

# ANALISIS DE LAS REPOBLACIONES DE ROBLES EN ALAVA Y GUIPUZCOA PARA DETERMINAR SU ORIGEN GENETICO

M. OLALDE, S. ESPINEL, A. RUIZ DE AZUA, J.CIRIZA, P.G. GOICOECHEA

NEIKER, A.B. INSTITUTO VASCO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO AGRARIO  
Granja Modelo de Arkaute, Apdo. 46, 01080 VITORIA-GASTEIZ  
E-mail: molalde@neiker.net

## RESUMEN

En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos tras el análisis de 43 repoblaciones de robles en Alava y Guipúzcoa, siendo las especies estudiadas *Quercus robur* y *Quercus faginea*. A través del estudio del ADN de cloroplastos (cpADN) se distinguieron ocho haplotipos, de los cuales únicamente tres aparecen de forma natural en el País Vasco. De todo esto se deduce que al menos en el 20.5 % de los casos la semilla utilizada en estas repoblaciones no es material autóctono, puesto que no procede de la Región de Procedencia Materna atlántica. También es de destacar que en el 93 % de las repoblaciones guipuzcoanas se han encontrado dos o tres haplotipos diferentes.

**P.C.** *Quercus*, repoblación, cpADN, procedencia

## INTRODUCCION

Según datos del Tercer Inventario Forestal del País Vasco, en 1996 existían 460 ha de *re poblado y monte bravo* de las especies *Quercus robur*, *Q. petraea* y *Q. faginea*. Un porcentaje muy importante de esta superficie supuestamente procede de repoblaciones recientes sujetas a planes de ordenación y regeneración. Esta superficie de repoblación es escasa comparada con otras especies, pero es de esperar que en los próximos años se vea incrementada por dos causas: la mayor sensibilización *ecológica* de la sociedad y las importantes ayudas que la Administración concede al propietario para repoblar con especies autóctonas.

El origen de la planta y de la semilla utilizada para realizar estas plantaciones es diverso. Muchos viveristas compran la bellota a empresas o viveros extranjeros, principalmente de Bélgica y Francia, para producir planta de roble que luego es vendida a particulares, contratistas o la Administración Forestal. Este hecho se debe a la escasez de semilla autóctona en el mercado y al precio que ofertan dichas empresas. Por otra parte, en muchas repoblaciones se compra la planta directamente a estos viveros extranjeros desconociéndose en algunos casos el origen de la semilla utilizada, que puede proceder de ese mismo país o que puede haber sido recogida en otro país diferente.

El ADN de los cloroplastos (cpADN) de las diferentes especies de robles muestra una elevada diversidad entre poblaciones, siendo escasa la diversidad o polimorfismo dentro de poblaciones (Ferris *et al.*, 1993, Petit *et al.*, 1993, Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997). Esta variabilidad se presenta con una importante estructura geográfica, lo cual puede explicarse por la transmisión exclusivamente materna del cpADN (Dumolin *et al.*, 1995), lo que limita el flujo genético entre poblaciones. Además esta transmisión uniparental confiere a la molécula un modo de evolución clonal que le ha permitido definir grandes grupos filogenéticos.

Durante los últimos años, el grupo de los robles blancos europeos ha sido objeto de diversos estudios genéticos, tanto a escala nacional como europea, que han puesto de manifiesto la relación existente entre las poblaciones actuales y los refugios existentes durante la última época glacial. Gracias al análisis de la distribución geográfica de los polimorfismos del ADN de cloroplastos (cpADN) se ha podido concluir que los robles que actualmente ocupan el territorio europeo proceden de tres refugios localizados en las tres penínsulas del sur de Europa: la Península Ibérica, Italia y los Balcanes.

Tras la retirada de los hielos glaciares y el restablecimiento de condiciones climáticas adecuadas (hace 15-13000 años) los robles comenzaron a expandirse hacia el resto de Europa desde estas tres penínsulas, siguiendo rutas de colonización que han podido discernirse recientemente mediante el análisis de la distribución geográfica de los polimorfismos del cpADN. En la [figura 1](#) puede observarse la localización geográfica de los haplotipos identificados en los robles blancos europeos.

