



Innovación Vegetal Mediterránea S.L.

INFORME DE PROYECTO

Título : “Caracterización molecular del nogal de Nerpio”

Trabajo realizado para la **Asociación de Productores de Nueces de Nerpio**

INTRODUCCIÓN

Como se menciona en la propuesta del proyecto, el ADN es la molécula donde se encuentra la información de lo que somos los seres vivos estando presente tanto en el reino animal como en el vegetal. Las diferencias que existen entre especies y entre individuos dentro de una especie se explican por cambios producidos en el ADN. Hoy día es posible analizar esta molécula mediante marcadores moleculares de ADN permitiéndonos por ejemplo establecer grados de parentesco o lejanía entre individuos de una misma especie, lo que nos permite también caracterizar individuos o poblaciones dentro de una especie.

Por lo tanto el objetivo de este trabajo ha sido:

- Caracterizar mediante marcadores moleculares de ADN una población local de nogal conocida como “Nuez de Nerpio”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se han empleado muestras de hojas jóvenes de 18 árboles de la población local seleccionados e identificados por la Asociación de Productores de Nueces de Nerpio. Como referencias se han usado 2 muestras de dos variedades foráneas (‘Franquette’ y ‘Chandler’) (Tabla 1).

Extracción de ADN

Con el objeto de extraer un ADN lo más limpio posible, para la extracción de ADN se ha empleado el kit DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen ya que se observó que mediante los procedimientos más corrientes de extracción no era posible extraer un ADN suficientemente limpio, debido posiblemente a la presencia de fenoles que acaban ensuciando y degradando la molécula del ADN.

Marcadores Moleculares

Se buscó en la bibliografía estudios publicados en nogal y se seleccionaron 11 marcadores microsatélites (SSRs) como los más indicados para la caracterización por presentar un alto polimorfismo en estos estudios. Cada uno de estos marcadores consta de dos cebadores que son una secuencia lineal de unas 20 bases (A, T, C y G) sintetizadas en el laboratorio. Hoy día hay laboratorios o empresas especializadas en sintetizar estos pequeños trozos de ADN. Estos cebadores se emplean para iniciar nueva síntesis de ADN empleando el ADN extraído como molde y amplificar regiones concretas del ADN cuyas variaciones de un individuo a otro es lo que se estudia. Esto se lleva a cabo mediante la técnica que se conoce como PCR (Polymerase Chain Reaction).

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de los 11 marcadores para cada muestra o árbol se realizó un análisis estadístico multivariante o análisis de grupos cuyo resultado final se puede observar de manera gráfica en un dendrograma en el que se puede deducir el parentesco o lejanía entre dos o más individuos.

RESULTADOS

Cada marcador SSR se puede considerar como un gen que se puede presentar bajo distintas variantes o alelos. Por ejemplo el color de los ojos es un gen con diferentes variantes. En la Figura 1 se puede ver un ejemplo del resultado obtenido en algunas de las muestras analizadas con uno de los marcadores empleados en este estudio. Como se puede observar en el conjunto de las muestras se detectan 4 variantes, sin embargo en cada individuo solo puede haber una o dos variantes como máximo.

En el archivo de datos adjunto se puede ver los resultados obtenidos con los 11 marcadores en el conjunto de muestras analizadas. Este es un archivo de unos y ceros que nos indican la presencia (1) o ausencia (0) de las distintas variantes o alelos de cada marcador para cada una de las muestras analizadas. Existen dos marcadores, WGA202 y WGA276, con un alelo cada uno, 293 y 192 respectivamente, que están presentes con una alta frecuencia (17/18) en la variedad local y sin embargo están ausentes en las dos variedades de referencia ('Franquette' y 'Chandler'). Estos dos marcadores se podrían usar para caracterizar o identificar la variedad 'Nogal de Nerpio' respecto a 'Franquette' y 'Chandler'.

El número de alelos o variantes por marcador nos habla acerca de la diversidad genética existente en el conjunto analizado. Si solo hubiese una variante por cada marcador en todos los individuos analizados significaría que serían idénticos, un clon, por lo tanto la diversidad sería nula. El número medio de alelos por marcador en la población de Nerpio fue de 2.8 valores estos más bajos que los obtenidos por otros autores con los mismos marcadores usados en este estudio en una población italiana y en otra iraní (Tabla 2). No obstante hay que tener en cuenta que en el caso de la población italiana se emplearon 43 individuos de la población más 6 testigos en comparación con los 18 más dos testigos empleados en este trabajo. El que se haya empleado más individuos y testigos puede explicar un mayor número de alelos por marcador ya que la probabilidad de aparezcan nuevos alelos es más alta. Respecto a la población iraní el número de individuos empleado fue de 15 más 5 testigos, esto puede

explicar que en conjunto sus valores hayan sido algo más altos (3.9 alelos/marcador) que los obtenidos en este estudio (3.3 alelos/marcador). Teniendo en cuenta todo esto se puede decir que la diversidad genética de la población local es similar a la encontrada en otras poblaciones estudiadas.

