

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE PINO PIÑONERO EN ANDALUCÍA MEDIANTE PROTEÍNAS DEL MEGAGAMETOFITO.

M.J. TOLEDO¹, J.B. ALVAREZ¹, B. ABELLANAS², L.M. MARTÍN¹.

¹ Departamento de Genética, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, E-14080 Córdoba.

² Departamento de Ingeniería Forestal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, E-14080 Córdoba.

RESUMEN

El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) es una especie mediterránea de destacado interés forestal por el tradicional uso de su piñón. Su área de distribución incluye toda la cuenca mediterránea y es en la Península Ibérica donde este árbol presenta las más extensas masas naturales. Dado que la reforestación de tierras agrarias se ha convertido en una línea prioritaria de la política europea, se ha despertado un gran interés en la caracterización del germoplasma. Para este fin, el uso de marcadores moleculares ha mostrado ser una buena herramienta. En las especies del género *Pinus*, el uso de las proteínas de reserva para estudios de variabilidad viene facilitado por la naturaleza haploide del megagametofito. En *P. pinea*, los estudios realizados con estas proteínas son prácticamente inexistentes. Se ha comenzado poniendo a punto la técnica de análisis, consiguiéndose buenos resultados (bandas bien definidas y variables) en globulinas, aunque es posible que, en el futuro, pueda estudiarse otras fracciones. Estas proteínas han sido separadas mediante electroforesis en geles lineales de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. Dado el alto número de bandas que aparecen en la fracción de globulinas se ha decidido estudiar la variabilidad para patrones constituidos por bloques de bandas, identificándose cinco bloques distintos que han resultado todos polimórficos.

P.C.: pino piñonero, variabilidad genética, recursos genéticos, proteínas.

SUMMARY

Stone pine (*Pinus pinea* L.) is a Mediterranean species of forest interest by the traditional use of his pinion. Its area of distribution includes all the Mediterranean area and is in the Iberian Peninsula where this tree presents the most extensive natural masses. Since the land's reforestation has become a high-priority line of the European policy, a great interest in the characterisation of germplasm has awaked. For this aim, the use of molecular markers has shown to be a good tool. In *Pinus* sp., the use of storage proteins for variability studies comes facilitated by the haploid nature from the megagametofite. In *P. pinea*, the studies made with these proteins are practically non-existent. It has been begun completing the analysis technique, obtaining itself good results (defined and variable bands affluent) in globulins, although it is possible that, in the future, it can study other fractions. These proteins have been separated by means of electrophoresis in linear gels of polyacrilamide with dodecyl sodium sulphate. Given the high number of bands that appear in the fraction of globulins it has I decide to study the variability for patterns constituted by blocks of bands, identifying itself five different blocks that have been all polymorphic ones.

K.W.: stone pine, genetic variability, genetic resources, proteins.

INTRODUCCIÓN

El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) es una especie arbórea forestal originaria de toda la cuenca mediterránea, dentro de la cual, la Península Ibérica, con 452.195 ha, es la zona donde forma mayores poblaciones espontáneas y se encuentra en condiciones ecológicas más diversas.

Además, el pino piñonero destaca por su importancia ecológica, tanto por presentar una gran adaptación a la sequía como por su valor protector en la fijación de dunas y terrenos arenosos. A esto hay que sumarle la alternativa que este pino supone a una parte de terrenos agrícolas de carácter marginal o excedentario que, según las directrices de la Comunidad Europea, deberán abandonar su destino agrícola en un futuro próximo. La producción de fruto, a pesar de no haber sido tradicionalmente prioritaria, presenta, sin embargo, unas buenas perspectivas económicas atendiendo a su demanda, tanto en el ámbito nacional como internacional.