El análisis filogenético de los haplotipos ha mostrado el parentesco de estas especies y ha descrito la existencia de cuatro linajes maternos, bien estructurados geográficamente, que son compartidos por especies de ámbito mediterráneo y por aquellas de ámbito templado (Petit *et al.*, 2001).

El análisis de 188 poblaciones de robles repartidas por la Península ha puesto de manifiesto la existencia de 15 haplotipos de cpADN entre 6 especies consideradas: *Q. canariensis*, *Q. faginea*, *Q. humilis*, *Q. petraea*, *Q. pyrenaica* y *Q. robur*. (Olalde *et al.*, 2001; Collada y Jiménez, comunicación personal).

La distribución geográfica de los estos haplotipos (Herrán *et al.*, 1999) muestra una destacada estructura espacial de los linajes, que constituye la base para la definición de Regiones de Procedencia Materna: áreas que maximizan la “varianza molecular” del cpADN entre grupos de poblaciones, al tiempo que minimizan la varianza entre poblaciones dentro de grupos ( [Figura 2](#), actualizada de Herrán *et al.*, 1999).

Las poblaciones naturales del País Vasco pertenecen a la RPM1 o Región de Procedencia Materna atlántica, y presentan haplotipos naranja H12, amarillo H10 y blanco H11. Mediante este trabajo se pretende caracterizar el haplotipo de la planta utilizada en las repoblaciones de robles realizadas en Alava y Guipúzcoa, de manera que se determine si pertenece a la región de procedencia materna en la que se localizan estas provincias, la atlántica, o si por el contrario pertenece a otra. Si se prueba la validez del método como control para futuras repoblaciones, se podrá comprobar el origen antes de repoblar de manera fiable y a un costo razonable.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Base de datos**

En la fase inicial de la investigación, se realizó una minuciosa consulta de los archivos de los Servicios de Montes de las Diputaciones Forales en cuanto a las repoblaciones de robles llevadas a cabo últimamente.

Inicialmente se recopilaron los datos relativos a las repoblaciones alavesas y guipuzcoanas, por ser los territorios con mayor número de ha repobladas con *Quercus*.

A partir de toda esta información disponible fueron seleccionadas 16 repoblaciones en Alava y 27 en Guipúzcoa, con superficies mayores de 1 ha y que se consideraron representativas en cuanto a localización, edad, interés científico, etc.

### **Material vegetal**

La recogida de muestras en las provincias de Alava y Guipúzcoa se realizó desde el 5 de Julio hasta el 17 de Agosto de 1999. Los robles estudiados pertenecen a las especies *Quercus robur* y *Quercus faginea*. De cada repoblación se eligieron cinco árboles, de una misma especie o de varias en caso de ser una repoblación con mezcla de especies. Debido al polimorfismo morfológico de las especies de *Quercus*, se eligieron aquellos individuos que menos dudas planteaban en su clasificación. De cada árbol se recogió una muestra de hojas sanas y verdes para la extracción de

ADN.

## PCR-RFLP

El ADN total de las 235 muestras se extrajo mediante el método descrito por Dumolin *et al.*, (1995). Este ADN se utilizó como molde en PCRs con un grupo de cuatro cebadores específicos del cpADN: DT, AS, TF y CD. Estos cuatro pares de cebadores fueron utilizados para caracterizar todos los individuos de todas las repoblaciones estudiadas. Las amplificaciones se llevaron a cabo tal y como se detalla en Demesure *et al.*, (1995). Seis µl de cada PCR se digirieron con un único encima de restricción, *TaqI* o *HinfI*, para no correr el riesgo de contar la misma mutación más de una vez, especialmente las inserciones-delecciones (indels).

Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, usando TBE (1x), a 500 V constantes durante 5 a 8 horas. La visualización de los fragmentos separados en los geles se realizó mediante tinción con plata.

