



Análisis de la diversidad genética de poblaciones de *Cryphonectria parasitica* en Galicia mediante microsatélites

Aguín, O., Montenegro, D., Mansilla, J.P.

Deputación Pontevedra
Estación Fitopatológica do Areiro

Estación Fitopatológica do Areiro. Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. E-mail: olga.aguin@depo.es

Introducción

En la actualidad el único sistema que se muestra eficaz en el control de del cancro del castaño causado por *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr, es la aplicación de cepas hipovirulentas. En el éxito de este control influyen significativamente la variabilidad y la estructura genética de la población. Tradicionalmente la variabilidad genética de las poblaciones de *C. parasitica* se ha estudiado mediante la determinación del número de tipos de compatibilidad, pero este sistema es limitado. Actualmente existen marcadores basados en ADN de tipo microsatélite (SSR, simple sequence repeats), que permiten el estudio directo del genotipo y posibilitan la identificación de individuos y el establecimiento de las relaciones existentes entre los miembros de una población.

Recientemente se han aislado 66 loci microsatélites que han sido utilizados con éxito en el estudio de la diversidad genética de poblaciones europeas y americanas de *C. parasitica*. Por eso el objetivo de este trabajo fue determinar esta diversidad en las poblaciones gallegas de *C. parasitica* mediante el estudio de 4 secuencias microsatélites.

