

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE REPOBLACIONES DE *QUERCUS ILEX* L. SUBSP. *BALLOTA* (DESF.) SAMP. IN BOL. EN ANDALUCÍA

C. BURGARELLA^{1*}, M. NAVASCUÉS², S. FICI², A. LORA GONZÁLEZ³

¹Dip.to di Scienze Botaniche, Università di Palermo, Via Archirafi 38, 90123 Palermo (Italia).

²School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ (Reino Unido).

³Dpto. de Ingeniería Forestal, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Av. Menéndez Pidal s/n, 14080 Córdoba (España).

*e-mail: cr1burco@uco.es. Dirección actual: Centro de Investigación Forestal, CIFOR-INIA. Carretera de La Coruña km 7,5, 28040 Madrid (España).

Resumen

En el proceso de repoblación forestal el adecuado manejo del material de reproducción es fundamental para el mantenimiento de los recursos genéticos forestales. En el presente trabajo se evalúan los niveles de diversidad y diferenciación genética de masas artificiales de *Quercus ilex* en relación a las masas naturales adyacentes mediante microsatélites nucleares. Para una de las repoblaciones también fue posible el análisis de la población natural origen de la semilla utilizada. Los niveles de diferenciación genética obtenidos entre los núcleos naturales y artificiales y la disminución del nivel de diversidad genética entre la repoblación y la población origen de la semilla se discuten en el marco de la transferencia de material entre regiones de procedencia distintas y en relación a la estrategia de recolección de semilla (número de árboles productores de semilla muestreados).

Palabras clave: recursos genéticos forestales, muestreo de semillas, contaminación genética, microsatélites.

Abstract

An adequate management of the reproductive material for reforestation activities is fundamental in the conservation of forest genetic resources. In the present work the levels of genetic diversity and differentiation between artificial stands of *Quercus ilex* and the adjacent natural stands are assessed with nuclear microsatellites. Also, it was possible to analyse the natural population used as seed source for one of the reforestations studied. The levels of genetic differentiation between natural and artificial stands and the decrease of genetic diversity from the seed origin population to the reforestation are discussed in relation to the transference of seed among provenance regions and to the seed collection strategy (number of trees used for sampling seeds).

Keywords: forest genetic resources, seed collection, genetic contamination, microsatellites

INTRODUCCIÓN

La adecuada gestión del material forestal de reproducción empleado en las repoblaciones contribuye de forma determinante a la conservación de los recursos genéticos forestales. El mantenimiento de la diversidad y de la funcionalidad evolutiva (capacidad de adaptación) de los ecosistemas forestales hace necesario que en las prácticas de reforestación se conserve un nivel mínimo de diversidad genética y que ésta no constituya un peligro de contaminación del acervo genético local.

Estudios teóricos sobre el diseño de colecta de semillas como material de reproducción ponen de manifiesto que la deriva genética producida en el muestreo está fuertemente determinada por el número de plantas de las que se recoge semilla (VENCOVSKY & CROSSA, 1999). Por otro lado, dentro de los factores que no se pueden controlar en la colecta de semilla, el número y diversidad (es

decir, flujo genético externo) de individuos polinizadores incrementa la diversidad genética de los lotes de semillas (KANG *et al.*, 2002).

Las consecuencias de la introducción de material foráneo pueden ser dos: una baja adaptación a las condiciones locales y una contaminación genética de las poblaciones autóctonas (LEFÈVRE, 2004). Para evitar los problemas derivados de estos fenómenos la mejor estrategia es el uso del material de reproducción dentro de regiones de procedencia descritas mediante parámetros genéticos o ecológicos.

Los marcadores moleculares, tales como microsatélites, han demostrado ser herramientas útiles para la evaluación del número de árboles productores de semilla y polinizadores (LEXER *et al.*, 1999; LEXER *et al.*, 2000) y en la identificación de reforestaciones de origen alóctono (RIBEIRO *et al.*, 2002).

