

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOCE POBLACIONES NATURALES DE *PINUS PINASTER* CON MARCADORES ISOENZIMÁTICOS

M. L. Salvador*, M.T. Seisdedos**, R. Alia** & L. Gil*

*Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética Forestal-E.T.S.I. de Montes. MADRID

**Área de Selvicultura y Mejora. CIFOR-INIA. APDO. 8111. 28080 - MADRID

RESUMEN

Se analizan 12 poblaciones naturales ibéricas de *Pinus pinaster* por marcadores isoenzimáticos. Los resultados obtenidos con 21 loci indican un nivel de heterozigosidad alto ($H_e=0.120$), un porcentaje de loci polimórficos del 57.5% (criterio del 99%), y un índice de variación entre poblaciones del 5.5%. Se discute la variación genética existente entre estas 12 poblaciones a través de la distancia genética de NEI.

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Pinus pinaster* (Ait.) es un ejemplo importante entre las coníferas ibéricas de la diversidad genética existente entre sus poblaciones. Con el centro de difusión en nuestro país (RIKLY 1943, Destremau & al. 1982), la especie presenta una gran variabilidad que ha sido demostrada a través de cinco ensayos de procedencias en el centro de España (ALÍA 1989).

Las isoenzimas del tejido de reserva del piñón (megagametofito), empleadas como marcadores genéticos, se han demostrado como una herramienta de gran utilidad en genética forestal para estudiar la estructura genética de las poblaciones, identificación de genotipos y estudiar las pautas de variación

de las especies. Este es resultado de que la mayoría de las especies forestales presenten niveles de variación elevados en sus loci (ADAMS, 1983).

Dentro de este marco el objetivo del trabajo se centra en estudiar la estructura genética de poblaciones ibéricas de *Pinus pinaster*, señalar las singularidades de ciertas poblaciones e interpretar la variación geográfica de la especie.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal que se utiliza es el tejido de reserva de las semillas germinadas de *Pinus pinaster*.

La elección de las doce poblaciones analizadas se hizo de manera que toda el área de distribución natural de la especie en la península estuviese representada, incluyendo una población de Portugal, Leiria (tabla 1 y gráfico 1).

Las poblaciones se han estudiado con veintiún loci isoenzimáticos como marcadores genéticos. La metodología utilizada es un compendio de las técnicas de electroforesis sobre geles de almidón aplicadas a especies forestales de CONKLE (1982), TANKSLEY & ORTON (1983) y CHELIAK & PITEL (1984).

Tabla 1. Zonas de recogida de *Pinus pinaster*. (1:50.000)

| Código | Población | Provincia | n° árboles | Hoja n° | Altitud (m) | Latitud | Longitud |
|--------|------------------------|-------------|------------|---------|-------------|--------------|-------------|
| AB | 1-Riopar | Albacete | 78 | 866 | 1200 | 38°28'05''N | 2°27'31''W |
| AL | 2-Oria | Almería | 80 | 973 | 1300 | 37°30'49''N | 2°20'11''W |
| CR | 3-Fuencaliente | Ciudad Real | 80 | 860 | 800-1000 | 38°25'05'' N | 4°11'53'' W |
| CS1 | 4-Benicasim | Castellón | 82 | 616 | 150-500 | 40°05'04''N | 0°00'46''E |
| CU2 | 5-Boniches | Cuenca | 82 | 636 | 1000-1150 | 39°59'18''N | 1°39'03''W |
| GR | 6-La Peza | Granada | 80 | 1010 | 1400 | 37°16'26''N | 3°22'10''W |
| LE | 7-Tabuyo del Monte | León | 80 | 230 | 1000-1100 | 42°18'13''N | 6°13'25''W |
| MA1 | 8-Estepona | Málaga | 83 | 1065 | 500 | 36°31'05''N | 5°07'11''W |
| PO | 9-S.Cipriano Ribarteme | Pontevedra | 85 | 262 | 300 | 42°07'06'' N | 8°21'52'' W |
| PRT | 10-Leiria (Portugal) | Leiria | 140 | - | 200 | 40°00'00'' N | 9°00'00'' W |
| V | 11-Cortes de Pallás | Valencia | 79 | 745 | 850-950 | 39°10'48''N | 0°56'41''W |
| VA | 12-Iscar | Valladolid | 80 | 429 | 760 | 41°20'05''N | 4°31'11''W |

