

mesa temática: Mejora genética forestal, viveros y repoblaciones.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MEDIANTE MICROSATÉLITES DE LOS CLONES COMERCIALES DE CHOPO EN ESPAÑA

de Lucas, AI; Giraldo, JJ; Hidalgo, E

Laboratorio de Diagnóstico Genético. Dpto. Producción Vegetal y Recursos Forestales. ETS Ingenierías Agrarias. Avda. Madrid, 44. 34004. Palencia. ailucas@pvs.uva.es

Resumen

La legislación vigente en España sólo autoriza el uso de 28 clones recogidos en el “Catálogo Nacional de Clones del Género *Populus*”, si bien este número puede aumentar progresivamente. Por otro lado, la producción de planta para choperas la realizan viveros especializados, normalmente inscritos en el Registro de Productores de Plantas de Vivero, que garantizan la calidad sanitaria de la planta, así como su identidad clonal. Sin embargo, y a pesar de la importancia de la identidad clonal en el rendimiento de la plantación, viveristas, productores y administraciones aún no disponen de una herramienta precisa y objetiva para certificar la identidad clonal de las plantas, que se suele basar en características morfológicas, más o menos subjetivas e inestables. Desde hace unos años, este problema se intenta paliar mediante el uso de distintas técnicas de genética molecular, encaminadas a establecer una relación biunívoca de patrones y clones, lo que garantizaría la identificación precisa de los mismos. En este trabajo hemos analizado los 28 clones del actual Catálogo ampliado en 2003, con un mínimo de 3 repeticiones independientes, con una batería de 6 microsatélites previamente descritos. Así, se han establecido patrones estables para todos los clones del catálogo, que han resultado específicos para 26 de los clones.

Palabras clave: *Populus*, Material forestal de reproducción, certificación, marcadores moleculares, SSRs.

INTRODUCCIÓN

El material Forestal de Reproducción del género *Populus* comercializado por los viveros en España ha de estar certificado como “Material Controlado” por los organismos oficiales dependientes del Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. Las descripciones morfológicas en las que se basa la certificación abarcan caracteres que, en mayor o menor grado, se ven influenciadas por el ambiente: condiciones edafoclimáticas, marco de plantación y otras técnicas de manejo y, muy especialmente, la edad de la planta y su estado sanitario. Por consiguiente, dichos caracteres morfológicos pueden resultar inestables o subjetivos o no ser expresados en las plantas jóvenes que se comercializan, lo que puede crear confusión en la identificación e, incluso, conducir a certificaciones erróneas que no serán detectadas hasta varios años más tarde.

Estas dificultades de identificación se agravarán necesariamente a medida que se incorporen al Catálogo nuevos clones, especies e híbridos tal como preveía la UE y tal como ha empezado a ocurrir en España, donde a los 14 clones iniciales, se han añadido otros 14 nuevos clones desde enero de 2003.

Estos problemas de certificación podrían ser solventados si se estableciera una herramienta basada en las características genéticas que resultan más estables y objetivas que los caracteres morfológicos.

Actualmente existe un amplio abanico de posibilidades, ya que en las últimas décadas se han desarrollado una importante serie de marcadores moleculares, mayoritariamente basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten analizar regiones de ADN particularmente polimórficas, donde es muy probable que existan diferencias entre clones. Además, los marcadores moleculares se pueden aplicar sobre cualquier órgano, y sobre plantas de cualquier edad y condición sanitaria, lo que los hace candidatos ideales para la certificación clonal. El principal escollo en la aplicación sistemática de estas técnicas con fines de certificación ha sido hasta ahora el coste asociado al proceso: tanto por el coste unitario de los consumibles, como la necesidad de disponer de infraestructuras costosas y de personal formado para ello.

