

UTILIZACION DEL POLIMORFISMO DEL ADN DE CLOROPLASTOS PARA DEFINIR REGIONES DE PROCEDENCIA MATERNA EN LOS ROBLES BLANCOS DE LA PENINSULA IBERICA

A. HERRAN
S. ESPINEL

P. G. GOICOECHEA

NEIKER, Granja Modelo-Arkaute Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos tras el estudio de 156 poblaciones de robles a lo largo de la Península Ibérica. Los robles estudiados pertenecen a seis especies: *Quercus canariensis*, *Q. faginea*, *Q. humilis*, *Q. pyrenaica*, *Q. robur* y *Q. petraea*. Se analizaron cinco árboles de cada población con cuatro pares de cebadores específicos de cpADN, lo que permitió distinguir un total de 13 haplotipos. En las poblaciones en las que había varias especies, generalmente todas mostraron el mismo haplotipo; y ninguno de los haplotipos comunes representa a una sola especie. El análisis de la varianza molecular (AMOVA) ha revelado una fuerte estructura genética. Las regiones de procedencia materna se definieron de tal manera que se maximizara la varianza entre grupos y minimizara la varianza entre poblaciones dentro de grupos. Por último, la distribución de haplotipos sugiere la existencia de diversos refugios glaciares no restringidos únicamente al sur de la Península.

PALABRAS CLAVE: *Quercus*
cpADN
AMOVA
Región de procedencia
Refugio glacial

INTRODUCCION

La importancia de establecer regiones de procedencia para especies forestales está fuera de dudas, debido en gran parte a las consecuencias desastrosas ocasionadas por movimientos de semillas poco afortunados. De acuerdo con la legislación actual, la región de procedencia (RP) para una especie, subespecie o variedad, se define como 'el territorio o conjunto de territorios sometidos a condiciones ecológicas prácticamente uniformes y en los que hay poblaciones que presentan características fenotípicas o genotípicas análogas' (OM 21-1-89; BOE núm. 33 del 8-2-89). En España, a pesar de que la genética de poblaciones de especies forestales es una disciplina poco desarrollada, se han delimitado RPs

Recibido: 29-9-98

Aceptado para su publicación: 11-12-98

para algunas de las especies de mayor interés, como algunos pinos ibéricos (Catalán *et al.*, 1991), el alcornoque, o algunos robles de hoja caduca (Díaz-Fernández *et al.*, 1995a, 1995b).

El análisis genético de robledales europeos mediante la utilización de marcadores moleculares nucleares ha mostrado, de forma constante, una elevada diversidad dentro de poblaciones y una escasa diversidad entre poblaciones (Zanetto *et al.*, 1994, Zanetto, Kremer, 1995; Le Corre *et al.*, 1997). A pesar de ello, Kremer, Zanetto (1997) pudieron establecer un gradiente longitudinal en *Q. petraea* que se interpretó como consecuencia de las migraciones postglaciales a partir de refugios diferentes.

El ADN de los cloroplastos (cpADN) de las diferentes especies de robles, por el contrario, muestra una elevada diversidad interpoblacional, y escasa diversidad intrapoblacional (Ferris *et al.*, 1993, Petit *et al.*, 1993, Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997). En concreto, es posible distinguir claramente tres zonas en el continente europeo: el Oeste, colonizado a partir de un refugio Ibérico; el Centro, colonizado a partir de un refugio localizado en Italia; y el Este, colonizado a partir de poblaciones procedentes de los Balcanes. Esta elevada estructuración genética del cpADN de los robles puede explicarse por su transmisión exclusivamente materna (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 la hace apropiada para reconstruir su filogenia.