El objetivo del presente trabajo es la evaluación de las prácticas forestales en dos casos de repoblación con encina realizadas en Andalucía. Mediante la caracterización genética de estas repoblaciones y de masas naturales adyacentes con microsatélites nucleares se persigue deducir los efectos en la diversidad genética del número de árboles productores de semilla colectados y la transferencia de semilla entre localidades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dos casos han sido analizados en el presente estudio. Cada caso incluye una masa de repoblación de *Quercus ilex* subsp. *ballota* y el encinar natural más cercano a ésta. El primer caso esta compuesto por la repoblación del año 2001 en el término municipal de Alboloduy (semilla procedente de Sierra de Baza) junto con el encinar natural del Montenegro. En el segundo caso se incluyen la repoblación del año 2002 en el término municipal de Gádor (semilla procedente de Sierra Morena) y el encinar natural de los Peñones de Tremendo. En este último caso fue posible estudiar la masa natural concreta, el monte público de El Cazador (término municipal de El Madroño), de donde procedían las semillas usadas en la reforestación. Para cada una de las cinco poblaciones descritas fueron muestreados de 30 a 40 individuos, dejando una separación de 50 m entre individuos en las masas naturales.

La extracción del ADN se realizó de hojas verdes usando un protocolo basado en el descrito por DOYLE & DOYLE 1987. El genotipo de cada individuo se ha definido con 6 microsatélites nucleares: MSQ4, QpAG15, QpAG36, QpAG46 (DOW *et al.*, 1995; STEINKELLNER *et al.*, 1997) con el protocolo descrito en SOTO *et al.* (2003), y QrZAG11 y QrZAG20 adaptados de KAMPFER *et al.* (1998).

Para cada población la diversidad genética ha sido descrita mediante: riqueza alélica (A), número efectivo de alelos (A_e), heterocigosis esperada (H_e) e índice de fijación (F_{IS}), calculados con los programas Fstat 2.9.3.2 (GOUDET, 2001) y Genepop 3.4. (RAYMOND & ROUSSET, 1995). Diferencias significativas en los niveles de diversidad genética (número de alelos, A , A_e , e H_e) entre parejas de poblaciones se han determinado mediante permutaciones de los datos. Para cada pareja estudiada (repoblación-masa natural de referencia; repoblación-masa natural de origen) 1000 muestreos con reemplazamiento sobre los individuos se han usado para construir las distribuciones de los distintos índices de diversidad genética bajo la hipótesis nula de no diferenciación genética entre poblaciones. El nivel de significatividad (valor P) se ha calculado como la proporción de permutaciones que presentan diferencias mayores que los observados. Así mismo se ha verificado la heterogeneidad de las frecuencias alélicas entre poblaciones con el test de Fisher (Genepop 3.4.). El índice θ (análogo a F_{ST}) de diferenciación entre parejas de poblaciones y su significatividad se ha

calculado con Fstat 2.9.3.2.

Una estimación del número de árboles que han contribuido con las bellotas o con el polen a las repoblaciones se ha obtenido con Parentage 1.0 (EMERY *et al.*, 2001). Este programa utiliza el método de inferencia bayesiana para estimar el número de padres y el parentesco para un conjunto de individuos. Mediante un método de Monte Carlo de cadena de Markov (MCMC) se explora la distribución posterior del modelo y su ajuste a los datos. Los datos lo componen el conjunto de genotipos de los individuos estudiados (repoblaciones de Alboloduy y Gádor) y, para el caso de Gádor, las frecuencias alélicas de la población reproductora (obtenidas de la muestra de El Cazador). El modelo está constituido por los elementos desconocidos: número de padres y parentesco. Tras un periodo de calentamiento de 1000 pasos de la cadena se toman 1000 muestras (cada muestra separada por 100 pasos para asegurar la independencia del muestreo) para obtener la estimación. El número efectivo de madres y de padres se ha obtenido a raíz del éxito reproductivo por planta estimado con Parentage usando la fórmula $N_e = 1/\sum w_i^2$ donde w_i es la proporción de gametos (masculinos o femeninos, según se calcule el número efectivo de padres o madres) producidos por el individuo i con respecto al total de gametos (masculinos o femeninos) que han dado origen a la progenie (CROW & KIMURA, 1970). Las estimaciones de los números de padres y madres y números efectivos de padres (N_{ep}) y madres (N_{em}) se obtuvieron como la mediana para las 1000 muestras del MCMC; el intervalo de confianza (IC) del 95% se obtuvo mediante el método de los percentiles. La efectividad de este método se ha comprobado con progenies de pedigrí conocido de *Quercus ilex* genotipadas para los mismos microsatélites (LORENZO, Z.; SOTO, A. y GIL, L. datos no publicados).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de las medidas de diversidad genética para las distintas poblaciones se presentan en la tabla 1. Un total de 136 alelos se han identificado en los 6 microsatélites, con una media de 22,6 alelos por locus. Los niveles de heterocigosidad encontrados son altos. La desviación del heterocigosidad observada de la esperada (F_{IS}) indica un ligero déficit de heterocigotos en todos los núcleos examinados, pero que no llega a ser significativo ($P > 0,05$).