Al analizar en conjunto todos los datos por marcador e individuo se obtiene un dendrograma en el que se puede ver como se distribuye esta diversidad que tendrá que ver con el grado de parentesco de los individuos. En nuestro caso los individuos de la población 'Nogal de Nerpio' se agrupan separados de los testigos empleados que a su vez se agrupan juntos con un índice de similitud muy bajo (Figura 2). Esto no ocurrió en los trabajos citados anteriormente donde los testigos aparecieron mezclados con los individuos de las poblaciones debido posiblemente a que esas poblaciones se han contaminado con el polen producido por las variedades foráneas y algunos de los árboles analizados son el resultado de estos cruzamientos. En este trabajo no ha ocurrido así, es posible que las variedades foráneas hayan llegado más recientemente y también a que el establecimiento de nuevas plantaciones con nueces de Nerpio no sea tan frecuente como antiguamente. Dentro de la variedad local los dos individuos o árboles más emparentados fueron Juan los Pollos y Molino de las Fuentes que presentaron un índice de similitud muy alto (0.87) lo que indica que probablemente sean plantas hermanas que procedan de un mismo árbol. El plantón Covacho que es un clon del árbol datado como más antiguo (aprox. 500 años) fue el más diferente respecto a los demás individuos estudiados.

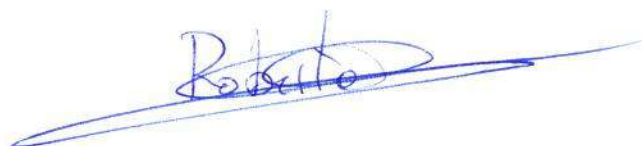
En conclusión por los resultados obtenidos podemos decir que la población local 'Nuez de Nerpio' presenta una alta diversidad genética con un posible origen diferente al de las variedades comerciales. Por todo ello se puede considerar esta población como un recurso genético interesante de conservar y susceptible de ser empleado en el desarrollo de nuevas variedades clonales.

Referencias bibliográficas

Foroni L, Woeste K, Monti LM, Rao R (2007). Identification of 'Sorrento' walnut using simple sequence repeat (SSRs). *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 1081-1094.

Mahmoodi R, Rahmani F, Rezaee R (2013). Genetic diversity among *Juglans regia* L. Genotypes assessed by morphological traits and microsatellite markers. *Span. J. Agric. Res.* 11(2): 431-437.

Córdoba, 13 de noviembre de 2017



Roberto Moreno Pinel
Responsable Técnico del trabajo

Tabla 1. Datos de las muestras recolectadas

Nº Expediente	Denominación	Coordenadas UTM	Altitud (m)
Nº 1	Raimundo García	X563997-Y4224654	980
Nº 2	Miguel Alfaro	X562793-Y4224442	983
Nº 3	Fº José (médico)	X561388-Y4222543	1094
Nº 5	Molino de las Fuentes	X561951-Y4220779	1190
Nº 6	Pincorto 1ª (Joaquín la Hoz)	X547397-Y4216507	1542
Nº 7	Pincorto 2ª	X547357-Y4216436	1515
Nº 9	Pedro Andrés	X553662-Y4221291	1212
Nº 10	José (Zapatones)	X560850-Y4221366	1151
Nº 12	Paquita (Los Casares)	X556722-Y4223929	1287
Nº 13	Antonio (Moreno)	X560768-Y4221560	1121
Nº 14	Antonio Moreno (Mollar)	X560723-Y4221893	1129
Nº 15	Cortijo El Herrero	X555763-Y4223655	1283
Nº 16	Río Moral (Patricio)	X554949-Y4221718	1175
Nº 18	José del Cerro	X555760-Y4223856	1282
Nº 19	Barranco Hondo 1ª	X561527-Y4222613	1110
Nº 20	Turnilla	-	-
Nº 24	Juan los Pollos	-	-
Nº 23	Plantón Covacho	-	-
Nº 21	'Chandler' (USA)	-	-
Nº 22	'Franquette'(Francia)	-	-

Tabla 2. Marcadores SSRs utilizados para analizar 20 genotipos de nogal localizados en Nerpio. Comparación de los resultados con los obtenidos en otros trabajos que analizaron 48 genotipos de nogal (42 entradas de Sorrento, Italia y 6 cultivares) y 21 genotipos de nogal (16 entradas de Irán y 6 cultivares) utilizando los mismos marcadores SSRs.

