

# INTROGRESION GENETICA PROCEDENTE DE PLANTACIONES DE HIBRIDOS EN RODALES NATURALES DE *POPULUS NIGRA*.

D. AGÚNDEZ<sup>1</sup>, S. FLUCH<sup>2</sup>, C. MAESTRO<sup>3</sup>, N. ALBA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INIA-CIFOR. Dpto de Mejora Genética y Biotecnología. Apdo 8111. 28080 Madrid. España.

<sup>2</sup>ARCS. Seibersdorf. Austria.

<sup>3</sup>Gobierno de Aragón. SIA. Montañana, Zaragoza.

[agundez@inia.es](mailto:agundez@inia.es)

## RESUMEN

El material procede de una zona de regeneración natural del Valle Medio del Ebro, el Soto de Aguilar en Zaragoza, de donde se tomaron 57 plantas con una edad estimada de 3 años, 5 pies de la plantación de híbridos más cercana y 5 pies (3 femeninos y 2 masculinos) de *P. nigra* adultos. Para identificar el clon híbrido se incluyó también una muestra de "I-214" del vivero del SIA. El ADN de cloroplastos es de herencia materna en frondosas y permite identificar especies e híbridos y evaluar la introgresión debida a la semilla. Los microsatélites nucleares se han utilizado como comprobación de resultados.

Del estudio se desprende la existencia de introgresión genética en la primera generación (regenerado) y la utilidad de estas técnicas. Se plantea la necesidad de un estudio más profundo para llegar a valorar la introgresión debida a los distintos clones utilizados en nuestras cuencas, de manera que se puedan tomar medidas de gestión destinadas a la conservación de *Populus nigra*.

**PALABRAS CLAVE:** ADN de cloroplastos, microsatélites nucleares, conservación de recursos, frondosas.

## SUMMARY

The material collected comes from an area of natural regeneration located in the Middle Valley of Ebro river, Soto de Aguilar in Zaragoza. From there 57 plants aged in about 3 years were taken. Five trees of the closest hybrid plantations and other five (3 males and 3 females) of adults *P. nigra*. In order to identify the hybrid clon a known sample of "I-214" from SIA tree nursery was included.

When evaluating introgression due to seeds and identifying species and hybrids, DNA of chloroplasts is used as its inheritance is maternal in broadleaves. To support and confirm these results nuclear microsatellites have been used.

This study shows the existence of genetic introgression in the first generation (regeneration) and the use of these techniques. A need for a deep study is raised, so it will be possible to evaluate the introgression effect by different clones used in our river systems. In this way management can be directed to the genetic resources conservation of *P. nigra*.

**KEY WORDS:** Chloroplast DNA, nuclear microsatellites, genetic resources conservation, broadleaves.

## INTRODUCCIÓN

La red europea para la conservación de recursos genéticos forestales (EUFORGEN), decidió en 1993 incluir *Populus nigra* L. (álamo negro) como especie piloto para uno de sus grupos de trabajo. Las razones, entre otras, por las cuales se toma esta decisión son: el género *Populus* tiene gran importancia económica en todo el mundo y los mejoradores están preocupados con la conservación a largo plazo de sus recursos genéticos; *Populus nigra* se considera especie amenazada debido principalmente a la alteración de los ecosistemas de ribera por las actividades humanas y por las interacciones entre acervos genéticos procedentes de las poblaciones naturales y de las cultivadas (LEFEVRE y DE VRIES, 2000). En el marco de EUFORGEN se elaboró un proyecto, aceptado y financiado por la EU. El proyecto EUROPOP (Diversidad genética en poblaciones de ribera del Álamo negro europeo para la evaluación de su biodiversidad, estrategias de conservación, desarrollo natural y mejora genética) desarrollará un método de evaluación de la diversidad genética para las

poblaciones naturales y las colecciones *ex situ*.