En Andalucía, desde 1989, se está desarrollando un programa de Mejora Genética de pino piñonero por equipos de trabajo de las en las universidades de Córdoba y Huelva. Mediante este programa se pretende fomentar la producción de piñón de las masas de pino piñonero y mejorar la productividad y las técnicas de este aprovechamiento. El objetivo principal es la obtención de individuos grandes productores de piñón, cuya posterior propagación permita mejorar este aprovechamiento aumentando la productividad de las masas, regularizando las cosechas y reduciendo los costes de producción (Abellanas et al, 1997). Por otra parte, el material seleccionado deberá cumplir el requisito de contribuir al mantenimiento de los recursos genéticos, incorporando tanta variabilidad genética como sea posible compatibilizar con el anterior objetivo productivo.

El conocimiento de la variabilidad genética es una herramienta fundamental para el apropiado uso del

material vegetal en las repoblaciones. Un aspecto que facilita el estudio genético en esta especie es la existencia de tejidos haploides y diploides en la semilla, así el embrión es diploide mientras que el endospermo es haploide. En este aspecto, el uso de marcadores genéticos cobra especial relevancia como herramienta para caracterizar la variabilidad genética.

Las proteínas de la semilla han mostrado ser excelentes marcadores genéticos en muchas especies vegetales (Gepts, 1989), pero los estudios llevados a cabo en pino piñonero con estos marcadores son muy escasos. La ventaja de utilizar las proteínas de la semilla como marcadores se encuentra en su alto nivel de polimorfismo, control genético simple, su independencia del ambiente y su bajo coste, sencillez y rapidez de su análisis.

El principal objetivo del presente trabajo, que se enmarca dentro del Programa de Mejora Genética de pino piñonero en Andalucía, es la caracterización de la variabilidad genética de la especie, a través del estudio de estos posibles marcadores en una colección de clones de pino piñonero procedentes de Andalucía.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado megagametofitos maduros de 120 clones de pino piñonero de 20 rodales distribuidos por Andalucía (Abellanas et al. 1997). Las cubiertas y el eje embrionario de las semillas fueron retirados antes de la extracción de las proteínas.

Veinte miligramos de megagametofito fueron homogeneizados con eter dietílico (20:1 v/p, 1h, 4°C) para eliminar lípidos. Una segunda extracción de lípidos se llevó a cabo con acetona (20:1 v/p, 1h, 4°C). Las proteínas fueron extraídas con una solución salina (0.5 M de ClNa) en relación 1:5 p/v a temperatura ambiente con agitaciones periódicas. Finalmente, las proteínas fueron precipitadas con 1 ml de acetona fría (-20°C). Tras la centrifugación y secado del pellet, este fue resuspendido en una solución tampón conteniendo 625 mM Tris-HCl pH: 6.8, 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 0.02% (p/v) azul de bromofenol y 2% (p/v) ditiotreitol en relación 1:5 (mg/μl).

Las proteínas fueron fraccionadas en un sistema de electroforesis vertical en placa. Se utilizó un sistema de tampón discontinuo Tris-HCl-SDS (pH: 6.8/8.8) con una concentración de poliacrilamida del 12% (p/v, C= 2.67%). La electroforesis fue realizada a una intensidad constante de 30 mA/gel a 18°C hasta una hora después de que el colorante marcador (azul de bromofenol) saliera del gel.

Los geles fueron teñidos durante 16 horas con una solución de ácido tricloroacético al 12% (p/v) conteniendo un 5% (v/v) de etanol y un 0.05% (p/v) de azul brillante de Coomassie R-250. La destinción se realizó con agua destilada durante dos días.

Todas las líneas fueron evaluadas para la presencia o ausencia de las bandas identificadas. Un análisis de correlación no-paramétrica de Kendall fue aplicada para determinar las relaciones de ligamiento o independencia entre bandas. El agrupamiento entre líneas se realizó mediante el índice de similitud de Jaccard usando el método UPGMA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los materiales usados en el presente trabajo fueron recolectados en las zonas de Andalucía donde era esperable un mayor grado de variabilidad. Estas masas forestales proceden tanto de repoblaciones como de poblaciones naturales. Dado que el proceso de repoblación llevado a cabo nunca se realizó con una herramienta como es la selección asistida por marcadores moleculares, no es asumible *a priori* la mayor uniformidad de las repoblaciones frente a las poblaciones naturales. Por esta razón el presente estudio se ha realizado sin tener en cuenta el origen natural o no del material base.