Los microsatélites son un tipo de marcador molecular que se caracteriza por presentar un nivel de polimorfismo elevado, herencia mendeliana codominante, requerimientos relativamente bajos de mano de obra y costo, muy alta reproducibilidad, facilidad de transmisión entre laboratorios y ser frecuentemente extrapolable entre especies próximas. En relación a otros marcadores utilizados para la caracterización del género *Populus*: isoenzimas (RAJORA, 1988, 1989; AGÜNDEZ *et al.* 1999), RAPDs (CASTIGLIONE *et al.* 1993; LIN *et al.* 1994; SÁNCHEZ *et al.* 1998) y AFLPs (AGÜNDEZ *et al.* 1999; ÁLVAREZ *et al.* 2001), los microsatélites presentan mayor resolución y estabilidad que las isoenzimas y los RAPDs, y menores costes y complejidad técnica y de interpretación que los AFLPs.

Todas estas características hacen de los microsatélites uno de los marcadores más populares y son utilizados en la actualidad para la construcción de mapas genéticos de ligamiento físico, así como en pruebas de paternidad e identificación, por lo que han sido elegidos para abordar este estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La recogida de material vegetal perteneciente a los 28 clones del Catálogo Nacional y que recogen la O.M. 17778/92 y Orden APA/544/2003), se realizó en cuatro localidades:

- Zaragoza: Vivero de planta madre del Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón (SIA-DGA).
- Guadalajara: Centro Nacional de Mejora Forestal “El Serranillo” perteneciente a la Dirección General para la Conservación de la Naturaleza del Ministerio de Medio Ambiente (DGCONA-MIMAM)
- Gerona: Estación experimental del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries del Departament

d'Agricultura Ramaderia i Pesca (IRTA-DARP)

- **León:** Vivero Forestal de la Junta de Castilla y León situado en la localidad de Villafer.

En la Tabla 1 se muestran los clones procedentes de cada uno de estos viveros y el número de repeticiones del que se dispone de cada uno de ellos.

El material vegetal se trasladó al laboratorio en forma de hojas o de varas, forzándose la brotación de estas últimas hasta la aparición de hojas. Posteriormente, el material vegetal, se conservó de dos formas diferentes (liofilizado y pulverizado con N₂ líquido) y se almacenó a -80°C.

Extracción, cuantificación, amplificación y análisis de fragmentos de ADN

El ADN total de cada individuo se extrajo siguiendo el protocolo descrito por DOYLE & DOYLE (1990), modificado por TORRES *et al.* (1993) para pequeños volúmenes.

Se han utilizado 6 iniciadores microsatélites, PTR2, PTR4 (DAYANANDAN *et al.* 1998), PTR7 (RAHMAN *et al.* 2000), PMGC433, PMGC486, PMGC2156 diseñados en la Universidad de Washington por la PMGC (Poplar Molecular Genetic Cooperative), previamente marcados con fluorocromos. Las características de estos iniciadores y su marcaje se describen en la Tabla 2.

La amplificación de ADN fue realizada en 10 µl de volumen de reacción en el que además del ADN, se incluyen unas concentraciones finales de: 1x GeneAmp PCR Buffer II (Applied Biosystems, Foster City, Calif.); 0,2 mM dNTP; 1 mM MgCl₂; 0,1 µM de cada iniciador y 0,3 u de Amplitaq® DNA polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Las reacciones fueron introducidas en los termocicladores GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) y PTC-100TM (MJ Research, Inc., Waltham, Mass.). Los parámetros de amplificación para los microsatélites PTR2 y PTR4 fueron los descritos por DE LUCAS (2003), para PTR7 los descritos por RAHMAN *et al.* (2000), y para los PMGC se utilizó el siguiente programa de PCR: Una desnaturalización inicial de 2' a 94°C, seguida por 35 ciclos formados por una desnaturalización de 15'' a 94°C, una hibridación de 30'' a 50°C y una extensión de 15'' a 72°C. La extensión final se realizó a 72°C durante 4'.