Comparando los valores multilocus de los índices de diversidad de las reforestaciones y de las masas naturales próximas (es decir, Alboloduy con Montenegro y Gádor con Tremendo) no se detectan diferencias significativas ($P > 0,05$) ni el número efectivo de alelos (A_e), ni en la riqueza alélica (A), ni en el nivel de heterocigosidad (H_e). Sin embargo, si se consideran los valores específicos para cada locus, la repoblación de Alboloduy y el bosque de Montenegro resultan significativamente diferentes ($P < 0,05$) en el número de alelos y la riqueza alélica de MSQ4 y QrZAG11 y del número efectivo de alelos ($P < 0,01$) y de la heterocigosidad de QpZAG15; el núcleo de Gádor y el bosque de Tremendo en el número efectivo de alelos, riqueza alélica y heterocigosidad de QpZAG46 ($P < 0,01$).

La comparación de las mismas parejas de poblaciones en la distribución de las frecuencias alélicas para el complejo de todos los loci (diferenciación génica), testada con el método de Fisher, resulta significativamente heterogénea ($P < 0,01$). Además, se puede notar que cada repoblación presenta numerosos alelos no detectados en las masas naturales cercanas: 14 Alboloduy (el 14,4% de sus alelos) y 19 Gádor (el 22,3%, Tabla 1).

Finalmente, el nivel de diferenciación genética medido con el índice θ (Tabla 2) es significativo para la repoblación de Gádor y el bosque de Tremendo, pero no lo es para Alboloduy y Montenegro.

La comparación repoblación-población de origen ha sido posible sólo entre Gádor y El Cazador: el número efectivo de alelos y la riqueza alélica estimados resultan significativamente superiores en la población de origen de El Cazador ($p < 0,05$), pudiéndose medir una reducción de A_e del 26% y de A

del 16 %. Como era esperable, la diferenciación genética es muy baja y no significativa (Tabla 2).

Es interesante notar que el bosque próximo a la repoblación, Tremendo, muestra valores de riqueza alélica y número efectivo de alelos aunque comparables con Gádor significativamente diferentes de la población de origen de la semilla, así como un valor de diferenciación significativo con El Cazador.

La estimación del número de árboles adultos implicados en la composición genética de las repoblaciones ha dado para Alboloduy el resultado de 13 madres (IC 95% = 10 a 16) y 20 padres (IC 95% = 16 a 26) potenciales, a los que corresponde un número efectivo de $N_{em} = 10,13$ (IC 95% = 7,84 a 12,50) y $N_{ep} = 15,38$ (IC 95% = 12,50 a 21,05) respectivamente. Similarmente, para la repoblación de Gádor se han estimado 18 madres (IC 95% = 12 a 23) y 23 padres (IC 95% = 18 a 26), correspondientes a $N_{em} = 13,55$ (IC 95% = 9,99 a 17,78) y $N_{ep} = 18,25$ (IC 95% = 14,41 a 21,73). Sin embargo, los resultados del análisis con un lote de plántulas de pedigrí conocido sugieren que el número de padres potenciales estimado con éste método pueda estar sobrestimado.

DISCUSIÓN

El nivel de diversidad genética representado en las dos repoblaciones de *Q. ilex* estudiadas no resulta significativamente bajo en comparación con las poblaciones naturales de la misma especie próximas al lugar del implante. No obstante, la distribución de las frecuencias alélicas significativamente diferente denota que la composición alélica no es homogénea entre núcleos artificiales y naturales en cada sitio.

