

VARIACIÓN MORFOLÓGICA E ISOENZIMÁTICA DEL ÁLAMO TEMBLÓN (*POPULUS TREMULA* L.) EN LA PROVINCIA DE PALENCIA

López de Heredia, U.; Cristobal, M.D.; Martínez, P; Pando, V*; Sierra, R.
Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura.
Departamento de Matemáticas y Estadística
ETSIIAA Palencia – Universidad de Valladolid
Avda. Madrid 57. Palencia.

RESUMEN

Se han estudiado caracteres morfológicos y patrones isoenzimáticos en cinco poblaciones de *Populus tremula* del norte de Palencia. El objetivo es estudiar la variabilidad de esas poblaciones naturales de álamo temblón. Se seleccionaron treinta árboles por población en cinco rodales con criterios de máxima distancia entre individuos y accesibilidad a copas de modo que se captara la mayor variabilidad posible.

El estudio morfológico se ha centrado en la medición de once caracteres foliares, tales como perímetro, número de dientes, ángulos en la base del limbo, etc.

El análisis isoenzimático se ha realizado sobre yemas durmientes y se han puesto a punto protocolos para los siguientes sistemas enzimáticos: LAP, GOT, ADH, SKDH, IDH, 6PGD, MDH, PGI, PGM, ACPH.

PALABRAS CLAVE: *Populus tremula*, morfología foliar, variabilidad genética, isoenzimas.

SUMMARY

Morphological traits and isozyme patterns have been studied in five populations of *Populus tremula* in northern Palencia. The aim is to test the variability of trembling aspen natural populations. Thirty trees per population were selected in five stands with maximum distance between individuals and canopy accessibility criteria, trying to capture the greatest variability among them.

Morphological study has focused on measuring eleven leaf traits, such as perimeter, number of teeth, angle in the basis of the leaf, etc.

Isozymic analysis has been made with dormant buds and we have developed protocols for the following isozyme systems: LAP, GOT, ADH, SKDH, IDH, 6PGD, MDH, PGI, PGM, ACPH.

KEY WORDS: *Populus tremula*, leaf morphology, genetic variability, isozymes.

INTRODUCCIÓN

Populus tremula L. es una especie de amplia distribución, que se encuentra presente prácticamente en toda Eurasia. Mientras en Centro y Norte Europa ocupa zonas de llanuras, en la Península Ibérica es una especie de montaña y media montaña.

La estructura de sus masas en la Península Ibérica es en forma de pequeños bosquetes o rodales, que en ocasiones no superan tan siquiera la veintena de individuos. Tradicionalmente se ha pensado que la colonización de nuevos espacios por parte de la especie, se lleva a cabo a partir de un número muy reducido de semillas viables (en ocasiones uno sólo) que consiguen expandirse mediante la propagación vegetativa de los brotes de raíz.

Recientes investigaciones llevadas a cabo en la ETSIIAA de Palencia, han demostrado que la viabilidad de la semilla polinizada en campo no es tan pequeña como se creía, llegando a germinar en sustrato de turba y vermiculita hasta en un 65% (Álvarez Sandonís, 2000).

Dichos resultados muestran que la reproducción sexual de *Populus tremula* pudiera ser más frecuente de lo que se supone, originando rodales con múltiples genotipos. Una manera de contrastar la hipótesis de homogeneidad genética es estudiando la variabilidad de las poblaciones naturales, para lo que se puede acudir a análisis morfológicos y análisis moleculares (concretamente isoenzimáticos). Así, el objetivo de este trabajo es dar una idea de la variación inter- e intrapoblacional de la especie y comparar los métodos utilizados para comprobar su validez.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de rodales

Se eligieron cinco rodales a partir del inventario para la selección de árboles sobresalientes de álamo temblón en el norte de la provincia de Palencia elaborado por A.I. de Lucas en 1996. La selección de rodales se ha hecho buscando masas de origen no antrópico, con un número suficiente de individuos, lo suficientemente separadas entre sí como para poder captar de la mejor forma posible la variabilidad de la especie, aisladas lo suficiente de otras especies del género *Populus* como para que no haya flujo genético entre ellas y con accesibilidad para la recogida de muestras.

