

VARIABILIDAD GENÉTICA DE CARACTERES ADAPTATIVOS EN *PINUS HALEPENSIS* Mill.

López, R.^{1*} Alía, R.², Palacios, P.¹, García-Esteban, L.¹, Climent, J.²

¹ Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética Forestal. ETSI de Montes (UPM). Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

² CIFOR-INIA. Carretera de La Coruña. Km 9. 28040 Madrid.

*autor para correspondencia:

e-mail: rosana.lopez@upm.es

Resumen

Se evaluó la variación intraespecífica del pino carrasco (*Pinus halepensis* Mill.) en caracteres relacionados con el crecimiento, biomasa y la supervivencia a la edad de siete años en veintidós procedencias del área de distribución española de la especie en dos parcelas de ensayo situadas en Madrid. El objetivo principal fue encontrar atributos que combinen el significado adaptativo con la capacidad de discriminación entre genotipos. Los resultados mostraron la existencia de variabilidad intraespecífica y diferencias en el control genético para caracteres posiblemente adaptativos relacionados con la morfología y anatomía foliar, el crecimiento, la biomasa y la fructificación, pero no en la supervivencia. La variación interanual del crecimiento en altura en los dos últimos años siguió un mismo patrón en todas las procedencias, sin interacción significativa procedencia x año. Por otra parte, el análisis de una submuestra de los materiales ensayados mostró diferencias significativas entre procedencias en la estructura del xilema, en caracteres relacionados con el balance hídrico y la acumulación de reservas (diámetro y longitud de los elementos conductores y densidad de elementos radiales). Se intentaron relacionar las variables climáticas de origen y del sitio de ensayo con los caracteres analizados.

Palabras clave: procedencias, adaptación, crecimiento, morfología foliar, variación del xilema.

INTRODUCCIÓN

La adaptación de las plantas a diferentes localidades, entendiendo esa adaptación como eficacia reproductiva (*fitness*), puede medirse casi directamente en especies anuales o de ciclos reproductivos cortos (SULTAN, 2000). Sin embargo, los árboles forestales son longevos y alcanzan tarde la madurez reproductiva por lo que el *fitness* se ha venido evaluando indirectamente a través la supervivencia y de caracteres de crecimiento, asumiendo la correlación de estas variables con la capacidad de reproducción. Por otra parte, la diversidad genética neutra y la diversidad evaluada en caracteres cuantitativos o adaptativos están en general poco relacionadas entre sí en especies forestales (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2002), por lo que los ensayos en ambiente común constituye una aproximación necesaria para conocer la diferenciación adaptativa y el potencial evolutivo de una especie o población.

El pino carrasco es una especie típica mediterránea. Es el más frugal de los pinos españoles pudiendo vivir en condiciones de clima y suelo en las que no crecería ninguna otra especie arbórea. Además, presenta una alta capacidad de regeneración después del incendio, perturbación frecuente en su área de distribución, con la que el pino carrasco ha evolucionado y a la que ha respondido mediante una estrategia de fructificación precoz y el mantenimiento de un destacado banco aéreo de semillas (GIL *et al.*, 1996; TAPIAS *et al.*, 2001). En general, se supone que el *Pinus halepensis* es una especie plástica. El estudio de los ciclos de crecimiento y floración en años sucesivos (PARDOS

et al., 2003) y en crecimiento en altura y diámetro (CHAMBEL & ALÍA, 2002) han revelado notables diferencias en función de las condiciones climáticas de ensayo, además, los ensayos de procedencias de esta especie han demostrado la existencia de interacción genotipo-ambiente en caracteres relacionados con la adaptación al frío y la sequía, lo que implica una adaptación diferencial de las procedencias a los sitios de ensayo (ALÍA *et al.*, 2001; CALAMASSI & FALUSI, 1980; CALAMASSI, 1986).

