

USO DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DEL MEGAGAMETOFITO COMO MARCADOR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN *ABIES PINSAPO*

María Ángela Martín Cuevas, Luis Miguel Martín Martín y Juan Bautista Álvarez Cabello

Departamento de Genética, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes. Edificio Gregor Mendel, Campus de Rabanales. Universidad de Córdoba. E-14071-CÓRDOBA (España). Correo electrónico: jb.alvarez@uco.es

Resumen

El pinsapo (*Abies pinsapo* Boiss.) se localiza exclusivamente en el sur de España, en las comarcas de Cádiz y Málaga, donde ocupa unas 5.000 ha. Diversos factores como la presencia de plagas y el decaimiento de las masas, de origen aún no determinado, hacen temer por el futuro de la especie. A todo ello hay que sumar la circunstancia de que es posible que se esté produciendo un estrechamiento de la base genética de la especie, debido a problemas de consanguinidad y deriva genética. Por esta razón, el desarrollo de una estrategia de conservación de la especie exige la evaluación de su diversidad genética. En este estudio, se han analizado la posibilidad de utilizar las proteínas del megagametofito de pinsapo como marcador de la diversidad genética de las masas de esta especie. La fracción albúminas ha mostrado la existencia de polimorfismo. Un análisis preliminar efectuado en 27 árboles, permitió identificar más de 41 bandas de las que, al menos 12 son polimórficas entre árboles y 8 dentro de árboles. Este resultado permite ser optimista sobre la posibilidad de emplear este marcador con la finalidad señalada.

Palabras clave: *Conservación, Variabilidad, Albúminas, Megagametofito*

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de reserva forman parte de las semillas de todas las especies vegetales y se acumulan en las últimas fases de maduración de las mismas. El papel biológico de estas proteínas es ser fuente de aminoácidos para los procesos de síntesis que tienen lugar durante la germinación. Esto ha propiciado que estos genes estén repetidos y sean neutros frente a la evolución, lo que conlleva la posibilidad de un amplio nivel de variación y que puedan considerarse representativos de la variabilidad genética en su conjunto.

Una de sus principales características es que son marcadores codominantes y presentan un alto

nivel de polimorfismo, suponiendo una gran ventaja frente a otros marcadores debido a su fácil análisis y su relativo bajo coste; además, hay que añadir su estabilidad frente los factores ambientales. Por todo ello, se consideran un marcador muy valioso para el estudio de la diversidad genética, ya que además existe un número considerable de genes implicados en dichas funciones (GEPTS, 1990).

Existe una cierta experiencia en la utilización de este marcador en especies forestales, tanto en frondosas (ÁLVAREZ *et al.*, 2003; MARTÍN *et al.*, 2005) como en coníferas (ÁLVAREZ *et al.*, 2004), que ha demostrado ser un buen marcador de la diversidad genética. Además, en el caso de las coníferas, el uso de estas proteínas

para estudios de variabilidad viene facilitado por la naturaleza haploide del megagametofito.

El pinsapo (*Abies pinsapo* Boiss.) es una especie endémica del Sur de la Península Ibérica, cuya área de distribución está muy restringida. En la actualidad sólo forma bosques importantes en el Parque Natural de la Sierra de las Nieves y en la Reserva Natural de los Reales de Sierra Bermeja en la provincia de Málaga y en el Parque Natural de Grazalema en la de Cádiz. De hecho, con el fin de asegurar su conservación y protección, estos enclaves han sido declarados “Reservas de la Biosfera” por la UNESCO.

Existen diversos problemas que hacen temer por el futuro de la especie como el cambio climático, la presencia de plagas, la baja producción de polen y el decaimiento de las masas, de origen aún no determinado (PASCUAL et al., 1993; ARISTA et al., 1997). A todo ello hay que sumar la circunstancia de que es posible que se esté produciendo un estrechamiento de la base genética en algunas poblaciones de la especie, debido a problemas de consanguinidad y deriva genética.

