

CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPECIES *POPULUS ALBA* L., *POPULUS TREMULA* L. Y *POPULUS X CANESCENS* (Ait.) Sm. MEDIANTE CARACTERES MORFOLÓGICOS Y MARCADORES MOLECULARES.

De Lucas A-I, Sierra R, Cristóbal M-D, López U, San Martín R, Martínez P.
Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura. ETSIIAA. Palencia.
Avda de Madrid 57, Palencia (Spain).

RESUMEN

Se ha realizado un estudio de la estructura de las poblaciones de especies de chopos autóctonos: *Populus tremula* L., *Populus alba* L. y *Populus x canescens* (Ait.) Sm., dado que su identificación, caracterización morfológica y ensayo como material genético puede conducir a la obtención de individuos adaptados a terrenos marginales y restauración de zonas de ribera degradadas. La caracterización de estas especies se ha realizado mediante análisis morfológicos y análisis isoenzimáticos. Se han encontrado parámetros morfológicos discriminantes entre especies y patrones de bandas isoenzimáticas que pueden utilizarse como resultados preliminares en la diferenciación de especies a nivel genético.

PALABRAS CLAVE: *P. alba*, *P x canescens*, *P. tremula*, isoenzimas, caracterización, Palencia.

SUMMARY

Native aspen (*Populus tremula* L., *Populus alba* L. And *Populus x canescens* (Ait.) Sm.) structure population is studied in depth since its identification, morphological characterization and genetic test might achieve adapted individuals to marginal sites and river banks restoration. The characterization of these species has been made through morphological and isoenzymatic analysis. Discriminant morphological parameters have been found between species and isoenzymatic band patterns, may be used as preliminar results in order to get genetic level species differentiation.

KEY WORDS: *P. alba*, *P x canescens*, *P. tremula*, isozymes, characterization, Palencia

INTRODUCCIÓN

El limitado número de clones sobre el que se sustenta la populicultura española, la mayoría de procedencia foránea, hace que a medio plazo, puedan plantearse problemas de inadaptación y una pérdida de recursos genéticos (Padró, 1987).

El cultivo de estos clones extranjeros se limita en la práctica a terrenos de buena calidad, donde se pueden lograr rendimientos óptimos. Existe por tanto, una carencia de clones alternativos adaptados a terrenos arcillosos, con sales o escasa disponibilidad de agua (Grau, 1991; Padró, 1992).

Este tipo de terrenos existen en algunas áreas de la comarca palentina del Cerrato. Suelos de valle caracterizados por un alto pH, alto contenido en caliza activa y elevados contenidos en yeso y texturas francas o franco-arcillosas (Del Peso et al, 1997), y sobre ellos se han encontrado ejemplares de álamos con un aspecto muy similar a *Populus tremula*. Su presencia en una zona fuera del rango ecológico y geográfico habitual de la especie, hacen pensar que realmente son híbridos entre *P.*

alba y *P. tremula* (*P. x canescens*, que en la Comarca del Cerrato es denominado como *P. x cerratensis* por Oria de Rueda, 1996).

La excelente presencia de regeneración procedente de renuevos de raíz y el estado sanitario aceptable de la mayoría de las masas, hace que estas tengan capacidad para perpetuarse en el tiempo. Esta especie además, puede acogerse a las subvenciones de la PAC, suponiendo una clara alternativa a otras especies en las repoblaciones de carácter protector o restaurador de las zonas de ribera en las comarcas de estudio, así como para ampliar la base clonal de nuestra populicultura.

Su identificación, caracterización y ensayo como material genético, puede conducir a la obtención de individuos de gran interés para estas expectativas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugares de recolección

La elección de rodales de las especies, *Populus tremula* (áreas de montaña), *P. x canescens* (dos grupos: el situado en Tierra de Campos al que se denominará *P. x canescens* y el que se sitúa en la comarca del Cerrato que se denominará *P. x cerratensis*) y *P. alba*, se realizó a partir de inventarios elaborados en la provincia de Palencia por de Lucas en 1996 y por Del Peso en 1997 respectivamente.

Se seleccionaron 4 rodales de cada especie, excepto de *P. x cerratensis* que fueron 3, basándose en criterios de origen supuestamente no antrópico de las masas, masas formadas por el mayor número de pies posibles y distancia entre rodales suficientemente grande como para poder representar la máxima variabilidad de la especie en la zona de estudio.