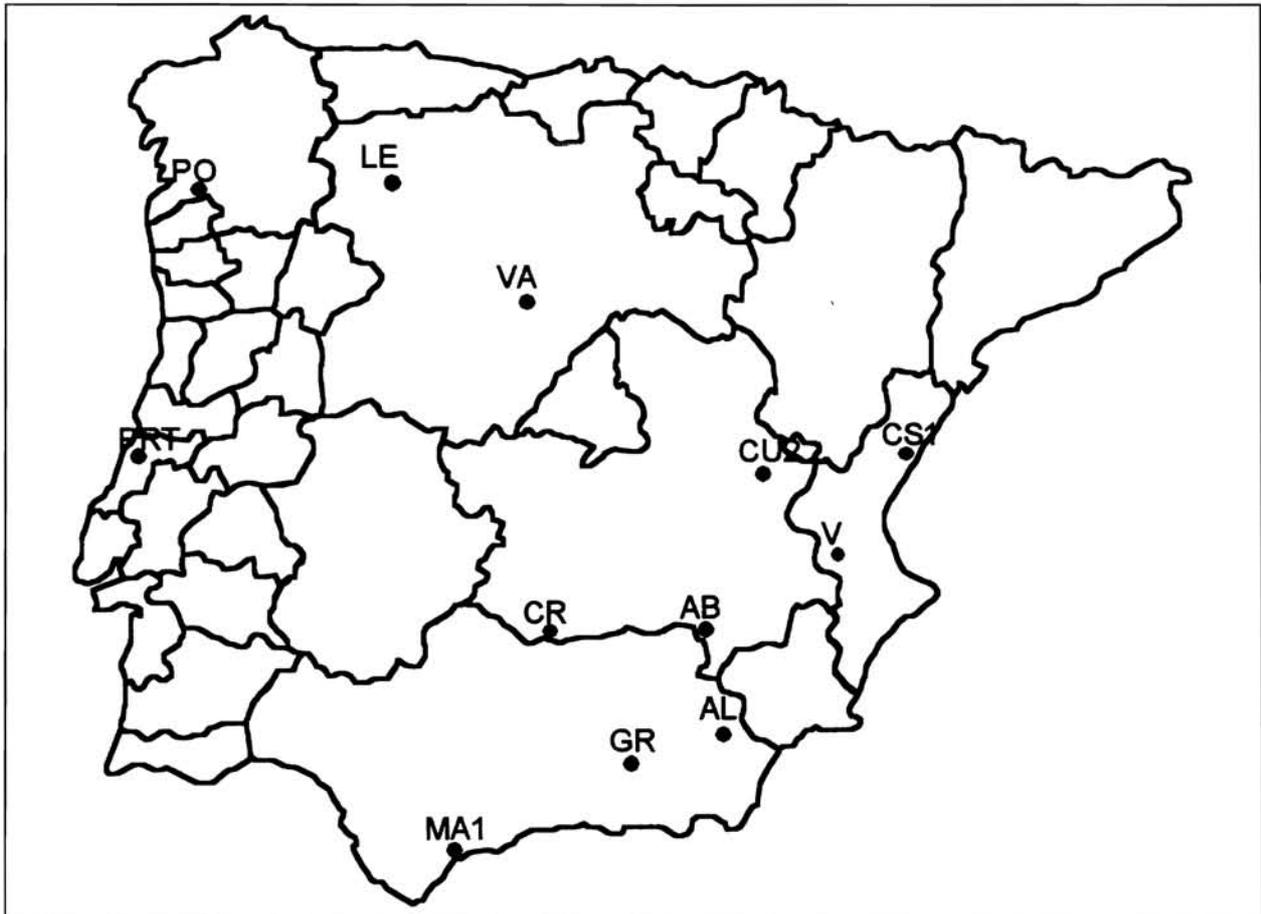
Figura 1. Situación geográfica de las doce procedencias de *Pinus pinaster*.

Tabla 2. Porcentaje de loci polimórficos -criterios del 99 y 95%- (Plp99, Plp95), número medio de alelos por locus -criterios del 99 y 95%- (Nal99, Nal95), número efectivo de alelos por locus (Ne) y heterozigosidad esperada por población (He).

