

# VARIACIÓN GENÉTICA DE *Pinus pinaster* Ait.: APLICACIÓN A LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL FORESTAL DE REPRODUCCIÓN (MFR)

D. BARBA<sup>1</sup>, S.C. GONZÁLEZ MARTÍNEZ<sup>1,2</sup>, M.M. RIBEIRO<sup>3</sup>, D. AGÚNDEZ<sup>1</sup>, L. SALVADOR<sup>4</sup>, R. ALÍA<sup>1</sup>, L. GIL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Mejora Genética y Biotecnología, CIFOR-INIA, Ctra. de La Coruña km 7, 28.040 Madrid.

<sup>2</sup> Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética, ETSIM, Ciudad Universitaria s/n, 28.040 Madrid.

<sup>3</sup> Departamento de Silvicultura e Recursos Naturais. Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal.

<sup>4</sup> Escuela Politécnica Superior, Universidad de Huelva, Ctra. de Palos de la Frontera s/n, 21.071 Rábida-Palos de la Frontera, Huelva.

## RESUMEN

El estudio con marcadores moleculares de las especies forestales permite analizar la distribución y estructura de la diversidad genética. Se han analizado 47 poblaciones de pino negral (*Pinus pinaster* Ait.) con 16 loci isoenzimáticos. Del conjunto inicial de 16 loci se han seleccionado aquellos con mayor polimorfismo y potencialidad para la identificación del Material Forestal de Reproducción (8 loci). Este conjunto de sistemas enzimáticos de evaluación se ha utilizado para estimar la diversidad genética poblacional de la especie. Posteriormente, las poblaciones fueron agrupadas según su situación geográfica y nivel de diversidad realizándose un Análisis Canónico Discriminante. A escala global se distinguen tres grandes grupos dentro del área de distribución natural de la especie: norte de África, Península Ibérica y sureste de Francia e Italia, pudiéndose subdividir las poblaciones ibéricas de pino negral en tres grupos con sentido geográfico: grupo este, grupo sureste y grupo noroeste. La utilización de los marcadores isoenzimáticos se ha mostrado de gran utilidad para identificar y certificar Material Forestal de Reproducción (MFR).

**P.C.:** diversidad genética, certificación de semilla, isoenzimas, pino negral.

## SUMMARY

Molecular markers in forest species are of great interest to estimate genetic diversity and structure. In this paper, we analysed 47 populations of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) using 16 polymorphic loci. From the original set of loci analysed we selected a subset of 8 loci that showed higher polymorphism and potentiality for the identification of seed origins. This subset was used to estimate genetic diversity in the natural range of the species. Additionally, groups of populations were done considering geographic position and diversity level and a Canonical Discriminant Analysis was conducted. Three major groups of populations were distinguished: northern Africa, Iberian Peninsula and southeastern of France and Italy. In the Iberian Peninsula three subgroups were found with significant geographical structure (east, northwestern and southeastern). The use of isozymes was shown to be useful for identification and characterization of seed zones in the Iberian Peninsula.

**K.W.:** gene diversity, seed certification, isozymes, maritime pine

## INTRODUCCIÓN

El estudio de las especies forestales mediante marcadores moleculares constituye una valiosa fuente de información para determinar la estructura genética y variación geográfica de sus poblaciones, así como para el análisis de los procesos genéticos que han contribuido a su situación actual. Por otra parte, permite evaluar la diversidad genética existente en los lotes de semilla comerciales procedentes de huertos semilleros o poblaciones naturales, e identificar su origen (SZMIDT *et al.*, 1988). Existen gran cantidad de estudios de la diversidad genética del

pino negral (*Pinus pinaster* Ait.) usando diferentes tipos de marcadores moleculares ya sea en el rango natural (BARADAT y MARPEAU, 1988; VENDRAMIN *et al.*, 1998) o a escala regional (SALVADOR *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2001a). La información procedente del análisis de isoenzimas de las poblaciones también se ha utilizado en esta especie para identificar Material Forestal de Reproducción, particularmente en la región de las Landas (Francia), donde el pino negral tiene un gran valor económico. En esta región BARADAT y MARPEAU (1988) propusieron una prueba de diagnóstico basada en un análisis discriminante de terpenos. Más recientemente, RIBEIRO *et al.* (2001b) desarrollaron un test para diferenciar las poblaciones landesas de las procedentes de Portugal y Galicia basándose en el análisis del ADN del cloroplasto mediante microsatélites (SSRs).

