

LA MEJORA GENÉTICA FORESTAL EN EL CIFOR-INIA

M. A. Bueno, D. Agúndez, N. Alba & R. Alía

Grupo de Mejora Genética Forestal. CIFOR-INIA, Apdo. 8111. 28080 MADRID

RESUMEN

El CIFOR-INIA tiene tres líneas de trabajo en el grupo de mejora genética. La mejora de *Pinus* sp. incluye la selección de masas, delimitación de regiones de procedencia y estudio de variabilidad a través de ensayos, marcadores isoenzimáticos y moleculares. La mejora de *Populus* sp. está enfocada a la obtención de nuevos clones, y el estudio y conservación de la diversidad genética en *P. alba*, *P. nigra* y *P. tremula*. Por último la biotecnología incluye la micropropagación en *Populus*, la obtención de haploides y la embriogénesis somática en *Quercus suber*. Se describe el estado actual de los trabajos en cada una de estas líneas.

1. INTRODUCCIÓN

Las actividades de mejora genética realizadas en el CIFOR-INIA se encuadran dentro de distintos campos, como son la prospección, el estudio de la variabilidad genética en ensayos en monte y con marcadores moleculares, cruzamientos controlados y embriogénesis somática. Las especies con las que se trabaja son pino silvestre, pinaster, laricio y carrasco, los chopos autóctonos y el alcornoque, principalmente.

Dado el amplio rango de actuaciones, la profundidad de estudio, lógicamente, no es la misma ni para todas las especies ni para cada línea de trabajo. La producción no es desdeñable como criterio orientador de la

mejora, pero otros criterios como la forma de los fustes, la adaptación a determinados ambientes son importantes en estas especies. Por ello, objetivos como conocer las pautas de variación y sistemas de reproducción, obtener un material selecto, conservar los recursos genéticos o facilitar la propagación de las especies, inciden directamente en la mejora.

Una descripción global de la investigación en materia de mejora genética forestal se presenta a través de los principales objetivos y resultados por géneros y especies. Se ha elegido esta ordenación para visualizar mejor los resultados en los géneros cuya problemática específica es similar, y por tanto lo son las estrategias de actuación. Las actividades realizadas se resumen dentro de 3 líneas principales: Mejora genética de *Pinus* sp., Mejora genética de *Populus* sp. y Biotecnología aplicada a la mejora.

2. MEJORA GENÉTICA DE *Pinus* sp.

Objetivos

- Caracterización de la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones:
 - Caracteres adaptativos
 - Marcadores moleculares
- Selección de masas.
- Recomendaciones de uso de semilla.

Especies

Pinus sylvestris, *P. nigra*, *P. pinaster* y *P. halepensis* en todo el ámbito de su distribución natural.

Líneas de trabajo

Estudio de la variabilidad

La delimitación de regiones es la primera fase seguida en el estudio de la diversidad de las especies forestales. Cumple dos funciones principales: constituye el marco para la selección de rodales y masas, y el punto de partida para comprobar la validez de las hipótesis sobre la variación genética. Las diferentes técnicas de estudio (caracteres morfológicos, ensayos, marcadores moleculares) permiten estimar la variabilidad genética existente e indicar pautas para un uso correcto de las distintas especies forestales.

Los ensayos de procedencia tienen como fin principal el estudio de caracteres que interesan directamente al repoblador: producción, adaptación a distintos ambientes, fenología, interacción genotipo-ambiente, etc. Actualmente existe una red de 19 parcelas de ensayo de todas las especies mencionadas (ver Tabla 1), cuyas edades varían desde 1 año en *P. halepensis* a 30 en *P. pinaster* (instaladas por el antiguo PFE). La descripción de los sitios de ensayos se encuentra recogida en documentos de trabajo que incluyen, además, los diseños utilizados, las caracte-

terísticas geográficas y climáticas de las procedencias, y las mediciones realizadas.

Los ensayos de progenie se sitúan en un segundo nivel: el estudio de la variabilidad dentro de las poblaciones. Su objetivo es estimar la heredabilidad de los caracteres y la correlación entre ellos. Se cuenta con ensayos de *Pinus pinaster*, procedencia Sierra de Gredos, seleccionada por su buen comportamiento en el ensayo del PFE, como procedencia de gran plasticidad, buenos crecimientos y alta calidad de fuste.