| POBLACIÓN | Plp99 | Plp95 | Nal99 | Nal95 | Ne | He |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| AB | 0.667** | 0.381 | 1.857 | 1.428 | 1.163 | 0.140 |
| AL | 0.529 | 0.381 | 1.619 | 1.476 | 1.114* | 0.103* |
| CR | 0.476* | 0.381 | 1.524* | 1.381 | 1.152 | 0.132 |
| CS1 | 0.571 | 0.333 | 1.809 | 1.428 | 1.152 | 0.132 |
| CU2 | 0.571 | 0.333 | 1.762 | 1.476 | 1.153 | 0.133 |
| GR | 0.619 | 0.333 | 1.857 | 1.428 | 1.149 | 0.130 |
| LE | 0.529 | 0.333 | 1.667 | 1.428 | 1.138 | 0.122 |
| MA1 | 0.571 | 0.428 | 1.714 | 1.476 | 1.178** | 0.151** |
| PO | 0.571 | 0.333 | 1.714 | 1.381 | 1.136 | 0.120 |
| PRT | 0.619 | 0.476** | 1.714 | 1.524 | 1.157 | 0.136 |
| V | 0.619 | 0.428 | 1.952** | 1.667** | 1.173 | 0.147 |
| VA | 0.571 | 0.286* | 1.762 | 1.333* | 1.148 | 0.129 |
| Media | 0.575 | 0.369 | 1.746 | 1.452 | 1.151 | 0.120 |

(**)Valor máximo, (*) valor mínimo.

A partir de las frecuencias alélicas se han obtenido los siguientes parámetros: Porcentaje de loci polimórficos -criterios del 99 y 95%- (Plp99, Plp95), número medio de alelos por locus -criterios del 99 y 95%- (Nal99, Nal95), número efectivo de alelos por locus (Ne) y heterozigosidad esperada por población (He). Asimismo, para cada loci se han obtenido los parámetros de diversidad de Nei, descomponiendo la variación total (HT) en la correspondiente a la variación entre poblaciones (DST) y dentro de poblaciones (HS). A partir de estos valores se ha calculado el cociente de Hs Diversidad genética (GST=DST/HS) y el número de migrantes (Nm).

Se han calculado los valores de distancias genéticas de NEI (1972), a partir de los cuales se ha obtenido un dendrograma utilizando el método UPGMA de SNEATH & SOKAL (1973).

Los análisis se han efectuado con el programa Geles (ALÍA, 1996).

3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En la Tabla 2 se recogen diversos parámetros de diversidad de cada una de las poblaciones analizadas, obtenidos a partir de las frecuencias alélicas en los 21 loci analizados. Estos resultados suponen que las poblaciones están en equilibrio panmítico. Si se los compara con los de otras especies del género *Pinus* (*halepensis*, *nigra* y *sylvestris*) están en el mismo orden de magnitud, mostrándose el *pinaster* como una especie muy variable.

Los resultados de la heterozigosidad esperada (He) y del número efectivo de alelos por locus (Ne) señalan a Estepona (MA1) como la que posee mayor variación y a Oria (AL) como la menos variable para estos

mismos parámetros. De la misma manera, Fuencialiente (CR) se muestra muy poco variable en el porcentaje de loci polimórficos (Plp99) y riqueza alélica (Nal99).

El análisis de la diversidad genética inter-poblacional se expone en la tabla 3. Se

observa que los valores de H_T , H_S , D_{ST} y G_{ST} varían considerablemente según el locus de que se trate; el valor del coeficiente de diversidad genética (G_{ST}), alcanza su valor máximo (0,137) en el locus Lap-2. El valor medio para este parámetro es de 0,05 (tabla 3) y es un valor bajo desde el punto de

Tabla 3. Distribución de la diversidad genética en veintiún loci enzimáticos, obtenida a través del análisis de doce poblaciones de *Pinus pinaster*.

| Locus | H_T | H_S | D_{ST} | G_{ST} | N_m |
|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|
| ACO | 0.088 | 0.083 | 0.004 | 0.049 | 4.800 |
| Got-1 | 0.076 | 0.071 | 0.005 | 0.066 | 3.533 |
| Got-2 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | - |
| HK | 0.529 | 0.486 | 0.042 | 0.081 | 2.847 |
| Idh-1 | 0.066 | 0.062 | 0.004 | 0.062 | 3.740 |
| Idh-2 | 0.099 | 0.093 | 0.006 | 0.061 | 3.832 |
| Lap-1 | 0.129 | 0.123 | 0.005 | 0.046 | 5.160 |
| Lap-2 | 0.264 | 0.228 | 0.036 | 0.137 | 1.566 |
| Lap-3 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | - |
| Mdh-1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | - |
| Mdh-2 | 0.313 | 0.305 | 0.008 | 0.026 | 9.339 |
| Mdh-3 | 0.072 | 0.071 | 0.001 | 0.018 | 13.617 |
| Mdh-4 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | - |
| 6Pgd-1 | 0.288 | 0.278 | 0.010 | 0.035 | 6.876 |
| 6Pgd-2 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | - |
| 6Pgd-3 | 0.014 | 0.013 | 0.001 | 0.045 | 5.218 |
| Pgi-1 | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.011 | 21.545 |
| Pgi-2 | 0.265 | 0.247 | 0.017 | 0.065 | 3.539 |
| PGM | 0.049 | 0.048 | 0.000 | 0.005 | 47.501 |
| Skdh-1 | 0.660 | 0.612 | 0.048 | 0.073 | 3.148 |
| Skdh-2 | 0.026 | 0.025 | 0.001 | 0.029 | 8.295 |
| Media | 0.140 | 0.131 | 0.009 | 0.055(a) | 4.664(b) |