La estructura genética de las poblaciones subdivididas se ha venido estudiando en términos de estadísticos-F desde que Wright (1951) propusiera medir la desviación de las frecuencias genotípicas mediante los parámetros F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} . Actualmente, la estimación de parámetros puede realizarse haciendo uso de la información molecular presente en las poblaciones que forman la muestra (Lynch, Crease, 1990; Excoffier *et al.*, 1992, Pons, Petit, 1996). El método conocido como 'Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)' (Excoffier *et al.*, 1992) utiliza el hecho de que una suma de cuadrados convencional (SS) puede escribirse como la suma de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de observaciones (Li, 1976). Por ello, es posible construir un análisis jerárquico de la varianza (molecular) directamente a partir de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de haplotipos. La partición de la varianza se realiza según el modelo lineal (Long, 1986).

$$p_{jig} = p + a_g + b_{ig} + c_{jig}$$

donde $j=1\dots N_{ig}$ es el número de individuos, $i=1\dots I_g$ son las poblaciones y $g=1\dots G$ son las regiones. Los efectos son: 'a' para grupos, 'b' para poblaciones dentro de grupos y 'c' para individuos dentro de poblaciones.

El modelo tiene fijados los individuos y las poblaciones, pero es posible variar los grupos para tratar de disminuir la varianza entre poblaciones dentro de grupos (V_b) y aumentar la varianza entre grupos (V_a). Esto es lo que se persigue en el establecimiento de las regiones de procedencia.

En este trabajo vamos a realizar un estudio sistemático del polimorfismo del cpADN de los robles de hoja caduca y/o marcescente de la península Ibérica. Posteriormente, utilizaremos el procedimiento descrito con anterioridad (AMOVA) para obtener las regiones de procedencia materna (RPMs) que mejor expliquen la varianza presente en los datos.

MATERIAL Y METODOS

Material Vegetal. Se ha realizado un muestreo de 156 poblaciones de robles de la península Ibérica, cuya localización se determinó con la ayuda de un GPS. En este estudio se han incluido poblaciones pertenecientes a las especies: *Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt) Liebl, *Q. humilis* Miller, *Q. pyrenaica* Willd., *Q. faginea* Lam y *Q. canariensis* Willd. De cada población se eligieron por regla general cinco árboles, separados por al menos 50 m. En algunas ocasiones se recogieron muestras en bosques mixtos, en los que se encontraban presentes al menos dos de las especies estudiadas. La Figura 1 muestra la distribución por especies de las poblaciones analizadas.

PCR-RFLP. El ADN total se extrajo mediante el método descrito por Dumolin *et al.*, (1995). Este ADN se utilizó como molde en PCRs con un grupo de cuatro pares de cebadores específicos del cpADN: DT, AS, TF y CD (Taberlet *et al.*, 1991; Demesure *et al.*, 1995). Estos cuatro pares de cebadores fueron utilizados para caracterizar todos los individuos de todas las poblaciones estudiadas. La elección de estos cebadores se basó en que son los que más polimorfismos presentan y permiten distinguir la mayoría de citotipos encon-

