

CARACTERIZACIÓN DE LOS CHOPOS COMERCIALES EN ESPAÑA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE REGIONES DE ADN MICROSATÉLITE E ITS

Elena Hidalgo Rodríguez¹ y Glòria Villalba Mata².

¹Area de Genética. Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura . E.T.S.Ingenierías Agrarias de Palencia. Av. Madrid, 57. 34071-Palencia.

²Departament de Química. E.T.S. Enginyeria Agrària. Rovira Roure, 177. 25191-Lleida.

RESUMEN

El material vegetal del género *Populus* comercializado por los viveros en España es certificado por los organismos oficiales dependientes del Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. Actualmente, la certificación se realiza en base a las características morfológicas de los distintos clones comerciales, según las descripciones disponibles. Sin embargo, dichas descripciones se han realizado mayoritariamente sobre ejemplares adultos, sobre caracteres influenciados por el ambiente y en su interpretación siempre interviene un cierto grado de subjetivismo.

Por consiguiente, parece interesante caracterizar los chopos comerciales en función de sus características moleculares, más objetivas, no influenciadas por el ambiente y presentes por igual en todos los órganos y en todos los estados de desarrollo, incluido el estado juvenil (1 o 2 años) que es el que comercializan habitualmente los viveros.

En este trabajo, hemos realizado la caracterización de los catorce clones comerciales de chopo en España utilizando como marcadores moleculares la región ITS del ADN ribosómico y dos de las primeras regiones SSR microsatélites identificadas en chopos (Dayanandan y Rajora, 1998).

PALABRAS CLAVE: chopo, *Populus*, microsatélites, marcadores moleculares, ITS, ADN ribosómico.

SUMMARY

The aspen trees belonging to the genus *Populus* sold in Spanish warren are certified by official organisms depending from the Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero.

This certification is nowadays made for all the clones on the basis of the available descriptions of their morphological characteristics. However, those descriptions are quite subjective, influenced by the environment and have been made mainly on adult individuals. In this context, it seems interesting to characterize commercial clones on the basis of molecular traits, which are more objective, identical in all organs, and ages (included the young sprouts that are usually available in commerce), and not influenced by environmental conditions.

In this case, we have characterized the fourteen aspen commercial clones in Spain using the ITS region of the ribosomal DNA and two of the first SSR microsatellites described specifically for aspen (Dayanandan y Rajora, 1998) as molecular markers.

KEY WORDS: aspen, *Populus*, microsatellites, molecular markers, ITS, ribosomal DNA

INTRODUCCIÓN

La legislación española limita desde 1992 (BOE nº179, de 27 de julio) los clones que se pueden comercializar en nuestro país, recogiendo catorce clones en el Catálogo Nacional de Materiales de Base, que se clasifican en cinco grupos, según su origen:

1. Los **euramericanos**, procedentes de la hibridación entre individuos masculinos de la especie europea *P. nigra* L. e individuos femeninos de la especie americana *P. deltoides* Marsh., ambas pertenecientes a la sección *Aigeiros*.

Es el grupo de clones más numeroso del Catálogo (8 clones) y comprende los siguientes: Agathe, Campeador, Canadá Blanco, Flevo, I-MC, I-214, I-488, Luisa Avanzo y Triplo.

2. Los **interamericanos**, procedentes de la hibridación entre dos especies americanas, *P. trichocarpa* Torr y *P. deltoides* Marsh, pertenecientes a las secciones Tacamahaca y *Aigeiros*, respectivamente.

En este grupo se cuentan dos clones de origen belga: Raspalje y Beaupré.

3. Un clon híbrido de *P. deltoides* x *P. alba* L. , conocido como 114/69
4. Un clon de la especie *P. deltoides* Marsh, denominado Lux.
5. Un clon perteneciente a la especie *P. nigra*, denominado Tr 56/75

En España, el material forestal de repoblación, básicamente estaquillas obtenidas por multiplicación vegetativa, debe estar certificado, para asegurar su identidad clonal, su estado sanitario y su calidad. Dicha certificación debe respetar todas las normas internacionales y nacionales que se han ido recogiendo sucesivamente en el BOE: BOE nº285, de 29 de septiembre de 1994 (normas O.C.D.E.); BOE nº33, de 8 de febrero de 1989 (normas C.E.); BOE nº153, de 27 de junio de 1998 (normativa española).

