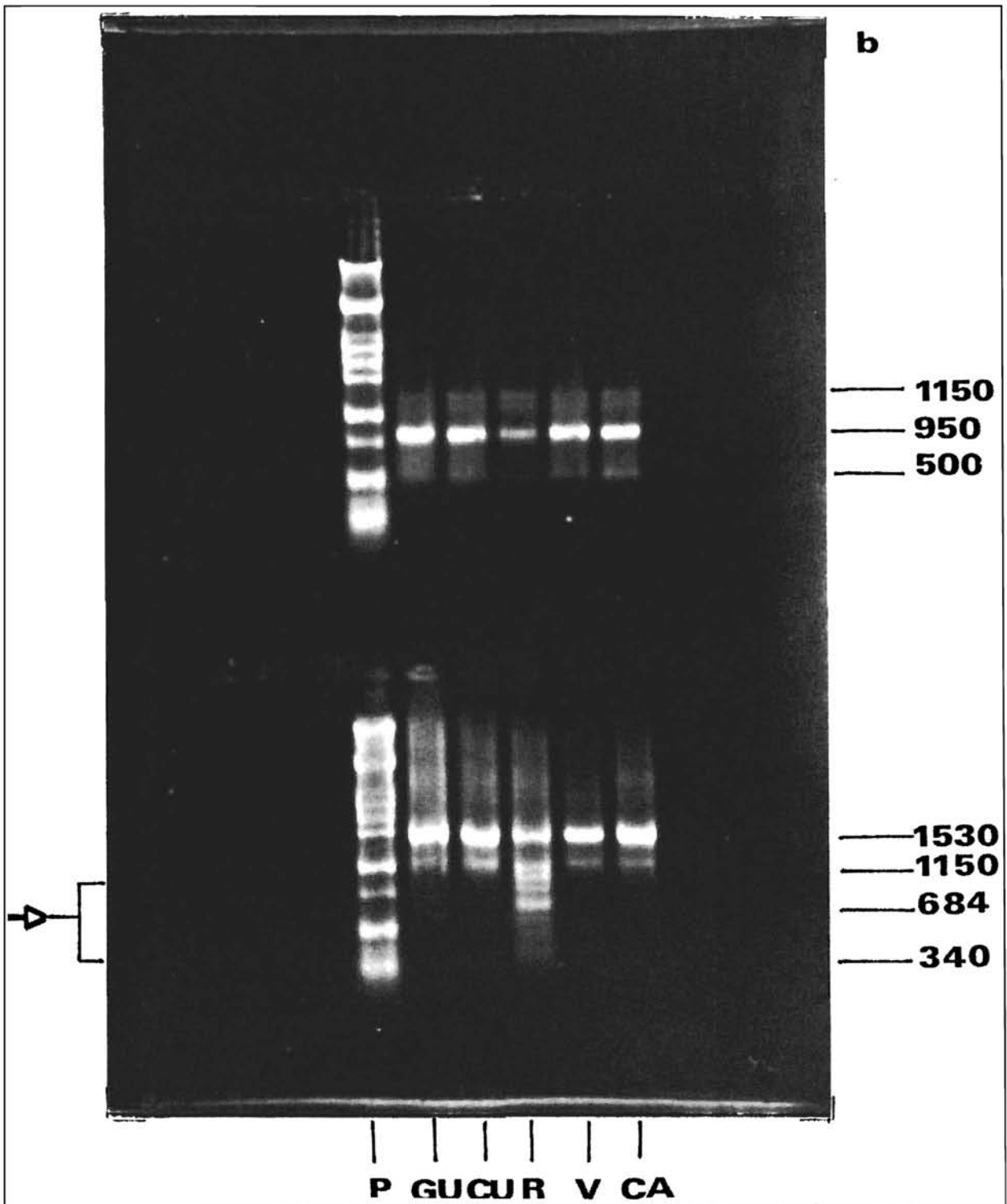


Figura 1. Amplificaciones obtenidas con el primer n° 9 (arriba) y el n° 15 (debajo). El patrón de pesos moleculares es lambda/Pst1. Las flechas indican las bandas polimórficas. El primer 15 permite diferenciar la población de Ricote.