Los fragmentos amplificados se analizaron en un analizador genético de fragmentos ABI-PRISM 310, utilizando como marcador interno el GeneScan ROX-500 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Los genotipos de los individuos han sido examinados utilizando el Software de Análisis de fragmentos GeneScan, versión 3.7. (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) (Fig. 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aplicando los parámetros de amplificación y discriminación alélica descritos anteriormente, se han obtenido los perfiles genéticos de los 28 clones para los seis *loci* estudiados. En todos los casos se han obtenido resultados consistentes, ya que las mismas muestras de las mismas procedencias siempre presentaron resultados idénticos. A su vez, todas las repeticiones disponibles de los clones de algunas de las procedencias (Tabla 1), presentaron los mismos genotipos. Se obtuvieron productos de amplificación para todos ellos, excepto en el caso de los clones interamericanos (*P. trichocarpa* x *deltoides*) para el marcador PTR4.

Los *loci* más discriminantes para los clones del Catálogo actual han resultado ser el PMGC486 y PMGC2156, ya que resultan muy polimórficos y cuentan con un elevado número de alelos (16 y 14 respectivamente), contenidos de información polimórfica (PIC) y poderes de discriminación (PD) altos, así como un número de genotipos únicos elevado (10 y 12 respectivamente) y muy por encima de la media de los microsatélites analizados (7,3) (Tabla 3). Analizando únicamente estos 2 *loci* se consigue identificar un total de 25 genotipos distintos de los 26 existentes, quedando únicamente por discriminar el clon BL-Constanzo de la pareja I-MC/NNDV, cuyo patrón sólo difiere en el marcador PTR2.

Los marcadores PMGC433 y PTR7 son también muy polimórficos y cuentan con un alto poder de discriminación (con valores que superan el 0.9), aunque presentaron una menor variabilidad que los dos anteriores para los clones estudiados (con 11 alelos cada uno y 9 y 8 genotipos únicos respectivamente). A pesar de ello han demostrado ser unos excelentes candidatos para emplear en estudios de especies del género *Populus* por su gran variabilidad y elevada especificidad. Conviene tenerlos a punto en los laboratorios de certificación, para ser utilizados en futuras ampliaciones del catálogo.

A pesar de que el marcador PTR4 presenta mayor polimorfismo y ofrece mejores resultados que PTR2 en otros estudios sobre híbridos euramericanos (RAJORA & RAHMAN, 2003) para los clones de este estudio aporta muy poca información, por lo que no parece un marcador interesante y no se aconseja su uso.

Así, aplicando estos 6 microsatélites sobre los 28 clones del Catálogo, se obtuvieron un total de 26 patrones genéticos distintos, de los cuales, 23 patrones son únicos y por tanto permiten identificar cada clon de forma biunívoca. Los seis clones que incluye el actual Catálogo Nacional y que no se diferencian mediante los 6 marcadores empleados son los siguientes:

- **I-214/Campeador.** Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis de que se trata del mismo clon, como ya establecen mediante el empleo de AFLPs e isoenzimas ÁLVAREZ *et al.* (2001) y AGÜNDEZ *et al.* (1999), contribuyendo a un antiguo debate sobre la identidad de estos dos clones.
- **I-MC/NNDV.** Presentan genotipos idénticos para los 6 microsatélites analizados. El estudio llevado a cabo por ÁLVAREZ *et al.* (2001) mediante AFLPs también indicaba identidad genética entre estos clones. Por el contrario, parece ser que existen diferencias claras en las caracterizaciones morfológicas realizadas sobre de estos dos clones.
- **Triplo y Viriato.** Aunque los genotipos observados para cada una de las plantas analizadas son idénticos, esta similitud genética es muy sorprendente, ya que Viriato es un *P. deltoides* mientras que el Triplo es un clon *euramericano*. Hay que tener en cuenta que en este estudio sólo disponíamos de una repetición de un único individuo del clon Viriato, procedente de la localidad del Serranillo. Por consiguiente, y aunque resulta aventurado avanzar cualquier hipótesis, podría tratarse de un error de etiquetado que merece comprobaciones más profundas.