Sistemática y materiales utilizados en la recogida del material vegetativo

Se eligieron y marcaron 30 árboles en cada rodal de forma aleatoria y homogéneamente repartidos por la masa. Con estos mismos criterios, se escogieron 5 de ellos para la toma de muestras de los caracteres morfológicos a estudiar: hojas, brácteas y coloración de la corteza.

Entre los meses de Marzo y Abril de 1999, se tomaron datos de la época de floración de cada especie y se realizó la recogida de amentos. Las mediciones se efectuaron en 2 amentos de cada árbol y de cada uno de ellos se extrajeron 3 brácteas: una del extremo, otra de la zona intermedia y la última de la base del amento.

Durante el mes de Julio del mismo año, se realizó la recogida de muestras foliares y la toma de datos de coloración de corteza. En cada uno de los 5 árboles, se seleccionaron las hojas siguiendo 2 criterios básicos: que la rama conste al menos de 5 braquiblastos y que las hojas no estén atacadas por defoliadores. De cada rama se eligieron 5 braquiblastos y se tomó una hoja de ellos (preferentemente del extremo) siguiendo la metodología de Barnes (1975, 1993). Para la caracterización

de la coloración de la corteza, se elaboró una paleta de colores, a la que se le asignó un código numérico que facilitase el posterior análisis de datos.

Igualmente se tomaron datos de época de caída de hojas en meses posteriores.

Mediciones de material vegetativo y metodología estadística utilizada en su estudio

Los parámetros foliares elegidos para realizar el estudio estadístico, han sido los determinados por otros autores para caracterización de especies de la sección Leuce (Barnes et al, 1975, 1993; Culot 1993). Los 11 caracteres considerados son los siguientes: Longitud del peciolo (PL), longitud del limbo (BL), anchura máxima del limbo (WMax), posición de la máxima anchura del limbo (MBWP), anchura del limbo al 50% (W50%), anchura del limbo al 90% (W90%), perímetro del limbo (BP), área del limbo (BA), número de dientes (TN), ángulo del limbo al 10% (BA10%) y ángulo del limbo al 25% (BA25%). Para realizar las mediciones de la mayoría de los parámetros foliares se utilizó el programa informático Winfolia (Regent Instruments Inc. Versión 4.0a), previo escaneado de las hojas.

Los parámetros de las brácteas discriminantes entre *P. tremula*, *P. alba* y *P. x canescens* son Longitud de bráctea, anchura de bráctea y número de dientes (Culot, 1993). La medición de estos parámetros tuvo que realizarse de forma manual, con una lupa de 4 aumentos y colocando las muestras sobre una cuadrícula milimetrada, dando lecturas de ancho y alto con una apreciación de 0.5 mm.

Todos los análisis estadísticos fueron confeccionados con el programa informático STATISTICA'99 Edition. Para el análisis de la variabilidad que pueda existir entre los grupos en cuanto a parámetros medidos en hojas y en brácteas, se utilizó el método de Análisis de Componentes Principales (ACP). Para el análisis estadístico de la coloración de corteza (dato categórico), se utilizó el denominado Análisis de Correspondencia (AC).

Método de Análisis molecular. Electroforesis de Proteínas

La toma de muestras de hojas para realizar los análisis moleculares se realizó en 2 rodales de cada especie. En cada rodal se tomaron varias hojas tiernas de cada uno de los 30 árboles seleccionados en un principio. Las muestras se mantuvieron a temperatura de 4° C y el análisis del material se realizó dentro de los tres días siguientes a su recogida (evitándose así la pérdida de actividad enzimática).

La electroforesis de proteínas se realizó sobre geles de almidón, con tres sistemas tampón (Tris citrato-litio borato pH 8,1/8,3; Morfolina citrato pH 6,7; Morfolina citrato pH 7,7) y 10 sistemas enzimáticos: PGM, LAP, ADH, 6-PGDH, SKDH, ACPH, PGI, GOT (AAT), IDH y MDH.

El protocolo seguido fue el utilizado por el INIA-CIFOR (1996) para las especies *Populus nigra* y *Populus alba*, con modificaciones y adaptaciones a las especies objeto de estudio (Soltis, 1969; Shaw & Prasad, 1983).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de la fenología de la especie y del análisis morfológico: Hojas, brácteas y coloración de corteza

El primer resultado observado en el análisis de las poblaciones ha sido la separación de grupos en función de la fenología de floración y de caída de hoja de las especies. *P. tremula* y *P. x cerratensis* presentan unos periodos de floración y caída de hojas similares (a pesar de su diferente distribución geográfica y ecológica) y más tardíos que *P. alba* y *P. x canescens*.