Entre las posibles causas de la heterogeneidad detectada se puede apuntar el carácter artificial de la agrupación de individuos en una repoblación, el sesgo producido por una colecta de las bellotas de un limitado número de árboles, o cierta diferenciación genética entre la zona de procedencia y el área de realización de la repoblación. En el caso del núcleo de Alboloduy, el origen de las semillas es la Sierra de Baza, cercana geográficamente e incluida en la misma región de procedencia de Sierra Nevada (Mapa 1), haciendo que las diferencias detectadas con el bosque de Montenegro sean debidas probablemente a una combinación de los dos primeros factores antes mencionados. De hecho, se ha encontrado un nivel de diferenciación genética θ muy bajo. Al contrario, en el caso de la repoblación de Gádor la diferenciación genética entre la población de origen de la bellota (Sierra Morena en la provincia de Sevilla) y el encinar autóctono de los Peñones de Tremendo es significativa y probablemente sea una componente determinante de la diferencia encontrada en la estructura alélica de la repoblación en comparación con el bosque local.

El estudio de la repoblación realizada en la Sierra de Gádor pone de manifiesto la contradicción entre la definición de regiones de procedencia para garantizar la conservación del acervo genético local (JIMÉNEZ SANCHO *et al.*, 1996) y su uso efectivo. La transferencia de material forestal procedente de la Región Extremadura a la Región de Sierra Nevada-Filabres puede constituir un caso de contaminación genética a escala regional.

Para las dos repoblaciones estudiadas, el número estimado de árboles madre no supera los 13 individuos y el número estimado de polinizadores oscila entre 15 y 20 individuos. Algunas consideraciones teóricas establecen que, en especies predominantemente alógamas y en condiciones de flujo polínico ilimitado, una muestra de 500 semillas de cada uno de 15 árboles no emparentados entre sí incluye el 95% de los alelos (BROWN & HARDNER, 2000). Según este modelo el número de madres estimado para Alboloduy y Gádor podría ser suficiente para garantizar cierto nivel de diversidad genética, y al menos en comparación con las poblaciones naturales locales parece que lo sea. Sin embargo, con respecto a la variabilidad de la población de origen, probablemente incluir un número mayor de árboles en la colecta podría incrementar la diversidad genética en la repoblación, compensando de tal forma, además, el aparentemente reducido aporte de los polinizadores (para Gádor se han estimado en apenas 23). De forma complementaria, queriendo definir la viabilidad de las dos repoblaciones en términos de tamaño efectivo poblacional (N_e), los valores asociados son extremadamente bajos. Teniendo en cuenta que el número de las plántulas que se ponen se reduce

drásticamente hasta alcanzar la madurez, y por consecuente disminuye N_e y la diversidad genética inicialmente representada por las bellotas, el mantenimiento de alta diversidad genética en los lotes de semillas representaría una garantía para el éxito de las implantaciones en sí mismas y, sobre todo, cuando tengan el fin de reforzar poblaciones naturales relictas, aisladas o empobrecidas genéticamente, proporcionando un incremento de flujo genético necesario para prevenir el proceso de fijación de los alelos debido a la deriva genética (según SAVOLAINEN & KUITTINEN, 2000 sería suficiente un solo migrante por generación).

El presente trabajo constituye un ejemplo de la aplicabilidad de los parámetros de diversidad y del test de la homogeneidad de las frecuencias alélicas como indicadores de la conservación de la diversidad forestal, en acuerdo con BOYLE (2000). Este autor ha propuesto un sistema de indicadores genéticos que incluye los niveles de variación (descriptores: números de alelos, diversidad genética) y los cambios direccionales de las frecuencias alélicas y genotípicas (descriptores: variación de la frecuencia genotípica, de los marcadores o de los valores medios de los índices de diversidad genética). En el caso del manejo de núcleos de repoblación de nuestro estudio se muestra que puede ser informativo incluir la estimación del número de árboles madre y polinizadores. Como subraya BOYLE (2000), una dificultad en el uso de indicadores de este tipo es el establecimiento de un umbral para las medidas de los descriptores: nuestros resultados sugieren que la población de origen es la referencia más útil, aunque no sea necesariamente representativa a nivel regional.