El estudio de la variabilidad genética de *Pinus halepensis* mediante marcadores moleculares ha puesto de manifiesto que se trata de una especie poco variable dentro del género (SCHILLER *et al.*, 1986; SCHILLER & GRUNWALD, 1987; BARADAT *et al.*, 1995). La variación detectada por estos marcadores es neutra, en el sentido de que no responde en general (con la excepción de algunas isoenzimas) a procesos selectivos del medio sobre las poblaciones, y por tanto, la diferenciación entre poblaciones puede estar infraestimada.

En este estudio se pretende evaluar la variación intraespecífica del pino carrasco respecto a un gran número de caracteres relacionados con el crecimiento, biomasa, supervivencia, morfología foliar y anatomía del xilema. Para ello, se llevaron a cabo mediciones destructivas en dos parcelas de un ensayo de procedencias que cubren todo el área de distribución española de la especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se evaluaron veintidós procedencias españolas de un ensayo de procedencias-progenies de *Pinus halepensis* (figura 1) en dos sitios de ensayo situados uno en el vivero de Puerta de Hierro (Madrid) perteneciente a la DGB y el otro en el INIA. Debido a la proximidad de las dos localidades y a la identidad de condiciones climáticas, el análisis de los datos se realizó conjuntamente, es decir, como si fuera una única parcela. El diseño fue en ambas de bloques completos al azar con dos o tres árboles por familia (unidad experimental), cinco familias por procedencia y un total de cinco réplicas.

Los árboles se aparearon en el 2003, a los siete años de edad, y se midieron las siguientes variables: altura total (*h03*), altura de 2002 y 2001 (*h02* y *h01*, respectivamente), diámetro basal (*db*), diámetro normal (*dn*), número de ciclos totales (*nc*), número de ciclos con acículas vivas (*ncv*), longitud y diámetro de la guía con acículas vivas (*lv* y *dv*), diámetro y longitud de una rama lateral elegida al azar del verticilo donde el eje principal conservaba acículas vivas (*lr* y *dr*), número de piñas y altura de la primera piña (*x* y *hx*), peso de las ramas (*pr*), peso del eje principal desramando (*pv*) y peso de la guía terminal (*pg*). A partir de estas variables se calculó el crecimiento de los años 2002 (*crec02*) y 2003 (*crec03*) y la biomasa aérea total (*bio*).

Se eligieron dos submuestras de procedencias para llevar a cabo un análisis anatómico del xilema y otro de morfología acicular. Para el estudio del xilema se realizaron preparaciones microscópicas de la sección basal de 42 árboles pertenecientes a 2 familias distintas de 3 procedencias, Guardiola (Barcelona), Palma de Mallorca (Baleares) y Carratraca (Málaga). En cada muestra se midió, además del crecimiento en diámetro (*dx*), en el corte transversal el diámetro de 25 traqueidas (*traqd*) y de 10 canales resiníferos (*chd*), en el radial la longitud de las traqueidas (*longtraq*) y se contabilizó el número de punteaduras por campo de cruce en 25 ocasiones (*pitt*) y en el corte tangencial el diámetro de 10 canales tangenciales (*tgchd*), número de radios (*nrad*), número total de células radiales (*celrad*) en $0,25 \text{ mm}^2$ y número de radios en función del número de células.

La anatomía acicular se evaluó en cuatro familias de cuatro procedencias, Cabanellas (Gerona), Zuera (Zaragoza), Ves (Albacete) y Carratraca (Málaga). En cinco acículas por muestra se midió en cortes transversales el área total, y las áreas de tejidos protectores (conjunto epidermis+hipodermis), del conjunto estela más endodermis (endodermis+tejido de transfusión+haces vasculares), del mesófilo y de los canales resiníferos. Se amplió la submuestra de procedencias a diez para obtener el peso seco foliar por unidad de área como índice de esclerofilia (GRATANI & BOMBELLI, 2000).