## RESULTADOS

El análisis genético de todos los árboles permitió distinguir 8 haplotipos. En varias repoblaciones, de los cinco árboles muestreados y analizados, tres pertenecían a haplotipos diferentes. Puesto que ninguno de los haplotipos representa una única especie, sino que los haplotipos más comunes son compartidos por varias especies, el análisis de los resultados se ha realizado globalmente y por otro lado diferenciando las especies.

La [figura 3](#) contiene la representación porcentual de los 8 haplotipos encontrados en las repoblaciones de *Q. robur* y *Q. faginea*. En dos gráficos similares se desglosaron y analizaron por un lado los haplotipos para la especie *Q. robur* y por otro lado *Q. faginea*.

La distribución de los haplotipos entre las diferentes repoblaciones analizadas se muestra en la [figura 4](#), donde el tamaño de cada sector es proporcional al número de individuos de cada haplotipo.

De los 8 haplotipos detectados en las 43 repoblaciones muestreadas, dos de ellos no aparecen de forma natural en estas provincias ni en el resto de la Península Ibérica, son los azules H5 y H6 (Herrán *et al.*, 1999). El porcentaje de individuos con estos haplotipos es del 2% del total muestreado. La especie en la que se han encontrado es *Q. robur*.

Por otro lado se ha visto que dos quejigos (*Q. faginea*) de una repoblación en Alava tienen el haplotipo verde H29 (Herrán *et al.*, 1999), por lo que provienen con toda seguridad del área mediterránea o RPM 3 (Andalucía oriental, buena parte de Castilla-La Mancha, Levante y Sur de Aragón, véase figura 2). El porcentaje que supone este tipo es de un 1 %.

Los haplotipos rojo H1 y azul H7, son muy comunes en Europa mientras que en la Península sólo aparecen en los Pirineos Orientales y Cataluña (Herrán *et al.*, 1999), es decir se localizan ambos en la RPM mediterránea, y por lo tanto están ausentes en la RPM atlántica. Además, puesto que ambos haplotipos se han detectado en repoblaciones con la especie *Q. robur*, y esta especie no se ha encontrado en la RPM mediterránea, se puede deducir su origen europeo no peninsular. El porcentaje sobre el total del tipo rojo H1 es del 13 %, mientras que del azul H7 es bastante menor con un 4.5 %.

Los haplotipos naranja H12, amarillo H10 y blanco H11, aparecen en el País Vasco de forma natural. El origen de la planta utilizada en las repoblaciones con estos haplotipos está en la RPM atlántica, por toda la costa atlántica desde Galicia hasta Dinamarca. Cabe la posibilidad de que el origen no sea local ya que la distribución de estos haplotipos a escala europea, en esta región, está muy generalizada.

El haplotipo más comúnmente usado en repoblaciones ha resultado ser el naranja H12, dado que tiene una representación en el total de las repoblaciones del 39 %. En el caso concreto de la

especie *Q. faginea* supone un 5.6 % de la planta, siendo el haplotipo menos abundante, mientras que para la especie *Q. robur* es el más numeroso con un 42.3 %.

También el haplotipo amarillo H10 está muy extendido con una representación del 32.5 % del total. En el caso del *Q. faginea* el 83.3 % de los individuos tiene este haplotipo, y en caso del *Q. robur* el porcentaje es del 27.5 %.

En las poblaciones naturales de *Quercus* de hoja caduca del País Vasco estos dos haplotipos H12 naranja y H10 amarillo son los más frecuentes. Además ambos haplotipos se han encontrado de forma natural en las dos especies *Q. faginea* y *Q. robur*. A su vez el haplotipo blanco H11 se ha encontrado esporádicamente en una formación natural de *Q. robur* en el Valle de Oma. En el caso de las repoblaciones este haplotipo se ha detectado en *Q. robur*, suponiendo un 8 % del total.