Los rodales seleccionados son los que muestra la Tabla 1, junto con una breve descripción de los mismos.

Población	Descripción
Salcedillo	Masa mixta con <i>Quercus</i> sp., <i>Betula</i> sp., <i>Sorbus</i> sp., <i>Fagus sylvatica</i> , etc. Los álamos forman una masa madura que sigue pequeñas vaguadas.
Tremaya	Una masa pura de álamos colonizaron una ladera de exposición norte tras una perturbación, probablemente tras un incendio.
Valcobero	Es una masa con pies femeninos y masculinos en un valle entre montañas. La población se subdivide en pequeños rodales que por su proximidad se consideran una misma población.
Velilla	Es un rodal típico de ribera, junto a pies de <i>Fagus sylvatica</i> . Los álamos aparecen únicamente en una de las riberas, indicando una probable expansión de origen vegetativo.
Congosto	El rodal de álamos ocupa una vaguada dentro de una extensa masa de <i>Q. pyrenaica</i> . El aspecto de la masa es relicto, en el límite ecológico de la especie.

Tabla 1: Descripción de las poblaciones de estudio

Análisis morfológico

El estudio morfológico se realizó sobre cinco hojas por individuo de braquiblastos, completamente desarrolladas, recogidas con pértiga de la parte media de la copa y siguiendo la metodología de Barnes (1975).

Con la ayuda del paquete informático WinFolia, se procedió a la medición de los siguientes once caracteres en cada hoja: anchura al 50 % de la longitud del limbo (ANCH_50), anchura al 90 % de la longitud del limbo (ANCH_90), ángulo al 10 % de la longitud del limbo (ÁNGULO_1), ángulo al 25 % de la longitud del limbo (ÁNGULO_2), ángulo en la base del limbo (ÁNGULO_B), ángulo en el ápice (ÁNGULO_A), superficie del limbo (SUPERFIC), perímetro del limbo (PERIMETR), número de dientes (NºDIENTE) y las relaciones entre longitud del limbo y longitud del peciolo (LL_LP) y entre longitud del limbo y anchura del limbo (LL_AL).

Se realizó un Análisis de Componentes Principales con las variables previamente estandarizadas, para obtener los factores que explicasen un mayor porcentaje de varianza. Se eligieron cuatro variables de entre las de mayores pesos en los factores, que definieran bien la morfología de la hoja del álamo. Los análisis se han hecho con el paquete informático Statistica 5.5 ('99 Edition).

Análisis isoenzimático

Para el estudio de los patrones isoenzimáticos se recogieron yemas indiferenciadas de 30 árboles por población en noviembre del 2000. Dentro de cada población, la selección de clones se hizo con un criterio de máxima distancia entre ellos, con los condicionantes del estado del clon y la accesibilidad a sus copas.

Se estudiaron diez sistemas enzimáticos diferentes, utilizados con frecuencia en el estudio de especies forestales y en particular de especies del género *Populus* (Bergmann, 1987; Rajora & Dancik, 1992; Gallo & Geburek, 1991; Cheliak & Pitel, 1984). Los sistemas estudiados fueron los siguientes: LAP, GOT, ADH, SKDH, IDH, 6PGD, MDH, PGI, PGM, ACPH.

Los protocolos se adaptaron de los desarrollados por el Laboratorio de Isoenzimas del Área de Selvicultura y Mejora del CIFOR-INIA en 1996 para *Populus alba* (Alba & Agúndez, 1996), consiguiendo una reducción importante en el volumen de reactivos utilizado.