Existen diversas descripciones morfológicas y evaluaciones tecnológicas del género *Populus* (Llensa de Gelcen, D.S., 1955; Hattemer, V.H., 1969; Roller, K.J., 1972), y de los clones aceptados en España (Padró, A., 1992; Grau, J.M., 1992). Todos estos estudios se han llevado a cabo sobre árboles adultos, no habiéndose realizado ninguna descripción de árboles en estado juvenil, que es el habitual en los viveros, aparte de un trabajo práctico tutorado realizado por Beatriz Miravete (2000). Esta carencia puede complicar la adscripción de árboles a los distintos clones, lo que es de particular importancia cuando el material vegetal presenta, en campo, características atípicas respecto a las descritas.

En este trabajo, hemos abordado la caracterización de los catorce clones comerciales en España mediante técnicas moleculares, para lo que hemos elegido, como marcadores, los SSR microsátélites. Los microsátélites son secuencias de nucleótidos muy cortas y muy repetidas, flanqueadas por secuencias de ADN conservadas. La amplificación dirigida de estas regiones por PCR genera una serie de bandas cuyo tamaño depende del número de repeticiones de la secuencia básica. Esta técnica, que es sencilla de realizar y de interpretar, se caracteriza por presentar un nivel de polimorfismo elevado, herencia mendeliana codominante, muy alta reproducibilidad y facilidad de transmisión entre laboratorios. Además, se puede automatizar, lo que facilitaría su implantación en los Servicios de Certificación de material vegetal de las distintas Administraciones. Como contrapartida, requiere un conocimiento previo del genoma, no disponible hasta 1998, y tiene unos costes asociados moderadamente

altos: superiores a los de los RAPDs, aunque más resolutivos y estables que ellos; y menores que los de los AFLPs, de mayor resolución, pero de mayor complejidad técnica y de interpretación.

La primera referencia de microsatélites, descritos específicamente para el género *Populus*, fue publicada en 1998 por Dayanandan y Rajora. En ella se definen cuatro regiones microsatélites, denominados respectivamente PTR1, PTR2, PTR3 y PTR4, que los autores ensayan sobre ejemplares de distintas especies, Tabla 1.

Tabla 1: Amplificación por PCR de los loci SSR en diferentes especies de *Populus* utilizando los iniciadores desarrollados para *P. tremuloides*. El signo (+) indica amplificación exitosa y el signo(-), ausencia de amplificación.

ESPECIES	PTR1	PT2	PTR3	PTR4
<i>P. deltoides</i>	-	+	-	-
<i>P. nigra</i>	-	+	-	+
<i>P. maximowiczzi</i>	-	+	-	+
<i>P. x canadensis</i>	-	+	-	+

En este trabajo hemos aplicado los microsatélites PTR2 y PTR4 a los catorce clones comerciales en España, procedentes de distintas localidades, así como a material del clon Canadá Blanco procedente de cuatro localidades más, entre las que se encuentran diversos ejemplares de dudosa adscripción. Así mismo hemos aplicado el análisis por PCR-RFLP a la región ITS del ADN ribosómico, con el fin de evaluar su potencial discriminatorio entre clones.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado se recoge en la Tabla 2, junto con los códigos utilizados.

Tabla 2: Material vegetal. Clones admitidos como materiales de base del género *Populus* para la producción de materiales forestales de reproducción controlados.

Especie	Clon comercial	Código
<i>Populus x euramericana</i> (Dode) Guinier: (<i>P. nigra</i> x <i>P. deltoides</i>)	Agathe F.	A
	Campeador	C
	Canadá Blanco	CB
	Flevo	F
	I-MC	MC
	I-214	214
	I-488	488
	Luisa Avanzo	LA
	Triplo	Tri
<i>Populus deltoides</i>	Lux	Lux
<i>P. deltoides</i> x <i>P. alba</i>	114/69	114
<i>Populus nigra</i>	Tr 56-75	Tr
<i>Populus x interamericana</i> : (<i>P. trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>)	Beaupré	B
	Raspalje	R

En todos los casos, se recogieron hojas jóvenes totalmente expandidas y aparentemente sanas, que no presentaban ningún tipo de mordedura o lesión, en tres localidades: Gimenells (Lleida, plantación realizada por técnicos del DARP); Mas Badía (Girona, estación experimental del IRTA-DARP) y Zaragoza (vivero de planta madre del Servicio de Investigaciones Agrarias de la Diputación General de Aragón). Las hojas se conservaron a 4°C entre su recolección en el campo y su congelación definitiva a -80°C.