De las fracciones posibles, descritas en otras especies de gimnospermas (Allona et al. 1994), nosotros hemos utilizado la de globulinas. Es de destacar el hecho de que todas las fracciones de proteínas presentes en el megagametofito de pino piñonero, son de pequeño tamaño, con peso molecular inferior a 45 kDa. Con respecto, a la fracción de globulinas, en la figura 1 puede observarse un ejemplo de la variabilidad detectada.

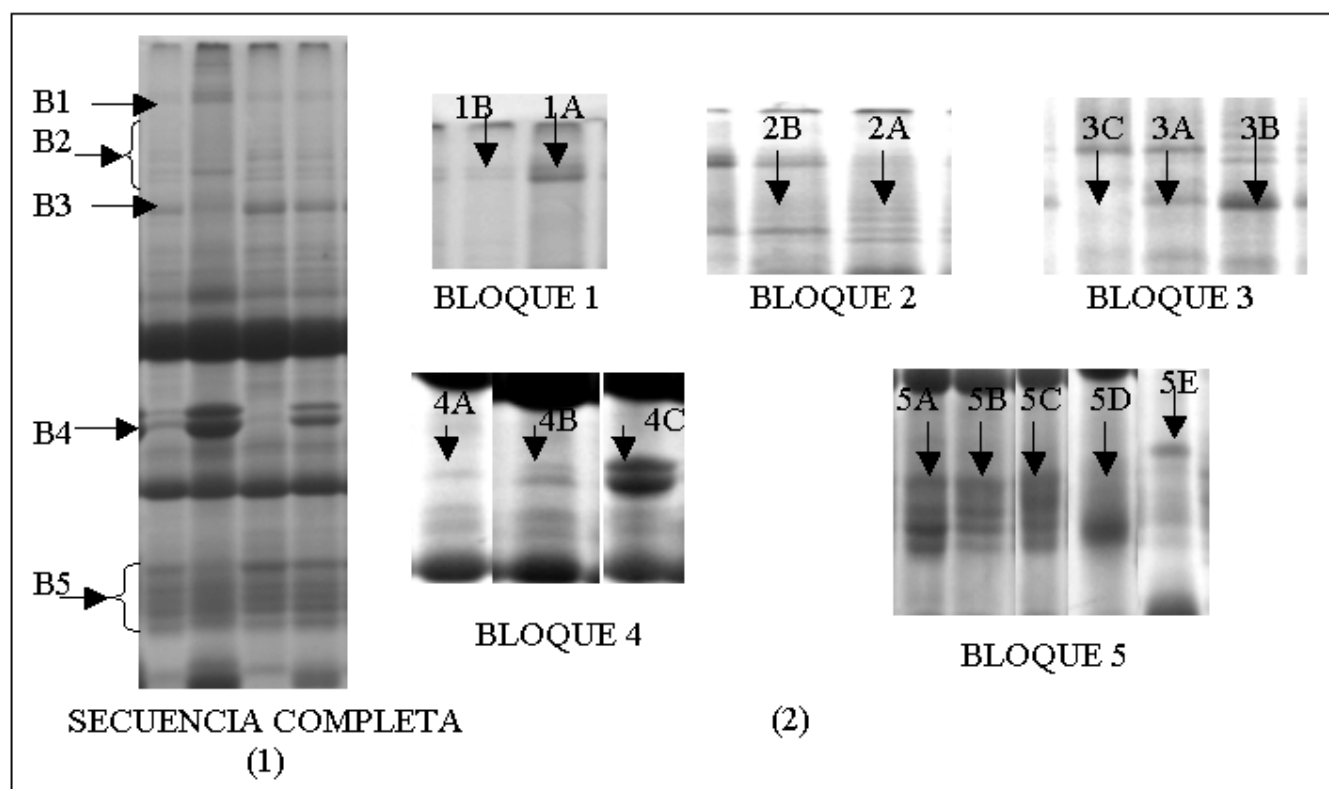


Figura 1.- SDS-PAGE de globulinas de proteínas del endospermo de *Pinus pinea* L. (1)Secuencia completa con los cinco bloques de análisis numerados en orden decreciente de pesos moleculares. (2)Variantes dentro de cada bloque nombradas con el número del bloque y una letra correspondiente a la variante propiamente dicha.

La numerosa presencia de bandas y las diferentes intensidades con que se presentaban hizo muy difícil la descripción de la variación banda a banda, por lo que se optó por discriminar en función de bloques de bandas dentro de zonas del gel previamente determinadas. La discriminación entre variantes dentro de cada bloque se hizo en función de la intensidad, posición y número de bandas presente. Las zonas susceptibles de análisis fueron 5, numeradas en orden decreciente de peso molecular.

Los bloques, así como las variantes detectadas para cada uno de ellos, aparece junto con sus frecuencias en la Tabla 1. Considerando las variantes de cada uno de los cinco bloques y su frecuencia en cada una de las zonas de actuación, se observa como la frecuencia de cada variante varía de una zona de actuación a otra, pero no se puede distinguir ningún tipo de tendencia. Además, cabe resaltar la dificultad de distinguir tendencias, dado el bajo número de individuos procedentes de las Zonas de Mejora 2 y 3 (definidas en el Programa de Mejora Genético del piñonero en andalucía)