Intermedio entre estos dos casos, se ha realizado un ensayo mixto de procedencias y progenies de *Pinus halepensis*, con el fin de detectar una posible diferenciación débil entre sus poblaciones. Los ensayos de procedencias, aún no instalados, tendrán como principal objetivo estudiar la interacción genotipo-ambiente y la adaptación de las procedencias a las distintas localizaciones.

El mismo material utilizado en ensayos de procedencias y estudios morfológicos, se ha analizado mediante isoenzimas para las especies *P. sylvestris* (dentro de un proyecto de cooperación Hispano-Alemán), *P. pinaster* (colaboración con la ETSI Montes de Madrid) y *P. halepensis*. El análisis de ADN se ha iniciado con las técnicas de RAPDs y microsátelites en *P. halepensis*. Los resultados aportan información sobre la estructura genética de las especies y sus poblaciones y la diferenciación existente entre ellas.

Tabla 1. Actividades realizadas en Mejora genética de *Pinus* sp.

	Regiones de procedencia	Rodales selectos	Ensayos de procedencia	Ensayos de progenie	Estudio morfológico	Terpenos	Isoenzimas	ADN
<i>P. sylvestris</i>	17	22	25 (6 sitios)	—	SI	◇	◇	♠
<i>P. nigra</i>	10	16	30 (4 sitios)	—	—	◇	♠	♠
<i>P. pinaster</i>	20 + 7	⊕	52 (6 sitios)	100 (2 sitios)	SI	◇	◇	♠
<i>P. halepensis</i>	18 ◇	⊕	27 (3 sitios)	135 (3 sitios)	SI	◇	11	11

⊕ En proceso de selección
 ◇ No realizado en CIFOR-INIA
 ♠ En proyecto

La comparación de resultados obtenidos con el mismo material permitirá obtener una mayor precisión en el conocimiento de la variabilidad.

Selección de masas

La selección de masas para la producción de semilla se realiza basándose en criterios de producción de los futuros montes o de su adaptación a determinadas estaciones. Esta línea de trabajo se realiza mediante un convenio de colaboración ICONA-INIA y su estado actual se desarrolla en Martín et al. (1996, en este volumen). Los trabajos encaminados a la conservación de recursos genéticos *ex situ* (recolección, caracterización y conservación de semillas) están directamente relacionados con esta línea de trabajo.

Estado actual

ICONA inició una serie de monografías sobre las regiones de procedencia de las especies forestales. Actualmente se encuentran ya publicadas, entre otras, la referente a *Pinus sylvestris* y *P. nigra*, la de *P. halepensis* y la de *P. pinaster*. A continuación se describe brevemente los estudios de variación referentes a cada una de estas especies.

Pinus sylvestris: Se ha realizado la caracterización morfológica y la instalación de 6 parcelas de ensayo (1990-1991), incluyendo 18 procedencias españolas y 7 alemanas. Los estudios ya realizados incluyen el comportamiento durante dos años en vivero, seguimiento y caracterización del ciclo anual de crecimiento a los 5 años desde su instalación, y la medición de los crecimientos anuales.

Pinus nigra: En 1995-96 se han instalado 3 parcelas de ensayo de procedencia, con 10 procedencias españolas, y una parcela que incluye, además, 20 del resto de la distribución europea de la especie.

Pinus pinaster: Los ensayos instalados en 1967, han permitido efectuar la evaluación de las procedencias y recomendaciones de uso, seguimiento del ciclo de crecimiento en diámetro, el estudio de la interacción genotipo-ambiente y la interpretación de esta interacción.

Los 2 ensayos de progenies de la procedencia Sierra de Gredos, con la representación de 100 progenies, ha permitido la estimación de la heredabilidad del crecimiento a los 5 años, el estudio de la respuesta fototrópica y seguimiento del ciclo fenológico de diversas familias.

Pinus halepensis: La recogida de material (ramillos y piñas) se efectuó en 1994. Se ha realizado la caracterización morfológica de 5 familias por población en un total de 30 poblaciones, el estudio comparativo de la germinación en condiciones controladas y el seguimiento del crecimiento durante el primer año en vivero. El ensayo de procedencias/progenies se ha instalado en 3 parcelas durante el período 1995-1996.

