



Variabilidad del ADN cloroplástico y su contribución al conocimiento del estado de conservación de *Ulmus glabra* en el Sistema Central



María Martín del Puerto¹, Felipe Martínez García² & Juan Pedro Martín¹

¹ Departamento de Biología Vegetal, E.T.S.I. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España.

² U. D. Botánica, Departamento de Silvopascicultura, E.T.S.I. Montes, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, España.

Introducción

El olmo de montaña (*Ulmus glabra* Hudson) tiene una distribución euroasiática, cuyo límite suroccidental se localiza en la Península Ibérica. En el Sistema Central, presenta una distribución fragmentada, existiendo menos de 20 núcleos poblacionales. La estructura poblacional de esos núcleos refleja un alarmante estado de conservación, esencialmente, debido a que, en general, cuentan con un número escaso de individuos y, la mayoría, muy jóvenes (Martínez *et al.*, 2009).

Con objeto de completar la caracterización de la diversidad genética del olmo de montaña en el Sistema Central, en el presente trabajo se ha analizado la diversidad existente en el ADN cloroplástico (ADNcp) de 16 poblaciones distribuidas a lo largo de dicho sistema montañoso y, para ello, se ha empleado la técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Materiales y Métodos

Se ha colectado material foliar de un número de individuos representativo del tamaño de cada una de las 16 poblaciones estudiadas, salvo en aquellos núcleos que presentan un escaso número de individuos, en cuyo caso se han muestreado todos los existentes (Tabla 1; Figura 1). Posteriormente, se ha procedido a la extracción de ADN en las 318 muestras analizadas, siguiendo el protocolo del *Kit* comercial "Núcleo Spin Plant II" (CLONTECH Lab.).

El método de PCR-RFLP consiste en amplificar una zona del ADN mediante PCR y, posteriormente, digerir el fragmento amplificado con una enzima de restricción, con objeto de detectar diferencias en los patrones de restricción. En nuestro caso, se han utilizado inicialmente 38 parejas de cebadores específicos diseñadas para amplificar en la región LSC (*Large Single-Copy Region*) del ADN cloroplástico (Tabla 2; Grivet *et al.*, 2001) y, para la posterior reacción de restricción se ha empleado la enzima *Hinf I*. Finalmente, se seleccionaron los pares de cebadores CP3, CP16, CP 19 y CP28 y las enzimas *Hinf I* y *Taq I*, salvo para CP19 que se utilizaron *Mva I* y *Alu I*.

Tabla 2: Cebadores y condiciones de PCR utilizadas (TA, Temperatura de *Annealing* en °C; TE, Tiempo de Extensión en min); así como, grado de amplificación y tamaño estimado del fragmento amplificado (en pares de bases) obtenido para las 38 regiones de ADN cloroplástico analizadas.

Pares de Cebadores	Condiciones de PCR	Grado de	Fragmento		
Código	Nombre	TA (°C)	TE (min)	Amplificación ¹	Amplificado
CP1	rpl23 / psbA3'	45	4	NA	---
CP2	trnH / trnK	62	2,5	+++	1.750
CP3	trnK / trnK	53,5	3	+++	2.700
CP4	trnK / trnQ	45	4	NA	---
CP5	trnQ / trnS	50	2,5	+++	1.450
CP6	trnS / trnR	50	3	NA	---
CP7	trnR / ccmp4-U	45	3	+	2.600
CP8	ccmp4-L / atpH	55	2,5	++	1.400
CP9	atpH / atpI	50	2,5	++	850
CP10	atpI / rpoC2	50	3	+++	2.200
CP11	rpoC2-f / rpoC2-r	50	4	+++	3.400
CP12	rpoC2 / rpoC1	50	3	+++	1.950
CP13	rpoC1 / rpoB	55	3	+++	1.950
CP14	rpoC1 / trnC	45	5,5	+	4.900
CP15	trnC / trnD	55	4	NA	---
CP16	trnD / trnT	52	2,5	++	1.350
CP17	trnT / psbC	50	4	NA	---
CP18	psbC / trnS	55	2,5	+++	1.600
CP19	trnS / trnf _M	62	2,5	+++	1.350
CP20	trnf _M / psaA	47,5	5,5	++	5.000
CP21	psaA / trnS	55	4,5	NA	---
CP22	trnS / trnT	50	2,5	NA	---
CP23	trnT / trnF	50	3	NA	---
CP24	trnF / trnV	50	4	NA	---
CP25	trnV / rbcL	55	4,5	++	3.800
CP26	rbcL / orf106	50	4	++	3.300
CP27	orf512 / orf184	50	3	+++	2.000
CP28	orf184 / petA	50	3	+++	2.800
CP29	petA / psbEr	40	3	+++	1.500
CP30	psbL / rps18	40	4,5	NA	---
CP31	rps18 / clpp	45	3	NA	---
CP32	clpp / psbB	45	3	NA	---
CP33	psbB / psbB	50	3	+++	1.500
CP34	psbB / petB	50	3	+++	2.700
CP35	petB / petD	50	3	+++	1.600
CP36	petD / rps8	40	3,5	NA	---
CP37	rps8 / rpl16	45	2	++	1.200
CP38	rpl16 / rpl2	50	4,5	++	4.000