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración del Laboratorio de Leguminosas del IFAPA de Córdoba y del Centro de Investigación Forestal CIFOR-INIA de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

BOYLE, T.; 2000. Criteria and indicators for the conservation of genetic diversity. En A. Young & D. Boshier & T. Boyle (Eds.), *Forest Conservation Genetics. Principles and Practice* (pp. 239-251). Oxon: CABI Publishing.

BROWN, H. D. & HARDNER, C. M.; 2000. Sampling the gene pools of forest trees for ex situ conservation. En A. Young & D. Boshier & T. Boyle (Eds.), *Forest conservation genetics. Principles and practice* (pp. 185 - 196). Wallingford. Oxon, U.K.: CABI Publishing.

CROW, J. F. & KIMURA, M.; 1970. *Introduction to population genetics theory*. New York-Evanston-London: Harper and Row Publ.

DOW, B.; ASHLEY, M. & HOWE, H.; 1995. Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 137-141.

EMERY, A. M.; WILSON, I. J.; CRAIG, S.; BOYLE, P. R. & NOBLE, L. R.; 2001. Assignment of paternity groups without access to parental genotypes: multiple mating and developmental plasticity in squid. *Mol Ecol*, 10: 1265-1278.

GOUDET, J.; 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Updated from Goudet (1995). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

JIMÉNEZ SANCHO, M. P.; DÍAZ-FERNÁNDEZ, P. M.; IGLESIAS SAUCE, S.; DE TUERO Y DE REINA, M. y GIL SÁNCHEZ, L.; 1996. *Las regiones de procedencia de Quercus ilex L. en España*. Madrid: ICONA.

KAMPFER, S.; LEXER, C.; GLÖSSL, J. & STEINKELLNER, H.; 1998. Characterization of (GA)_n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas*, 129: 183-186.

KANG, K. S.; LAI, H.-L. & LINDGREN, D.; 2002. Using single family in reforestation: gene diversity concerns. *Silvae Genetica*, 51(2-3): 65-72.

LEFÈVRE, F.; 2004. Human impacts on forest genetic resources in the temperate zone: an updated review. *For. Ecol. Manag.*, 197(1-3): 257-271.

LEXER, C.; HEINZE, B.; STEINKELLNER, H.; KAMPFER, S.; ZIEGENHAGEN, B. &

GLÖSSL, J.; 1999. Microsatellites analysis of maternal half-sibs families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contaminations and inference of the seed parents from the offspring. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 185-191.

LEXER, C.; HEINZE, B.; GERBER, S.; MACALKA-KAMPFER, S.; STEINKELLNER, H.; KREMER, A. & GLÖSSL, J.; 2000. Microsatellites analysis of maternal half-sibs familie of *Quercus robur*, pedunculate oak: II. Inferring the number of pollen donors from the offspring. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 858-865.

RAYMOND, M. & ROUSSET, F.; 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 86: 248-249.

RIBEIRO, M. M.; LEPROVOST, G.; GERBER, S.; VENDRAMIN, G. G.; ANZIDEI, M.; DECROOQ, S.; MARPEAU, A.; MARIETTE, S. & PLOMION, C.; 2002. Origin identification of maritime pine stands in France using chloroplast simple-sequence repeats. *Annals of Forest Science*, 59: 53-62.