Los objetivos de este trabajo son: (1) analizar la distribución de la diversidad genética en el rango natural de la especie, (2) seleccionar un conjunto de sistemas enzimáticos de evaluación que proporcione estimaciones de diversidad genética y que sea fácilmente reproducible en laboratorio, y (3) evaluar la utilidad de dicho sistema para la identificación de material forestal de reproducción (MFR) de pino negral en la Península Ibérica en relación con las Regiones de Procedencia de la especie.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Material vegetal y análisis isoenzimático*

Se han analizado un total de 47 poblaciones de origen natural, de las cuales 38 se encuentran en la Península Ibérica (P.I.) incluyendo todas las Regiones de Procedencia definidas en esta especie (7 en procedencias de área restringida), 2 proceden del norte de África (Marruecos y Túnez), 6 del sureste de Francia e Italia y, por último, se ha incluido una mezcla de semilla comercial de la región de las Landas (Francia). En las poblaciones españolas se han recogido 2-3 piñas de 80 árboles separados entre sí al menos 50 m, analizándose ó bien 70-80 megagametofitos por población ó megagametofitos y embriones de 35-40 semillas. En las poblaciones no ibéricas la recogida individualizada de semilla no fue posible y se procedió al análisis de una muestra aleatoria a partir de lotes de semilla proporcionados por el *Laboratoire de génétique et amélioration des arbres forestiers* (INRA, Francia). La extracción de isoenzimas se ha realizado con semilla germinada (3-4 mm de radícula) siguiendo el protocolo de CONKLE *et al.* (1982). Se han analizado los siguientes sistemas enzimáticos (16 loci) mediante electroforesis en geles de almidón: 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*6Pgd-1* y *6Pgd-2*; EC 1.1.1.44), isocitrato deshidrogenasa (*Idh*; EC 1.1.1.42), malato deshidrogenasa (*Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3* y *Mdh-4*; EC 1.1.1.37), fosfoglucoasa isomerasa (*Pgi-1* y *Pgi-2*; EC 5.3.1.9), fosfatasa ácida (*Acph*; EC 3.1.3.2), glutamato deshidrogenasa (*Gdh*; EC 1.4.1.3), catalasa (*Cat*; EC 1.11.1.6), glutámico-oxalacético transaminasa (*Got-1* y *Got-2*; EC 2.6.1.1), fosfoglucomutasa (*Pgm*; EC 2.7.5.1) y leucin-aminopeptidasa (*Lap*; EC 3.4.11.1). La interpretación genética de los sistemas enzimáticos y los métodos de análisis en laboratorio están descritos en CASTRO (1989) y SALVADOR (1997). Los loci con mayor grado de polimorfismo y estructura geográfica han sido seleccionados para formar parte del conjunto de sistemas enzimáticos de evaluación (*Idh*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgi-2*, *Acph*, *Gdh*, *Got-2*, *Lap*).

### *Análisis de datos*

La distribución de la variación genética a escala global se ha estudiado mediante el cálculo de la diversidad genética unilocus de Nei ( $H_e$ ; NEI, 1973) y el error estándar entre loci. Posteriormente, se realizó una agrupación de las poblaciones según su situación geográfica, nivel de diversidad y la información procedente de los análisis previos realizados