H_T = diversidad genética total
 H_S = diversidad dentro de las poblaciones
 D_{ST} = diversidad entre poblaciones
 G_{ST} = coeficiente de diversidad genética
 N_m = número de migrantes

Tabla 4. Matriz de distancias genéticas calculadas a partir de la fórmula de Nei (1972).

| | AB | AL | CR | CS1 | CU2 | GR | LE | MA1 | PO | PRT | V | VA |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| AB | 0.000 | | | | | | | | | | | |
| AL | 0.010 | 0.000 | | | | | | | | | | |
| CR | 0.011 | 0.017 | 0.000 | | | | | | | | | |
| CS1 | 0.017 | 0.014 | 0.020 | 0.000 | | | | | | | | |
| CU2 | 0.012 | 0.010 | 0.013 | 0.015 | 0.000 | | | | | | | |
| GR | 0.005 | 0.010 | 0.023 | 0.015 | 0.017 | 0.000 | | | | | | |
| LE | 0.011 | 0.007 | 0.011 | 0.007 | 0.009 | 0.015 | 0.000 | | | | | |
| MA1 | 0.007 | 0.011 | 0.024 | 0.024 | 0.015 | 0.006 | 0.021 | 0.000 | | | | |
| PO | 0.019 | 0.019 | 0.015 | 0.006 | 0.019 | 0.022 | 0.007 | 0.031 | 0.000 | | | |
| PRT | 0.014 | 0.009 | 0.013 | 0.004 | 0.012 | 0.014 | 0.004 | 0.021 | 0.004 | 0.000 | | |
| V | 0.005 | 0.006 | 0.010 | 0.008 | 0.007 | 0.008 | 0.005 | 0.011 | 0.011 | 0.008 | 0.000 | |
| VA | 0.010 | 0.008 | 0.013 | 0.005 | 0.009 | 0.012 | 0.001 | 0.019 | 0.007 | 0.003 | 0.005 | 0.000 |

vista que indica que el 5% de la variación total corresponde a la diferenciación entre poblaciones. Ésta es un situación típica de

las coníferas que raramente exceden el 10% en los valores de *Gst* debido a una ausencia de barreras al flujo génico (HAMRICK & *al*