La extracción del ADN total fue realizada a partir de un centímetro cuadrado de hoja congelada en nitrógeno líquido, mediante el protocolo de Doyle & Doyle, (1990), diseñado para la extracción con CTAB de ADN de plantas leñosas y respetando las modificaciones introducidas por Torres et al. (1993), para manejar pequeños volúmenes. Cada extracción de ADN fue cuantificada, su pureza fue estimada y el material, conservado a -20°C hasta su utilización.

La amplificación por PCR, tanto de los microsatélites como de la región ITS, se realizó siguiendo las indicaciones de la literatura, aunque en el caso de PTR2 y PTR4 hubo que realizar una puesta a punto previa para optimizar la amplificación, especialmente referida a las concentraciones de los reactivos y a los parámetros de la amplificación.

Para el RFLP de la región ITS, se purificó el ADN amplificado con el kit "High pure PCR product purification" de Gibco BRL y se procedió a su digestión, siguiendo las recomendaciones del fabricante (MBI Fermentas o Pharmacia) con cinco enzimas de restricción de dianas de cuatro o cinco pares de nucleótidos (*HaeIII*, *HinfI*, *AluI*, *TaqI*, *RsaI* y *HpaII*).

Los productos de las amplificaciones y de las digestiones fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (1-3.5%), agarosa MetaPhor (2%) o poliacrilamida (5-8%). Los patrones de peso molecular utilizados fueron λ /HindIII, la escala de 1Kb o θ X-174RF, todas de Pharmacia.

Todos los reactivos utilizados eran de casas comerciales reconocidas y de grado analítico o para Biología Molecular.

Todos los materiales recolectados fueron sometidos a un mínimo de tres extracciones y tres amplificaciones independientes, con el fin de evaluar la consistencia de los datos obtenidos entre clones y dentro de clones. Por otro lado, todas las amplificaciones y las digestiones fueron también sometidas a un mínimo de tres electroforesis independientes, utilizando diferentes soportes y con distintos patrones de peso molecular, con el fin de estimar de la forma más fiable posible el tamaño de los distintos fragmentos.

RESULTADOS

El ADN obtenido a partir de las hojas de chopo fue abundante y de buena calidad para su posterior amplificación.

La amplificación del ADN realizada con los iniciadores PTR2 y PTR4, según las indicaciones de la bibliografía, rindió, en nuestras condiciones cantidades de ADN insuficientes o múltiples bandas, por lo que fue necesaria una puesta a punto de las condiciones de la reacción, que afectó especialmente a las concentraciones finales de los reactivos de la amplificación. La composición de las mezclas de reacción y las condiciones de amplificación para ambas parejas de iniciadores se recogen en las Tablas 3 y 4.

TABLA 3: Composición de las mezclas de reacción para la amplificación por PCR de los microsatélites PR2 y PTR4.

REACTIVO	[] FINAL PTR2	[] FINAL PTR4
H ₂ O milliQ	Variable	Variable
AND	1 ul	1 ul
Tampón de amplificación (LAB) 10x	LAB 1x	LAB 1x
PTR2 U	0.4 uM	-
PTR2 L	0.4 uM	-
PTR4 U	-	0.2uM
PTR4 L	-	0.2uM
dNTPs	0.2 mM	0.2mM
Taq-polimerasa	2.5 u	2.5 u
MgCl ₂	1 mM	1mM

TABLA 4: Parámetros del programa de amplificación para PTR2 y PTR4.