En el último informe elaborado por la Comisión Nacional del Álamo (PADRÓ, 2000), se estima en 6.000 ha la superficie de formaciones de ribera existente en nuestro país, de las cuales, 2.900 ha se sitúan en el Valle del Duero y 1.350 ha en el Valle Medio del Ebro. En este último, se mantiene hoy en día el 59% de la superficie existente en los años 50 y se considera que el 41% de la superficie actual se encuentra en un fuerte proceso de degradación. Ante esta situación, se han iniciado una serie de actividades de conservación dirigidas principalmente al inventario de los recursos genéticos y a la instalación y mantenimiento de las colecciones *ex situ* (ALBA, 2000).

Las plantaciones de *P x euramericana* podrían presentar un problema en la conservación de recursos debido a la no existencia de barreras biológicas para la fertilización entre *P. nigra* y los híbridos, habiéndose probado en condiciones controladas que las especies del género *Populus* se pueden cruzar entre ellas en distintas combinaciones, incluso después de la generación F1 (CAGELLI y LEFEVRE, 1995). En España, la mayoría de las plantaciones se han realizado con el clon femenino "I-214" (*P x euramericana*), estando en contacto con rodales naturales. La valoración de los procesos de introgresión de estos híbridos en las poblaciones naturales de *Populus*, es necesaria para los programas de conservación de recursos genéticos.

El ADN de cloroplastos (cpADN) analizado mediante la técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), se ha utilizado como marcador genético en estudios de filogeografía, para identificar especies e híbridos entre distintas especies. El genoma de cloroplasto en el género *Populus* es de herencia materna y su estudio ha servido para conocer la variación entre especies y dentro de ellas (ver revisión en HEINZE, 1998). Se han descrito cebadores universales que permiten el análisis de un amplio rango de especies (DEMESURE *et al.*, 1995; DUMOLIN-LAPÈGUE *et al.*, 1997).

El desarrollo de microsatélites nucleares (nSSRs) codominantes y altamente polimórficos permiten conocer la variación genética, los niveles de heterocigosidad, y la dispersión de las especies. Actualmente se han desarrollado ya 12 pares de cebadores para el álamo negro (van der SCHOOT *et al.*, 2000) que nos permitirán: la evaluación de la diversidad genética en poblaciones naturales y en las colecciones existentes; distinguir individuos y establecer las relaciones entre descendencia y parentales.

El estudio de la introgresión se ha realizado con marcadores morfológicos y moleculares en zonas geográficas de contacto entre especies de *Salix* (HARDIG *et al.*, 2000), con cpADN para estudiar la hibridación entre *P. nigra* y *P. alba* (SMITH y SYTSMA, 1990), con marcadores nucleares (HEINZE, 1997) y con cpADN (HEINZE, 1998) para estudiar la introgresión entre *P. nigra* y otras especies o híbridos.

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos de una evaluación preliminar del fenómeno de la introgresión genética de híbridos en las poblaciones naturales de *Populus nigra* en España, aplicando el protocolo desarrollado en el proyecto EUROPOP.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción del rodal: El Soto de Aguilar está localizado en el Valle Medio del Ebro, en Zaragoza. El rodal objeto de estudio es de regeneración natural, instalado en una antigua zona de extracción de áridos que sufre encharcamientos temporales. Se encuentra rodeado de una antigua plantación de híbridos, presumiblemente "I-214" para producción de madera, de floración femenina ([Figura 1](#)).

Material vegetal: En la zona de regeneración se recolectaron 57 plantas con una edad estimada de 3 años, 5 pies de la plantación de híbridos más cercana y 5 pies (3 femeninos y 2 masculinos) de *P. nigra* adultos. Para identificar el clon híbrido se incluyó también una muestra de "I-214" del vivero del SIA.

Análisis en laboratorio: La extracción de ADN total se realizó a partir de hojas siguiendo el método de DELLAPORTA *et al.* (1983). El ADN de cloroplastos es de herencia materna en frondosas y permite la identificación de especies e híbridos y evaluar la introgresión debido a semilla. Dentro del proyecto EUROPOP se ha desarrollado el protocolo de análisis de mediante las técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y RFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos

digeridos con enzimas de restricción) con ADN de cloroplasto (FLUCH, en preparación), probándose cebadores universales de PCR diseñados para *Nicotiana tabacum* y que funcionaron en robles. Para la amplificación se ha seguido con modificaciones a DEMESURE *et al.* (1995), 5 µl del producto de PCR se han digerido con 5 U de la enzima MnlI en un volumen total de 15 µl. Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y posteriormente se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata.

