

RAPDs PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÓMICA EN CLONES DE *POPULUS TREMULA* OBTENIDOS *IN VITRO*

N. Sánchez*, J.A. Manzanera**, J.M. Grau* & M.A. Bueno*

*INIA-CIFOR. Ap.8111. 28080 MADRID.

**ETSIM Ciudad Universitaria s/n. 28040 MADRID

RESUMEN

Se han identificado con RAPDs clones de *P. tremula*. Estos clones muestran el mismo patrón molecular en los árboles adultos donantes, en los explantos *in vitro* y en las plántulas aclimatadas a vivero.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando la propagación se lleva a cabo mediante la clonación *in vitro* de individuos adultos seleccionados, es importante conocer la integridad genómica de las plantas micropropagadas respecto a la planta madre. De esa manera las características del genotipo elegido se mantendrán en la propagación. El análisis mediante marcadores moleculares RAPDs contribuye como una nueva evidencia al conocimiento de la estabilidad genética en plantas propagadas mediante cultivo *in vitro* (RANI & al., 1995).

Entre las especies arbóreas cuya plantación tiene como fin principal la restauración o la creación de ecosistemas forestales permanentes, se encuentra *Populus tremula*. Se ha localizado en grupos aislados, rodeados de otras especies, a 1500 m de altitud en Balsaín, La Jarosa y Canencia. En estos rodales se pueden observar ejemplares de buen porte entre 20 y 70 años. Debido a su

dificultad de propagación por estaquilla, mediante cultivo de tejidos se ha llevado a cabo una propagación clonal fiable y rápida de individuos seleccionados.

La identificación de clones es posible llevarla a cabo mediante marcadores moleculares. Con las técnicas derivadas de la PCR (WELSH & al., 1990; ERLICH & al., 1991), entre ellas la conocida como RAPD (WILLIAMS & al., 1990) se pueden detectar polimorfismos en el ADN. La identificación molecular por este método de clones propagados *in vitro* y de estos mismos cultivados posteriormente en vivero es de suma importancia para asegurar la identificación genética a utilizar en forestación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

El análisis se ha realizado:

- En la mezcla de 10 explantos (*Pools*) de cada uno de los 5 clones *in vitro* (BUENO & al., 1992; 1993) pertenecientes a tres rodales de *P. tremula*, Balsaín (2B y 3B), Canencia (4C y 5C) y La Jarosa (1J).
- En hojas de clones de árboles jóvenes

crecidos en vivero y procedentes de los clones “*in vitro*” (clones 4C, 5C, 1J, 2B y 3B) y adicionalmente los clones 3C y 1B no presentes en el análisis de los clones *in vitro*.

- En los árboles adultos originarios de estos clones *in vitro* (5C, 1J, 2B y 3B) y en árboles adultos pertenecientes al rodal de los originarios de los clones *in vitro* el 3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28 y 29 del rodal “C” Canencia; el 2, 3 y 4 del “J” de La Jarosa; y el 1, 4, 5, y 6 del “B” de Balsain.

Cultivo *in vitro*

Los segmentos nodales y yemas apicales de brotes de raíz de *P.tremula* se esterilizaron con hipoclorito sódico 1% durante 20' seguido de agua destilada estéril con intervalos de 5'. Los explantos se inocularon en Woody Plant Medium modificado y como reguladores de crecimiento se utilizaron 0,5 mg/l BAP y 0,02 mg/l de ANA. Se añadió sacarosa 3% y agar como agente gelificante 8g/l. El medio fue ajustado a pH 5,6 y esterilizado en autoclave a 1,2 atmósferas y 120° C durante 20 minutos.

El medio de elongación fue el mismo, bajando el BAP a 0,1 mg/l. Los reguladores de crecimiento para el medio de enraizamiento fueron 0,5 mg/l AIB y 0.02 mg/l ANA. Todos los cultivos se incubaron en una cámara climática con fotoperiodo de 16 horas de luz. La temperatura de día fue de 25°C y de 20 °C de noche.

Las vitroplantas se aclimataron en invernadero con tunel de niebla y 90% de humedad relativa. El sustrato empleado fue turba y perlita 1:1 estéril. A las dos semanas aproximadamente se plantaron en vivero.

Análisis Molecular

Extracción de ADN. Método de Dellaporta (DELLAPORTA & *al.*, 1983) con las siguientes modificaciones: 0.02 g de explanto o de hoja y en el caso de los árboles adultos de hoja congelada a -80°C, se maceraron en eppendorf con una punta estéril (antes y después del *buffer* de extracción). *Buffer* de

extracción: Tris-ClH pH 8, 111 mM; EDTA 55 mM; ClNa 550 mM y 2-β-Mercaptoetanol 10 mM. SDS (sodium dodecil sulfato) añadido posteriormente al acetato potásico.

