

# ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA, MEDIANTE MICROSATÉLITES DEL CLOROPLASTO, DE *Pinus halepensis* MILL. EN SEIS POBLACIONES ESPAÑOLAS

A. GÓMEZ\*, M<sup>a</sup> A. BUENO\*, G.G. VENDRAMIN\*\* & R. ALÍA\*

\* C.I.F.O.R.-I.N.I.A. CTRA. DE LA CORUÑA KM 7,5 28007 MADRID.

\*\* ISTITUTO MIGLIORAMENTO GENETICO PIANTE FORESTALI. C.N.R. 50134 FLORENCIA.

## RESUMEN

La técnica de cpMicrosatélites se ha empleado para lograr estudiar la diversidad genética de *Pinus halepensis*. Las muestras de ADN analizadas, 144 en total, proceden de embriones pregerminados, que se han obtenido en la recolección de semillas de 30 árboles de cada una de las 6 poblaciones estudiadas. Dichos árboles se han seleccionado, en cada población, mediante muestreo aleatorio. La amplificación mediante la técnica de PCR empleando pares de cebadores específicos para 9 cpMicrosatélites y el análisis de los productos resultantes de dicha amplificación a través del programa Fragment Manager y el secuenciador A.L.F., han permitido la determinación de 28 haplotipos, siendo el número medio de haplotipos presentes en cada población 8.

También se ha podido establecer un gradiente de variabilidad creciente desde las poblaciones del sur a las del norte y mediante el análisis de varianza se ha determinado la variabilidad intrapoblacional (89,54%) y una elevada variabilidad interpoblacional (10,46%).

P.C.: cpMicrosatélites, PCR, Haplotipo.

## SUMMARY

The cpMicrosatellites method has been used to study the genetic diversity of the species *Pinus halepensis*. The DNA samples, a total number of 144, are pregerminated embryos, that have been obtained from seeds of 30, at random, chosen trees for each one of the 6 studied populations. The amplification by PCR technique using specific primers for 9 cpMicrosatellites and the analysis of the amplification products with the software Fragment Manager and the A.L.F. Sequencer, have determined 28 different haplotypes. The average of haplotypes per population is of 8.

Also, a gradient of diversity has been shown from the South to the north populations and the variance analysis has given the within population variability (89,54%) and a high between populations variability (10,46%).

K.W.: cpMicrosatellites, PCR, Haplotypes.

## INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares de ADN constituyen un sistema de estudio genético con numerosas posibilidades que incluyen desde la construcción de mapas genómicos, estudios taxonómicos o poblacionales hasta la identificación de genotipos individuales.

La variabilidad detectada mediante marcadores de ADN, es en esencia, superior a la que detectan otras técnicas, ya que el estudio se amplía desde las regiones codificantes a las no codificantes del genoma, es decir, los polimorfismos silenciosos.

Entre estos marcadores se encuentran los microsatélites o repeticiones de secuencias simples que consisten como su propio nombre indica en la repetición en el genoma de un único nucleótido, en general más de 10 veces, considerándose así perfectos. Existen también los imperfectos cuando la repetición se ve truncada por algún nucleótido diferente o incluso los compuestos cuando están formados por la repetición de secuencias más complejas.

Los microsatélites pueden ser amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (SAIKI *et al.*, 1988), empleando un par de cebadores específicos formados por las secuencias que enmarcan la región repetitiva. Los polimorfismos entre los diferentes individuos se deben así a la diferencia en el número de unidades repetidas, pudiendo de este modo cada locus poseer varios alelos.

Se ha decidido emplear esta técnica para complementar el estudio de variabilidad en poblaciones españolas de *P. halepensis*, especie mediterránea que se distribuye por el este de la Península Ibérica y las Islas Baleares y que presenta claras ventajas para su uso en reforestación, como son su adaptación a la sequía o su recuperación tras los incendios forestales. Para ello se ha partido de muestras pertenecientes a distintas regiones de procedencia que difieren entre si por características ecológicas y fenotípicas, con la finalidad de poder establecer programas de conservación de recursos genéticos y selección de material de calidad para la reforestación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- *Material vegetal y extracción del ADN.* Las semillas se recolectaron en seis poblaciones naturales de *Pinus halepensis* Mill., localizadas en la zona oriental de España: Cabanellas (Gerona), Zuera (Zaragoza), Villa de Ves (Alicante), Ricote (Murcia), Carratraca (Málaga) y S'Avall (Mallorca).

Se pusieron a germinar 24 semillas pertenecientes a 30 árboles seleccionados al azar en cada población. Cuando el embrión comenzaba a germinar (aproximadamente 7 días) la cubierta de la semilla se retiró y el megagametofito fue separado, obteniéndose ADN de alta calidad a partir del embrión, mediante el procedimiento del CTAB (DOYLE y DOYLE, 1990).

El ADN se conservó a 4°C para su uso a corto plazo y a -20°C para su empleo a largo plazo.