¹ NA: No Amplifica; ++: amplificación débil; ++: amplificación buena; +++: amplificación muy intensa.

Tabla 1: Localización, código y número de individuos muestreados en cada una de las 16 poblaciones de *Ulmus glabra* del Sistema Central estudiadas.

Localidad	Cód.	Nº Ind.	Localidad	Cód.	Nº Ind.	Localidad	Cód.	Nº Ind.	Localidad	Cód.	Nº Ind.
Becerril	BEC	22	El Paular	PAU	2	Valle de Iruelas	IRU	57	Cuevas del Valle	CVA	11
Navafria	NAV	14	Cercedilla	CER	6	Casillas	CAS	20	Candeleda	CAN	8
Montejo de la Sierra	MON	1	Rozas de Puerto Real	ROZ	46	Piedralaves	PIE	7	Aldeanueva de la Vera	ALD	10
Rascafría - Morcuera	RAS	33	El Tiemblo	TIE	42	Mombeltrán	MOM	10	S. Martín de Trevejo	STR	29



Figura 1: Detalle de la localización y de algunos individuos de la población segoviana de Navafria..

Resultados y Discusión

El análisis mediante PCR-RFLP de las cuatro regiones cloroplásticas analizadas ha revelado la existencia de una escasa variabilidad en las 16 poblaciones de olmo de montaña del Sistema Central estudiadas. Por una parte, 15 de las poblaciones fueron monomórficas, no presentaron ninguna variación intrapoblacional; por otro lado, a nivel interpoblacional, únicamente se han detectado tres clorotipos (haplotipos del ADNcp) distintos: uno, mayoritario, presente en 311 individuos y en 15 de las 16 poblaciones; un segundo clorotipo, único y exclusivo de la población de Cercedilla, y un tercer clorotipo encontrado tan solo en uno de los dos individuos de la población de El Paular (Figura 2). Estos datos señalan la existencia de una gran homogeneidad en el ADNcp de estas poblaciones de *U. glabra*, coincidiendo con estudios previos realizados a nivel de toda la Península Ibérica para esta especie, aunque con un menor número de poblaciones (Gil *et al.*, 2004).

Conclusiones

Los resultados del presente trabajo, junto con otros datos obtenidos con el análisis del ADN nuclear, vienen a remarcar el alarmante estado de conservación de esta especie en el Sistema Central, donde el reducido número de poblaciones se ve acentuado por la escasa variabilidad detectada en las mismas. Es por ello, que se hace necesario un seguimiento de estos núcleos presentes en este sistema montañoso, especialmente de poblaciones como la de Cercedilla, que consta de menos de 10 individuos, muy jóvenes y ubicados en un espacio reducido, pero que podría tener especial interés debido al clorotipo exclusivo que presenta.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado dentro de los Proyectos CCG07-UPM/AMB-1467 y QM100205015, los cuales han sido cofinanciados por la Comunidad de Madrid y la Universidad Politécnica de Madrid.