Una selección de las 11 poblaciones consideradas como más representativas del conjunto de la especie, se han analizado mediante isoenzimas. Actualmente se está poniendo a punto la técnica para su análisis con RAPDs y microsatélites.

3. MEJORA GENÉTICA Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS DE *Populus* sp.

Objetivos

- Obtención de nuevos clones.
- Mantenimiento de la variabilidad genética de las especies mediante el establecimiento de colecciones.

Especies: *P. alba*, *P. nigra*, *P. tremula*.

Líneas de trabajo:

Obtención de nuevos híbridos.

La realización de cruzamientos tiene como fin obtener nuevos clones híbridos que puedan adecuarse a ciertas condiciones de stress hídrico y salinidad. Es sabido que *P. alba* es especie capaz de soportar estas condiciones, por ello fue elegida como parental para aportar resistencia a los nuevos clones. *P. deltoides* ya ha sido sometida a

diversos procesos de selección, de los que disponíamos algunos clones en las colecciones del INIA. Estos habían sido utilizados como parentales en cruzamientos realizados con anterioridad, mostrando un comportamiento bueno tanto en la producción de polen como de semillas. La obtención de los parentales de *P. alba* se ha efectuado en diversas prospecciones tanto en el Sur como en la Cuenca del Ebro.

Conservación de recursos genéticos

La metodología aplicada a la conservación es común para todas las especies y se basa en el desarrollo de la siguientes actividades: Prospección, Recolección, Conservación y Caracterización.

Los trabajos de prospección y localización de rodales, es en este momento al que nos estamos concentrando nuestro trabajo en estas primeras fases de la conservación. Se está utilizando la información disponible en Mapas Forestales e inventarios, así como la ayuda de los Servicios Forestales.

Los trabajos de recolección llevan consigo la toma de datos sobre diferentes aspectos de árbol recolectado.

La conservación del material se realiza en viveros y está previsto mantener el material en cepas de donde poder realizar la propagación y por tanto el mantenimiento del material genético recolectado. En algunas ocasiones la propagación es asistido por técnicas de propagación in vitro.

La caracterización llega a la descripción y evaluación del material en conservación sobre diferentes aspectos tanto morfológico, fenológicos de resistencia o genética mediante técnicas moleculares. Para ello está previsto la instalación de arboretos donde la observación de diferentes aspectos del árbol se puedan realizar.

Estado actual

Obtención de nuevos híbridos

Se realizaron 21 cruzamientos de los que 8 producen semilla fértil. De estos se obtuvieron cerca de 800 plantas de las que en la

actualidad quedan algo más de 500 que se mantienen en cepas.

El material obtenido ha sido sometido a un seguimiento en vivero. Algunos clones han sido propagados e instalados en parcelas para la evaluación de su comportamiento en campo en los próximos años. Los trabajos realizados y previstos son, por años, los de la Tabla 2.

El comportamiento del material está siendo aceptable en lo que concierne a su comportamiento en vivero, capacidad de enraizamiento y supervivencia en campo. En la actualidad el material se mantiene en vivero en cepas, y se dispone de dos parcelas (95C y 96C) y una en vivero (95). Para el próximo año está previsto instalar una parcela (97S) sobre terreno con problemas de salinidad en donde se pueda evaluar la adaptación de 30 clones que hayan tenido un buen comportamiento en vivero.

Tabla 2. Actividades realizadas y previstas con los clones obtenidos, por años.

Clonación	Plantación	Selección
1993	1995 C	2001
1994	1996 C	2002
1995	1997 S	2003
1996	1998 S	2004

C: Evaluación de crecimiento y forma en plantación de los clones que se van definiendo como más interesantes.

S: Evaluación de caracteres de resistencia a stress salino e hídrico.

Conservación de recursos genéticos

Los trabajos de conservación recursos genéticos en *Populus alba* y *P. nigra*, se han iniciado, en el INIA, a partir de 1994 con la aprobación de un proyecto dentro de la convocatoria de Conservación de Recursos fitogenéticos del MAPA, en *P. tremula* la aprobación del convenio ICONA-INIA para

la delimitación zonas ecológicas y obtención de material ha sido el inicio de estos trabajos que englobamos dentro de las actividades de conservación.