La concentración de las muestras se midió tras la mezcla ADN-dye, en un espectrofotómetro de fluorescencia, para llevarlas a una concentración final de 10 ng/μl.

- *Amplificación.* Se realizó la amplificación de 9 microsatélites del cloroplasto, diferentes para cada muestra, empleando 9 pares de cebadores (Tabla 1), diseñados por VENDRAMIN *et al.*, (1996) según la secuencia del cloroplasto de *Pinus thunbergii*, publicada por WAKASUGI *et al.*, (1994).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9600. La mezcla para la reacción, en un volumen final de 25 μl, contenía: 25 ng de ADN de la muestra, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10x tampón de reacción (Pharmacia), 0,5 unidades de *Taq*-DNA polimerasa (Pharmacia), 200 mM de cada dNTP y 0,2 mM cebador.

La amplificación se realizó siguiendo los siguientes parámetros: un primer paso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C, un paso de adición del enzima a 80°C durante 5 minutos, y 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C. El último ciclo se continúa con una extensión de 8 minutos a 72°C.

Una alícuota de los productos de amplificación se visualizó en geles de agarosa 1,5% tras la separación mediante electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

- *Análisis de los cpMicrosatélites*. Los tamaños de los productos de amplificación fueron analizados mediante el programa Fragment Manager en un secuenciador automático A.L.F. de Pharmacia, para ello se emplearon geles de acrilamida con mezcla de las amplificaciones de tres cpMicrosatélites diferentes con el mismo ADN-muestra junto a patrones internos de 50, 100, 150 y 200 pb.

- *Análisis de los datos*. A partir de las frecuencias de los haplotipos definidos mediante la combinación de las variantes de los cpMicrosatélites, se han obtenido diversos parámetros de diversidad: nº total de haplotipos, nº efectivo y diversidad genética.

Se ha efectuado una descomposición de la varianza entre y dentro de las poblaciones por medio del programa Arlequin, empleando el programa AMOVA (MICHALAKIS *et al.*, 1996), utilizando la "Pairwise distance".

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las amplificaciones han resultado ser positivas, como se esperaba, considerando que los cebadores habían demostrado ser útiles en diferentes especies del género *Pinus* (VENDRAMIN *et al.*, 1996).

Los polimorfismos han sido definidos por el diferente tamaño de los cpMicrosatélites, generado por el número de repeticiones que presentan las variantes de productos de amplificación de cada par de cebadores, excepto para el cpMicrosatélite denominado con el código 4825 para el que todas las muestras presentan el mismo tamaño de 87 pb el resto han resultado ser más o menos variables como se recoge en la Tabla 1, el hecho de que se detecten tantas variaciones se puede explicar considerando la naturaleza misma de los microsatélites, que suelen localizarse en regiones no codificantes del genoma, favoreciendo así la persistencia de las mutaciones por no afectar a aspectos esenciales para la existencia, pudiendo además, extenderse fácilmente en la migración de genes vía polen. De hecho, en especies del género *Pinus*, POWELL *et al.* (1995), han demostrado que las repeticiones de mononucleótidos en el cloroplasto son altamente polimórficas.

La presencia de estas secuencias repetidas en el genoma del cloroplasto permiten realizar estudios de variabilidad que difieren de los realizados con los microsatélites nucleares debido a que su herencia es uniparental. De este modo, la herencia paterna del cloroplasto en especies del género *Pinus* entre las que se encuentra *P. halepensis*, con la consiguiente ausencia de recombinación, permiten el establecimiento de los diferentes citotipos o haplotipos. En este caso, se han determinado 28 haplotipos diferentes formados por la combinación de los tamaños de los 9 cpMicrosatélites. Puede considerarse elevado el número de haplotipos comparándolo con estudios previos realizados en esta especie, pero en el que queda reflejada la potencia de esta técnica en el análisis de variabilidad frente a otro tipo de marcadores moleculares o morfológicos.

Concuerdan este estudio con otros en los que aún considerando que el genoma plastidial 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.

La Tabla 2 recoge índices de diversidad como son el número de haplotipos presentes en cada población, con una media de 8 haplotipos por población y que varía desde los 6 de Carratraca a los 10 de la población de Cabanellas. El número efectivo de haplotipos muestra un mínimo en la población de S'Avall, lo cual podría explicarse por su localización ya que se trata de la única población insular de las estudiadas lo cual supone cierto separación entre las poblaciones baleares y las peninsulares por las barreras geográficas. Otro índice que se ha calculado es el de diversidad genética con un rango que oscila desde 0,8116 de la población de

Cabanellas a 0,6449 para la población de Sàvall por lo que presenta un gradiente positivo desde las poblaciones del norte hacia el sur.