Análisis de los datos

El número de árboles por unidad experimental, tres, fue demasiado pequeño como para poder evaluar de manera eficiente las diferencias en el porcentaje de supervivencia a nivel de familia

(intraprocedencia) por lo que se analizó sólo entre procedencias. Para ello se empleó un ANOVA con suma de cuadrados tipo III.

La variación interanual del crecimiento en altura de las distintas procedencias en los dos últimos años del ensayo se evaluó representando en un diagrama cartesiano en el eje de abscisas el crecimiento medio de las procedencias del año 2002 y en el de ordenadas el de 2003. Para hallar dicho crecimiento se realizó un GLM con factores bloque, procedencia y familia anidada en procedencia y la altura inicial del año en cuestión como covariable para compensar el efecto ontogénico en el crecimiento. Los puntos de la línea con pendiente igual a 1 representarían ausencia de plasticidad. Cuanto más alejado esté un punto de esta bisectriz, el genotipo correspondiente será más plástico (PIGLIUCCI & SCHLICHTING, 1995). Se intentó relacionar el crecimiento de estos dos años con el número de ciclos y la duración del periodo vegetativo evaluado a través de los datos climáticos de temperatura y precipitaciones proporcionados por una estación situada en el sitio de ensayo (figura 2).

Debido a que se encontró correlación espacial significativa en los sitios de ensayo, para analizar los datos de las variables *h03*, *db*, *dn*, *nc*, *ncv*, *x* y *bio* se construyeron los variogramas de las dos parcelas de estudio con objeto de, utilizando el método de *kriging*, definir unas nuevas variables restando a las originales la correlación espacial. Estas últimas se estudiaron con un modelo lineal generalizado (GLM) con tres factores: bloque, procedencia y familia, considerando la familia anidada dentro de la procedencia y todas las interacciones posibles.

Los datos del xilema y de la morfología acicular se analizaron con un GLM con los factores procedencia, familia dentro de procedencia y árbol dentro de familia y se relacionaron los resultados con las condiciones climáticas de origen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Supervivencia y caracteres de crecimiento

No se encontraron diferencias significativas entre procedencias para la supervivencia ni para la variación interanual del crecimiento. Se observó en todos los casos un mayor crecimiento en el año 2003 y además una respuesta muy similar, es decir la interacción procedencia x año no resultó significativa (figura 3). Los estudios realizados sobre la fenología de esta especie muestran una gran dependencia de las condiciones ecológicas del sitio (PARDOS *et al.*, 2003). En este ensayo el crecimiento de los brotes vegetativos comenzó a finales de enero principios de febrero, con el alargamiento de las yemas formadas el otoño anterior. Cabe pensar que las bajas precipitaciones de febrero de 2002 pudieron retrasar el inicio de la elongación del brote respecto a febrero de 2003. Podemos especular que las elevadas lluvias durante el otoño de 2002 contribuyeron en el brote preformado para 2003. La influencia de las precipitaciones de años anteriores en la longitud del brote y la floración fue demostrada para *Pinus pinea* en nuestro país (MUTKE *et al.*, 2003). No obstante, pese a la incorporación de la variable, no podemos descartar el efecto ontogénico (en este caso, incremento del crecimiento absoluto con la edad) en la respuesta observada ya que nos hallamos en la zona exponencial de la curva de crecimiento. El modelo establecido para evaluar la existencia o no de diferencias entre procedencias en las variables *h03*, *db*, *dn*, *nc*, *ncv*, *x* y *bio* explicó entre el 60% y el 90% de la variabilidad. Se observaron diferencias significativas entre procedencias para todas las variables estudiadas lo que parece indicar la existencia de variabilidad adaptativa dentro de la especie. El factor familia no fue significativo en ningún caso debido tal vez al bajo número de progenies por procedencia. Las procedencias con mayores crecimientos en altura y diámetro no coincidieron con las que presentaron mayor número de ciclos totales o vivos. Si bien destacaron algunas procedencias costeras como Guardiola (Barcelona) y Tibi (Alicante) con valores altos de ambas variables y por el contrario Hajar (Teruel) con valores muy bajos.