PARÁMETRO	PTR2		PTR4	
Desnaturalización inicial	1 min	94 °C	1 min	94 °C
Desnaturalización cíclica	30 s	94 °C	30 s	94 °C
Hibridación cíclica	30 s	60 °C	30 s	57 °C
Extensión cíclica	30 s	72 °C	30 s	72 °C
Extensión final	5 min	72 °C	5 min	72 °C
Hold	4 °C		4°C	
Nº ciclos	35 x		35 x	
Volumen de reacción	25		25	
Vol. de muestra/reacción	1		1	
Volumen mix/reacción	24		24	

Los iniciadores **PTR2** amplificaron de forma eficaz y consistente los catorce clones de chopo comerciales en España, incluyendo algunos (Beaupré, Raspalje y 114/69) cuyos parentales (*P. alba* y *P. trichocarpa*) no habían sido probados por los autores que los describieron. Los tamaños de los amplímeros obtenidos se recogen en la

Tabla 5. En todos los casos, los amplímeros obtenidos con los iniciadores PTR2 presentaban el mismo número de bandas y los mismos tamaños de las mismas dentro de cada clon, tanto en las amplificaciones independientes realizadas dentro de la misma procedencia, como en las amplificaciones de las distintas procedencias.

El patrón de bandas obtenido con los iniciadores PTR2 es polimórfico, y llega a resultar específico para los clones Agathe (una banda de 212 pb), Lux (dos bandas, de 211 y 237 pb) y Tr 56/75 (tres bandas de 206, 210 y 233 pb). El resto de los clones ensayados se agruparon bajo tres patrones: los clones I-MC, I-488 y Triplo (tres bandas de 210, 220 y 223 pb), los clones Beaupré, Raspalje, Luisa Avanzo y 114/69 (una banda de 210-211 pb) y los clones Campeador, Flevo, I-214 y Canadá Blanco (dos bandas de 209 y 235 pb).

Tabla 5: Tamaños estimados de los amplímeros obtenidos por amplificación de los catorce clones de chopo comerciales en España con los iniciadores PTR2.

CLON	TAMAÑO MICROSATÉLITE
Agathe	212
Campeador	209/235
Canadá Blanco	209/235
Flevo	209/235
I-214	209/235
I-MC	210/220/223
I-488	210/220/223
Triplo	210/220/223
Luisa Avanzo	210
Lux	211/237
Beaupré	210
Raspalje	210
Tr 56/75	206/210/223
114/69	211

Para la correcta interpretación de estos datos, hay que tener en cuenta que el tamaño de las bandas se dedujo a partir de estimaciones en geles no desnaturizantes, por lo que algunas de las bandas observadas podrían diferir ligeramente de las consignadas en la Tabla 5. De igual modo, podría ocurrir que alguna de las tres bandas que aparecen en clones no triploides, correspondieran, en realidad, con distintas configuraciones del mismo alelo. Por último, en los casos en que sólo se detecta una banda, podemos presumir que alguno de los parentales no es amplificado por la pareja de iniciadores (alelo “nulo”) o que ambos parentales presentan el mismo alelo. Para poder adscribir cada una de las bandas detectadas a uno de estos fenómenos habría que repetir las electroforesis en geles desnaturizantes (con urea).

Los ensayos realizados con los iniciadores **PTR4** no amplificaron, en ningún caso y bajo ninguna de las múltiples condiciones ensayadas, los clones Lux ni 114/69, confirmando que las especies *P. alba* y *P. deltoides* no son amplificables por PTR4:

ya los autores de dicho microsatélite habían intentado sin éxito amplificar algunos ejemplares de estas especies. En los casos en los que aparece *P. nigra* como parental (todos los euramericanos y Tr 56/75) sí se produjo amplificación, así como en los clones interamericanos, híbridos de *P. deltoides*, y *P. trichocarpa*. La amplificación en este último caso (clones Raspalje y Beaupré) parece ser debida al parental de la especie *P. trichocarpa*, que no había sido probada por los autores del microsatélite, puesto que tanto en nuestros ensayos como en los de los autores, *P. deltoides* no parece amplificable por PTR4.