Locus	Nogales de Nerpio, España		Nogales de Sorrento, Italia (Foroni et al. 2005)		Nogales de Irán (Mahmoodi et al. 2013)	
	Tamaño* (bp)	Nº alelos*	Tamaño (bp)	Nº alelos	Tamaño (bp)	Nº alelos
WGA1	208-210	2	181-195	3	185-207	3
WGA5	256-290	4 (3)	240-266	7(5)	202-283	5
WGA9	249-263	4 (3)	236-248	6	-	-
WGA27	221-225	2	192-210	5(3)	monomórfico	1
WGA32	187-213	3 (2)	120-196	4(3)	160-195	4
WGA69	179-194	3	162-182	6	-	-
WGA71	222-224	2	136-210	8	202-216	2
WGA89	229-238	3	212-222	5	211-290	4
WGA202	276-293	4	260-276	4(3)	193-282	7
WGA276	192-210	5 (4)	168-194	6	180-212	4
WGA321	243-263	4 (3)	227-265	7	-	-
Nº total alelos		36 (31)		61(55)		31
Media alelos		3.3 (2.8)		5.5(5)		3.9

*en paréntesis los valores considerando solo las entradas de Nerpio (sin los cultivares Chandler y Franquete) y las entradas italianas sin los testigos empleados.