Por otro lado, y en general, los individuos pertenecientes al mismo clon deberían presentar resultados idénticos, independientemente del lugar en el que se haya recolectado el material. Sin embargo, en tres casos se han encontrado discrepancias, indicando posibles errores de manejo o de etiquetado:

- Los clones **2000 Verde** y **Guardi** presentan genotipos intercambiados en las muestras procedentes del vivero de Zaragoza respecto a los de “El Serranillo” y León. Aunque esto merece una comprobación adicional, podemos suponer que ha existido un error en el manejo o etiquetado del material.
- Respecto al clon **Bordils**, los genotipos de “El Serranillo” y Zaragoza difieren en 3 loci, y ninguno de los 2 genotipos coincide con otro clon del catálogo. Por consiguiente podemos inferir que se trata de dos clones distintos pero no es posible establecer si alguno de los dos casos es realmente Bordils. Lo que sí resulta evidente es que se trata de individuos genéticamente próximos, ya que coinciden en 3 microsatélites, y son los únicos individuos homocigotos para el marcador PMGC486 de los 28 estudiados. En ambos casos, nos encontramos ante dos patrones genéticos únicos en el Catálogo, lo que permite su identificación inequívoca.

CONCLUSIONES

Todos los microsatélites empleados son altamente polimórficos y discriminantes, demostrando su utilidad para estudios de caracterización e identificación de clones del género *Populus*, a excepción del marcador PTR4, que presentó un polimorfismo y poder de discriminación muy bajos, por lo que no ha resultado informativo en este trabajo de caracterización. Los microsatélites más informativos y con mayor poder de discriminación han sido el PMGC2156 y PMGC486, que en total discriminan 25 de los 26 genotipos encontrados. Para identificar biunívocamente cualquier clon del catálogo (exceptuando las parejas que no han sido discriminadas, dos de las cuales podemos considerar sinónimas), sería suficiente con emplear los marcadores PMGC486, PMGC2156 y PTR2, resultados que se pueden obtener en sólo dos reacciones de PCR.

Todos los clones presentaron el mismo patrón genético en las distintas localidades estudiadas, exceptuando el clon Bordils en el material procedente de “El Serranillo” y Zaragoza, y los clones Guardi y 2000 Verde con patrones genéticos intercambiados. Estas ambigüedades y diferencias de interpretación parecen indicar que en la práctica se producen errores de manejo con una cierta frecuencia, y por tanto, queda patente la necesidad de utilizar técnicas de caracterización molecular que detecten los errores de catalogación, apoyando las técnicas tradicionales basadas en marcadores morfológicos y fenológicos.

Por consiguiente, y además de investigar el momento y el lugar en el que se producen los errores, sería aconsejable realizar un estudio genético de comprobación sobre el material de reproducción de forma periódica para evitar multiplicar el error. La misma medida podría también ser utilizada sobre muestreos en plantaciones de producción.