El desarrollo de un programa de conservación hace necesaria la evaluación de la diversidad genética de la especie. En este estudio, se ha

analizado la posibilidad de utilizar las proteínas del megagametofito de pinsapo con la finalidad de determinar el nivel de diversidad genética aún conservada en las masas actuales de pinsapo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se seleccionaron 27 árboles distribuidos a lo largo de los tres enclaves citados. Estos árboles fueron georreferenciados mediante sus coordenadas geográficas obtenidas con GPS y apoyado por un esquema de campo que permitió situarlos con total precisión. Dada la disposición apical de los conos, estos fueron recolectados con una pértiga en los árboles de menor altura; mientras que, en los de mayor altura, fueron operarios de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía los encargados de su recolección (Figura 1). Se tomaron entre 2 y 3 conos por árbol ante la previsible baja fertilidad de la especie; de hecho, el número de piñones útiles obtenidos no superó el 10% de los recolectados en la mayoría de los árboles.

Se analizaron 10 megagametofitos maduros por cada árbol (Tabla 1). En una primera fase,



Figura 1. Muestra del sistema de recolección según la altura de los árboles

Localización	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (msnm)	Nº árboles
P.N. Sierra de las Nieves	36° 39' – 36° 43'	4° 58' - 5° 02'	1110-1570	14
R.N. Reales de Sierra Bermeja	36° 29'	5° 12'	1120-1440	8
P.N. Grazalema	36° 46'	5° 25'	1000-1050	5

Tabla 1. Localización y número de árboles seleccionados para el estudio

las cubiertas y el eje embrionario de cada piñón fueron retirados antes de proceder a la extracción de las proteínas. Las muestras fueron molidas y transferidas a un vial de microfuga de 1.5 ml.

La extracción de proteínas se realizó según el método de extracción secuencial descrito por FONSECA *et al.* (1997) y ensayado con éxito en alcornoque. La separación de las proteínas se realizó mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según el método de tampón discontinuo de LAEMMLI (1970). Los geles fueron realizados en un sistema de electroforesis vertical en placa de 140x140x1,5 mm. La electroforesis fue llevada a cabo a intensidad constante (30 mA por gel) y 18°C de temperatura. Los geles fueron teñidos con una solución de ácido tricloroacético al 12%, etanol al 5% y azul brillante de Coomassie R-250 al 0,001%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las cuatro posibles fracciones a obtener según el proceso de extracción secuencial, esto es, albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, en este estudio se ensayaron las dos primeras. Los análisis mostraron que, si bien en otras especies de Gimnospermas se han usado las glo-

bulinas para este tipo de estudios (ÁLVAREZ *et al.*, 2004); en el caso del pinsapo, fueron las albúminas las que mostraron una mejor resolución. No obstante, dada la complejidad inicial del proteinograma, se procedió al ajuste del protocolo inicial de FONSECA *et al.* (1996) a las características concretas del megagametofito de pinsapo. El ajuste permitió una mayor limpieza del gel y una delimitación más clara de las bandas, lo que permitió incluso la separación de bandas muy próximas de forma conspicua. A esto hay que añadir que esta fracción mostró un alto nivel de variación, por lo que se escogió para efectuar el análisis de los 27 árboles seleccionados.

Se ensayaron distintas concentraciones de poliacrilamida (8%, 10% y 12%) para los geles de electroforesis con el fin de ajustarlos a una mayor resolución, siendo los geles con una concentración del 12% de poliacrilamida, los que mostraron los mejores resultados (Figura 2). Los geles fueron divididos en zonas usando para ello un marcador de peso molecular conocido; en el caso de los geles al 12%, las zonas obtenidas fueron cinco, clasificadas como A (por encima de 66 KDa), B (entre 66 y 45 KDa), C (entre 45 y 30 KDa), D (entre 30 y 20 KDa) y E (por debajo de 20 KDa). El mayor porcentaje de variación se detectó en las zonas B, C y D (Figura 2).