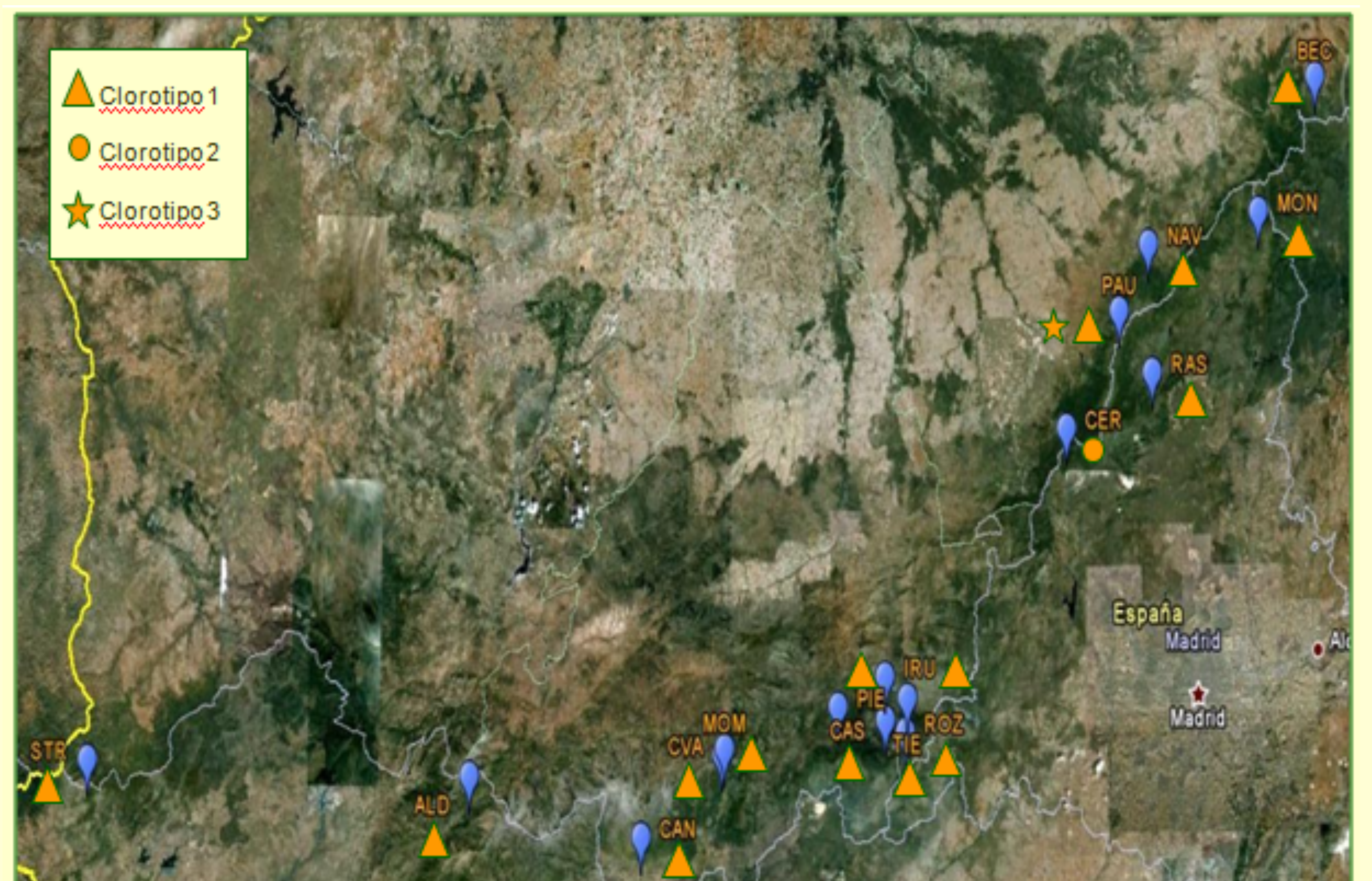


Figura 2: Mapa de distribución de los tres clorotipos localizados en las 16 poblaciones del Sistema Central.

Bibliografía

- Gil, L., Fuentes-Utrilla, P., Soto, A., Cervera, M.T. & Collada, C. 2004. English elm is a 2,000 - year - old Roman clone. *Nature* 431: 1053.
- Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G.G. & Petit, R.J. 2001. Genome walking with consensus primers: Application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Mol. Ecol. Notes* 1: 345-349.
- Martínez, F., Génova, M., Gómez Manzanque, F., Merino, S. & Arche, J. 2009. Estado de conservación de *Ulmus glabra* Huds. en el Sistema Central español. 5º Congreso Forestal Español. Ávila.