Preparación de las Muestras Previas a la Amplificación. Para clones *in vitro*, ADN aislado de 10 explantos tomados al azar de cada clon. Se hizo una mezcla en cantidades equivalentes del ADN (denominada *pool*). Se realizó con otros 10 explantos distintos de cada clon y el resultado fue el mismo, con ello se demostró la repetitividad del proceso. La PCR se realizó tanto con el *pool* como con cada explanto individual. Se hicieron diluciones de cada muestra de ADN a 1/5, 1/10, 1/20, 1/30 y 1/40. Y de ellas se seleccionaron aquellas en las que había amplificación en la reacción PCR con un *primer* concreto. Cada una de las amplificaciones que se muestran en las figuras se repitieron con los mismos resultados.

Amplificación del ADN. Esta se realizó en 12,5 µl o 25 µl de volumen final, conteniendo 10 mM de Tris-ClH, 50 mM de ClK, 1.5 mM de Cl₂Mg a pH 8.3 y a 20 °C. Los dNTPs se utilizaron a una concentración de 200 µM (Boheringer). Los *primers* analizados fueron los de Operon (A, N y P (tabla 1) 0.2 µM. La concentración del ADN cromosómico fue de 0.5 ng a 1 ng por µl de reacción, según la muestra. Taq Polimerasa (Boheringer) 0.04 us/µl de reacción. La mezcla de reacción se transfirió al termociclador “personal cycler” (Biometra). Las condiciones de reacción (NELSON & *al.*, 1993) se realizaron a: 95 °C (5 s); 92 °C (55 s); 34 °C (1 min); y 72 °C (2 min) durante 45 ciclos. Se realizó una previa desnaturalización del ADN a 95 °C (5 s) y 92 °C (1 min 55 s) y una extensión final de 72 °C (7 min).

Electroforesis en Gel de Agarosa. El producto de amplificación se analizó en geles de agarosa (1.2%) en *buffer* TAE y corrido en el mismo *buffer* 1 h a 80 V. El gel

Tabla 1. Primers utilizados en la reacción PCR; (+) amplificación y (-) no amplificado. Los primers pertenecen a la casa comercial Operon y el código es el utilizado por la misma casa.

KIT A			KIT N		
CÓDIGO	5' - 3'	AMPLIFICACIÓN	CÓDIGO	5' - 3'	AMPLIFICACIÓN
01	CAGGCCCTTC	+	01	CTCACGTTGG	+
02	TGCCGAGCTG	+	02	ACCAGGGGCA	+
03	AGTCAGCCAC	+	03	GGTACTCCCC	+
04	AATCGGGCTG	-	04	GACCGACCCA	+
05	AGGGGTCTTG	+	05	ACTGAACGCC	-
10	GTGATCGCAG	+	06	GAGACGCACA	+
			07	CAGCCCAGAG	+
			08	ACCTCAGCTC	-
			09	TGCCGGCTTG	-
			10	ACAACCTGGGG	-
			11	TCGCCGCAAA	-
			12	CACAGACACC	-
			13	AGCGTCACTC	-
			14	TCGTGCGGGT	-
			15	CAGCGACTGT	-
			16	AAGCGACCTG	+
KIT P					
CÓDIGO	5'-3'	AMPLIFICACIÓN			
01	GTAGCACTCC	+			
02	TCGGCACGCA	+			
03	CTGATACGCC	+			
04	GTGTCTCAGG	+			

se introdujo en bromuro de etidio (1µg/ml) y fue fotografiado bajo luz UV.

3. RESULTADOS

En el análisis molecular del ADN, el protocolo de extracción de ADN de Dellaporta (DELLAPORTA;1983.) con las modificaciones introducidas resultó el más conveniente, buscando para cada muestra la dilución adecuada que amplificara en la reacción PCR, así como la repetitividad del proceso.

Los primers utilizados para el análisis con RAPDs, fueron los que se indican en la tabla 1. Con 16 de ellos se obtuvo una buena amplificación. El primer OPA01 (de los 16

que amplifican) fue seleccionado para realizar RAPDs en las distintas muestras, ya que en los clones "in vitro" mostraban polimorfismo en las bandas de ADN de los Pools de los clones pertenecientes a los diferentes rodales citados según la procedencia de los mismos (Figura 1).