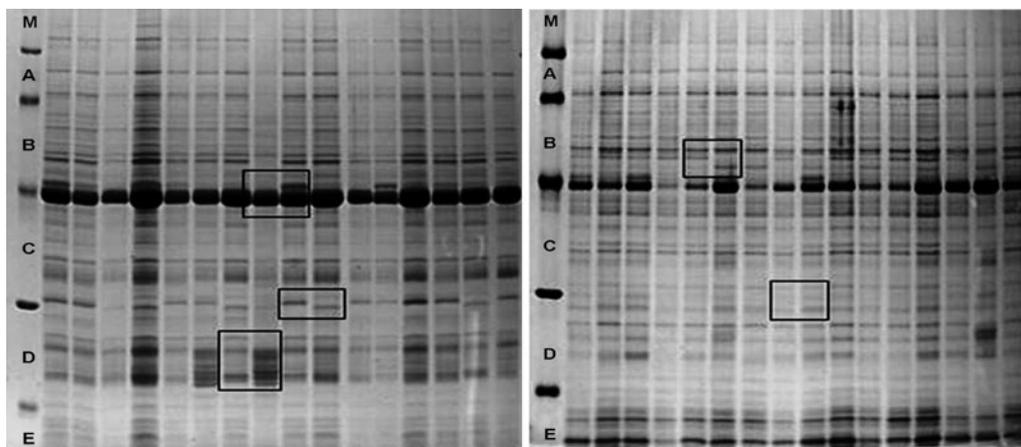


Figura 2. Muestra representativa de la variabilidad encontrada para la fracción albúminas en los árboles analizados. Los recuadros muestran ejemplos del polimorfismo encontrado. M = marcador de peso molecular; A-B, zonas marcadas en el gel en base al marcador empleado (ver texto)

En las descendencias de los árboles de cada enclave estudiados se han identificado, al menos, 41 bandas distintas; de las cuales, al menos, 12 fueron polimórficas entre árboles y 8 dentro de árboles. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos para dos de estos árboles, donde puede observarse la presencia de polimorfismo, marcados por recuadros en la figura.

Por otra parte, aunque el número de árboles empleado es pequeño para poder sacar conclusiones sobre la distribución de la diversidad entre los distintos enclaves, fue el pinsapar del P. N. de la Sierra de las Nieves el que mostró el mayor porcentaje de bandas polimórficas, mientras que la menor variación se detectó en el de la R. N. de los Reales de Sierra Bermeja.

En conclusión, este resultado permite ser optimista sobre la posibilidad de emplear este marcador con la finalidad antes señalada, dado el nivel de variación detectado para la fracción albúminas.

Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Dirección General de Gestión del Medio Natural (Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía) por la autorización para recolectar material en los pinsapares andaluces. También queremos agradecer a D. José López Quintanilla y a los técnicos de las Delegaciones de la Consejería de Medio Ambiente de Cádiz y Málaga por su inestimable ayuda durante la recolección.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ, J.B.; MUÑOZ, C.; MARTÍN-CUEVAS, A.; LÓPEZ, S. & MARTÍN, L.M.; 2003. Cotyledon storage proteins as markers of the genetic diversity in *Castanea sativa* Miller. *Theor. Appl. Genet.* 107: 730-735.
- ÁLVAREZ, J.B.; TOLEDO, M.J.; ABELLANAS, B. & MARTÍN, L.M.; 2004. Use of megagametophyte storage proteins as markers of the genetic diversity in stone pine (*Pinus pinea* L.) in Andalusia, Spain. *Genet. Resour. Crop Evol.* 51: 621-627.
- ARISTA, M.; HERRERA, F.J. Y TALAVERA, S.; 1997. *Biología del pinsapo*. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
- FONSECA, P.A.; FERREIRA, R.B. & TEIXEIRA, A.R.; 1997. Seed proteins from *Quercus suber*. *J. Agr. Food Chem.* 45: 3443-3447.
- GEPTS, P.; 1990. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir (eds.), *Plant population genetics, breeding and genetic resources*: 64-82. Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- LAEMMLI, U.K.; 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- MARTÍN, M.A.; MARTÍN, L.M. & ÁLVAREZ, J.B.; 2005. Cotyledon storage proteins in European sweet chestnut. *Acta Hort.* 693: 459-463.
- PASCUAL, L.; GARCÍA, F.J & PERFECTTI, F.; 1993. Inheritance of isozyme variation in seed tissues of *Abies pinsapo* Boiss. *Silvae Genet.* 42: 335-340.