El análisis de microsatélites nucleares se realizó para la comprobación de los resultados obtenidos con cpDNA, y para la comparación de la diversidad del rodal de introgresión con los datos obtenidos de las poblaciones naturales (EUROPOP, en preparación). La amplificación se realizó con 20 ng de ADN molde en un volumen total de 20 µl siguiendo con modificaciones a van der SCHOOT (2000). Se amplificaron 2 fragmentos el PMS14 y el PMS20. La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research, con el siguiente programa: 1 ciclo de 95° C durante 15'; 30 ciclos de 50'' a 95° C, 50'' a 50°C o 60°C, y 1'30'' a 72° C; elongación final de 10' a 72°C. La electroforesis y visualización se realizó con cebadores marcados con fluorescencia en un secuenciador automático ABI Prism de Perkin-Elmer.

## RESULTADOS

- ADN de cloroplastos: Todas las muestras han amplificado a excepción de 3 plantas del regenerado y un híbrido. Se han encontrado 2 haplotipos distintos, identificando uno de ellos como “*nigra*” al mostrarlo las 5 plantas del rodal natural analizadas. Los 4 híbridos de la plantación y el “I-214” de control muestran el mismo haplotipo, al que denominamos “*deltoides*” ya que el “I-214” es un híbrido *P. nigra x P. deltoides*. Del total del regenerado, 54 plantas, 52 muestran haplotipo “*nigra*” y 2 haplotipos “*deltoides*” (planta 11, P11, y planta 43, P43). Esto hace un total de 3.7% de plantas con genotipo híbrido. En la [figura 2](#) podemos observar un detalle del gel donde se aprecian los 2 haplotipos encontrados.

- Microsatélites nucleares: Se han amplificado todas las plantas a excepción de 4 plantas del regenerado y del “I-214”, por lo que no se puede afirmar si el genotipo encontrado con nSSRs corresponde exactamente a este híbrido. En la [figura 3](#) se representa mediante gráfico de barras las frecuencias alélicas absolutas para los 2 microsatélites analizados.

Para el fragmento PMS20 se han encontrado un total de 12 alelos de 220 a 241 bp (pares de base). Los dos alelos que caracterizan a los híbridos son 223 y 229 bp, no siendo ninguno de los dos específicos ya que también se encuentran en los *P. nigra*. La P11 y la P43 comparten los mismos alelos, 223 y 235 bp, siendo la frecuencia de este genotipo en el rodal de 28.57 %. Los alelos mayoritarios son 223 bp representando un 18.75 %, 235 bp con un 27.68 %.

Para el fragmento PMS14 Se han detectado 12 alelos que van desde 192 a 225 bp. El alelo 192 lo muestran únicamente los híbridos y 2 plantas del regenerado que coinciden con las plantas con haplotipo “*deltoides*” con cpDNA: P11 y P43. El genotipo de los híbridos es 192 y 210 bp y las P11 y P43 comparten 192 y 213 bp. Los alelos que con mayor frecuencia aparecen en el rodal son 207 bp con un 26.27 %, 210 bp con un 28.81 % y 213 bp con un 27.12 %.

## CONCLUSIONES

El estudio de ADN de cloroplastos mediante la técnica RFLP y los microsatélites nucleares, ha demostrado la existencia de introgresión vía semilla de plantaciones de *P. nigra x P. deltoides* en rodales naturales de *P. nigra*. Se plantea la necesidad de un estudio más profundo para llegar a valorar la introgresión debida a los distintos clones utilizados en nuestras cuencas, de manera que se puedan tomar medidas de gestión destinadas a la conservación de *Populus nigra*.