Del análisis global de los resultados se deduce con total certeza que al menos en el 20.5 % de los casos la semilla utilizada en las repoblaciones no es material autóctono, puesto que no procede de la Región de Procedencia Materna atlántica. El 79.5 % restante si es material procedente de esta región, y además los haplotipos de las especies con las que se ha repoblado coinciden totalmente con lo que se ha encontrado en las poblaciones naturales del País Vasco.

Otra cuestión interesante a destacar es que en el 93 % de las repoblaciones de Guipúzcoa aparecen dos o tres haplotipos diferentes, lo que puede ser indicador de que la semilla utilizada proviene de rodales diferentes, aunque a veces ocurre que en un mismo rodal se presenta más de un haplotipo. En el caso de Alava en un 19 % de las repoblaciones se ha encontrado más de un haplotipo.

## DISCUSIÓN

A partir de este estudio se ha puesto de manifiesto que el 20.5 % de la bellota empleada en las repoblaciones de Alava y Guipúzcoa no es autóctona, y el 79.5 % restante es muy probablemente local. No obstante, conviene destacar que con estas técnicas únicamente se detecta el origen genético de las repoblaciones, lo cual no quiere decir que existan poblaciones u orígenes que se adapten bien a las condiciones del País Vasco.

En pocas ocasiones se conoce el origen genético de la semilla empleada, incluso posiblemente es desconocido por el propio viverista. A menudo la escasez de semilla autóctona en el mercado, es la razón por la que se ha de repoblar con semilla de origen foráneo.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan una información muy valiosa para los Servicios de Montes ya que mediante un método sencillo, barato y eficaz como es el análisis del ADN de cloroplastos (cpADN), se puede determinar en algunos casos la procedencia de la semilla utilizada en repoblaciones con especies de robles.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos de investigación FAIR1-PL95-0297 (UE) y AGF96-1428 (CICYT). Marta Olalde agradece a la Fundación *Iturriaga* y al Gobierno Vasco la concesión de una beca de Formación de Tecnólogos e Investigadores durante la cual participó en este proyecto. Asimismo deseamos expresar nuestro agradecimiento a Ander Isasmendi, Patxi Saéz de Urturi, Ana Herrán y Mónica Hernández, así como a los ingenieros y guardas de las Diputaciones Forales de Alava y Guipúzcoa.

## BIBLIOGRAFIA

DEMESURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R.J.; (1995). *A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast ADN plants*. Mol Ecol 4: 129-131.

- DUMOLIN, S.; DEMESURE, B.; PETIT, R.J.; (1995). *Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method*. Theor Appl Genet 91: 1253-1256.
- DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; DEMESURE, B.; FINECHI, S.; LE CORRE, V.; PETIT, R.J.; (1997). *Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent*. Genetics 146: 1475-1487.
- FERRIS, C.; OLIVER, R.P.; DAVY A.J.; HEWITT, G.M.; (1995). *Native oak chloroplast reveal an ancient divide across Europe*. Mol Ecol 2: 337-344.
- GOBIERNO VASCO; (1997). *Inventario Forestal de la Comunidad Autónoma del País Vasco*. Ed. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz.
- HERRAN, A.; ESPINEL, S.; GOICOECHEA, P.G.; (1999). *Utilización del polimorfismo del ADN de cloroplastos para definir regiones de procedencia materna en los robles blancos de la Península Ibérica*. Invest. Agr.: Sist. Recur. For. Vol. 8 (1): 139-150.
- OLALDE, M.; HERRÁN, A.; ESPINEL, S.; GOICOECHEA, P.G.; (2001). *White oaks phylogeography in the Iberian Peninsula*. Forest Ecol. Manage (en prensa).
- PETIT, R.J.; KREMER, A.; WAGNER, D.B.; (1993). *Geographic structure of chloroplast DNA polymorphism in European oaks*. Theor Appl Genet 87: 122-128.
- PETIT, R.J.; CSAIKL, U.M.; BORDÁCS, S.; BURG, K.; COART, E.; COTTRELL, J.; DEANS, J.D.; DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; FINESCHI, S.; FINKELDEY, R.; GILLIES, A.; GLAZ, I.; GOICOECHEA, P.G.; JENSEN, J.S.; KÖNIG, A.O.; LOWE, A.J.; MADSEN, S.F.; MÁTYÁS, G.; MUNRO, R.C.; OLALDE, M.; PEMONGE, M.H.; POPESCU, F.; SLADE, D.; TABBENER, H.; TAURCHINI, D.; VAN DAM, B.; ZIEGENHAGEN, B.; KREMER, A.; (2001). *Chloroplast DNA variation in European white oaks: synthesis based on data from over 2.600 populations*. Forest Ecol. Manage (en prensa).