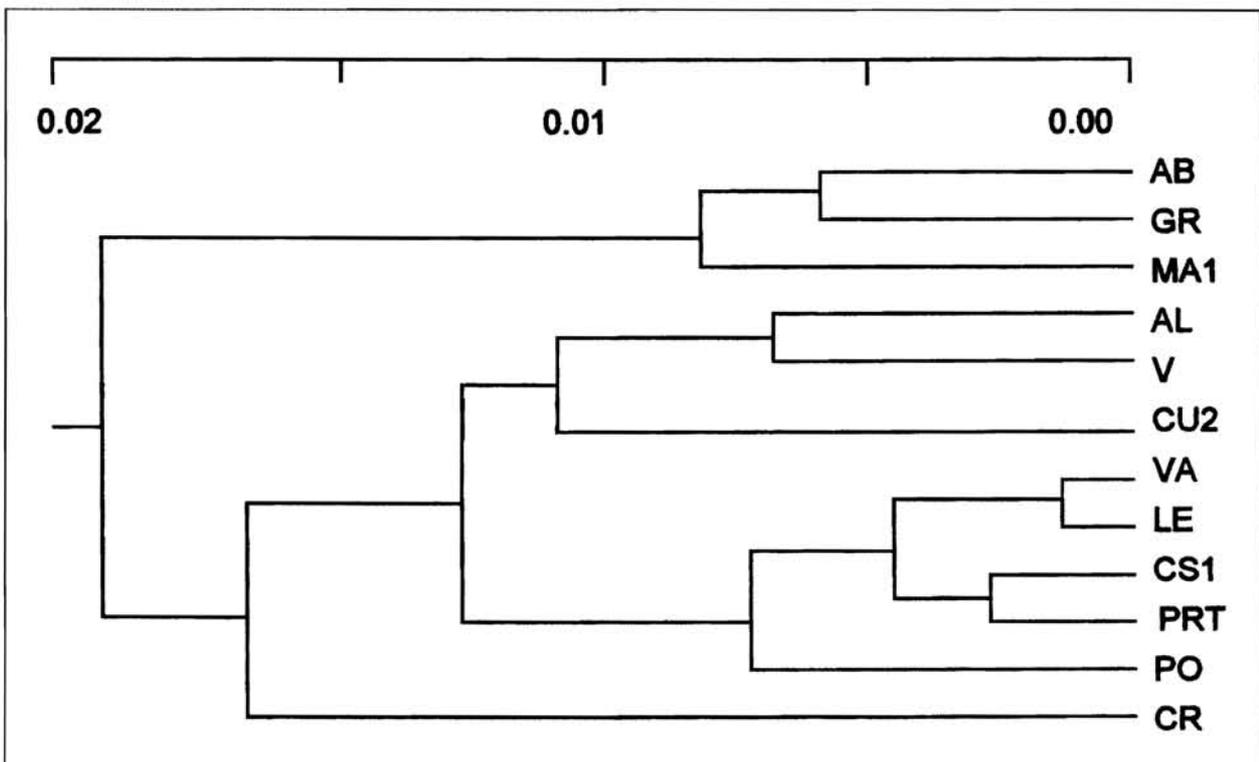


Figura 2. Dendrograma construido con el método UPGMA, a partir de la matriz de distancias.

1979). En ese orden de resultados, el número de migrantes medio del conjunto de poblaciones es de $N_m=4,66$, un valor mayor de uno indica que el flujo de genes vence los efectos de la deriva genética y no se producirían diferenciaciones locales.

A partir de los valores de distancias genéticas (tabla 4) y utilizando el método UPGMA de SNEATH & SOKAL (1973) se calcula el dendrograma de *Pinus pinaster* (gráfico 2), del cual se extraen las siguientes observaciones:

- 1) las poblaciones atlánticas de *Pinus pinaster* (PRT, PO, LE y VA) y las poblaciones mediterráneas (CU2, V y AL) se reúnen en un solo grupo.
- 2) la población de Fuencaliente (CR) se une a este primer grupo.
- 3) las poblaciones andaluzas (GR y MA1) y Oria (AB) están estrechamente relacionadas entre sí y genéticamente distantes de las otras.

Estos resultados concuerdan con los trabajos de diversos autores que han usado distintos marcadores para diferenciar poblaciones de *Pinaster* (BARADAT & MARPEAU 1988; ALLONA & al 1996). En ellos postulan la existencia de poblaciones atlánticas, perimediterráneas y magrebíes. BARADAT & MARPEAU (1988) sugieren que las poblaciones cercanas al Estrecho de Gibraltar se han convertido en poblaciones relicto que han sobrevivido a diferentes episodios de glaciación y son fuente de variación, como podría ser el caso de Estepona (MA1) con unas características de variación destacadas.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, W.T.; 1983. *Application of isozymes in tree breeding*. En: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*. S.D. Tanksley and T.J. Orton (Editores). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. p.:406-416.
- ALÍA, R.; 1989. *Mejora genética de Pinus pinaster (Ait.): Estudio de procedencias*. Tesis Doctoral. ETSI Montes, UPM. 205 p.
- ALLONA, I., SAIZ-OMEÑACA, J.A., CASADO, R. & ARAGONCILLO, C.; 1996. Megagametophyte salt-soluble proteins as genetics markers in *Pinus pinaster* Ait. *Silvae Genetica* 45: 21-24.
- BARADAT, PH. & MARPEAU-BEZARD, A.; 1988. *Le pin maritime. Biologie et génétique des terpènes pour la connaissance et l'amélioration de l'espèce*. Thèse doctorae d'Etat, Université Bordeaux-I, 551p.
- CHELIAK, W.M. & PITEL J.A.; 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report. Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service. *Agriculture Canada*.
- CONKLE, M.T., HODGSKISS, P.D., NUNNALLY, L.B. & HUNTER, S.C.; 1982. *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. Gen. Tech. Rep. PSW-64. Berkeley, CA: Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture ; 18p.
- DESTREMAU, D.X., ALAZARD, P. & CHAPERON, H.; 1982. Monographie Génétique de *Pinus pinaster*. *Annales Forestales. Zagreb*. 9/4. p: 125-250.
- HAMRICK, J.L., LINHART, Y.B. & MITTON, J.B. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10: 173-200.
- NEI, M.; 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.*, 106:283-292.
- RIKLY, M.; 1943. Das Pflanzenkleid der Mittelmerländer. Vol I. *Huber. Vern.*
- SNEATH, P.H. & SOKAL, R.R.; 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
- TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J.; 1983. *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A*. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. 516 p.