Previos a estos trabajos y como consecuencia de la prospección realizada se obtuvo un material de *Populus alba* que, ha sido para esta especie, el inicio de la colección. Igualmente y como consecuencia de la actividad de los mejoradores, en el SIA-DGA de Zaragoza ya se dispone de un material de *P. nigra* sobre el que está previsto realizar diferentes estudios isoenzimáticos para el estudio de su variación e identificación.

P. alba: Existe material en conservación y sobre el que se han realizado diferentes trabajos de seguimiento en vivero, trabajos de selección respecto al carácter reproducción vegetativa, y estudios de variación y caracterización isoenzimática.

P. nigra: Existe un trabajo de prospección y recolección iniciado en Navarra y se ha iniciado el trabajo de prospección en Castilla León.

P. tremula: Dada la dificultad de propagación de esta especie se ha puesto a punto la técnica de propagación in vitro de brotes de raíz, y se han iniciado los trabajos de prospección y recolección en la Comunidad de Castilla-León, en los Montes de Valsain y Navarra.

4. BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA MEJORA GENÉTICA.

Objetivos

- Micropropagación en *Populus*.
- Conservación "in vitro" de los clones micropropagados.
- Identificación de clones mediante marcadores moleculares en *Populus*.
- Obtención de haploides en *Quercus suber* L.
- Embriogénesis somática en *Quercus*.

Especies: *Populus* sp, *Quercus* sp.

Líneas de trabajo:

- Propagación clonal de árboles adultos por cultivo "in vitro" de *Populus tremula* y *Populus alba*.
- Estudio de marcadores moleculares (RAPDs) para la identificación de clones en el género *Populus*.
- Inducción de embriogénesis gamética a partir de anteras para la obtención de plantas haploides en *Quercus suber*.
- Embriogénesis somática en *Quercus canariensis* y *Quercus suber*.

Estado actual:

Populus tremula: Se continúan los trabajos de micropropagación, iniciados en el laboratorio INIA-CIFOR en 1990. Las vitroplantas obtenidas de individuos sobresalientes adultos de varias procedencias han tenido una capacidad de enraizamiento y aclimatación cercana al 95%. De manera escalonada se han mantenido tres años en vivero y a continuación se han llevado a monte.

Actualmente hay establecidas 9 parcelas: 6 en el Monte de Valsain desde hace dos años, con una supervivencia cercana al 90%; 3 en el Puerto de Canencia, en Torremocha del Jarama y en Riaño, instaladas el año pasado. De todas ellas se están tomando datos.

En la cámara de cultivo se continúan micropropagando clones de otras procedencias.

Populus alba: especie con cierta dificultad en la propagación vegetativa, se está llevando a cabo también propagación "in vitro" con algunos clones.

Recientemente se ha iniciado un programa de aplicación de marcadores moleculares (RAPDs) a la identificación de clones del género *Populus* pertenecientes a rodales diferentes y micropropagados "in vitro" que facilita la tarea de la clonación, permitiendo conocer visualmente la huella de la identificación genética.

Quercus suber: Es la primera vez que se consiguen haploides en esta especie. Se colectan los amentos durante la etapa de floración, de Mayo a Junio. Las anteras una vez esterilizadas se depositan en el medio de cultivo adecuado y se someten a stress de temperatura. Previamente mediante *squash* se observa el desarrollo de la formación del polen. Cuando la microspora está en la fase binucleada es el momento adecuado para la interrupción formandose un callo embriogénico en vez de un grano de polen. La embriogénesis gamética se desarrolla en distintos medios de cultivo y madura y se somete a desecación para la germinación en una planta. La haploidía se ha confirmado mediante conteo cromosómico y citómetro de flujo.

