

CONSERVACION EX SITU DE *POPULUS NIGRA* L. EN ESPAÑA : CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E ISOENZIMÁTICA DE LAS COLECCIONES ESTABLECIDAS

Maestro C*, Alba N** Agúndez D**

*Unidad Recursos Forestales. Servicio de Investigación Agroalimentaria, D.G.A. Apdo.727. 50080 Zaragoza. cmaestro@aragob.es

**Dpto.de Mejora Genética y Biotecnología , CIFOR-INIA. Apdo. 8111. 28080 Madrid.

RESUMEN

La colección ex situ de *P. nigra* en España, constituida actualmente por 150 clones procedentes de las cuencas del Ebro, Duero y Tajo, está siendo objeto de estudios orientados a la evaluación de la variación genética de la especie a nivel nacional y europeo. Se presentan los resultados referidos a la caracterización morfológica e isoenzimática de 100 de estos clones. A nivel morfológico ,se aprecian diferencias cuantitativas en el tamaño de las hojas y peciolo entre las distintas zonas de muestreo para *P. nigra* mientras que los mismos tipos de hojas, en cuanto a forma, están presentes en cada una de las cuencas. El estudio de isoenzimas revela un bajo nivel de diversidad genética en la colección de *P. nigra*. La distancia genética estimada entre los genotipos del Ebro y del Duero-Tajo revela una gran similitud entre las poblaciones estudiadas.

PALABRAS CLAVE: *Populus nigra*, conservación ex situ, isoenzimas, caracterización morfológica, diversidad genética.

SUMMARY

The Spanish ex situ collection of *Populus nigra* is composed, currently, by 150 clones from the three main river basins in Spain: Ebro, Duero and Tajo. Studies on genetic variation of *P. nigra* are being carried out at national and European level. Results of morphological and isozyme characterisation of 100 clones from this collection are presented. Morphological traits show quantitative differences for leaf size in *P. nigra* coming of different river basins. These differences do not exits for leaf shape. The isozyme analysis reveals a low level of genetic diversity in this collection. Genetic distance shows a great similarity between the populations analysed.

KEY WORDS: *Populus nigra*, ex situ conservation, isozymes, morphological characterization, genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

Populus nigra es una especie autóctona de nuestros bosques de ribera. Tiene una gran importancia ecológica en su hábitat natural debido a su alta capacidad colonizadora (especie pionera), a través de semilla o por propagación vegetativa, de áreas abiertas e inestables que posibilitan , cuando las condiciones son más estables, el establecimiento del resto de especies que conforman el bosque ripario. Su regeneración natural está fuertemente asociada a la dinámica fluvial.

Además de su interés como especie nativa, *P. nigra* posee un interés económico como elemento clave en el desarrollo presente y futuro de la populicultura por su calidad de genitor masculino para la obtención de híbridos euramericanos. También es utilizada en plantaciones en algunos países como Turquía donde es ampliamente cultivado como especie pura (TUNCTANER, 1995). Debido a su gran plasticidad es utilizada en programas de recuperación de suelos en zonas afectadas por contaminación industrial (LEFEVRE *et al*, 1998). No obstante, la utilización más extendida de esta especie es como genitor masculino en los programas de mejora para la obtención de híbridos euramericanos. Estos híbridos integran unas buenas características culturales del genitor femenino *P. deltoides* con la gran capacidad de adaptación a las diversas condiciones edáficas y climáticas que incorpora el genitor masculino *P. nigra*. El 63 % de los cultivares de chopo registrados por el IPC (International Poplar Commission), incluyen a *P. nigra* como ancestro (VIART, 1992).

P. nigra es una de las especies forestales amenazadas en Europa (ARBEZ, 1993; CAGELLI & LEFEVRE, 1994; WHITE, 1993; DE VRIES, 1995; TABBUSH, 1996). Las principales causas que han originado este declive son principalmente las alteraciones sufridas en su hábitat natural debido a la actividad humana así como a la polución genética ocasionada por cruzamientos espontáneos con los híbridos euramericanos cultivados.

Actualmente existen programas nacionales para su conservación en la mayor parte de los países europeos incluido España. Su objetivo es el de preservar el máximo de diversidad genética de *P. nigra* que asegure: un potencial para la adaptación natural de la especie, un material de base autóctono que garantice el desarrollo de futuros programas de mejora genética así como la posibilidad de su utilización directa. Una de las estrategias de conservación consiste en el establecimiento de colecciones *ex situ*.