con estas mismas poblaciones (SALVADOR *et al.*, 2000; GONZÁLEZ MARTÍNEZ *et al.*, 2001). Los grupos considerados y las Regiones de Procedencia que incluyen fueron los siguientes: noroeste de la P.I., que a su vez se subdivide en Galicia y Portugal (A en la Figura 1; San Cipriano de Ribaterme, Leiria y Oleiros) y grupo Noroeste en sentido general (B, C y D, en la Figura 1; S. del Teleno, S. de Oña, S. de Gata-Las Hurdes, Bajo Tietar, S. de Gredos, S. de Guadarrama, Meseta Castellana y Montaña Soria-Burgos); grupo Este de la P.I. (Serranía de Cuenca, Albarracín, Maestrazgo, S. de Espadán y Levante), grupo Sureste de la P.I. (S. Segura-Alcaraz, Moratalla, S. de Almijara-Nevada y S. Bermeja), Ibérico Central y Páramos de Molina (Codos y Mazarete), norte de África (Tamjout y Tabarka) y sureste de Francia e Italia (Plan Pinet, Porto Fino, Tocchi, Córcega, Cerdeña y Pantellaria). La población de las Landas no fue incluida en ninguno de los grupos dado su carácter de mezcla de varias poblaciones de discutido origen. Tampoco se incluyeron las poblaciones pertenecientes a procedencias de área restringida. Con los grupos considerados, se ha realizado un Análisis Canónico Discriminante basado en las frecuencias de los alelos más comunes en cada uno de los loci seleccionados para formar parte del conjunto de sistemas enzimáticos de evaluación (*Idh*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgi-2*, *Acph*, *Gdh*, *Got-2*, *Lap*).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

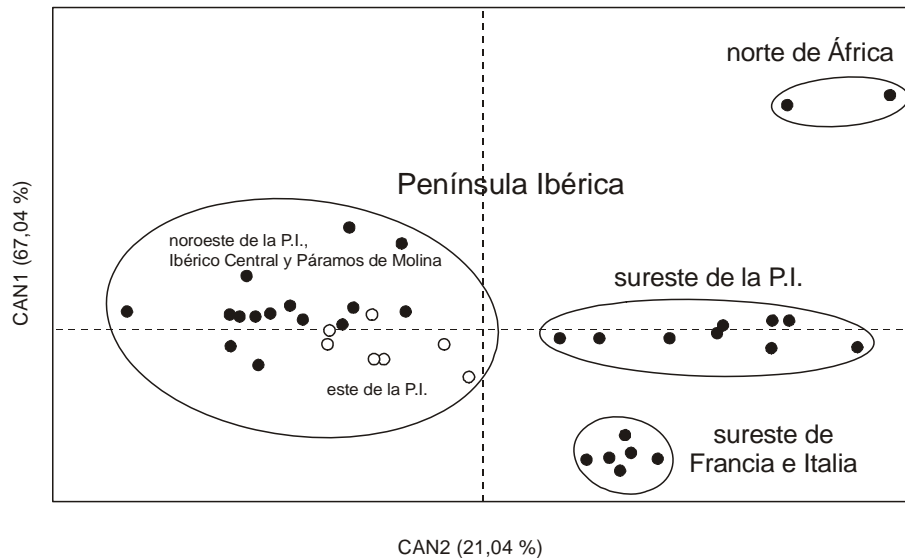
Los valores más altos de diversidad genética de *P. pinaster* se obtienen en poblaciones circunmediterráneas próximas a la costa (Figura 1), incluyendo las situadas en Córcega, Cerdeña y la Isla de Pantellaria (Italia). Esta última ha sido considerada como un foco de expansión de la especie tras las últimas glaciaciones (VENDRAMIN *et al.*, 1998). En cambio, existe una gran reducción en la diversidad genética de las poblaciones africanas, presentando valores mínimos en el rango de distribución del pino negral (0,070 en Tmj y 0,102 en Tk). En la Península Ibérica, la diversidad genética aparece geográficamente estructurada en tres grandes grupos de poblaciones (grupo Este, grupo Sureste y grupo Noroeste), con poblaciones de transición entre los mismos. Las poblaciones del grupo Este presentan la mayor diversidad genética encontrada en la P.I. (0,216). En cambio, las poblaciones del Noroeste peninsular muestran una alta heterogeneidad en niveles de diversidad, pudiéndose distinguir una importante reducción de la misma en dirección Este (subgrupo D: 0,199) a Oeste (subgrupo A: 0,150). La diversidad genética en las procedencias de área restringida no es homogénea, estando estrechamente relacionada con el área geográfica. Así, se encuentran altos valores de diversidad en poblaciones próximas a la cuenca Mediterránea (T y Ma2), mientras que existe una reducción progresiva de la misma según nos alejamos de la costa. Por último, destacar la singular composición alélica de la población de Las Gabarras (Girona), intermedia entre las poblaciones del grupo Este peninsular y las del sureste de Francia e Italia.