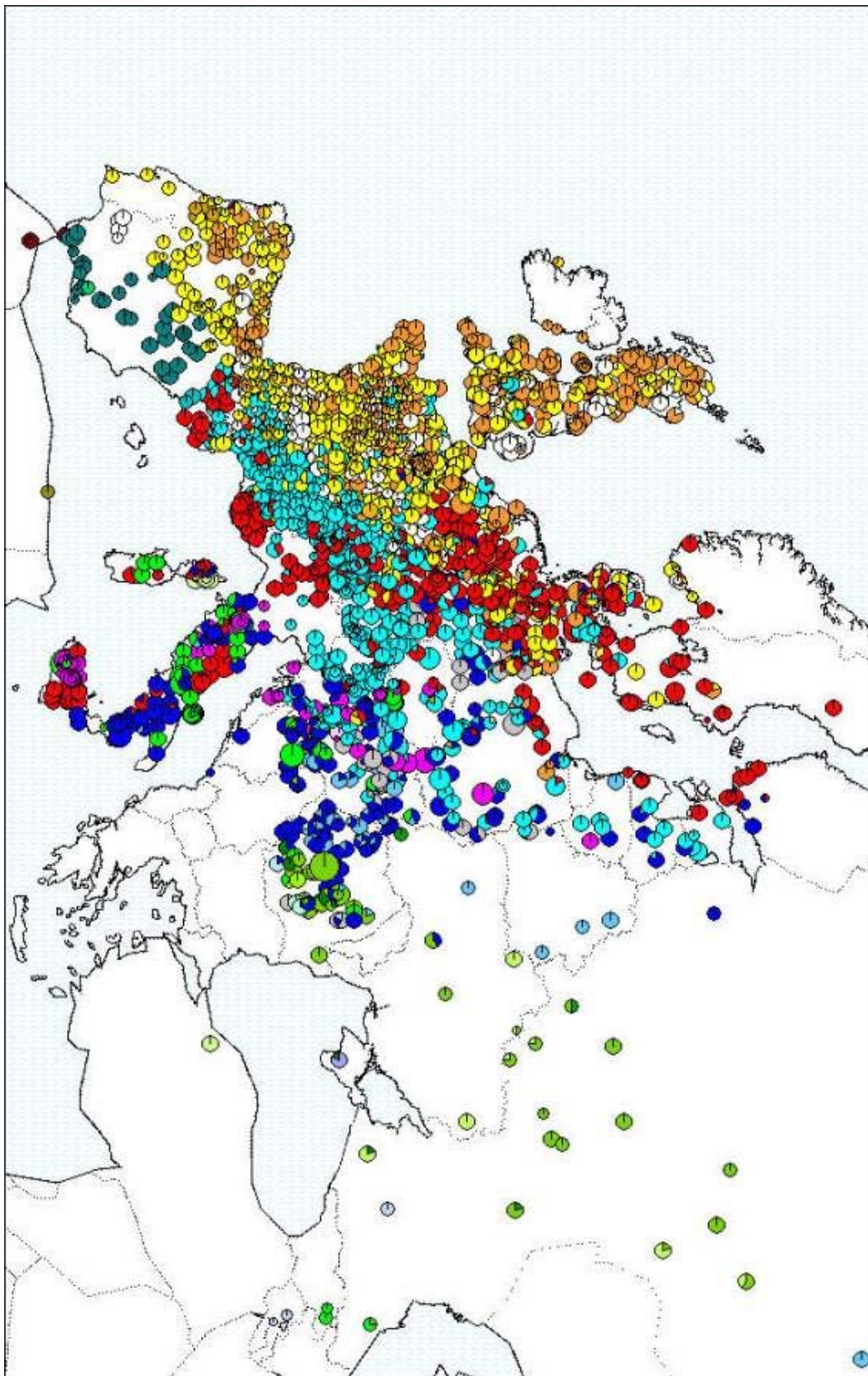


Figura 1: Distribución de los haplotipos de cpADN identificados en los robles blancos europeos (<http://www.pierroton.inra.fr/Fairoak/>)

[Volver / Return](#)

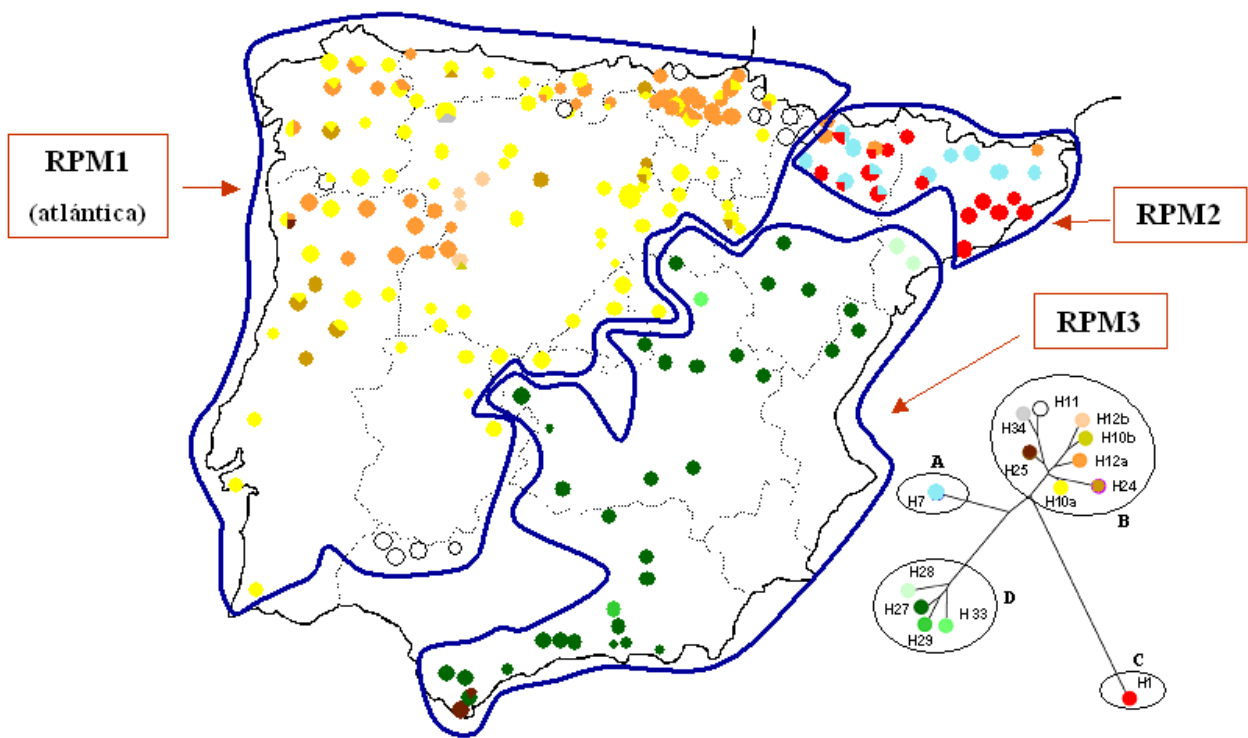


Figura 2: Relaciones filogenéticas y Regiones de procedencia materna (RPMs) para los robles blancos de la Península Ibérica (*Quercus canariensis*, *Q. faginea*, *Q. humilis*, *Q. petraea*, *Q. pyrenaica* y *Q. robur*) (Actualizada de Herrán *et al.*, 1999).