La mayor parte de los países disponen de colecciones *ex situ* establecidas como apoyo a los programas de mejora de *Populus* (BISOFFI *et al*, 1987, LEFÈVRE *et al*, 1998). Estas colecciones son mantenidas en campo como parcelas de cepas madre renovadas cada 6-8 años y como huertos clonales de árboles adultos (conservación a medio plazo) según las normas establecidas por el grupo EUFORGEN (DE VRIES, 1996). Este es el caso de la colección de genotipos de *P. nigra* del SIA-DGA establecida entre 1985 y 1987 en el marco de la realización del programa de cruzamientos controlados (*P. deltoides* x *P. nigra*) (PADRÓ, 1987).

Esta colección está constituida por 110 genotipos procedentes de 34 localizaciones diferentes situadas en las márgenes del río Ebro y de algunos de sus afluentes. Así mismo en el CIFOR-INIA, se inició en el año 1995 una colección de *P. nigra* procedente, principalmente, de las Cuencas del Duero y Tajo. Actualmente se ha establecido una colección conjunta SIA-CIFOR (150 genotipos), mantenida en una doble ubicación (Madrid, Zaragoza) para facilitar los trabajos de caracterización y conservación. Además de un uso directo, estas colecciones constituyen un excelente material de trabajo para el estudio de la variación genética de la especie.

Un enfoque usual en el estudio de la variación genética incluye el análisis de caracteres fenotípicos que informan sobre la variación adaptativa (sometida a una presión de selección) y análisis con marcadores bioquímicos y moleculares (variación

neutra) que aportan un estudio directo del genoma. En el género *Populus*, el análisis de isoenzimas ha resultado eficaz tanto para la caracterización de clones (RAJORA, 1989a), la diferenciación entre especies (RAJORA, 1989b), así como en estudios de variación genética de poblaciones (CHELIAK & DANCİK, 1982; RAJORA, 1989b; LEGIONNET & LEFEVRE, 1996; ALBA & AGÚNDEZ, 2000).

La caracterización y evaluación de la variación genética de una población es una tarea importante puesto que la diversidad genética en las poblaciones y de las especies determina la tasa de adaptación evolutiva así como la amplitud de respuesta en la mejora tradicional (PEREZ DE LA VEGA, 1993). Además, esta fase es necesaria para evaluar la eficacia de las actividades de conservación, identificar zonas de especial interés así como para definir las mejores estrategias de conservación y gestión de los recursos a largo plazo. Con este objetivo se ha iniciado el estudio de la variación genética contenida en esta colección de *P. nigra*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han caracterizado 100 clones de *P. nigra*: 75 del Ebro, 25 del Duero y Tajo.

Caracterización morfológica

El estudio se ha realizado sobre plantas de un año en ensayo de vivero (parcelas del SIA-DGA en Montañana, Zaragoza) con un diseño en bloques al azar con seis repeticiones y una planta por repetición. Las hojas muestreadas (6 hojas por clon) se corresponden con la 5ª hoja verdadera desde el ápice. Para la caracterización morfológica de los clones se ha utilizado el descriptor establecido por EUFORGEN para la especie *Populus nigra* (VAN SLYCKEN, 1996).

Caracteres foliares a estudio:

LL: Longitud del nervio principal; LW: Anchura máxima; LR: Relación entre longitud y anchura máxima; PL: Longitud del peciolo; PR: Relación entre la longitud del peciolo / longitud de la hoja; HP: Vellosoidad del envés foliar e HI: Intensidad de la vellosoidad; BS: Forma de la base (clases 1 a 11); JS: Forma de la inserción con el peciolo (clases 1 a 6); TS: Forma del ápice (clases 1 a 9).

Las medidas se han realizado sobre fotografías digitales con ayuda del programa Photoshop. Sobre las variables cuantitativas (tamaño de las hojas) se ha realizado un análisis multivariante: Análisis de Componentes Principales (ACP). La variación de la forma de la hoja se ha evaluado a partir de las distribuciones de frecuencias de las clases cualitativas definidas para cada carácter.