Agradecimientos

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto de investigación KGN-541A financiado por la Junta de Castilla y León. Los autores de este trabajo quieren agradecer a E. Notivol (SIA-DGA), F. Camps (IRTA-DARP), J.L. Peñuelas (DGCONA-MIMAM) y J.L. García (Servicio Territorial de MA, León) su colaboración en el suministro del material vegetal. A M.T. Cervera por aconsejarnos en la selección de iniciadores. A J.C. Santana y P. Recio por la ayuda prestada en laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- AGÚNDEZ, D.; CERVERA, M.T.; ALBA, N.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. & GRAU, J.M.; 1999. Genetic identification of commercial clones of *Populus* based on isozymes and AFLPs. *Vitoria-Gasteiz Proceedings*. Spain.
- ÁLVAREZ A.; CERVERA, M.T.; AGÚNDEZ, D.; ALBA, N.; GONZÁLEZ ANTOÑANZAS, F.; ZAPATER, J.M. y GRAU, J.M.; 2001. Aplicación de la técnica AFLPs para la identificación de clones del Género *Populus*. *I Simposio del Chopo*. Zamora.
- B.O.E. nº 179 de 27/7/1992. O.M. 17778/1992 de 24 de junio, por la que se publica el Catálogo nacional de los clones admitidos como materiales de base para los materiales forestales de reproducción relativo al género *Populus* L.
- B.O.E. nº 63 de 14/3/2003. ORDEN APA/544/2003 de 6 de marzo, por la que se publica la ampliación del Catálogo nacional de los clones admitidos como materiales de base para los materiales forestales de reproducción relativos al género *Populus* L.
- CASTIGLIONE, S.; WANG, G.; DAMIANI, G.; BANDI, C.; BISOFFI, S. & SALA, F.; 1993. RAPD fingerprints for identification and taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. *Theor. Appl. Genet.* 87:54-59.
- DAYANANDAN, S.; RAJORA, O.P. & BAWA, K.S.; 1998. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theor. Appl. Genet.* 96: 950-956.
- DE LUCAS, A.I.; 2003. Descripción molecular con microsatélites de clones comerciales de chopo en España y su automatización con fines de certificación. Trabajo Práctico Tutelado. Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. ETSIIAA (Universidad de Valladolid). Palencia.
- DOYLE, J.J. & DOYLE J.L.; 1990. Isolation and characterization of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- KLOOSTERMAN, A.D.; BUDOWLE, B. & DASELAAR, P.; 1993. PCR-amplificación and detection of the human D1S8 VNTR locus. *Int. J. leg. Med.* 105:257-264.
- LIN, D.; HUBBES, M. & ZSUFFA, L.; 1994. Differentiation of poplar and willow clones using RAPD fingerprints. *Tree Physiol.* 14:1097-1105.
- RAHMAN, M.H.; DAYANANDAN, S. & RAJORA, O.P.; 2000. Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*. *Genome* 43 : 293-297.
- RAJORA, O.P.; 1988. Multilocus genetic structure, characterization, and relationships of *Populus x canadensis* cultivars. *Genome* 32:99-108.
- RAJORA, O.P.; 1989. Genetic structure and identification of *Populus deltoides* clones based on allozymes. *Genome* 32:440-448.
- RAJORA, O.P. & RAHMAN; M.H.; 2003. Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus x canadensis*) cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 106:470-477.
- SÁNCHEZ, N.; GRAU, J.M. & BUENO, M.A.; 1998. RAPD markers for the identification of *Populus* species. *Silvae Genet.* 47:67-71.
- TORRES, A.M.; WEEDEN, N.F. & MARTÍN, A. ; 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.* 93: 613-617.
- WEBER, J.L.; 1990. The informativeness of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphism. *Genomics* 7:524-530.

Tabla 1.- Material vegetal disponible procedente de las 4 localidades. N° de repeticiones/clon procedentes de cepas madre distintas.

LOCALIDAD	CLONES DISPONIBLES (OM 17778/92)	REPETICIONES	CLONES DISPONIBLES (APA/544/2003)	REPETICIONES	MUESTRAS
Zaragoza	13	3/clon	11	1/clon	50
Guadalajara	13	1/clon	11	1/clon	24
Gerona	14	2/clon	---	---	28
León	11	3/clon	11	3/clon	66
TOTALES					168

Tabla 2.- Motivo repetido, secuencias *forward* y *reverse* de los iniciadores microsatélites utilizados en este trabajo. Fluorocromo con el que se ha marcado la secuencia *forward* y temperaturas de hibridación de la PCR.