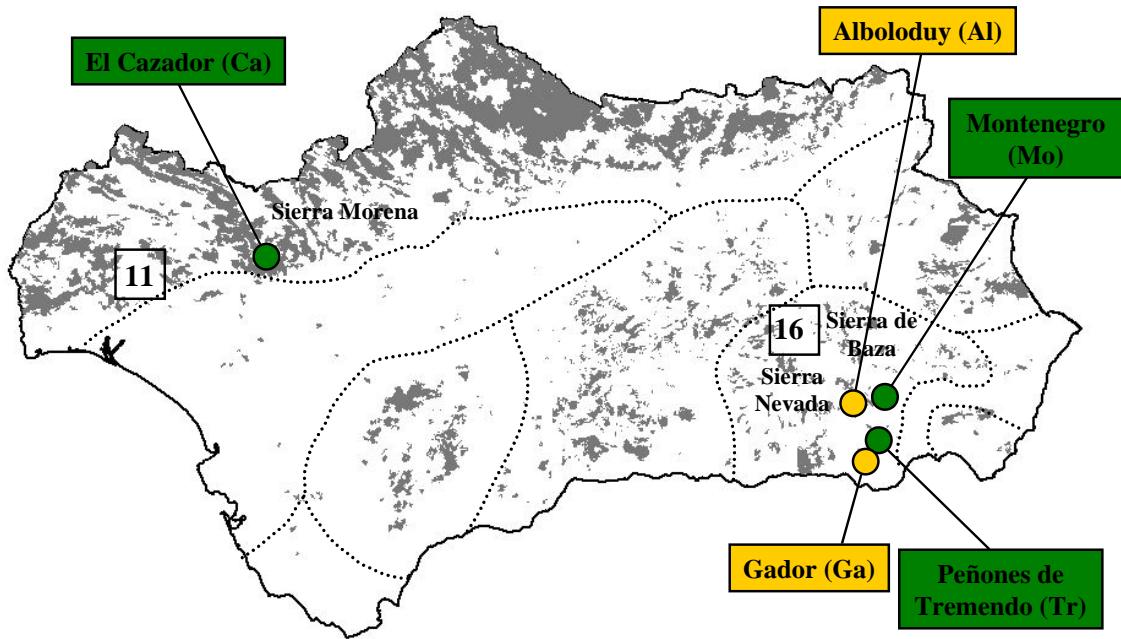
SAVOLAINEN, O. & KUITTINEN, H.; 2000. Small population processes. En A. Young & D. Boshier & T. Boyle (Eds.), *Forest Conservation Genetics. Principles and Practice* (pp. 91-100). Oxon: CABI Publishing.

SOTO, A.; LORENZO, Z. y GIL, L.; 2003. Nuclear microsatellites markers for the identification of *Quercus ilex* L. and *Quercus suber* L. híbrids. *Silvae Genetica*, 52(2): 63-66.

STEINKELLNER, H.; FLUCH, S.; TURETSCHKE, E.; LEXER, C.; STREIFF, R.; KREMER, A.; BURG, K. & GLÖSSL, J.; 1997. Identification and characterization of (GA/CT)_n - microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology*, 3: 1093-1096.

VENCOVSKY, R. & CROSSA, J.; 1999. Variance effective population size under mixed self and random mating with applications to genetic conservation of species. *Crop Science*, 39: 1282-1294.

Figura 1. Localización de las repoblaciones y de las poblaciones naturales de *Q. ilex* estudiadas en Andalucía.



- Límites de las regiones de procedencias de *Q. ilex* (JIMÉNEZ SANCHO *et al.* 1996).
11 Región Extremadureña; 16 Sierra Nevada – Filabres.
- Poblaciones naturales estudiadas
- Núcleos artificiales estudiados
- Cobertura de encinar nivel 6 y 7 (Mapa Forestal de España)

Tabla 1. Tamaño muestral (n) y medidas de diversidad genética (A , riqueza alélica, A_e número efectivo de alelos, H_e , heterocigosidad esperada y F_{IS} índice de endogamia) para las cinco muestras estudiadas. Para A , A_e y H_e se muestra el valor medio entre loci y la desviación típica entre paréntesis.

	Alboloduy (Al)	Montenegro (Mo)	El Cazador (Ca)	Gádor (Ga)	Tremendo (Tr)
n	40	40	40	37	31
Alelos totales (exclusivos)	97 (4)	96 (3)	104 (11)	85 (5)	88 (6)
Alelos de la repoblación ausentes en la población de referencia	14			19	
A media¹	11,29 (4,60)	11,14 (5,73)	12,13 (5,26)	10,29 (4,47)	10,32 (5,00)
A_e media	7,04 (3,84)	7,70 (5,28)	8,84 (6,24)	6,67 (4,20)	7,90 (5,67)
H_e media	0,76 (0,21)	0,76 (0,21)	0,76 (0,25)	0,72 (0,27)	0,74 (0,27)
F_{IS} multilocus	0,137	0,145	0,091	0,088	0,119

Tabla 2. Diferenciación genética θ por parejas de poblaciones. * valor $P < 0,05$.

	Montenegro	Cazador	Gádor	Tremendo
Alboloduy	0,0075	0,013	0,0238*	0,0072
Montenegro		-0,0008	0,0098*	0,0234
El Cazador			0,004	0,0323*
Gádor				0,0413*