[Volver / Return](#)

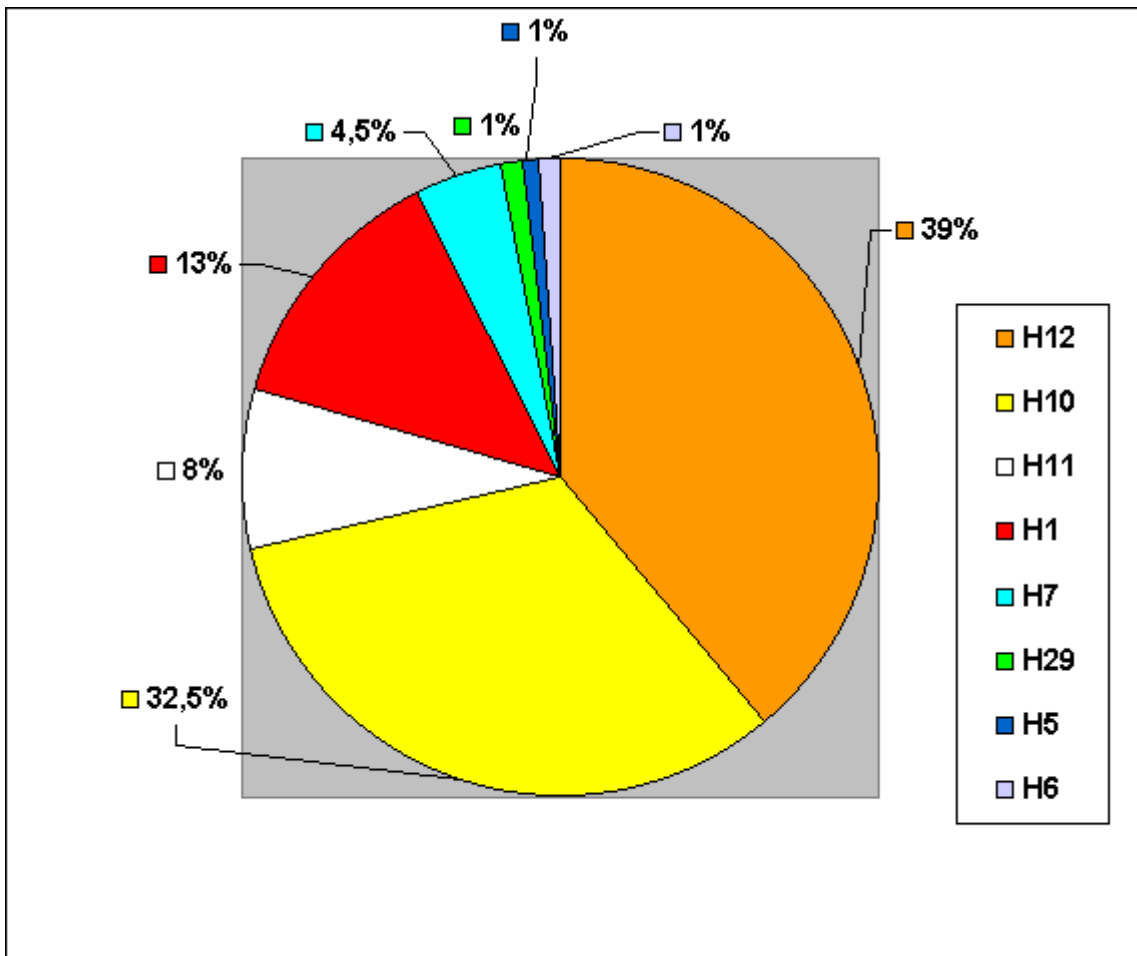


Figura 3: Representación porcentual de los 8 haplotipos presentes en las repoblaciones con robles blancos *Q. robur* y *Q. faginea* en Alava y Guipúzcoa