Caracterización isoenzimática

Se ha utilizado como técnica de base la electroforesis de enzimas en gel de almidón siguiendo los protocolos establecidos en el proyecto EUROPOP. Las extracciones se han realizado sobre hojas jóvenes recolectadas de plantas mantenidas en invernadero. Se han analizado 7 sistemas enzimáticos: PGI, PGM, LAP, 6PGD, MDH, IDH y MNR.

Se han estimado los parámetros de diversidad genética: porcentaje de loci polimórficos, número medio de alelos por loci polimórfico, heterocigosidad esperada

bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg (He) (Nei 1978), heterocigosidad observada (Ho). La distancia e identidad genética se estimó según el método de Nei (1978). Para el cálculo de los parámetros genéticos se han utilizado los programas BIOSYS-1 v1.7 (SWOFFORD & SELANDER, 1989) y PopGene3.6.

RESULTADOS

Caracteres morfológicos cuantitativos

La tabla 1 presenta los parámetros descriptivos para los caracteres LL, LW, PL, LR y PR para cada zona. Los coeficientes de variación de los tres caracteres LL, LW y PL son elevados en las colecciones del Ebro y Duero con respecto al Tajo, en particular para la longitud del peciolo. En las tres zonas la anchura es superior a la longitud. Aparece una gradación, en cuanto a tamaño de la hoja, entre las tres zonas siendo en el Tajo donde *P. nigra* presenta hojas de mayor tamaño mientras que en el valle del Ebro, *P. nigra* se caracteriza por un tamaño menor de la hoja. El Duero ocupa una posición intermedia.

Tabla 1. Caracterización morfométrica (mm) de las hojas de *P. nigra* de la colección ex situ. LL: Longitud del nervio principal; LW: Anchura máxima; LR: Relación entre longitud y anchura máxima; PL: Longitud del peciolo; PR: Relación entre la longitud del peciolo / longitud de la hoja.

Cuenca		LL	LW	PL	LR	PR
Ebro	Media	62.19	67.81	33.73	0.92	0.55
	S.D	12.93	15.86	10.13	0.12	0.09
	C.V	20.7	23.3	30	0.13	0.16
Duero	Media	78.73	89.13	47.11	0.89	0.60
	S.D	14.92	18.18	10.78	0.08	0.08
	C.V	18.2	20.4	22.8	0.09	0.13
Tajo	Media	91.23	105.6	52.36	0.87	0.57
	S.D	10.42	16.57	8.24	0.12	0.07
	C.V	11.4	15.7	15.7	0.13	0.12

S.D. desviación estándar; C.V.: coeficiente de variación

El ACP define dos ejes principales que representan el 83.62 % de la variación total lo cual implica una buena correlación entre la información morfológica. El primer eje (62.25% de la variación total) está explicado por la longitud del peciolo, anchura de la hoja y, en menor medida, por la longitud de la hoja. Las tres variables tienen coordenadas positivas. La longitud del peciolo y la anchura de la hoja aparecen estrechamente correlacionadas. La relación LR y la longitud (LL) son los caracteres con mayor contribución en el 2° eje principal (21.37% de la variación total). La representación de los clones en el plano definido por los dos ejes principales forma una distribución de puntos continua pero con individuos dispersos en las 4 zonas delimitadas por los ejes.

Caracteres morfológicos cualitativos

Existen diversas formas posibles para la base, ápice e inserción con el peciolo en las tres zonas muestreadas (Figura 1). Las distribuciones de las diversas clases cualitativas son muy similares en las tres zonas, sólo se observan variaciones en la frecuencia dentro de las clases.