## REFERENCIAS

ALBA, N. (2000). *Conservación de Recursos Genéticos del género Populus en España*. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Fuera de Serie nº 2. pp: 45-57.

CAGELLI, L.; LEFEVRE, F. (1995). *The conservation of Populus nigra L. and gene flow with cultivated poplars in Europe*. Forest Genetics 2 (3): 135-144.

DELLAPORTA, S.L., WOOD J., HICKS J.B.; (1983). A plant minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.

DEMASURE, B., SODZI, N., PETIT, R.J.; (1995). *A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants.* *Molecular ecology* 4: 129-131.

DUMOLIN-LAPÈGUE, S., PEMONGE, M.H., PETIT R.J.; (1997). *An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants.* *Molecular ecology* 6: 393-397.

HARDIG, T.M.; BRUNSFELD, S.J.; FRITZ, R.S.; MORGAN, M.; ORIANSC.M. (2000). *Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (Salix) hybrid zone.* *Molecular ecology* 9: 9-24.

HEINZE, B. (1997). *A PCR marker for a Populus deltoides allele and its use in studying introgression with native European Populus nigra.* *Belgian Journal of Botany* 129 (2): 123-130.

HEINZE, B. (1998). *PCR-based chloroplast DNA assays for the identification of native Populus nigra and introduced poplar hybrids in Europe.* *Forest Genetics* 5 (1): 31-38.

LEFEVRE, F.; DE VRIES, S. (2000). *Populus nigra network.* En TUROK, J. and GEBUREK, TH. (ed.). *International collaboration on forest genetic resources: the role of Europe.* Proceedings of the Second EUFORGEN Steering Committee meeting. pp: 93-96.

PADRÓ, A. (2000). *El cultivo de los álamos y los sauces. Cómo atender a las demandas de la Sociedad y del Medio Ambiente.* Comisión Internacional del Álamo. Informe de la Comisión Nacional de España. 21ª Reunión Portland, Oregón. 7 pp.

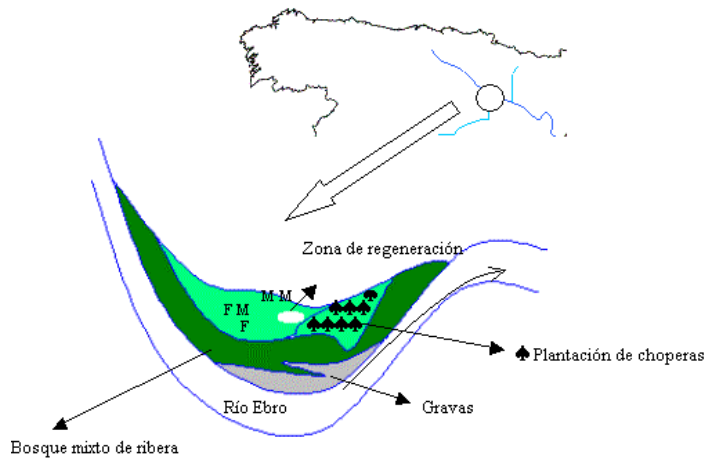
van der SCHOOT, J.; POSPISKOVA, M.; VOSMAN, B.; SMULDERS, M.J.M. (2000). *Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (Populus nigra L.).* *Theoretical and Applied Genetics* 101: 317-322.

SMITH, R.L.; SYTSMA, K.J. (1990). *Evolution of Populus nigra (sect. aigeiros): introgressive hybridization and the chloroplast contribution of Populus alba (sect. Populus).* *American Journal of Botany* 77 (9): 1176-1187.