La figura 2A muestra el análisis de la reacción PCR con el mismo primer y en este caso son clones de los árboles adultos de cada uno los tres rodales, en los que se incluyen los originarios de los clones *in vitro*. Los árboles adultos muestran el mismo patrón de bandas que los clones *in vitro* correspondientes (figura 1). En la figura 2B se observa que las plántulas procedentes de cultivo *in vitro* y aclimatados en vivero tienen el mismo patrón molecular que los correspondientes *in*

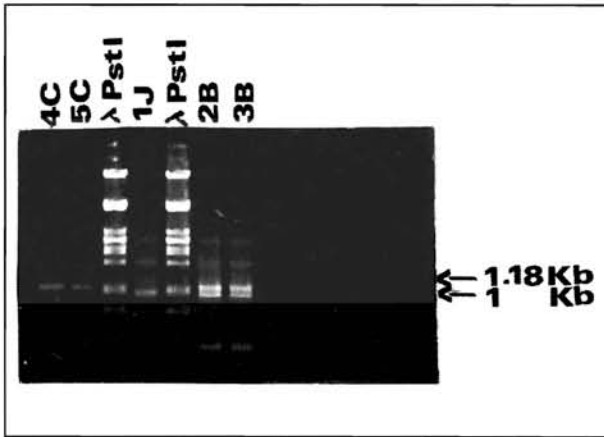
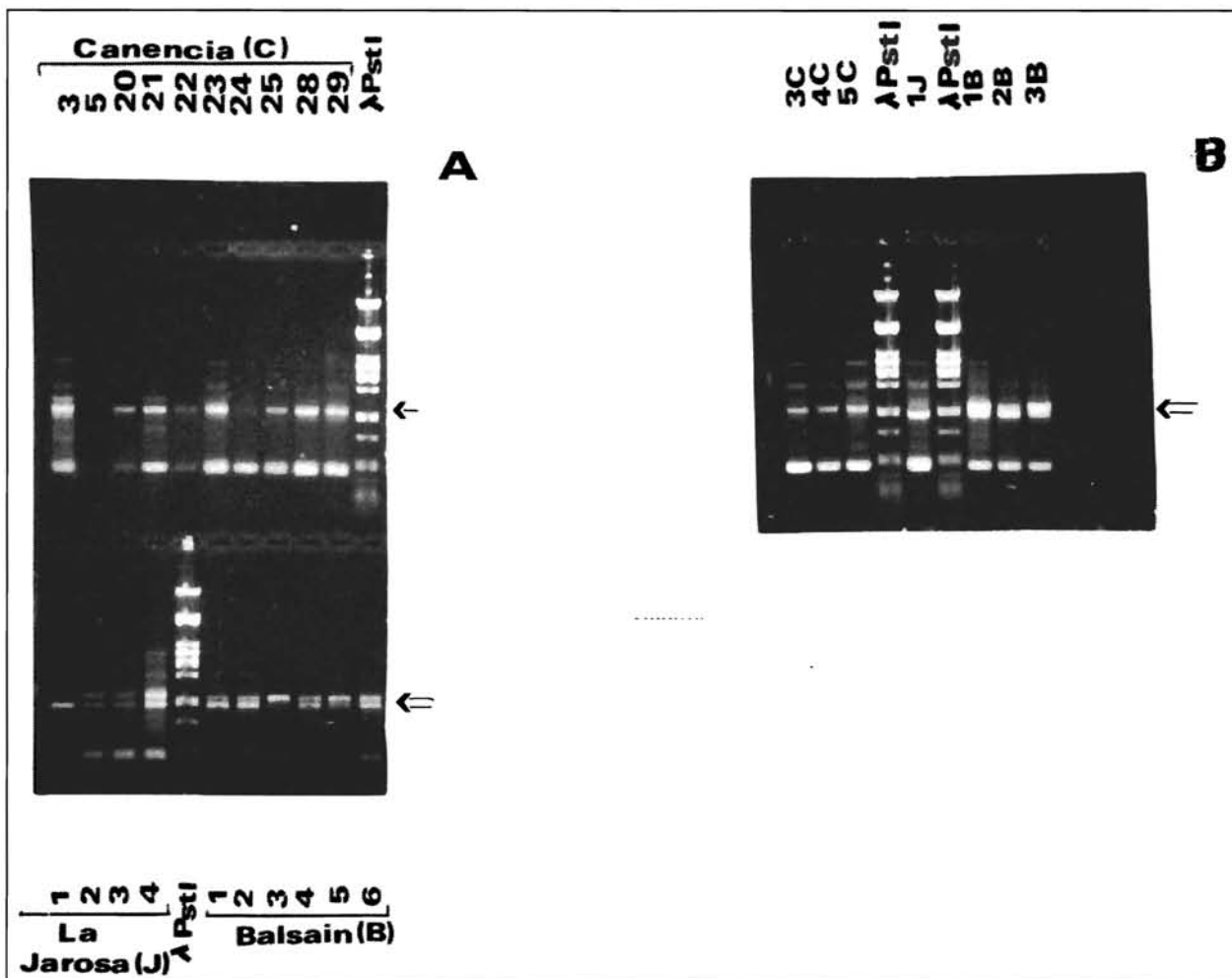