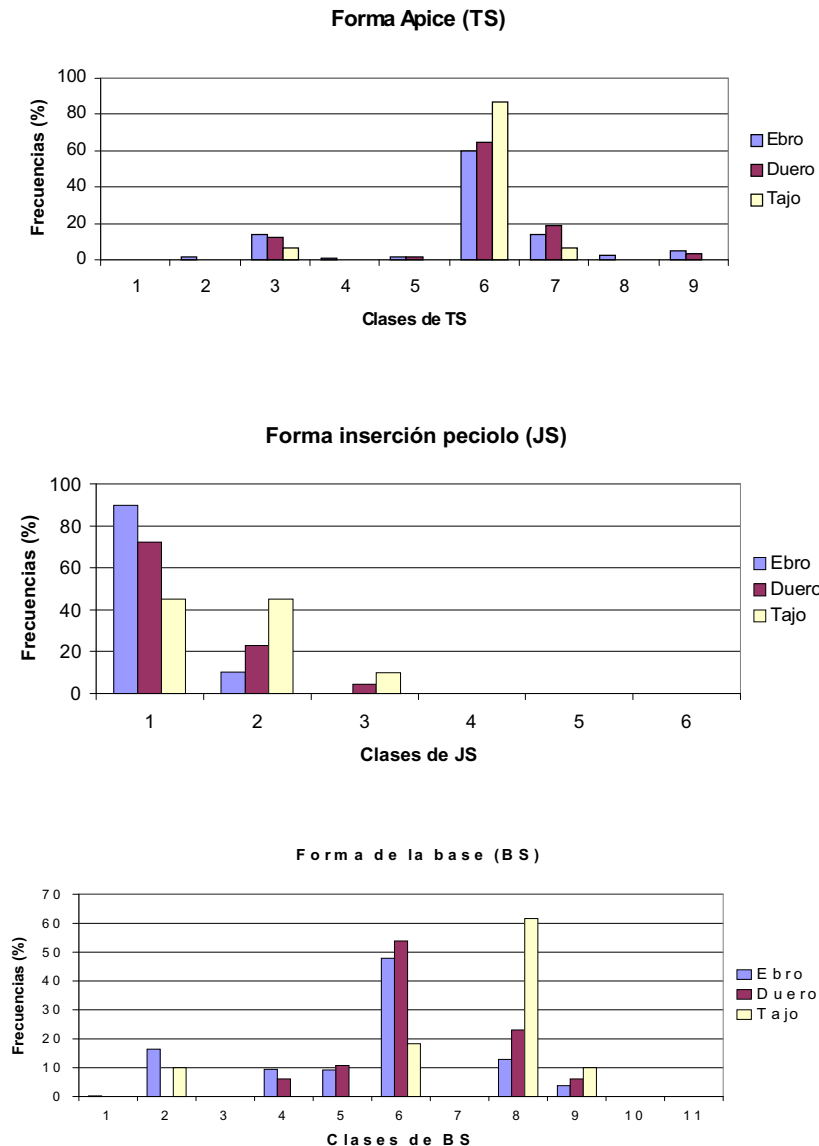


Figura 1. Distribución de frecuencias para los caracteres morfológicos (TS, BS,JS) de las hojas de *P. nigra* procedentes del Ebro, Duero y Tajo.

Las forma más frecuente de la base en el Ebro y Duero es la que corresponde a la clase 6 (forma de cuña amplia y recta) mientras que en la zona del Tajo es más frecuente la clase 8 (recta) aunque la 6 también está presente. En cuanto a la forma del ápice, la máxima representación en todos los grupos es para la clase 6 (estrecho y corto acuminado). Los clones del Ebro presentan un mayor rango de variación para este carácter, posiblemente debido al mayor tamaño de la muestra. En cuanto a la inserción con el peciolo, la clase 1 (recta) es la preponderante entre los clones del Ebro y Duero mientras que en el Tajo las clases 1 y 2 (poco profundo) están

equitativamente representadas. La clase 3 (forma de cuña) no está representada en el Ebro.

Frecuencias alélicas, variación genética y distancia genética.

Se estudiaron un total de 9 loci, codificando para siete sistemas isoenzimáticos, de los cuales 4 son polimórficos (PGI-A, PGM, LAP e IDH-A) con un total de 8 alelos (2 alelos detectados en cada loci polimórfico). El alelo 3 de PGI-2, únicamente se presenta en la colección que procede del Ebro. También destaca la alta frecuencia del alelo 3 de IDH-A en la colección del Duero-Tajo. La heterocigosidad observada fue prácticamente similar a la esperada (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de diversidad genética en la colección ex situ de *P. nigra*

Poblacion	Número medio de alelos por locus polimórfico.	Porcentaje de loci polimórfico	Ho (error)	He (error)
Ebro	1.4	44.4	0.042 (0.028)	0.038 (0.025)
Duero-Tajo	1.2	22.2	0.055 (0.040)	0.055 (0.040)

Las distancias genéticas nos aproximan al conocimiento de la dinámica y evolución de las especies. La distancia genética entre el material procedente del Ebro y el del Duero y Tajo es muy pequeña (0,006) lo cual revela una gran similitud entre zonas.