Si bien se encontraron diferencias significativas entre poblaciones en el número de conos femeninos, el escaso número de árboles que había fructificado hace que la comparación de este carácter sea poco eficiente.

Anatomía del xilema

Las variables del xilema que diferenciaron más las procedencias fueron el diámetro de las

traqueidas, el diámetro de los canales en el corte transversal y número de radios y número de células radiales por unidad de superficie. Asimismo, la familia fue un factor significativo en la longitud de las traqueidas. Sólo se encontró correlación entre el número de radios y el número de células radiales por unidad de superficie y el crecimiento en diámetro con el diámetro de las traqueidas y con el número de células radiales. Parece que el diámetro y la longitud de las traqueidas están íntimamente relacionado con el periodo seco de las localidades de origen. Se ha encontrado que las procedencias con menor número de meses secos son las que presentan traqueidas de mayor diámetro y menor longitud. Los diámetros grandes hacen más eficiente la conducción de agua pero podrían suponer mayor riesgo de cavitación, si bien ambos aspectos no parecen ser necesariamente antagónicos en coníferas mediterráneas (FROUX *et al.*, 2002).

Morfología y anatomía foliar

No se observaron diferencias en el peso foliar por unidad de área entre procedencias pero sí entre familias, lo que nos indica que es un factor controlado genéticamente a nivel familiar y no de población. Sin embargo, tanto la familia como la procedencia influyeron significativamente en la anatomía foliar. El porcentaje del área total ocupado por el mesófilo fue menor en la procedencia de Ves (Albacete) que es la que tiene menor precipitación anual. El porcentaje del área total ocupado por la endodermis, tejido de transfusión y haces vasculares fue significativamente menor en Cabanellas (Gerona) que en el resto de localidades. Esta procedencia, a diferencia de las otras, carece de periodo seco y es la que disfruta de temperaturas más suaves durante todo el año.

CONCLUSIONES

La variabilidad intraespecífica de *Pinus halepensis* en España difiere en los distintos caracteres estudiados. Todas las procedencias presentaron un alto índice de supervivencia aunque provenían de regiones con características ecológicas muy distintas. La estructura del xilema y la anatomía acicular parecen estar menos influidas por el ambiente y más controladas genéticamente que el crecimiento y la fructificación.

Agradecimientos

A Fernando del Caño, Sara Herrera y Santiago de Blas por su participación en el trabajo de campo, a Beatriz Becerril por la realización de los cortes microscópicos para el análisis de la anatomía del xilema y a Francisco Masedo por sus consejos en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- ALÍA, R.; GÓMEZ, A.; AGÚNDEZ, M.D.; BUENO, M.A. & NOTIVOL, E.; 2001. Levels of genetic differentiation in *Pinus halepensis* Mill. in Spain using quantitative traits, isozymes, RAPDs and cp-microsatellites. In: Müller Starck, G. & Shubert, R. (eds.). *Genetic Response of Forest Systems to Changing Environmental Conditions*. 70, 151-159. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London.
- BARADAT, P.; MICHELOZZI, M.; TOGNETTI, R.; KHOUJA, M.L. & KHALD, A.; 1995. Geographical variation in the terpene composition of *Pinus halepensis* Mill. In: Baradat, P.; Adams, W. T. & Muller-Starck, G. (eds.), *Population genetics and genetic conservation of forest trees*, 141-158 .
- CALAMASSI, R. 1986. Caractérisation de quelques provenances de *Pinus halepensis* Mill. sur la base de la structure anatomique-morphologique des aiguilles. *Ann. Sci. For.* 43(3): 281-298.
- CALAMASSI, R. & FALUSSI, M.; 1980. Variazione geografica e resistenza a stress idrici in semi de *P. halepensis* Mill, *P. brutia* Tenn. e *P. eldearica* Medw. *Annali dell' Istituto Sperimentale per la Selvicoltura* 9: 103-130 .
- CHAMBEL, M.R. & ALÍA, R.; 2002. Phenotypic plasticity in mediterranean pines (*Pinus pinaster*, *Pinus halepensis* and *Pinus nigra*). In '*Medpine2- International meeting on Mediterranean pines*'. Chania, Creta (Greece).