Quercus canariensis y *Quercus suber*: Se continua la investigación en la optimización de los procesos para la regeneración de planta a partir de embriogénesis somática.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBA, N.; 1992. *Mejora genética de Populus alba*. XIX Sesión de la Comisión Internacional del Alamo.
- ALBA, N. & GONZÁLEZ, L.; Mejora genética de *Populus alba*: estudios previos. *Actas del Congreso Forestal Español de Lourizán*. Tomo II: 77-81.
- ALBA, N.; 1994. Conservation of forest genetic resources of *Populus* in Spain. *Reunión del grupo de mejora de chopos de la Comisión Internacional del Alamo*. FAO. Turquía.
- AGÚNDEZ, D., ALIA, R., DÍEZ, R., GIL, L. & PARDOS, J.A.; Variación de *Pinus sylvestris* L. en España: Características de Piñas y piñones. *Investigación Agraria*. Serie Sistemas y Recursos Forestales. 1(2): 151-162, (1992).
- AGÚNDEZ, D., ALÍA, R., GIL, L., J.A. PARDOS, & STEPHAN, R.; Ensayo de procedencias españolas y alemanas de *Pinus sylvestris* L.: comportamiento en vivero y supervivencia en monte. *Ecología* 8: 245-257.
- AGÚNDEZ, D., GALERA, R., MARTÍN, S. & DÍEZ, R.; 1992. Emergencia, supervivencia y crecimiento de 16 procedencias de *Pinus sylvestris* L. en vivero. *Montes* 28: 56-58.
- ALÍA, R., GIL L., PARDOS J.A. & CATALAN, G.; Interacción procedencia-edad en 52 procedencias de *Pinus pinaster* Ait. en España. *Investigación Agraria*. Serie Sistemas y Recursos Forestales. No. 0. pp: 11-25 (1991).
- ALÍA, R. & GIL, L.; Ritmo anual de crecimiento en circunferencia de 15 procedencias de *Pinus pinaster* Ait. *Montes*. 28: 34-36. (1992).
- ALÍA, R., AGÚNDEZ, D., DÍEZ, R., MARTÍN, S. & L. GIL; 1994. Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) Breeding program in Spain. *Investigación Agraria*. Número especial. 3, 181-191.
- BUENO, M.A, ALBA, N., GRAU J.M., & MANZANERA, J.A.; 1995. Some strategies for preservation of forest genetic resources. *Diversity*. Vol. 2 nº 1-2: 87-88.
- BUENO, M.A, ASTORGA, R. & MANZANERA, J.A.; 1992. Micropropagación de *Populus alba* "Siberia Extremeña" a partir de amentos. *Investigación Agraria*. Serie Sistemas y Recursos Forestales. Vol 1 (2): 163-171.
- BUENO, M.A, ASTORGA, R. & MANZANERA, J.A.; 1992. Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber* L. *Physiologia Plantarum* 85: 30-34.
- BUENO, M.A, SÁNCHEZ, N., MANZANERA, J.A. & GRAU, J.M.; 1996. Propagación "in vitro" de *Populus tremula* L: Una alternativa para la reforestación. *ITEA* vol extra nº 17 pg 341-350.
- BUENO, M.A, GÓMEZ, A., VICENTE, O. & MANZANERA, J.A.; 1996. Stability in ploidy level during somatic embryogenesis in *Quercus canariensis* L. Somatic Cell Genetics. *Forestry Sciences*. Kluwer Academic Publishers. (in press).
- BUENO, M.A, GÓMEZ, A., BOSCAIU, M.,

MANZANERA J.A. & VICENTE, O.; 1996. *Stress-induced formation of haploid plants through anther culture in cork oak (Quercus suber L.)*. (in prep.)

GALERA PERAL, R.; 1993. *Variación morfológica de Pinus sylvestris L en España: Caracteres de acículas, piñas y piñones*. Tesis doctoral. UPM-ETSI Montes. Madrid. 154 pp + anexos.

SIERRA DE GRADO, R.; 1994. *Mejora genéti-*

ca de Pinus pinaster Aiton de la procedencia Sierra de Gredos. Caracteres de crecimiento y forma. Tesis doctoral. UPM-ETSI Montes. Madrid. 191 pp.

CATALÁN, G. (COORD), GIL, P., GALERA, R., MARTÍN S., AGÚNDEZ, D. & ALÍA R.; 1991. *Las regiones de procedencia de Pinus sylvestris L. y Pinus nigra Arn subsp. salzmanii (Dunal) Franco en España*. ICONA. MADRID. 31p + 31 fichas.