A partir de la matriz de correlación formada por 696 datos agrupados por especies y por las 11 variables medidas en cada hoja, se obtuvo la siguiente extracción de factores con su correspondiente representación gráfica (Tabla 1 y Figura 1):

STAT. Factor Loadings (Unrotated) (hojas.sta)
 FACTOR Extraction: Principal components
 ANALYSIS (Marked loadings are > 0.700000)

VARIABLE	FACTOR 1	FACTOR 2
BL	0.837056 *	0.415936
Wmax	0.984042 *	-0.022874
MBWP	0.560855	0.671904
W50%	0.978255 *	-0.001939
W90%	0.682785	0.015342
BA10%	0.626488	-0.701013 *
BA25%	0.666434	-0.698247
BA	0.957064 *	0.173644
BP	0.930360 *	0.146470
TN	0.599889	-0.436048
PL	0.690498	0.220946

Tabla 1.- ACP para las mediciones en hojas.

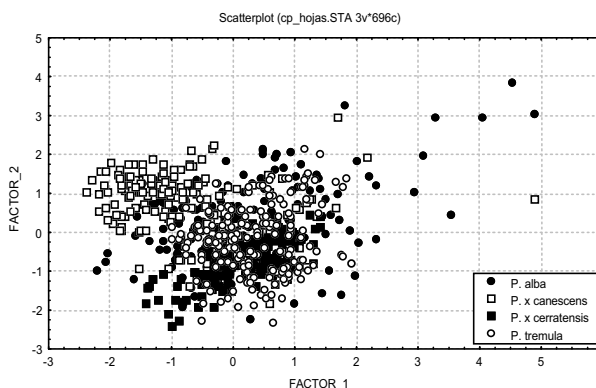


Figura 1.- Representación de ACP en el análisis de hojas.

Atendiendo a estos resultados, los parámetros medidos en las hojas que proporcionan una mayor contribución en la variabilidad total son 6: Longitud del limbo, Anchura del limbo al 50%, Anchura máxima del limbo, Área del limbo, Perímetro del limbo y el Angulo del limbo al 10%.

Según este análisis no es posible diferenciar grupos utilizando las hojas como parámetros discriminantes observándose un solapamiento de todas las especies.

A partir de la matriz de correlación formada por los 3 parámetros medidos en brácteas en 450 datos agrupados en la variable especie, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 2), y su representación gráfica (Figura 2):

STAT. Factor Loadings (Unrotated) (bracteas.sta)
 FACTOR Extraction: Principal components
 ANALYSIS (Marked loadings are > .700000)

VARIABLE	FACTOR 1	FACTOR 2
ALTO_MM	-0.679747	-0.645796
ANCHO_MM	-0.910480 *	0.062166
N_DIENTE	-0.455971	0.838599 *

Tabla 2.- ACP para medición de brácteas de todas las especies.

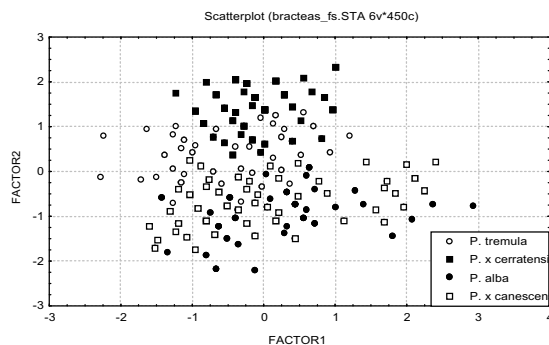


Figura 2.- Representación de ACP en el análisis de brácteas de todas las especies.

Se puede apreciar que los parámetros más discriminantes a la hora de realizar el análisis de componentes principales en el estudio de brácteas son 2: Ancho de la bráctea y Número de dientes. Atendiendo a este análisis se obtienen dos grupos bien diferenciados: por un lado se solapan *P. alba* con *P. x canescens* mientras que por otro lado aparecen solapados *P. tremula* y *P. x cerratensis*.

Para la diferenciación entre especies solapadas, se volvió a aplicar un ACP que enfrentara *P. alba* con *P. x canescens* y *P. tremula* con *P. x cerratensis*. Con esta segunda aplicación, se consiguieron discriminar las especies *P. tremula* y *P. x cerratensis*, no así las otras dos especies, dado que el método de análisis no logró la extracción de sus factores principales. Los resultados de este segundo análisis vienen representados a continuación, siendo los parámetros que más contribuyen a la separación de estos grupos, la interacción de todos ellos (Tabla 3):

STAT. Factor Loadings (Unrotated) (bracteas.sta)
 FACTOR Extraction: Principal components
 ANALYSIS (Marked loadings are > .700000)

VARIABLE	FACTOR 1	FACTOR 2
ALTO_MM	-0.753916 *	0.437411
ANCHO_MM	0.281741	0.889774 *
N_DIENTE	0.749857 *	0.255204

Tabla 3.- ACP para la medición de brácteas de las especies *P. tremula* y *P. x cerratensis*.