## AGRADECIMIENTOS

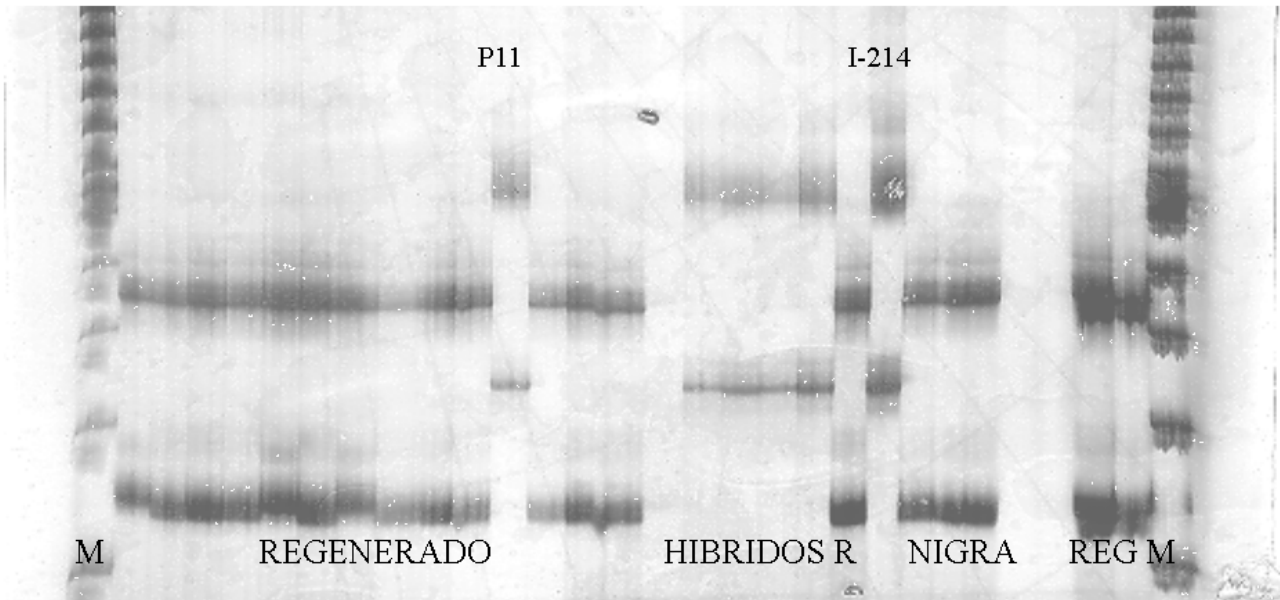
Este estudio ha sido financiado por La Comisión de las Comunidades Europeas, Agricultura y Pesca (FAIR) en el programa específico RTD, PL97-3386, "Genetic diversity of European Black Poplar for evaluation of biodiversity, conservation strategies, nature development and genetic improvement". No refleja necesariamente su opinión y de ninguna manera anticipa la política de la Comisión en este área.

FIGURA 1. Situación del Soto de Aguilar y gráfico esquemático del rodal de regeneración estudiado. F= pies de *P. nigra* femeninos; M= pies de *P. nigra* masculinos