Tabla 1.- Frecuencias absolutas y relativas de cada variante por bloques y por zonas de actuación

Bloques	Zona nº 1		Zona nº 2		Zona nº 3		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
1A	31	40.8	12	44.4	8	66.7	51	44.3
1B	45	59.2	15	55.6	4	33.3	64	55.7
2A	42	55.3	8	29.6	4	33.3	54	47.0
2B	34	44.7	19	70.4	8	66.7	61	53.0
3A	31	40.8	5	18.5	5	41.7	41	35.6
3B	37	48.7	16	59.3	4	33.3	57	49.6

3C	8	10.5	6	22.2	3	25.0	17	14.8
4A	26	47.4	6	22.2	3	25.0	45	39.1
4B	22	28.9	15	55.6	6	50.0	43	37.4
4C	18	23.7	6	22.2	3	25.0	27	23.5
5A	28	36.8	12	44.4	3	25.0	43	37.4
5B	29	38.2	7	25.9	4	33.3	40	34.8
5C	17	22.4	7	25.9	5	41.7	29	25.2
5D	1	1.3	1	3.8	0	0.0	2	1.7
5E	1	1.3	0	0.0	0	0.0	1	0.9
Total	76		27		12		115	

Merece destacarse el alto grado de polimorfismo encontrado, ya que todos los bloques analizados fueron polimórficos y que el número de secuencias de patrones distintos supera el 30 % del número de individuos. Además, sólo dos de las variantes y para uno de los bloques, pueden clasificarse como de baja frecuencia (5D y 5E)

Otra cuestión que cabe plantearse, dados los resultados, es si la variación para cada uno de los distintos bloques, que en la práctica cabría considerar como loci, es independiente o, por el contrario, hay asociación entre variantes de dichos bloques. Para dar contestación a esta cuestión, se realizó un análisis de correlación no-paramétrica tomando las variantes dentro de bloques como variables. El resultado es que, como no podría ser de otra forma, la correlación entre variantes del mismo bloque, cuando fueron dos, es siempre -1, indicando alelismo. Dado que el número de pares de datos fue 115, hemos considerado significativa la correlación cuando fue superior a |0.6| (Tabla 2). En estas circunstancias, algunas combinaciones son más frecuentes de lo que le correspondería si estuvieran al azar. Parece pues detectarse un ligamiento entre los genes que codifican las bandas de los bloques 1,2,3y4.