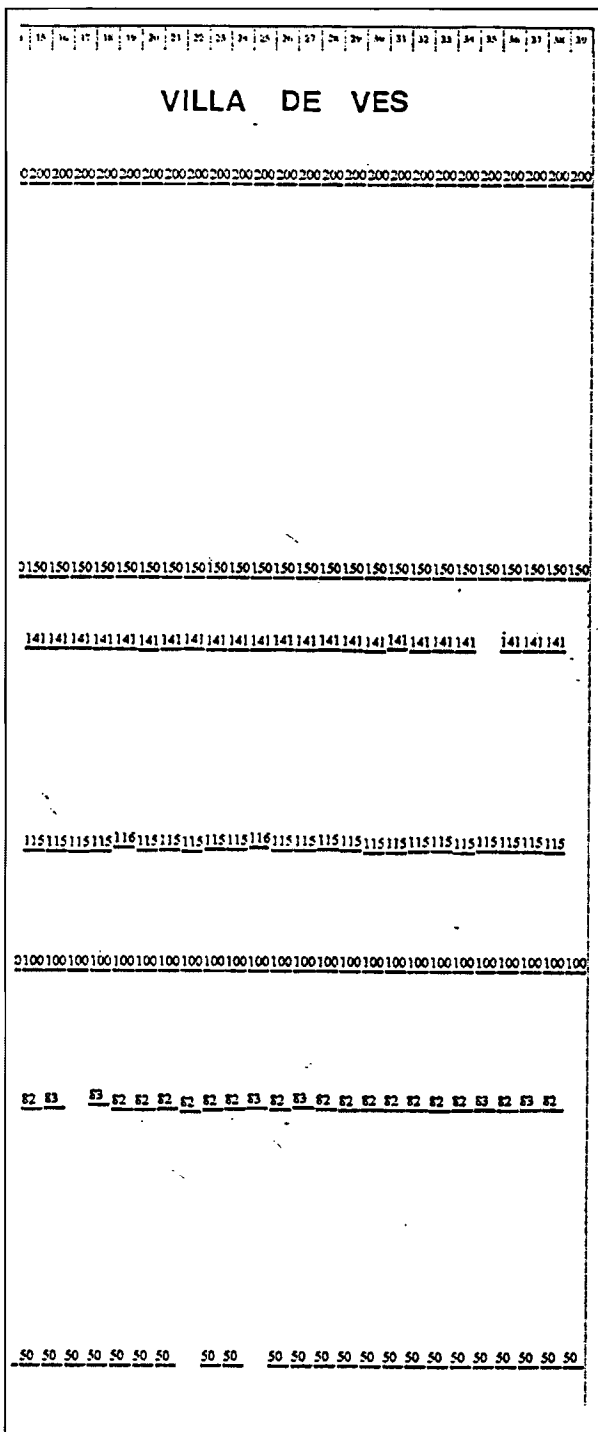


Figura 2. Fragmentos SSR del cloroplasto analizados mediante el programa Fragment Manager en el secuenciador automático ALF. Los tamaños de los fragmentos aparecen sobre la banda correspondiente. Las bandas de 50, 100, 150 y 200 pb se corresponden con patrones internos.

productos de la amplificación de cpMicrosatélites fueron analizados mediante el programa Fragment Manager en un secuenciador automático A.L.F. de Pharmacia.

### 3. RESULTADOS

#### RAPD

Un total de 10 semillas por población, elegidas al azar, han sido germinadas obteniéndose plántulas para la posterior extracción de su ADN. La mezcla del ADN de cada uno de los diez individuos de cada población ha constituido un “pool” cuya concentración final de 10 mg/ml se ha empleado en las amplificaciones realizadas con 20 oligonucleótidos decámeros pertenecientes al Kit N de la casa Operon.

Como resultado se ha comprobado la idoneidad de los métodos empleados y las condiciones de amplificación, obteniéndose buenos productos de amplificación con 15 primers de ellos (75%), entre los cuales 5 presentaban bandas polimórficas (25%). (Fig. 1).

#### cpMicrosatélites

El empleo del programa Fragment Manager y el secuenciador ALF de Pharmacia permiten la detección de diferencias de tamaño de un único par de bases lo cual no sería posible mediante geles convencionales.

Se ha comprobado que los productos de amplificación obtenidos con los pares de cebadores empleados presentan tamaños similares a los de otras especies del género *Pinus*, VENDRAMIN & al., 1996.

Mediante esta técnica se han detectado polimorfismos intraespecíficos para los tres loci estudiados, el conjunto de los fragmentos para cada individuo permite establecer haplotipos que difieren en el tamaño de las amplificaciones.

La figura 2 muestra los resultados obteni-

dos del análisis de tres microsatélites en 24 individuos de la población de Villa de Ves (Alicante).

#### 4. CONCLUSIONES

- La reacción de amplificación llevada a cabo con unas condiciones específicas muestra un alto grado de reproductividad.
- Los pares de primers diseñados por Vendramin *et al.* (1996) son útiles en la amplificación de cpMicrosatélites para las muestras de *P. halepensis* españolas.
- La variación genética es detectable mediante RAPDs empleando un único cebador que en general produce numerosos fragmentos.
- Los sistemas RAPD y cpMicrosatélites se muestran como herramientas muy útiles para el estudio de la variabilidad genética en esta especie.
- En una primera aproximación los resultados indican un nivel de variabilidad semejante al detectado mediante otros marcadores moleculares, isoenzimas.

#### BIBLIOGRAFÍA

BROWN, A.D.H.; 1979. Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theor. Pop. Biol.* 15:1-42.

GOTTLIEB, L.D.; 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64:161-180.

MORGANTE, M. & OLIVIERI, A.M.; 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant J.* 3(1):175-182.

MOSSELER, A., EGGER, K.N. & HUGHES, G.A.; 1992. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Can. J. For. Res.* 22:1332-1337.

POWELL, W. & *al.*; 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the populations genetics of pines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7759-7763.

SAIKI, R.K. & *al.*; 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

VENDRAMIN, G.G. & *al.*; 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molec. Ecol.* 5:111:1-4.

WAKASUGI, T. & *al.*; 1994. Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.91:9794-9798.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M.; 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nuc. Ac. Res.* Vol.18, N°24:7213-7218.

WILLIAMS, J.G.K. & *al.*; 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Ac. Res.* Vol.18, N°22:6531-6535.