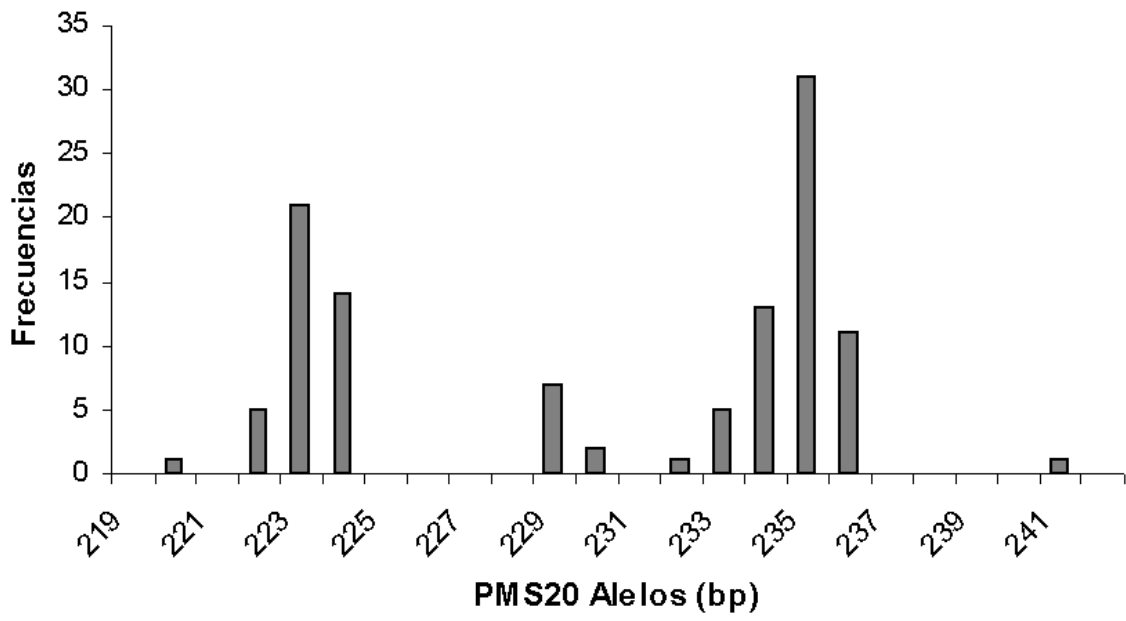
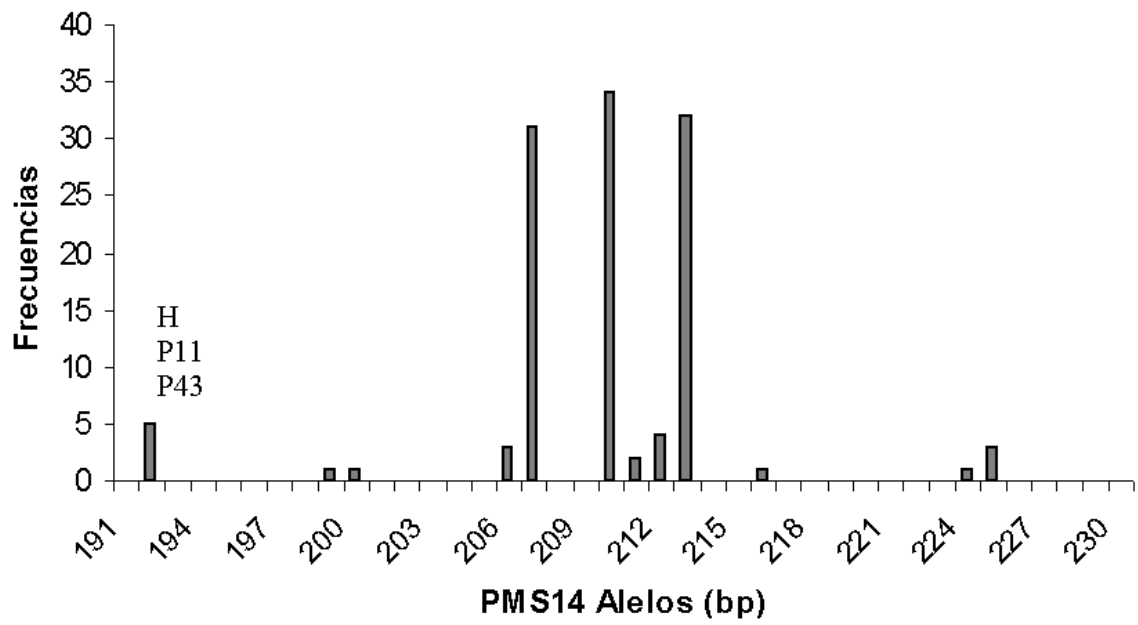
[Volver / Return](#)

FIGURA 2. Haplotipos del fragmento DT de cpADN encontrados para el rodal de regeneración en el Soto de Aguilar (Zaragoza). M = marcador de peso molecular; P11=planta n° 11 que muestra el haplotipo "deltoides".



[Volver / Return](#)

Figura 3. Frecuencias alélicas absolutas para los 2 loci de microsatélites nucleares analizados (PMS14 y PMS20). El tamaño en pares de bases (bp) es aproximado. P11, P43= plantas que muestran haplotipo "deltoides", H=pies de la plantación (3).



[Volver / Return](#)