- FROUX, F.; HUC, R.; DUCREY, M. & DREYER, E.; 2002. Xylem hydraulic efficiency versus vulnerability in seedlings of four contrasting Mediterranean tree species (*Cedrus atlantica*, *Cupressus sempervirens*, *Pinus halepensis* and *Pinus nigra*). *Annals of Forest Science* 59(4): 409-418.
- GRATANI, L. & BOMBELLI, A.; 2000. Correlation between leaf age and other leaf traits in three Mediterranean maquis shrub species: *Quercus ilex*, *Phillyrea latifolia* and *Cistus incanus*. *Environmental and Experimental Botany* 43: 141-153.
- GIL, L.; DÍAZ-FERNÁNDEZ, P.; JIMÉNEZ, M. P.; ROLDÁN, M.; ALÍA, R.; AGÚNDEZ, D.; DE MIGUEL, J.; MARTÍN, S. y DE TUERO, M.; 1996. *Las regiones de procedencia de Pinus halepensis Mill.* Editorial O. A. De Parques Nacionales, DGCONA. Madrid, 113pp.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; ALÍA, R. & GIL, L.; 2002. Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity* 89(3): 199-206.
- MUTKE, S.; GORDO, J.; CLIMENT, J. & GIL, L.; 2003. Shoot growth and phenology modelling of grafted stone pine (*Pinus pinea* L.) in Inner Spain. *Ann. For. Sci.* 60: 527-537.
- PARDOS, M.; CLIMENT, J.M.; GIL, L. & PARDOS, J.A.; 2003. Shoot growth components and flowering phenology in grafted *Pinus halepensis* Mill. *Trees*. 17: 442-450.
- PIGLIUCCI, M. & SCHLICHTING, C. D.; 1995. Reaction norm of *Arabidopsis* (Brassicaceae) III. Response to nutrients in 26 populations from a worldwide collection. *Amer. Jour. Bot.* 82: 1117-1125.
- SCHILLER, G.; CONKLE, M.T. & GRUNWALD, C.; 1986. Local differentiation among Mediterranean populations of Aleppo pine in their isoenzymes. *Silvae Genetica* 35(1): 11-19.
- SCHILLER, G. & GRUNWALD C.; 1987. Resin monoterpenes in range-wide provenance trials of *Pinus halepensis* Mill. in Israel. *Silvae Genetica* 36(3-4): 109-114.
- SULTAN S. E.; 2000. Phenotypic plasticity for fitness components in polygonum species of contransings ecological breath. *Ecology* 82(2): 328-343.
- TAPIAS, R.; GIL, L.; FUENTES-UTRILLA, P. & PARDOS, J.A.; 2001. Canopy seed banks in Mediterranean pines of South-eastern Spain: a comparison between *Pinus halepensis* Mill., *P. pinaster* Ait., *P. nigra* Arn. and *P. pinea* L. *Journal of Ecology*. 89: 629-638.