Material y métodos

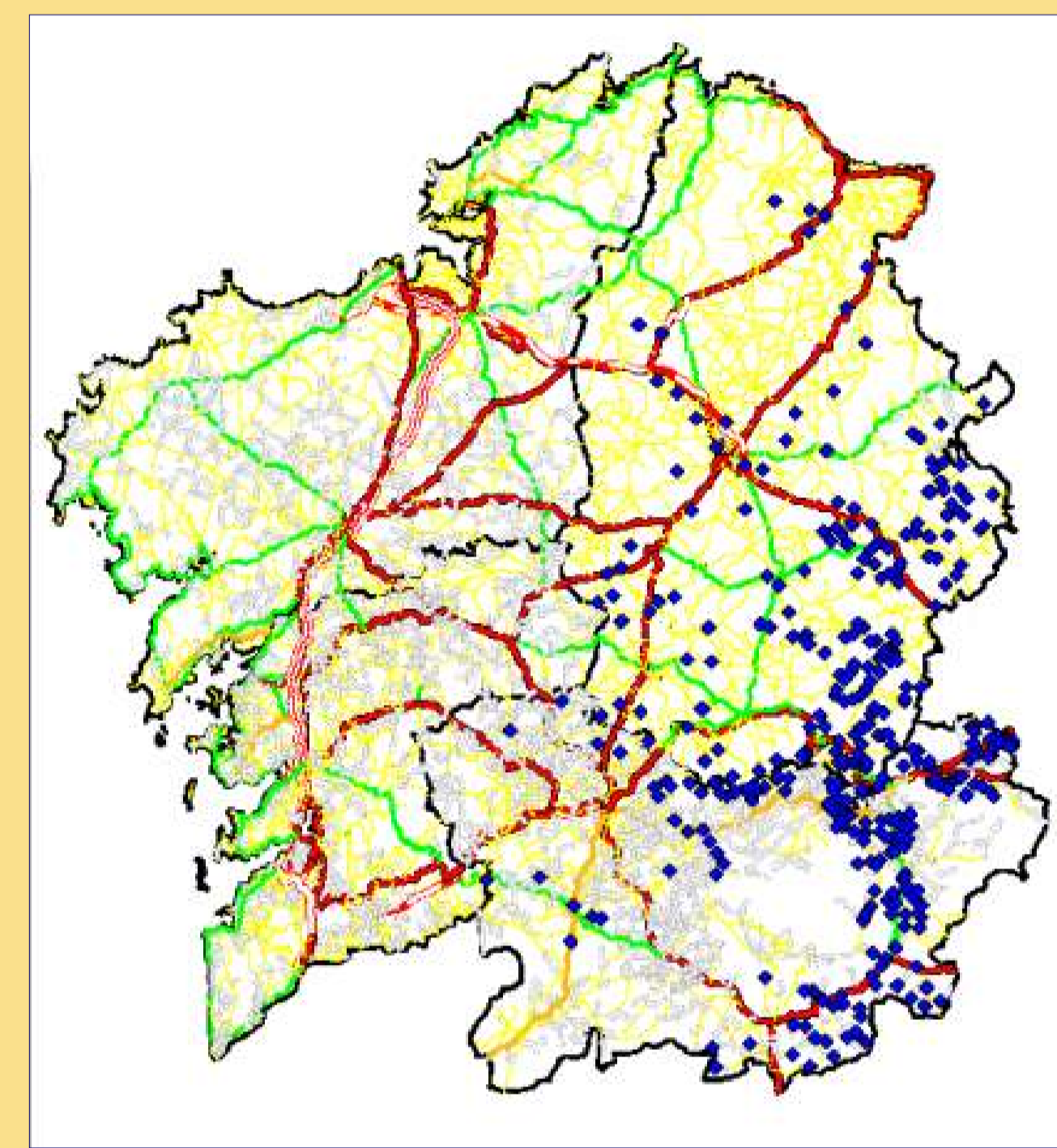
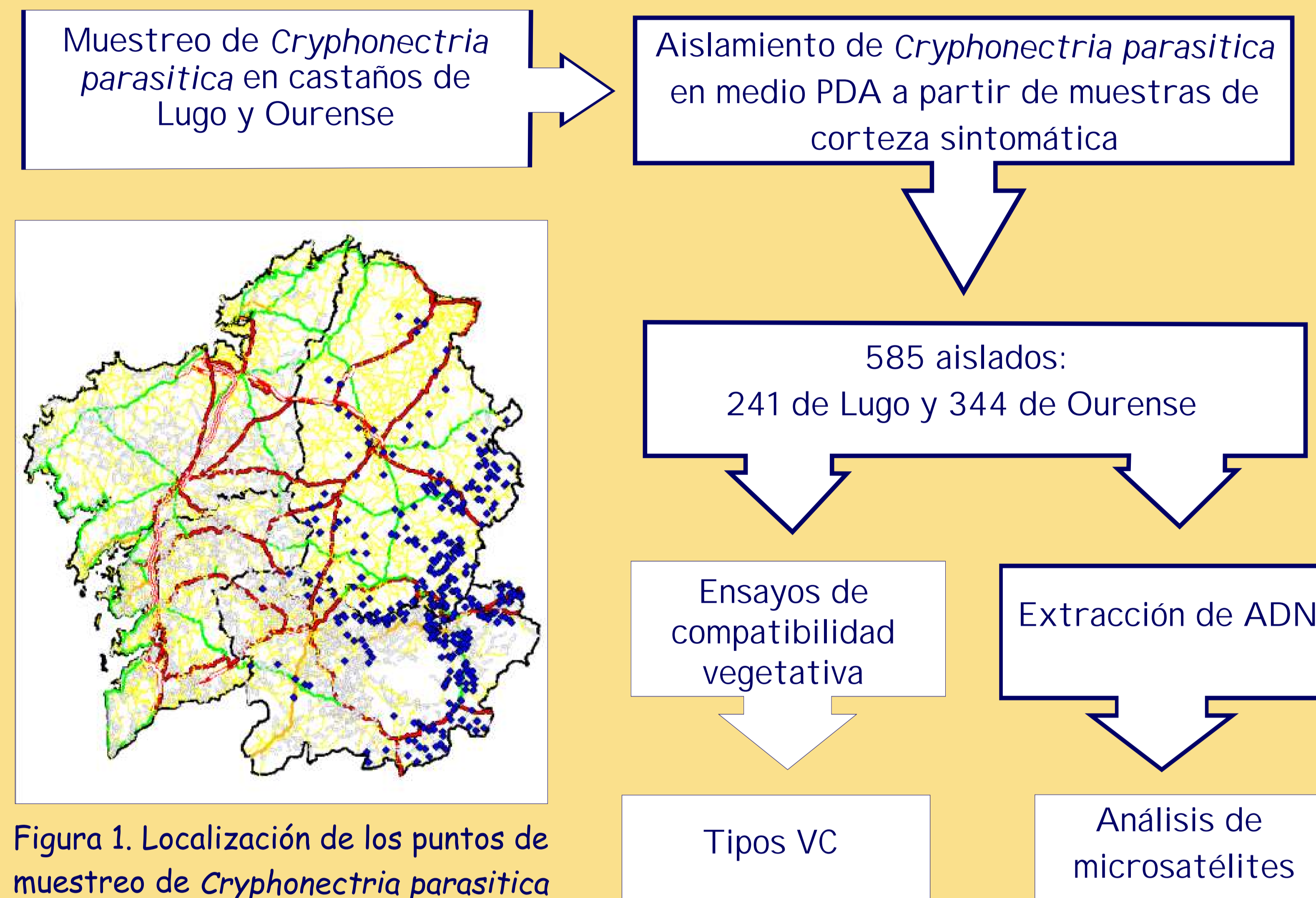


Figura 1. Localización de los puntos de muestreo de *Cryphonectria parasitica* en las provincias de Lugo y Ourense.

ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES

1. Extracción de ADN: EZNA Fungal DNA KIT (Omega Biotek), a partir de 40 mg de micelio fresco.
2. Amplificación: G4, E4 y E8 utilizando el primer directo marcado. G14 utilizando una cola de M13 marcada (Schuelke, 2000) (tabla 1).
3. Análisis de fragmentos: secuenciador ABIPrism 3130 (Applied Biosystems).
4. Asignación del tamaño de alelos: GeneScan V3.5 (Applied Biosystems).
5. Análisis de datos: programa POPGENE V1.32.
 - > Frecuencias alélicas.
 - > Índice de Nei.
 - > Índice de diversidad de Shannon.

Tabla 1. Loci microsatélites analizados, referencia bibliográfica, motivo de repetición y fluoróforo utilizado para su marcaje.