DISCUSIÓN-CONCLUSIÓN

Este primer estudio sobre la variación isoenzimática de *P. nigra* en la colección española, revela un nivel de diversidad genética muy bajo con respecto a los descritos para otras especies del género (KREMER, 1994). Los resultados en cuanto al número de alelos, porcentaje de loci polimórficos y heterocigosidad media (observada y esperada) son muy bajos comparados con los observados en *P. nigra* en Francia (LEGIONNET & LEFÈVRE, 1996) y con *P. alba* en España (ALBA, 2001). El material analizado presenta un exceso de homocigotos, por lo que parece existir una selección a favor de los mismos. Este primer resultado no está en concordancia con lo descrito para especies con una amplia representación geográfica, intercambio genético alto favorecido por la abundancia de semillas y diseminación del polen y semillas por el viento. Esta posible reducción de la diversidad genética puede haberse producido por la fragmentación y aislamiento de las poblaciones, con repercusiones previsibles en el mantenimiento de las mismas.

En el caso de los caracteres fenotípicos, la variabilidad observada en el tamaño de la hoja y peciolo indican un mayor rango de variación para los caracteres cuantitativos. Esta variación también se observa en los caracteres cualitativos: dentro de cada una de las zonas estudiadas, y para un tamaño medio característico de la hoja, se han observado distintos tipos de hoja atendiendo a la forma. Los clones procedentes de la cuenca del Tajo se muestran diferentes; es especialmente notable los aspectos

relacionados con el tamaño de la hoja, aspectos relevantes desde un punto de vista adaptativo pudiendo estar relacionados con intensidad de la luz, ya que el material procede de zonas encajonadas donde la intensidad luminosa es baja. Otros aspectos morfológicos adaptativos y que concionan la intersección de la luz el angulo de inserción de ramas y forma de la copa, caracteres de los que se ha previsto la caracterización en el segundo año de vivero.

Estos primeros resultados deben de ser completados y contrastados con los resultados obtenidos con otro tipo de marcadores moleculares, altamente eficaces en la detección de polimorfismos, (AFLP's, microsatélites nucleares, cpADN) (HEINZE, 1998) que han sido aplicados también al estudio de esta colección y cuyo análisis está en curso en el desarrollo del proyecto europeo (EUROPOP).

Se observa una mayor variación entre la cuencas, en los caracteres morfológicos en comparación con los isoenzimáticos. Este aspecto pone en evidencia la conveniencia de realizar caracterizaciones morfológicas para la evaluación de los caracteres adaptativos y evaluación de la variación genética.

Aunque en la colección están representadas las tres cuencas de mayor importancia en superficie e influencia socioeconómica en España, sería conveniente ampliar la prospección de *P. nigra* a un mayor ámbito geográfico que nos permita evaluar con mayor precisión el potencial genético actual de esta especie en nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de caracterización morfológica y de análisis isoenzimático se ha realizado con le apoyo del proyecto FAIR5-CT97-3386 "Genetic diversity in river populations of European Black Poplar for evaluation of biodiversity, conservation strategies, nature development and genetic improvement" y del Proyecto INIA RF98-006 "Caracterización, conservación y utilización de recursos genéticos de *Populus nigra* en el Valle Medio del Ebro".

BIBLIOGRAFÍA

ALBA, N., AGÚNDEZ, D., 2000. Characterisation of *Populus alba* L, by isozymes. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales, Vol 9(2): 305-315.

ALBA, N., 2001. Variabilidad genética de *Populus alba* L. Mediante caracteres isoenzimáticos y fenotípicos. Aplicación a la selección y conservación de recursos genéticos. Tesis, U.P.M, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes, Madrid Febrero 2001, 145p.

ARBEZ M. 1993. Conservation of Forest Genetic Resources. Report on the follow-up of the Strasbourg Resolution 1990. Ministerial Conference on the protection of forest in Europe. Helsinki 16-17 June 1993. Ministry of Agriculture and Forestry of Finland Publisher. p.59-64.

BISOFFI, S., GEMIGNANI, G., GRAS, M.A., MAY, S., MUGHINI, G., 1987. Establishment of *Populus nigra* genetic reserves in Italy. *Genetica Agraria* 41: 105-114.