Figura 1. Amplificación mediante RAPDs con el primer OPA1 del DNA de los clones de *P. tremula* "in vitro" de: Balsain (B), La Jarosa (J), y Canencia (C). Control de peso Molecular DNA del Fago λ PstI. Las flechas (\leftarrow) indican las bandas de DNA diferentes entre los clones "in vitro".

in vitro (Figura 1). Por tanto se ha determinado una estabilidad en el genoma entre los árboles que originaron los clones *in vitro* y las plántulas que proceden de estos clones *in vitro*.

En cada una de las Figuras 1, 1A y 2B se observa diferencia entre los 3 rodales: banda de 1.8 kb para los clones de Canencia, banda

Figura 2. Amplificación mediante RAPDs con el primer OPA1 del DNA de: Figura A, los árboles originales de los clones de *P. tremula* "in vitro" y de otros árboles de esos mismos rodales. Rodales: Balsain (B), La Jarosa (J), y Canencia (C). Los clones 21 y 24 de Canencia son los originales de los clones 4C y de 5C "in vitro" respectivamente (fig. 1), en el caso de la Jarosa y Valsain el número se corresponde con el mismo de los clones "in vitro" (fig. 1). Figura B, plántulas y árboles procedentes de clones "in vitro", aclimatados en invernadero, y posteriormente transplantados a vivero. Figura A y B, Control de Peso Molecular, DNA del fago λ PstI.



de 1kb ó banda de 1 y 1.9 kb los de La Jarosa, y el doblete de bandas para los de Balsaín de 1 y 1.8 kb. En cualquier caso, con este *primer* se diferencian e identifican a cada uno de los clones segun el rodal de procedencia. Los patrones de bandas son diferentes entre los miembros de distintos rodales y similares entre los miembros de un mismo rodal. Por tanto, es posible identificar cada uno de los clones según la procedencia geográfica del rodal una vez propagados. Ello será muy útil para la identificación del material utilizado en la reforestación.

4. CONCLUSIONES

El marcador molecular OPA01 nos permite confirmar que los clones analizados “in vitro” son los mismos que los clones aclimatados en vivero. A su vez este marcador identifica y diferencia cada uno de los clones denominados según la zona geográfica de procedencia del rodal a que pertenecen: Balsaín, La Jarosa y Canencia. Por tanto será útil para identificar estos clones en todas las fases de la reforestación.

BIBLIOGRAFÍA

BUENO, M.A., ASTORGA, R., MANZANERA, J.A. & DE LOS RÍOS, M.D.; 1992. Propagación clonal de árboles adultos *Populus tremula* de la Sierra de Madrid por cultivo de tejidos. *19 Sesión de la Comisión Internacional del*

Alamo (Zaragoza) 1:523-531.

BUENO, M.A., GRAU, J.M. & DE LOS RÍOS, M.D.; 1993. Micropropagación de árboles adultos de *Populus tremula* e identificación de clones en rodales mediante electroforésis. *Congreso Forestal Español*, Tomo II, 177-182.

DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. & HICKS, J.B.; 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant. Mol. Biol. Reporter*, 1:19-21.

ERLICH, H.A., GELFAND, D. & SNINSKY, J.J.; 1991. Recent advances in the polimerase chain reaction. *Science*, 252:1643-1650.

NELSON, C.D., NANCE, W.L. & DOUDRICK; 1993. A partial genetic Linkage map of slash pine (*Pinus alliotii* Engelm. var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs. *Theor. Appl. Genet.*, 87:145-151.

RANI, V., PARIDA, A. & RAINA, S.N.; 1995. Random amplified polymorphic markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Report*. 14: 459-462.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M.; 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic. Acids. Res.*, 18:7213-7218.

WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J. RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V.; 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acids. Res.*, 18:6531-6535.