Se han obtenido la heterocigosis media por población y el porcentaje de loci polimórficos, además de un dendrograma en base a las distancias de Nei (Nei, 1972) con el procedimiento UPGMA. Estos análisis se han realizado con la ayuda del paquete informático TFPGA (Miller, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis morfológico

El Análisis de Componentes Principales (PCA) con el procedimiento Varimax Normalizado para las once variables en estudio previamente estandarizadas, explica con cinco factores el 92 % de la varianza. Las variables elegidas para definir la morfología de la hoja fueron: ángulo en la base del limbo (ÁNGULO_B), perímetro del limbo (PERIMETR), número de dientes (NºDIENTE) y la relación entre la longitud del limbo y la longitud del peciolo (LL_LP). Con estas cuatro variables se considera que podemos conocer la forma de una hoja de temblón de un modo bastante completo, de modo que son las variables que sugerimos para posteriores análisis.

En la Figura 1 se puede ver el gráfico de componentes principales que enfrenta a las variables estandarizadas PERIMETR y ÁNGULO_B. Se observa que las poblaciones de Velilla y Valcobero se agrupan a un lado del gráfico, aunque con diferencias entre ellas, y que las otras poblaciones forman una nube mucho más compacta, con los individuos más próximos entre sí. La estructura de masa parece ser la definitoria del comportamiento de las poblaciones en este gráfico, ya que las masas más compactas presentan una menor diversidad intrapoblacional, mientras que las masas más extensas, formadas por pequeños rodales, muestran mayores diferencias entre individuos para estas variables.

En este sentido, se puede apreciar para la población de Valcobero la existencia de dos subgrupos dentro de la población, que se podrían explicar como individuos de

procedencias diferentes compartiendo un mismo espacio o bien como una variación fenotípica en los diferentes microambientes de la población.

La población de Salcedillo muestra menos variabilidad de la esperada, al tratarse de una masa extensa situada en medio de un bosque mixto, y presenta un perfil cercano al de las poblaciones de Congosto y Tremaya.

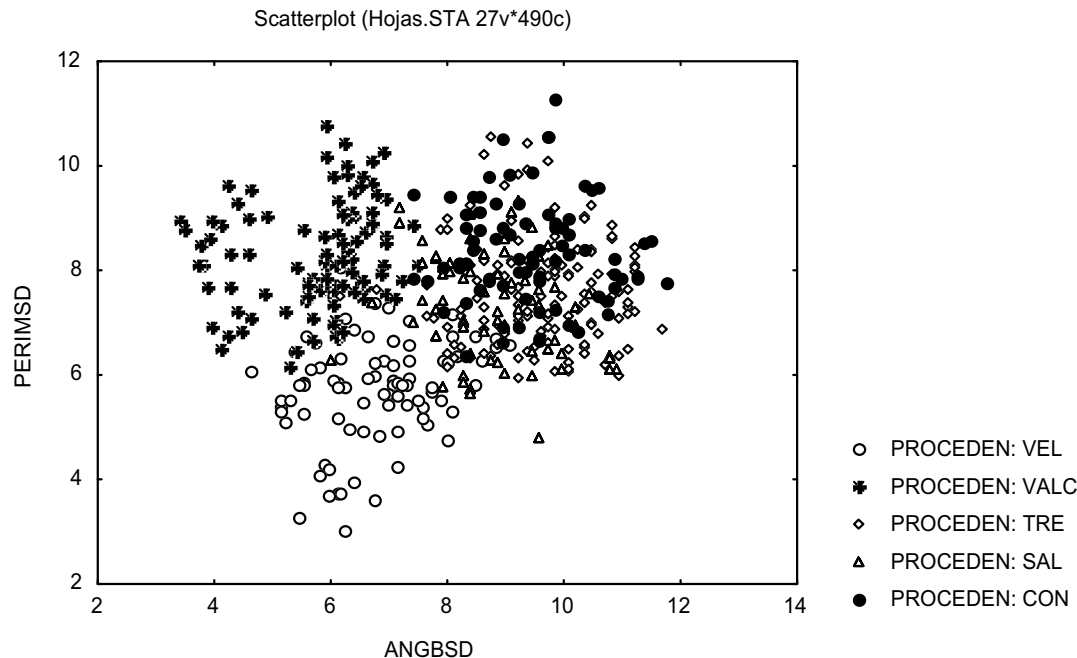


Fig. 1: Gráfico de Componentes Principales para las variables perímetro y ángulo de la base estandarizadas.