La correlación entre las estimaciones de diversidad realizadas con el conjunto completo de loci (16 loci) y el conjunto de sistemas enzimáticos de evaluación (8 loci) es muy alta en todo el rango de distribución de la especie ( $r = 81\%$ ), siendo aún mayor en el caso específico de la Península Ibérica ( $r = 96\%$ ). La utilidad de dicho conjunto de sistemas enzimáticos de evaluación puede observarse en las Figuras 2 y 3. En un Análisis Canónico Discriminante a escala global, el eje CAN1 (67,04% de varianza explicada) separa tres grandes grupos de poblaciones con significado geográfico: norte de África, Península Ibérica y sureste de Francia e Italia. Dichos grupos se consideran originados por diferentes refugios glaciares de la especie (VENDRAMIN *et al.*, 1998; SALVADOR *et al.*, 2000; GONZÁLEZ MARTÍNEZ *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2001a). Por otra parte, el eje CAN2 (21,04% de varianza explicada) separa grandes grupos de poblaciones dentro de la Península Ibérica.

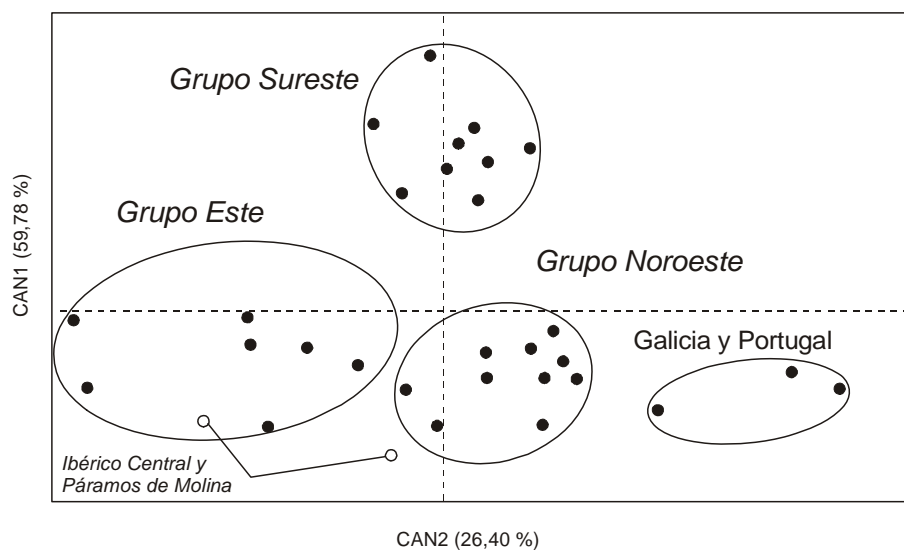


**Figura 1.** Distribución de la diversidad genética de *P. pinaster* ( $H_e$ ) en el área de distribución de la especie con 8 loci isoenzimáticos. Entre paréntesis el error estándar.

Si el análisis se reduce sólo a la Península Ibérica (Figura 3), la variación clinal en dirección sur-norte se manifiesta en el distanciamiento genético de las poblaciones del grupo Sureste con respecto al resto (59,78% de varianza explicada). En cambio, en dirección este-oeste la diferenciación genética de las poblaciones es menos acusada y la separación de las poblaciones del grupo Este y Noroeste se establece de forma progresiva. Dicha estructura geográfica de la variación genética permite distinguir entre los grupos de procedencias indicados, proporcionando una herramienta para la identificación de Material Forestal de Reproducción (MFR).



**Figura 2.** Análisis Canónico Discriminante para el rango de distribución natural de pino negral usando un conjunto de sistemas enzimáticos de evaluación (8 loci).