CHELIAK, W.M., DANCİK, B., 1982. Genic diversity of natural populations of a clone-forming tree *Populus tremuloides*. *Can.J. Genet. Cytol.* 24: 611-616.

CAGELLI, L., BISOFFI, S., 1994. Variability of juvenile traits within the Italian collection of *P. nigra* and selection of superior clones. International Poplar Commission. 37th Executive Committee Meeting. Sapanca, Turkey, 3-7 October 1994.

CAGELLI, L., LEFÈVRE, F., 1994. The conservation of *Populus nigra* and gene flow with cultivated poplars in Europe. III Workshop on Conservation of the wild relatives of European cultivated plants. Gibilmanna-Palermo, 21-27 September 1994. 18p.

DE VRIES, S., 1995. *Populus nigra* in the Netherlands. Frison E., Lefèvre F., de Vries S., and Turok J., compilers 1995. *Populus nigra* Network, Report of the first meeting, 3-5 October 1994, Izmit, Turkey. IPGRI, Rome, Italy. p.46.

DE VRIES, S., 1996. Guidelines for maintenance and duplication of *ex situ* field collections of *Populus nigra*. Turok J., Lefèvre F., Cagelli L and de Vries S. compilers. 1996. *Populus nigra* Network. Report of the second meeting, 10-12 September 1995, Casale Monferrato, Italy. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp.11-12.

HEINZE, B., 1998. Biochemical and molecular genetic methods available for the characterization of *Populus nigra*. L. *Populus nigra* Network. Report of the fourth meeting, 3-5 October 1997, Geraardsbergen, Belgium. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp.43-70.

KREMER, A., 1994. Diversité génétique et variabilité des caractères phénotypiques chez les arbres forestiers. *Genet.Sel.Evol.* 26, Suppl.1: 105-123.

LEFÈVRE, F., LEGIONNET, A., DE VRIES, S., TUROK, J., 1998. Strategies for the conservation of a pioneer tree species, *Populus nigra* L., in Europe. *Genet.Evol.* 30 (Suppl.1: S181-S196).

LEGIONNET, A., LEFÈVRE, F., 1996. Genetic variation of the riparian pioneer species *Populus nigra* L. 1. Study of population structure based on isozymes. *Heredity* 77 : 629-637.

NEI, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 283-290.

PADRÓ, A., 1987. Creación y selección de nuevos híbridos euramericanos de chopo en el marco de la mejora del género *Populus* en España. Tesis doctoral. E.S.I.M. Madrid, 224p.

PÉREZ DE LA VEGA, M., 1993. Biochemical characterization of populations. *in* Plant Breeding: Principles and prospects. M.D. Hayward, N.O. Bosemark and I. Romagosa eds. Chapman and Hall, London 1993. p: 184-200.

RAJORA , O.P. 1989a. Characterization of 43 *Populus nigra* L. clones representing selections, cultivars and botanical varieties based on their multilocus allozyme genotypes. *Euphytica* 43: 197-206.

RAJORA, O.P., 1989b. Marker allozyme genes and alleles for differentiation of *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. maximowiczii*, and their interspecific hybrids. *Can. J. Bot.* 68: 990-998.

SWOFFORD, D.L., SELANDER, B.R., 1993. BYOSYS-1. Release 1.7. Center for Biodiversity Illinois Natural History Survey.

TUNCTANER , K. ,1995. Conservation of genetic resources of *Populus nigra* in Turkey. Frison E., Lefèvre F., de Vries S., and Turok J, compilers 1995. *Populus nigra* Network, Report of the first meeting, 3-5 October 1994, Izmit, Turkey. IPGRI, Rome, Italy. p.41-44.

VAN SLICKEN, J., 1996. Plant descriptors for *Populus nigra*. Turok J., Lefèvre F., Cagelli L and de Vries S. compilers. 1996. *Populus nigra* Network. Report of the second meeting, 10-12 September 1995, Casale Monferrato, Italy. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp.13-24.

VIART , M., 1992. Présentation du Catalogue International des cultivars de Peupliers. In: Padró, A. (ed) Proceedings of the 19th Session of International Poplar Commission, 22-25 September 1992, Zaragoza.

WHITE , J., 1993. Black poplar: the most endangered native timber tree in Britain. For. Comm. Research Information Note 239.