Análisis isoenzimático

Por ahora, a la espera de posteriores análisis, se han interpretado cuatro sistemas enzimáticos (ADH, SKDH, LAP, 6PGD) para los que se han encontrado cinco loci polimórficos. Los loci que presentan polimorfismos son los siguientes: ADH, SKDH, LAP-2, 6PGD-4 y 6PGD-5. Los patrones obtenidos para estos loci coinciden con las interpretaciones dadas por la bibliografía consultada para salicáceas (Bergmann, 1987; Rajora & Dancik, 1984; Gallo & Geburek, 1991; Cheliak & Pitel, 1984). Los parámetros de diversidad obtenidos para estos cinco loci se pueden apreciar en la Tabla 2.

Población	Número de individuos	Heterocigosis media	% de loci polimórficos
VEL	25	0.3357	80
VALC	29	0.3335	80
TRE	30	0.1733	60
SAL	23	0.2134	60
CON	29	0.1763	80
MEDIA		0.2464	

Tabla 2: Heterocigosis media y porcentaje de loci polimórficos encontrados en las poblaciones en estudio para los sistemas ADH, SKDH, LAP y 6PGD.

Como se puede apreciar, los mayores índices de heterocigosis aparecen en las poblaciones de Velilla y Valcobero, algo que concuerda con los datos de morfología foliar. La población de Salcedillo presentaría un índice de heterocigosis intermedio entre las poblaciones anteriores y las de Tremaya y Congosto, que son las que menor heterocigosis presentan. Estos resultados hay que tomarlos con cautela, ya que por el momento el número de loci analizado es pequeño, pero sí se pueden apreciar las tendencias en cuanto a las diferencias de heterocigosis entre poblaciones.

Por otra parte, en lo que se refiere al porcentaje de loci polimórficos encontrados, Tremaya y Salcedillo son las que menos encuentran (60%), mientras que Velilla, Valcobero y Congosto presentan un mayor porcentaje (80%).

El dendrograma que muestra la Figura 2 agrupa a las poblaciones de Tremaya, Congosto y Salcedillo, que son las masas de aspecto más compacto, y en las que previsiblemente la regeneración por brotes vegetativos tiene mayor importancia. La población de Valcobero aparece aislada del resto de poblaciones, y por tanto es la más diferente genéticamente. En una posición intermedia aparece la población de Velilla. Destaca la cercanía genética de las poblaciones de Salcedillo y Tremaya, pese a que pertenecen a diferentes cuencas.

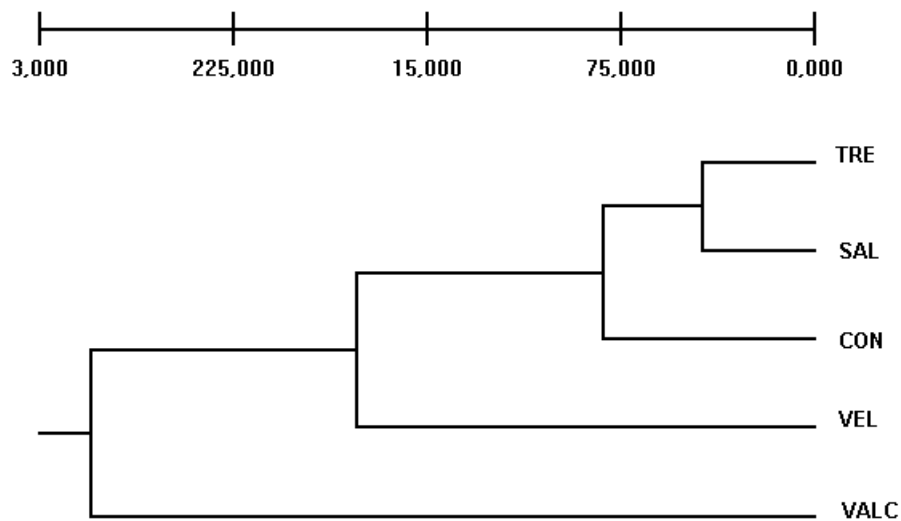


Fig. 2: Dendrograma que agrupa a las diferentes poblaciones en función de la distancia genética de Nei (1972).