**Figura 3.** Análisis Canónico Discriminante para las poblaciones ibéricas de pino negral usando un conjunto de sistemas enzimáticos de evaluación (8 loci).

## CONCLUSIONES

Existen tres grandes grupos de poblaciones de pino negral en su distribución natural: norte de África, Península Ibérica y sureste de Francia e Italia (incluyendo Las Gabarras, Girona). Dichos grupos pueden diferenciarse claramente usando un conjunto de sistemas enzimáticos de evaluación (8 loci). Dicho conjunto permite, a su vez, la distinción de los grupos geográficos de la especie en la Península Ibérica y la caracterización de la diversidad genética en cada población, siendo de gran interés en la identificación y certificación del Material Forestal de Reproducción (MFR).

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al *Servicio de Material Genético* (DGCN) por la ayuda proporcionada en la recolección y selección de poblaciones a analizar. Gracias también a C. García por su colaboración en los trabajos de laboratorio. S.C. González Martínez disfruta de una beca predoctoral del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto INIA SC97-118 y el convenio DGCN-INIA CC00-0035.

## BIBLIOGRAFÍA

- BARADAT, P.H., MARPEAU-BEZARD, A.; (1988). *Le pin maritime, Pinus pinaster Ait. Biologie et génétique des terpènes pour la connaissance et l'amélioration de l'espèce*. Universidad de Bordeaux I, Bordeaux, Francia. Tesis Doctoral.
- CASTRO, L.F.; (1989). *Isoenzimas do Pinus pinaster Ait. numa perspectiva de aplicação ao melhoramento genético da espécie*. Universidad de Trás os Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal. Tesis Doctoral.
- CONKLE, M.T., HODGKISS, P.D., NUNNALLY, L.B., HUNTER, S.C.; (1982). *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. General Technical Report PSW-64.
- GONZÁLEZ MARTÍNEZ, S.C., AGÚNDEZ, D., ALÍA, R., SALVADOR, L., GIL, L.; (2000). *Geographical variation of gene diversity of Pinus pinaster Ait. in the Iberian Peninsula*. En: *Genetic response of forest systems to changing environmental conditions* (ed. Müller-Starck G), en prensa. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- NEI, M.; (1973). *Analysis of gene diversity in subdivided populations*. Proc Natl Acad Sci USA 70: 3321-3323.
- RIBEIRO, M.M., PLOMION, C., PETIT, R.J., VENDRAMIN, G.G., SZMIDT, A.E.; (2001a). *Variation in chloroplast single-sequence repeats in Portuguese maritime pine (Pinus pinaster Ait.)*. Theoretical and Applied Genetics 102: 97-103.
- RIBEIRO, M.M., LEPROVOST, G., GERBER, S., VENDRAMIN, G.G., ANZIDEI, M., DECROOCQ, S., MARPEAU, A., MARIETTE, S., PLOMION, C.; (2001b). *Origin identification of maritime pine stands in France using chloroplast single-sequence repeats*. Pendiente de publicación.
- SALVADOR, L.; (1997). *Estudio de la variabilidad genética de Pinus pinaster en España usando marcadores proteicos e isoenzimáticos*. U. P. M., Madrid. Tesis Doctoral.
- SALVADOR, L., ALÍA, R., AGÚNDEZ, D., GIL, L.; (2000). *Genetic variation and migration pathways of maritime pine (Pinus pinaster Ait.) in the Iberian Peninsula*. Theoretical and Applied Genetics 100: 89-95.
- SZMIDT, A.E., EL-KASSABY, Y.A., SIGURGEIRSSON, A., ALDEN, T., LINDGREN, D., HÄLLGREN, J.-E.; (1988). *Classifying seedlots of Picea sitchensis and P. glauca in zones of introgression using restriction analysis of chloroplast DNA*. Theoretical and Applied Genetics 76: 841-845.
- VENDRAMIN, G.G., ANZIDEI, M., MADAGHIELE, A., BUCCI, G.; (1998). *Distribution of genetic diversity in Pinus pinaster Ait. as revealed by chloroplast microsatellites*. Theoretical and Applied Genetics 97: 456-463.