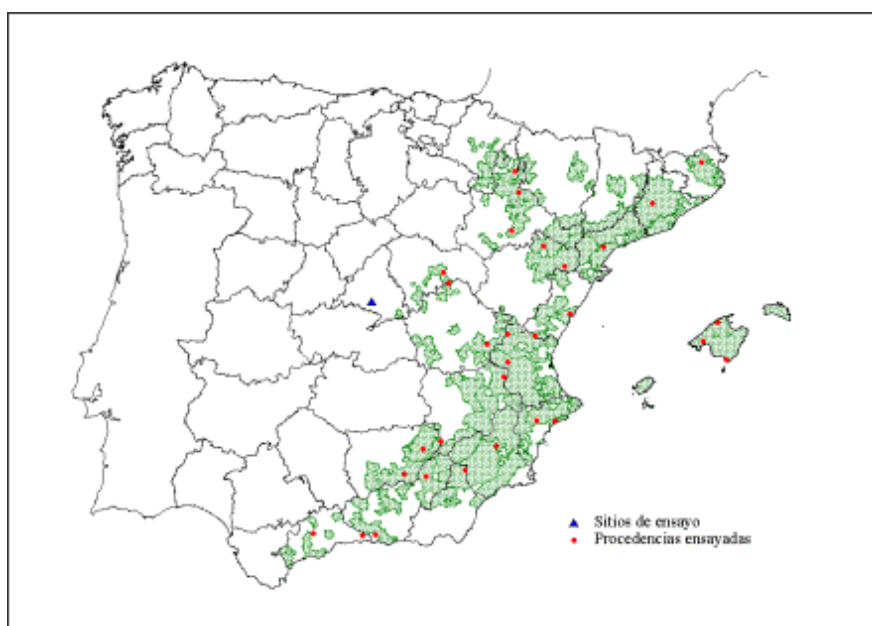


Figura 1. Localización de las procedencias estudiadas y los sitios de ensayo.

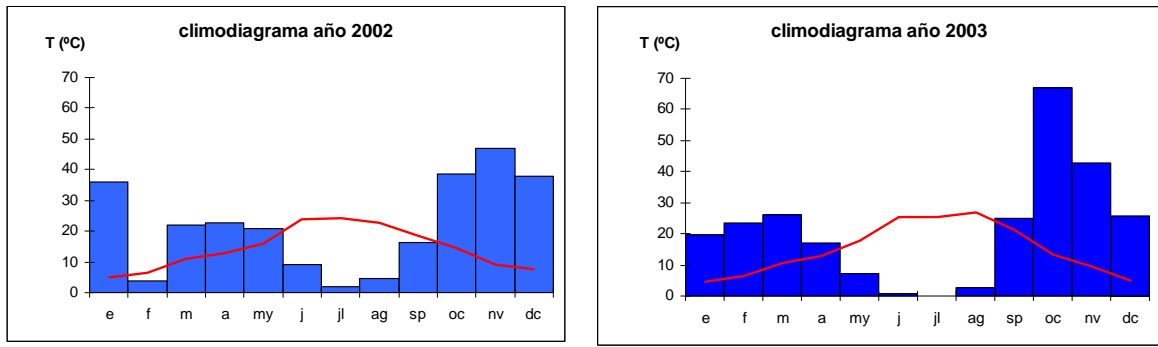


Figura 2. Climodiagramas del sitio de ensayo. Año 2002 (derecha) y año 2003 (izquierda).

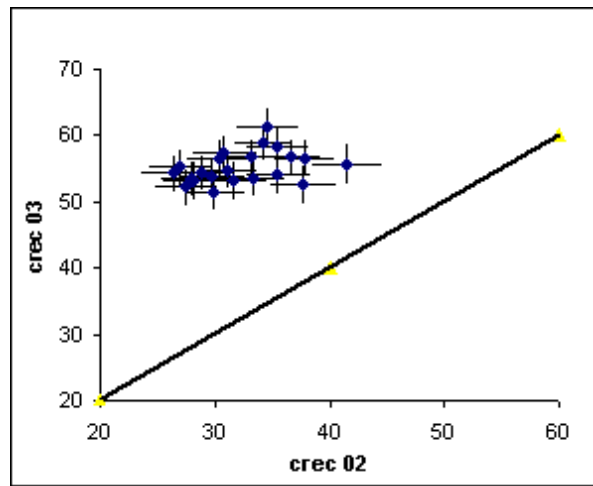


Figura 3. Comparación del crecimiento en 2002 y 2003 para las distintas procedencias.