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo, aunque no es definitivo, son varias. Por un lado, los métodos morfológicos e isoenzimáticos muestran variabilidad en las poblaciones naturales de *Populus tremula*, lo que indica que la viabilidad de la semilla puede ser más elevada de lo previsto. Además, se han encontrado cuatro variables que definen perfectamente la morfología de la hoja del álamo temblón y sobre las que hay que centrar todos los esfuerzos en posteriores análisis, al evitar el engorro de tener que medir once variables. Estas variables son el ángulo de la base, el perímetro, el número de dientes y la relación entre la longitud del limbo y la longitud del peciolo.

En cuanto a las poblaciones estudiadas, tanto el análisis morfológico como el genético, reflejan que la población de Valcobero es la más diferente, seguida de la de Velilla, mientras que entre las otras tres poblaciones (Congosto, Salcedillo y Valcobero) no hay diferencias muy marcadas.

No obstante, las limitaciones del estudio, como el pequeño número de loci analizados, o el reducido número de individuos en las poblaciones, sugieren la necesidad de seguir avanzando en el estudio de éstas y otras poblaciones de álamo temblón, para conocer mejor su funcionamiento ecológico y dinámicas de regeneración.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto **VA 40/99: Bases para la conservación y gestión de *Populus tremula* y *Populus x canescens* en Castilla y León**, financiado por la Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León.

Queremos agradecer al Área de Selvicultura y Mejora del INIA-CIFOR de Madrid el que nos prestaran el WinFolia para medir las hojas y su apoyo para introducirnos en el fascinante mundo de las isoenzimas (gracias Nuria, Lola, Santi, Ricardo...).

A todos los compañeros del laboratorio y la gente que ha ayudado a que esto salga adelante (Ana, Natalia, Lola, Pablo, Elena, Teresa...).

BIBLIOGRAFÍA

ALBA, N.; AGÚNDEZ, D.; SALVADOR, L. & SEISDEDOS, MT.; 1996. *Protocolos para las especies Pinus pinaster, Pinus halepensis, Populus nigra y Populus alba. Análisis isoenzimático*. Área de Selvicultura y Mejora. INIA-CIFOR. Madrid.

ALVAREZ, M.; 2000. *Estudio de la propagación de Populus tremula L. a partir de semilla, en condiciones controladas*. Trabajo fin de carrera. ETSIIAA Palencia.

BARNES, BV.; 1975 Phenotypic variation of trembling aspen in Western North America. *Fon. Sci.* 21:319-328.

BERGMANN, F.; 1987. *Characterization of multiclonar aspen cultivars using isozyme electrophoresis*. For. Ecol. Manage. 22: 167-172.

CHELIAK, WM. & DANCİK, BP.; 1982. *Genetic diversity of natural populations of a clone forming tree Populus tremuloides*. Cn. J. Genet. Cytol. 24: 611-616.

DE LUCAS, AI.; 1996. *Selección de árboles sobresalientes de álamo temblón (Populus tremula L.) en el norte de la provincia de Palencia*. Trabajo fin de carrera. ETSIIAA Palencia.

GALLO, LA. & GEBUREK, T.; 1991. *Genetics of isozyme variants in Populus tremula, Populus tremuloides and their hybrids*. Euphytica 53: 225-233.

MILLER, M.; 1997. *Tools for Population Genetics Analysis (TFPGA)*. Users manual.

NEI, M.; 1972. *Genetic distance between populations*. Amer. Natur. 105: 385-398.

RAJORA, OP. & DANCİK, BP.; 1992. *Genetic characterization and relationships of Populus alba, Populus tremula and P. canescens, and their clones*. Theor. Appl. Genet. 84: 291-298.