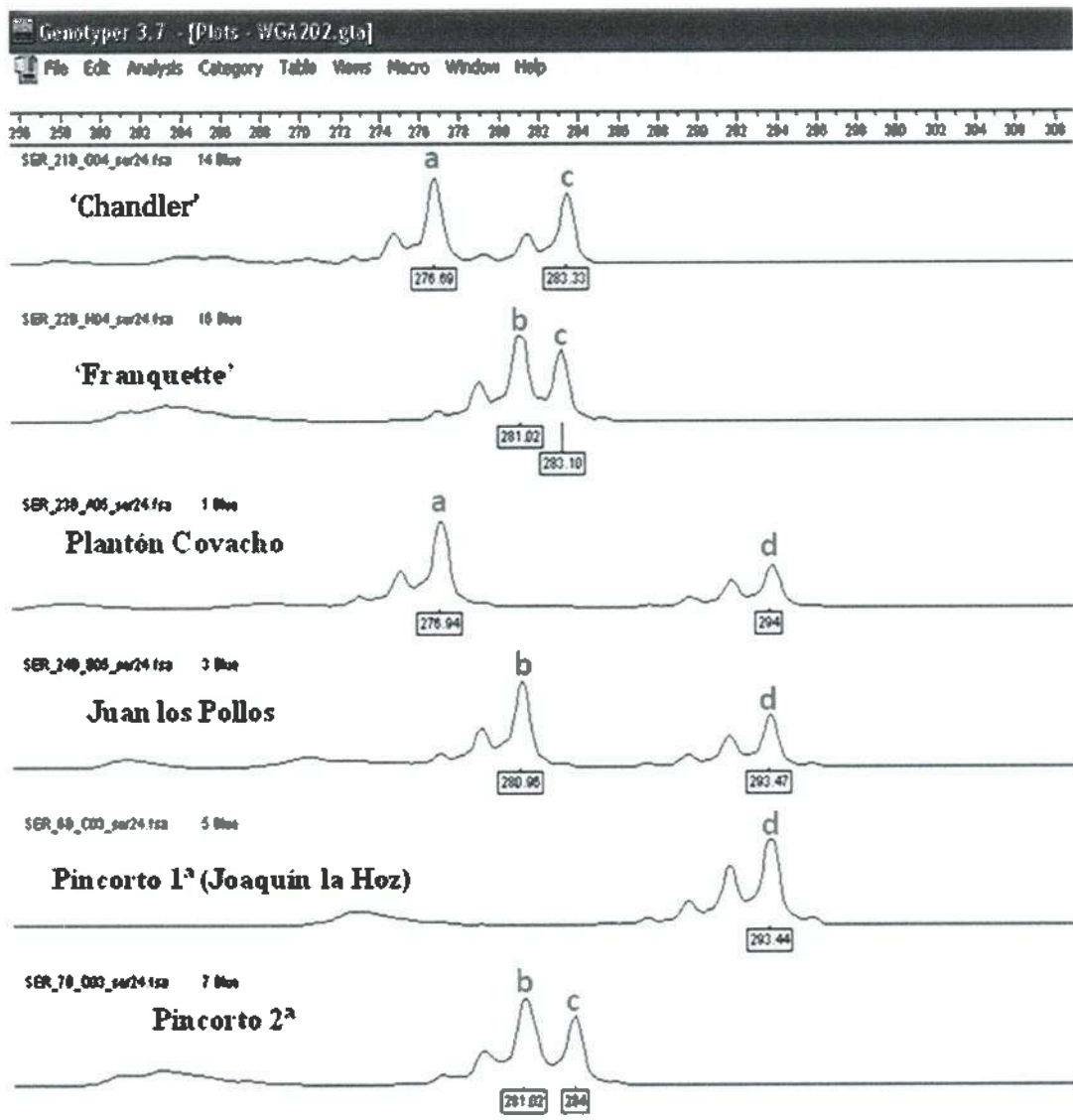


Figura 1. Ejemplos del resultado obtenido en algunas muestras de nogal analizadas con el marcador WGA202.

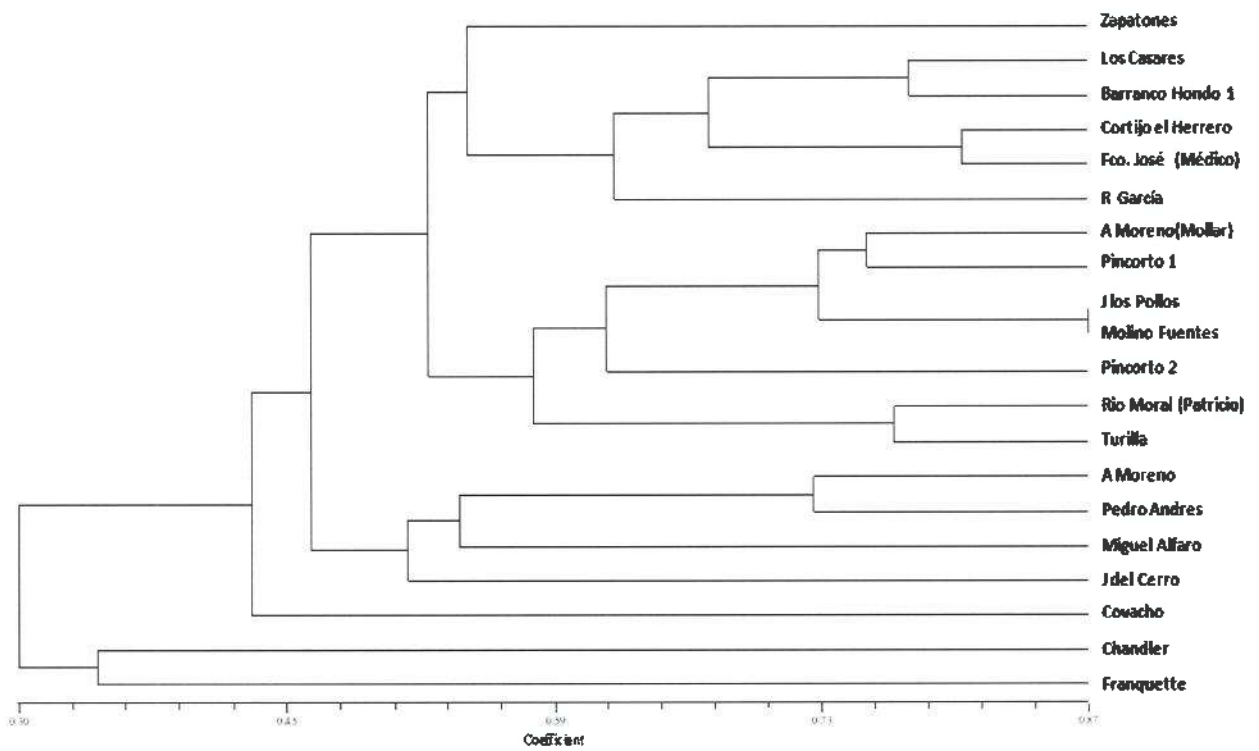


Figura 2. Dendrograma obtenido de 20 genotipos de nogal utilizando 11 marcadores SSR y el índice de similitud de Jaccard.