Al aplicar el método de AC, para los datos tomados en la coloración de corteza, se obtuvieron los siguientes resultados expuestos en la Figura 3:

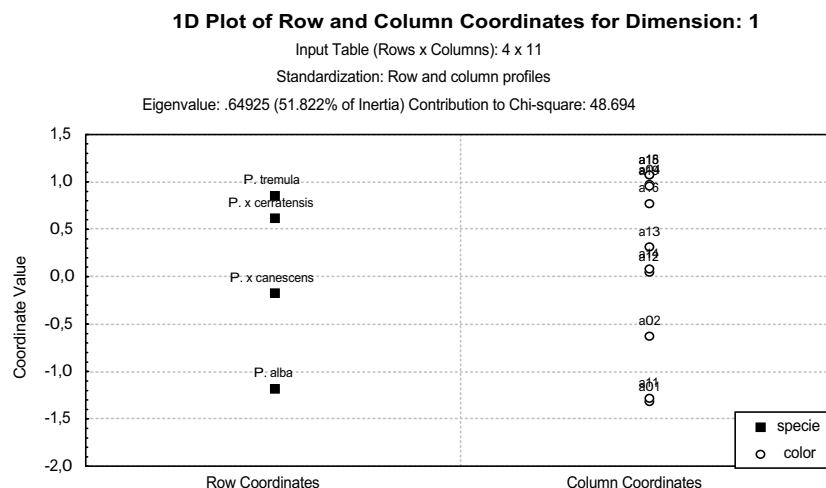


Figura 3.- Representación del AC efectuado sobre datos de coloración de corteza.

Mediante la coloración de la corteza se diferencian perfectamente las especies de *P. tremula*, *P. alba* e incluso *P. x canescens*, que aunque aparezca entre ambos y más próxima a *P. alba*, posee tonalidades propias. *P. x cerratensis* también presenta tonalidades intermedias entre sus dos presuntos parentales, pero la escasa distancia que lo separa de *P. tremula*, hace casi imposible (con este tipo de análisis) que el color de la corteza sea un parámetro discriminante entre las dos especies.

Resultados del análisis molecular.

En la siguiente tabla, se presenta un resumen de los resultados obtenidos en el análisis molecular, teniendo en cuenta 3 tipos de variabilidad para los 10 sistemas isoenzimáticos ensayados (Tabla 4).

ISOENZIMA	TIPOS DE VARIABILIDAD			Distinción de Especie	
	Intraespecífica (dentro de poblaciones)	Intraespecífica (entre poblaciones)	Interespecífica		
LAP	SI	NO	NO	<i>P. alba</i> de <i>P. tremula</i> de <i>P. x canescens</i> de <i>P. x cerratensis</i> .	
ADH	SI	NO	SI		
SKDH	SI	NO	NO		
PGM	SI	¿SI?	¿SI?		
IDH	SI	NO	SI	<i>P. tremula</i> con el resto	
6-PGD	SI	NO	NO		
PGI	SI	NO	NO	<i>P. alba</i> = <i>P. x canescens</i> con <i>P. tremula</i> y <i>P. x cerratensis</i>	
GOT	SI	NO	SI		
ACPH	SI	NO	SI		
MDH	SI	SI	SI	<i>P. x canescens</i> con el resto	

Tabla 4.- Resumen de los tipos de variabilidad obtenidos con los 10 sistemas enzimáticos ensayados.

Se ha encontrado variabilidad intraespecífica (dentro de poblaciones), en los 8 grupos de poblaciones ensayadas. La variabilidad intraespecífica (entre poblaciones), sólo se puede asegurar para *P. alba* y para *P. tremula* con el sistema enzimático MDH.

No se han encontrado diferencias significativas en el análisis de las frecuencias relativas de los distintos patrones de bandas, por lo que a la hora de definir la variabilidad interespecífica, se ha realizado atendiendo únicamente a la presencia o ausencia de loci específicos para alguno de los grupos.