Locus	Referencia	Core	Marcaje
CpG4	Breullin et al., 2006	(GA) ₁₆	VIC
CpE4	Breullin et al., 2006	(GT) ₁₉	NED
CpE8	Breullin et al., 2006	(AAC) ₁₅	PET
CpG14	Kubisiak et al., 2007	(AGGAAG) ₆	6-FAM

Resultados

Los 4 microsatélites estudiados fueron polimórficos detectándose de 3 a 5 alelos por locus. En la figura 2 se muestra el electroferograma de una de las muestras analizadas. La diversidad genética de los loci varió desde 0,05 a 0,5 (tabla 2). Los tamaños de los alelos obtenidos para cada locus y las frecuencias alélicas estimadas en el conjunto de todos los individuos se muestran en la tabla 3.

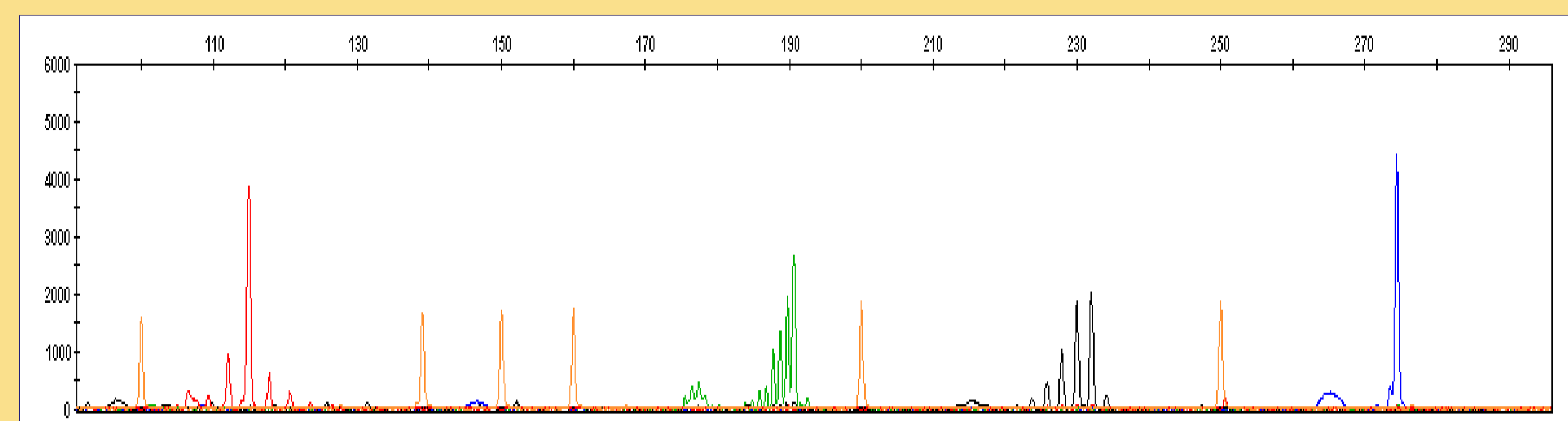


Figura 2. Electroferograma en el que se observan los picos correspondientes a los 4 loci estudiados.

Tabla 2. Características de los 4 loci microsatélite analizados. Rango de los alelos detectados (expresado en nucleótidos), número de alelos observados y diversidad genética de cada locus en el conjunto de la población (He).

Locus	Rango	Número alelos	He
CpG4	182-208	4	0,41
CpE4	219-231	3	0,05
CpE8	97-118	5	0,05
CpG14	255-285	4	0,50

Tabla 3. Tamaño y frecuencia de los alelos encontrados en cada locus.

Locus							
G4		E4		E8		G14	
Tamaño (n)	Frecuencia alélica	Tamaño (n)	Frecuencia alélica	Tamaño (n)	Frecuencia alélica	Tamaño (n)	Frecuencia alélica
208	0,72	231	0,98	118	0,01	285	0,6
190	0,27	225	0,014	115	0,98	273	0,4
188	0,014	219	0,01	106	0,01	263	0,01
182	0,02			103	0,01	255	0,01
				97	0,01		

Tabla 4. Diversidad genética de los 4 loci microsatélite y diversidad de tipos de compatibilidad vegetativa (tipos VC) en las poblaciones de Lugo y Ourense.

Población	Lugo	Ourense
Nº individuos	241	344
Loci microsatélite		
Nº medio alelos	3,25	3,75
He	0,26 ± 0,27	0,23 ± 0,20
Nº haplotipos	8	10
Hs	1,10	1,10
Tipos VC		
Nº tipos	7	7
Hs	0,93	0,98

He: índice de Nei. En paréntesis se indica la desviación estándar.

Hs: índice de Shannon.

Referencias

- BREULLIN, F., DUTECH, C. y ROBIN, C. 2006. Genetic diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. *Mycological Research*, 110:288-296.
- KUBISIAK, T. L., DUTECH, C. y MILGROOM, M. G. 2007. Fifty-three polymorphic microsatellite loci in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Ecology Notes*, 7: 428-432.
- SCHUELKE, M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.

Agradecimientos. Este trabajo ha sido posible gracias a un convenio de colaboración entre la Deputación de Pontevedra y la Xunta de Galicia a través de la Consellería de Medio Rural.