MICROSATELITE	MOTIVO REPETIDO	SECUENCIA DEL INICIADOR	FLUOROCROMO*	T ^a HIBRIDACIÓN
PTR2	(TGG) ₈	fw-AAGAAGAAGCTCGAAGATGAAGAAGT rv-ACTGACAAAACCCCTAATCTAACAA-	6-FAM	58 °C
PTR4	(TC) ₁₇	fw-AATGTCGAGGCCTTTCTAAATGTCT rv-GCTTGAGCAACAAACACACCAGATG	NED	56 °C
PTR7	(CT) ₅ AT(CT) ₆	fw-ATTTGATGCCTCTTCCTTCCAGT rv-TATTTTCATTTTCCCTTGCTTT	HEX	60 54 °C
PMGC433	AG	fw-GCAGCATTGTAGAATAATAAAAG rv-AAGGGGTCTATTATCCACG	NED	50 °C
PMGC486	AG	fw-AGAAGTTGTTGAACCCGATGGG rv-GCTACAACTTTGTTGTACCC	HEX	50 °C
PMGC2156	AG	fw-GATCTCTTTACATCACTCATC rv-GAATGTCCTTACTCCATTGTTGG	6-FAM	50 °C

* Applied Biosystems, Foster City, Calif.

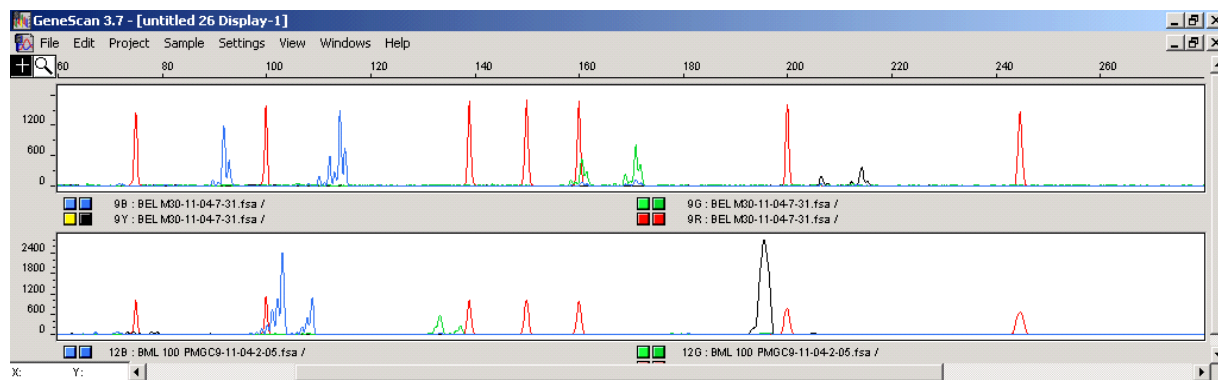


Fig.1.- Electroferograma de una PCR conjunta para los 3 marcadores PMGC.

Tabla 3.- Heterocigosis observada (Ho); Poder de discriminación según Kloosterman *et al.* (1993) (PD); N° de Alelos por locus; N° de genotipos totales y de genotipos únicos por locus; Contenido de información polimórfica según Weber (1990) (PIC) y Rango alélico (en pares de bases) de los marcadores microsatélites utilizados.

MARCADOR	Ho	P.D.	N° DE ALELOS	GENOTIPOS TOTALES	GENOTIPOS ÚNICOS	PIC	RANGO (p.b.)
PTR2	0,586	0,790	7	9	4	0,577	203-221
PTR4	0,042	0,517	4	3	1	0,518	195-203
PTR7	0,276	0,904	11	15	8	0,881	227-253
PMGC433	0,793	0,904	11	16	9	0,791	195-223
PMGC486	0,931	0,926	16	18	10	0,911	127-171
PMGC2156	0,448	0,899	14	17	12	0,845	84-132
MEDIA	0,513	0,823	10,7	13,0	7,3	0,754	---