Tabla 2.- Coeficientes de correlación entre las variantes de algunos bloques.

	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A
1A	1.000						
1B	-1.000	1.000					
2A	-0.746	0.746	1.000				
2B	0.746	-0.746	-1.000	1.000			
3A	0.433	-0.433	-0.448	0.448	1.000		
3B	-0.689	0.689	0.682	-0.682	-0.789	1.000	
4A	-0.644	0.644	0.671	-0.671	-0.401	0.598	1.000

Los coeficientes en negrita fueron significativos al 99.%.

El análisis de grupos en toda la población, ha dado un dendrograma, que se presenta en la figura 2 con un ajuste del 88,9%. Como puede observarse, los 115 individuos han dado lugar a 41 secuencias de patrones distintas. De estos 41 grupos, 20 se presentan en una sola muestra, mientras que el mayor de los grupos está formado por 23 individuos. El progresivo agrupamiento de los patrones no permite detectar ningún salto cualitativo. Por otra parte, no se ha podido observar ninguna asociación de la agrupación inicial o los siguientes niveles en la pertenencia o no al mismo rodal, ni a la distribución espacial, ni a la pertenencia o no a masas naturales o repobladas, definidas éstas según Ruiz de la Torre (1990).

En un nuevo intento de asociar la variación obtenida para las globulinas con la distribución espacial, se efectuó un nuevo análisis de grupos, según la misma metodología, pero haciéndolo por separado para los individuos procedentes de cada una de las tres Zonas de Mejora. Tampoco en este caso pudo encontrarse ninguna asociación consistente entre los grupos encontrados y la distribución espacial. Los tres dendrogramas obtenidos, presentaron un ajuste del 92,7%; 81,1%; y del 90,2% para las zonas 1, 2, y 3 respectivamente.

CONCLUSIONES

1. En este primer estudio, las proteínas de la semilla que parecen más prometedoras para ser usadas como marcadores moleculares en pino piñonero son las globulinas. No obstante, hasta haber efectuado estudios complementarios, no puede descartarse la utilidad de las restantes fracciones proteicas de la semilla.

2- Para las globulinas se ha encontrado un cierto grado de polimorfismo, que incluso puede ser mayor

cuando una mejora en la técnica de análisis permita incrementar la nitidez de las bandas.

3- Parecen existir relaciones de ligamiento entre algunos de los genes responsables de las globulinas de pino piñonero.

4- No se ha detectado una asociación clara entre la variabilidad genética existente para estas proteínas y la distribución espacial del material analizado ni tampoco entre las zonas consideradas naturales o de repoblación. En todo caso, estos resultados deben ser considerados como meramente preliminares.

BIBLIOGRAFÍA

ABELLANAS, B; CUADROS, S; NAVARRO, R; OLIET, J; BASTIDA, F; BUTLER, I; LÓPEZ, J & MONTEAGUDO, F.J; (1997). *Programa de mejora de pino piñonero (Pinus pinea, L.) en Andalucía*. Cuadernos de la S.E.C.F. 5: 57-66.

ALLONA, I; COLLADA, C; CASADO, R & ARAGONCILLO, C; (1994). *Electrophoretic analysis of seed storage proteins from gymnosperms*. Electrophoresis, 15: 1062-1067.

GEPTS, P; (1989). *Genetic diversity of seed storage proteins in plants*. En: Plant population Genetics, Breeding, and Genetic Resources (A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp. 64-82

RUIZ DE LA TORRE, J; (1990). *Mapa forestal de España E. 1:200000. Memoria General*. ICONA, Madrid.