CONCLUSIONES

Se han caracterizado las poblaciones de *Populus tremula*, *Populus alba* y su híbrido *Populus x canescens* mediante el análisis morfológico de hojas, brácteas y coloración de la corteza. De entre estos tres caracteres, los que resultan más discriminantes a la hora de separar entre especies son las brácteas y la coloración de la corteza. Los parámetros más discriminantes en la medida de brácteas son el ancho de bráctea y el número de dientes para todas las especies, y los tres parámetros medidos en brácteas para diferenciar *P. tremula* y *P. x cerratensis*.

Se ha realizado la caracterización isoenzimática de un subgrupo de poblaciones, encontrando sistemas enzimáticos que muestran la existencia de diferentes tipos de variabilidad:

- Todos los sistemas enzimáticos son polimórficos dentro de poblaciones en todas las especies analizadas en este estudio.
- Los dos únicos sistemas que muestran variabilidad intraespecífica (entre poblaciones), son MDH para *P. alba* y *P. tremula* y PGM (esta última con reservas).
- Los sistemas enzimáticos que muestran diferentes patrones entre especies son los siguientes: ADH, IDH, PGI, GOT, ACPH, MDH.

Los caracteres morfológicos de coloración de corteza y brácteas (parámetros ancho y número de dientes), pueden servir para clasificar las especies. Con los resultados de los ensayos electroforéticos, se comprueba que efectivamente se encuentran diferencias entre los grupos, pero para poder clasificar las especies o comprobar el carácter híbrido de *P. x canescens*, sería necesaria la elaboración de segregaciones mediante cruces controlados y posterior análisis de los parentales y de progenies. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el análisis morfológico apunta a ser más discriminante a la hora de diferenciar especies que en análisis molecular, al menos, para ciertos parámetros. Aunque los resultados isoenzimáticos a los que se ha llegado muestran diferencias entre las especies, sólo pueden considerarse como resultados preliminares.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio está enmarcado dentro del proyecto de investigación VA 40/99 financiado por la Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León. Agradecemos al CIFOR- INIA habernos facilitado el programa Winfolia y su ayuda en la interpretación de patrones isoenzimáticos. A todos aquellos que han hecho posible tanto los trabajos de laboratorio como los trabajos de campo.

BIBLIOGRAFÍA

ALBA, N; AGÚNDEZ, D; SALVADOR, L; SEISDEDOS, M.T.- (1996) Protocolos para las especies *Pinus pinaster*, *Pinus halepensis*, *Populus nigra* y *Populus alba*. Análisis isoenzimático. Área de silvicultura y mejora. INIA-CIFOR. Madrid.

BARNES, B.V.- (1975) Phenotypic variation of trembling aspen in Western North America. *Fon. Sci.* 21:319-328.

BARNES, B.V; FUQING, H.- (1993) Phenotypic variation of Chinese aspens and their relationships to similartaxa in Europe an North America. *Can. J. Bot.* Vol 71.

CULOT, A.- (1993) Contribution à l'étude des peupliers de la section *Leuce*. La variation morphogénétique de *Populus tremula* L., *P. alba* L., *P. canescens* (Ait.) Sm. et leurs hybrides. Tesis doctoral. Universite libre de Bruxelles. Bruxelles.

DEL PESO, C; DE LUCAS, A-I.- (1997) El álamo cano del Cerrato (*Populus x canescens*). Conservación de sus recursos genéticos en al Provincia de Palencia. I Congreso Forestal Hispano Luso, II Congreso Forestal Español. IRATI'97.

GRAU, J.M.-. (1991) Ecología del chopo. Selección natural. En: El cultivo del chopo. Monografías Universitarias. Universidad Internacional Alfonso VII. Soria.

LUCAS DE, A.I.- (1996) Elección de árboles sobresalientes de *Populus tremula* L. en la provincia de Palencia. Proyecto fin de carrera de Ingeniería Técnica Forestal. ETS IIAA. Palencia.

ORIA DE RUEDA, J-A.- (1996) Guía de las plantas silvestres de Palencia. Ed. Cálamo. Palencia.

PADRÓ, A; ORENSANZ, J.- (1987) El chopo y su cultivo. Ed. Ministerio de Agricultura. Madrid.

PADRÓ, A.- (1992) Clones de chopo para el Valle Medio del Ebro. Diputación General de Aragón. Zaragoza.

SHAW, C.R; PRASAD, R.- (1969) Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Amer. Fern. J.* 56:45-72.

SOLTIS, D.E; HAUFLEER, C.H.- (1983) Starch gel electrophoresis of Ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern. J.* 73: 9-27.