Estos índices de diversidad parecen superiores a los que se pueden obtener mediante otros sistemas isoenzimas, terpenos, o marcadores morfológicos. Recientemente, los microsátélites se han empleado en el análisis genético de especies vegetales y su hipervariabilidad los hace marcadores ideales para estudios de genética de poblaciones (MORGANTE y OLIVIERI, 1993), detectándose un nivel de variación intra e interpoblacional superior al que previamente habían mostrado otros marcadores.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA), entre los 28 haplotipos detectados, ha repartido la varianza total en sus componentes intra e interpoblacionales (Tabla 3). La varianza intrapoblacional supone un 89,54% del total, mientras la interpoblacional es del 10,46%,

Esta varianza interpoblacional es superior a la que según HAMRICK (1990), se señala para especies forestales perennes.

La estima precisa de la variabilidad genética es un prerequisite para optimizar las estrategias de conservación de recursos genéticos en especies forestales, su conocimiento mediante métodos tradicionales puede ser complementado mediante el empleo de técnicas de marcadores moleculares, entre los cuales los cpMicrosátélites constituyen un método rápido, eficaz y preciso, como queda demostrado con los resultados obtenidos en el presente estudio.

## CONCLUSIONES

1) Los cpMicrosátélites constituyen una técnica de elevada potencia para la detección de variabilidad genética, como queda demostrado al determinar 28 haplotipos distintos con 9 cpMicrosátélites.

2) La diversidad detectada en la especie *P. halepensis* mediante este sistema es elevada y superior a la observada mediante otros métodos de análisis.

3) La descomposición de la varianza mediante el programa AMOVA refleja que la variación interpoblacional supone un 10,46% del total, mientras el 89,54% restante se atribuye a variación intrapoblacional.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

HAMRICK, J.L. (1990). Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. En Soltis, E.D. y Soltis, P.S. (eds). *Isozymes in Plant Biology*. Chapman and Hall. London, pp.87-105.

MICHALAKIS, Y. & EXCOFFIER, L. (1996). A Generic Estimation of Population Subdivision Using Distances Between Alleles With Special Reference for Microsatellite Loci. *Genetics* 142:1061-1064.

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

POWELL, W.; MORGANTE, M.; McDEVITT, R.; VENDRAMIN, G.G. & RAFALSKI, J.A. (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.; GELFOND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, B.T.; MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

VENDRAMIN, G.G.; LELLI, L.; ROSSI, P. & MORGANTE, M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology* 5 (111): 1-4.

WAKASUGI, T.; TSUDZUKI, J.; ITO, S.; NAKASHIMA, K.; TSUDZUKI, T. & SUGIURA, M. (1994). Loos of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9794-9798.

POBLACIÓN	N	Ne	He
CABANELLAS	10	4.500	0.8116
ZUERA	9	4.411	0.7899
VILLA DE VES	8	3.429	0.7391
RICOTE	8	3.000	0.6486
CARRATRACA	6	3.165	0.7138
S'AVALL	7	2.618	0.6449

N: Número total de haplotipos observados en cada población.

Ne: Número efectivo de haplotipos calculado como;  $Ne = 1 / (\sum p_i^2)$  siendo  $p_i$  la frecuencia de cada haplotipo en la población.

He: Diversidad genética calculada como;  $He = (n / (n-1)) (1 - \sum p_i^2)$  donde n es el número de individuos analizados en cada población.

Tabla 2: Índices de diversidad

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADO S	COMPONENTES	PORCENTAJE DE VARIACIÓN
INTERPOB.	5	6.889	0.04231	10.46
INTRAPOB.	138	50.000	0.36232	89.54
TOTAL	143	56.889	0.40463	

Tabla 3: Análisis de varianza realizado mediante el programa AMOVA.

CODIGO	CEBADORES	TAMAÑO pb
1100	AGAATAAACTGACGTAGATGCCA	87
	AATTTTCAATTCCTTTCTTTCTCC	88
1520		111
	CTTGGATGGAATAGCAGCC	113
	GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA	114
		115
2610	CCCGTATCCAGATATACTTCCA	109
	TGGTTTGATTCATTCGTTTCAT	112
		113
3655	TTTTGGCTTACAAAATAAAAGAGG	137
	AAATTCCTAAAGAAGGAAGAGCA	139
		140
4110	TCCCGAAAATACTAAAAAAGCA	82
	CTCATTGTTGAACTCATCGAGA	83
4825	CGAGATTGATCCGATACCAG	89
	GAGAGAACTCTCGAATTTTTCG	
7195		146
	TTCATTGGAAATACACTAGCCC	147
	AAAACCGTACATGAGATTCCC	148
		149
7995	CTTTTGTTTTTCAACAATTGCA	137
	ACATCTATCTCCCATATCGGC	138
		140
8730		166
	GCCAGGGAAAATCGTAGG	168
	AGACGATTAGACATCCAACCC	172
		173

Tabla 1: Pares de cebadores y tamaño de los fragmentos amplificados. Secuencias de los pares de cebadores empleados en la amplificación de 9 cpMicrosatélites en *P. halepensis* y variantes de los productos de amplificación según su tamaño en pb.