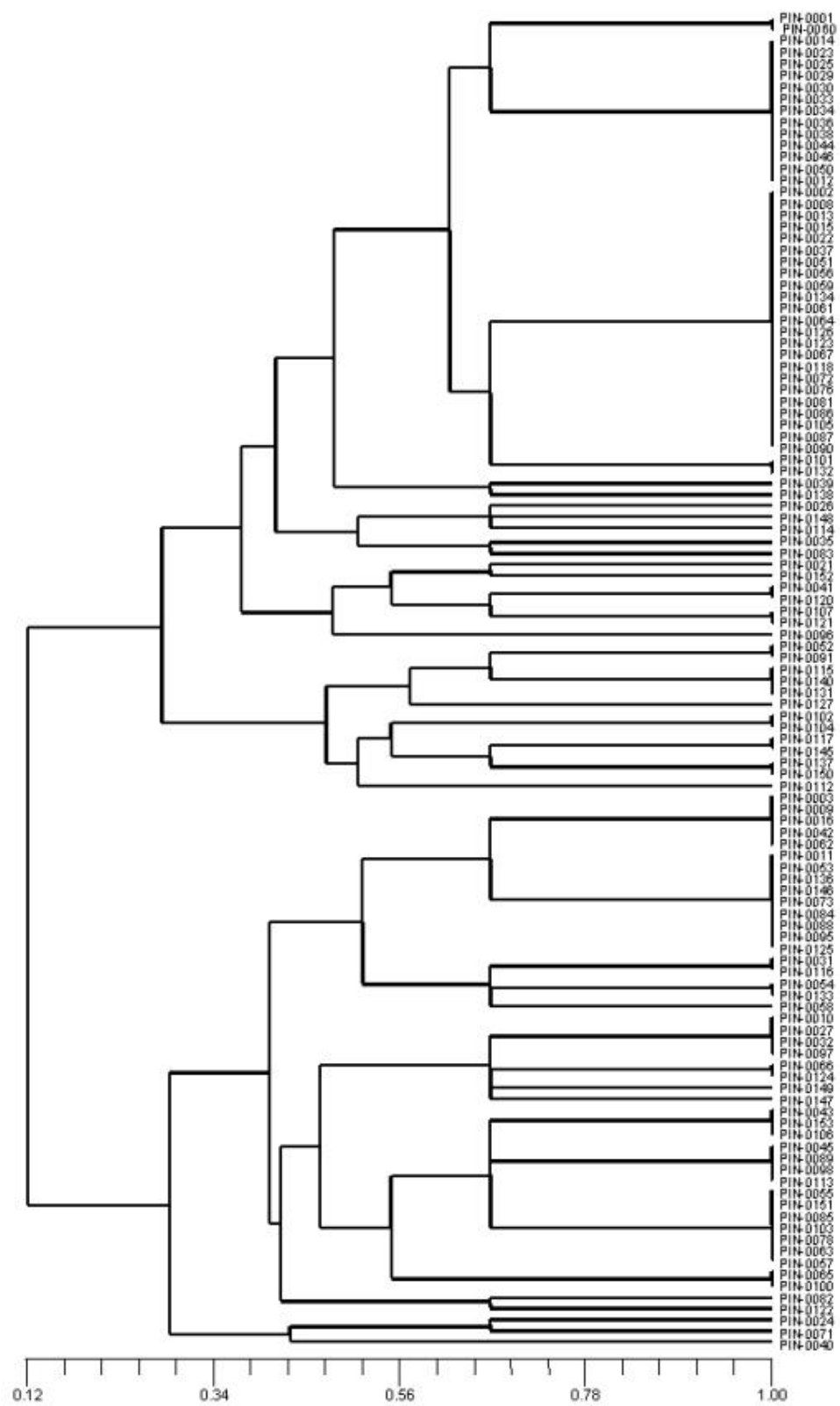


FIGURA 2. Análisis de grupos según el coeficiente de similitud de Jaccard (1908)