[Volver / Return](#)



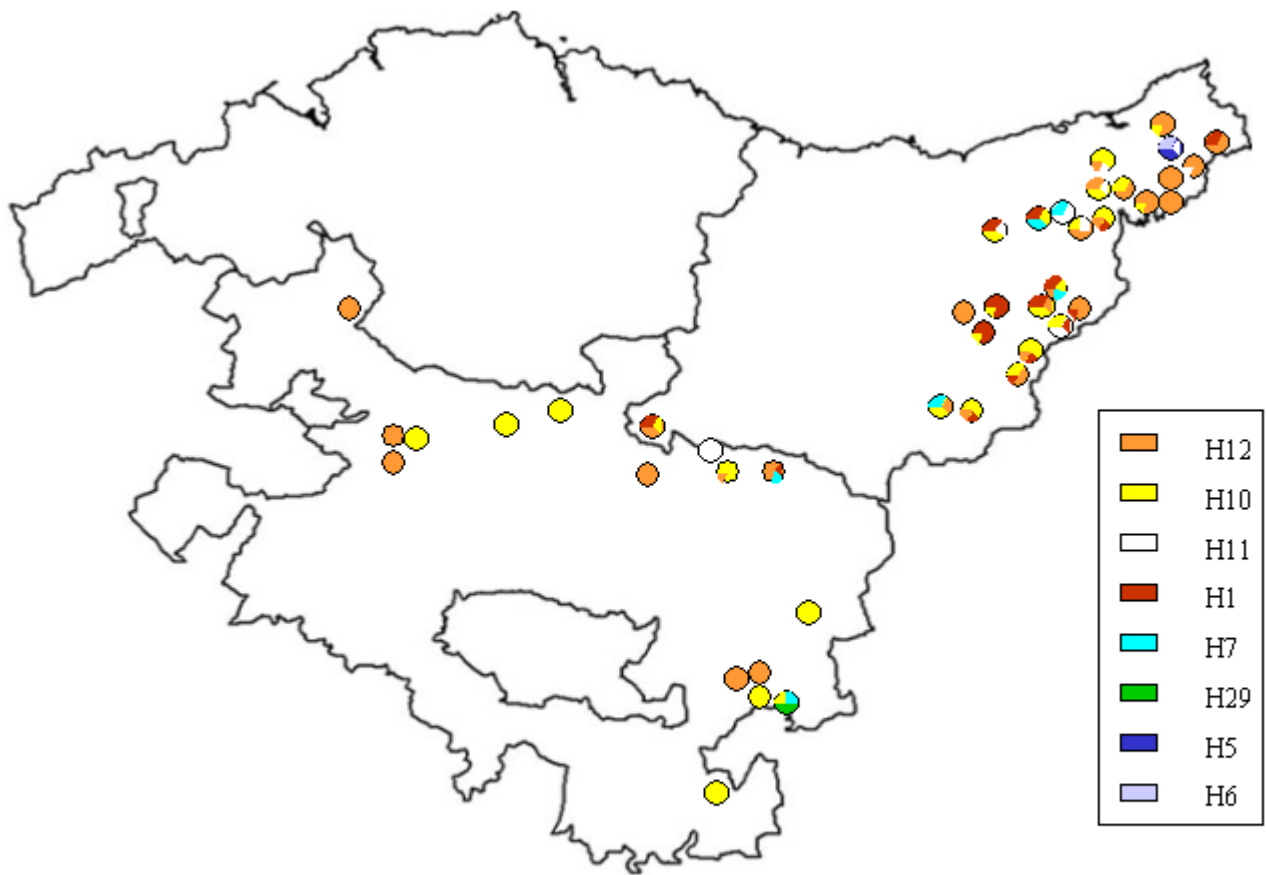


Figura 4: Distribución de los 8 haplotipos encontrados en las 43 repoblaciones de especies de robles blancos analizadas en Alava y Guipúzcoa. El tamaño de cada sector es proporcional al número de individuos analizados.

[Volver / Return](#)