En cuanto a la **región ITS** del ADN ribosómico, todos los clones fueron amplificados de forma estable y abundante con los iniciadores ITS1 e ITS4, pero tanto la banda de amplificación, como los fragmentos de restricción obtenidos por RFLP-PCR con una batería de enzimas de restricción de alta frecuencia de corte, fueron monomórficos, rindiendo en todos los casos bandas del mismo tamaño (en la Tabla 6 se recogen estos datos). Se deduce, por consiguiente, que la región ITS es muy homogénea en las distintas especies de chopo, por lo que dicha región carece de valor como marcador de identificación de clones.

Tabla 6: Tamaño de las bandas generadas por la digestión de la región ITS con distintos enzimas de restricción.

MATERIAL	TAMAÑO DE BANDA	PRODUCTOS DE LAS DIGESTIONES					
		Hae III	Hinf I	Alu I	Taq I	Rsa I	Hpa II
14 clones	647	213	280	No corta	280	515 119	290
		145	160		100		250
		145	120		100		80
		124	80		80		
			50		60		

A la vista de los resultados expuestos en este trabajo se deducen las siguientes

CONCLUSIONES

El microsatélite PTR2 descrito por Dayanandan y Rajora en 1998 dirige la amplificación de todos los clones de chopo comerciales en España, incluidos aquellos cuyos parentales (*P. alba* y *P. trichocarpa*) no habían sido probados previamente.

Las condiciones de amplificación para PTR2 se modifican respecto al protocolo original, especialmente en lo que respecta a la temperatura de hibridación, que pasa de 63 a 60°C.

Los patrones obtenidos con PTR2 son estables y consistentes para los distintos clones y las distintas procedencias analizadas y resultaron polimórficos. Sin embargo, el grado de polimorfismo detectado (6 patrones distintos en los 14 clones) no permite identificar de forma biunívoca todos los clones. Para calcular de forma más fiable los tamaños de las bandas y la identidad alélica de los patrones, habría que llevar a cabo

la separación de las bandas de amplificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

El microsatélite PTR4, descrito por los mismos autores, dirige la amplificación de todos los clones entre cuyos parentales se encuentran *P. nigra* o *P. trichocarpa*, (este último no había sido ensayado por los autores), aunque no amplifica aquellos en los que intervienen *P. deltoides* y *P. alba* (este último no probado previamente). Sin embargo, en este caso, no hemos encontrado unas condiciones de amplificación consistente y estables, por lo que no recomendamos la utilización de este microsatélite con fines de identificación clonal.

La región ITS del ADNr fue amplificada de forma estable y consistente por los iniciadores universales ITS1 e ITS4 en los catorce clones. Sin embargo, este marcador no resulta polimórfico, generando una única banda de amplificación y un patrón único de PCR-RFLP para cada uno de los enzimas ensayados.

CONCLUSIÓN FINAL: El análisis del tamaño de los amplímeros de regiones microsatélite de chopo se presenta como una herramienta sencilla, eficaz y económicamente abordable para la identificación de material vegetal de vivero en el género *Populus*. Sin embargo, dada la escasez de microsatélites descritos en este género, aún no se ha podido establecer una relación biunívoca entre patrones y clones.

BIBLIOGRAFÍA

BOE nº33 de 08/02/89. O.M. 3079/89 y O.M. 3080/89 de 21 de enero

BOE nº 179 de 27/07/92. O.M. 17778/92 de 24 de junio

BOE nº 76 de 30/03/93 O.M. 378/93 de 12 de marzo

BOE nº 153, de 27 de junio de 1998

DAYANANDAN, S., RAJORA, O.P., AND BAWA, K.S. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). Theor. Appl. Genet. (1998) 96: 950-956

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

MIRAVETE, B. Caracterización morfológica de 13 clones de chopo (*Populus* sp.) pertenecientes al Catálogo Nacional de Materiales de base, ubicados en Gimenezells (Lleida). Trabajo práctico tutorado. Universitat de Lleida. 2000

PADRÓ, A. Clones de chopo para el valle medio del Duero. Diputación General de Aragón. Departamento de Agricultura Ganadería y Montes. 1992.

TORRES, A.M., WEEDEN, N.F., MARTIN, A. Linkage among isozyme, RFLPs and RAPDs markers in *Vicia faba*. Theor. Appl. Genet. (1993) 93: 613-617.