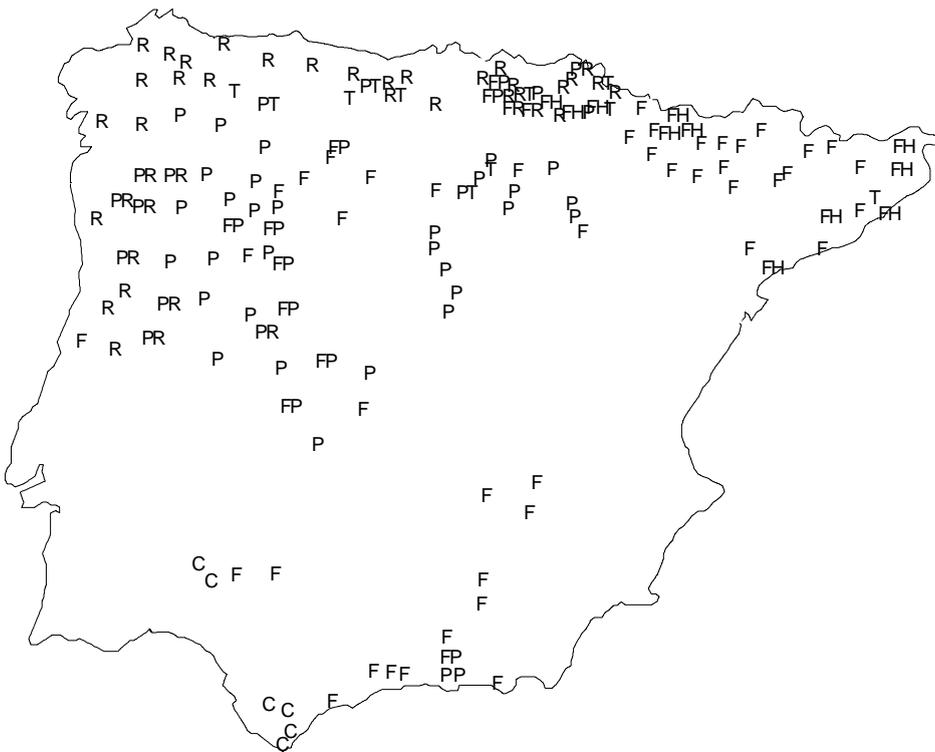


Fig. 1.—Distribución de especies en las 156 poblaciones de robles ibéricos analizadas. C: *Quercus canariensis*; F: *Q. faginea*; H: *Q. humilis*; P: *Q. pyrenaica*; R: *Q. robur*; T: *Q. petraea*.
Species distribution among the 156 populations of Iberian white oaks analyzed. C: *Quercus canariensis*; F: *Q. faginea*; H: *Q. humilis*; P: *Q. pyrenaica*; R: *Q. robur*; T: *Q. petraea*.

trados en Europa (Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997). Las amplificaciones se llevaron a cabo tal y como se detalla en Demesure *et al.*, (1995). Cinco μ l de cada PCR se digirieron con un único enzima de restricción (*Taq I* o *Hinf I*) 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 poliactalimida al 8% y se visualizaron mediante tinción con Bromuro de Etidio.

Análisis Filogenético. Los haplotipos se ordenaron filogenéticamente utilizando el grupo de programas 'Phylip 3.5' (Felsenstein, 1993). El análisis se llevó a cabo a partir de una matriz de distancias fenéticas entre haplotipos, basada en el número de diferencias observadas en los patrones de PCR-RFLP. Se obtuvieron dos árboles filogenéticos mediante el método 'Neighbor-Joining' y el método de máxima parsimonia de Wagner.

AMOVA. El análisis de la varianza molecular (AMOVA) se llevó a cabo con el programa 'Arlequin 1.1' (Schneider *et al.*, 1997). El análisis se repitió varias veces con diferentes agrupamientos en regiones. Para estimar la significación de cada uno de los componentes de la varianza se utilizaron 16.000 permutaciones.

RESULTADOS

Polimorfismo del cpADN. Todos los individuos de las 156 poblaciones fueron analizados con los cuatro pares de cebadores mencionados. Tras la digestión de los fragmentos con los enzimas de restricción *Taq I*, *Hinf I*, *Hinf I* y *Taq I* respectivamente, se identifica-

TABLA 1

PATRONES DE LOS FRAGMENTOS DE PCR-RFLP PARA LOS 13 HAPLOTIPOS PRESENTES EN LOS ROBLES DE LA PENINSULA IBERICA

PCR-RFLP fragment patterns for the 13 haplotypes found among the white oaks of the Iberian Peninsula

Fragmentos de PCR-RFLP										
Haplotipo	DTTaq1	DTTaq2	DTTaq3	ASHinf1	ASHinf2	ASHinf5	ASHinf6	TFHinf7	CDTaq3	Vector
H1	1	1	5	1	2	2	3	3	1	115122331
H2	1	2	2	1	1	1	4	3	1	122111431
H3	1	2	3	1	1	1	4	3	1	123111431
H4	1	2	3	1	1	3	4	3	1	123113431
H5	1	2	2	1	1	2	2	1	1	122112211
H6	1	2	2	1	1	2	2	3	1	122112231
H7	1	2	4	1	1	2	2	3	1	124112231
H8	1	2	4	1	1	2	1	3	1	124112131
H9	1	2	3	1	2	2	2	3	1	123122231
H10	9	1	2	2	1	2	2	3	2	912212232
H11	1	2	3	1	1	2	2	3	1	123112231
H12	1	2	3	1	1	2	1	3	1	123112131
H13	1	2	3	1	1	2	2	1	1	123112211

Las columnas corresponden a zonas polimórficas de los fragmentos indicados, tras cortar con el enzima de restricción apropiado. *Each column corresponds to a polymorphic zone of the indicated fragments, after cutting with the appropriate restriction enzyme.*

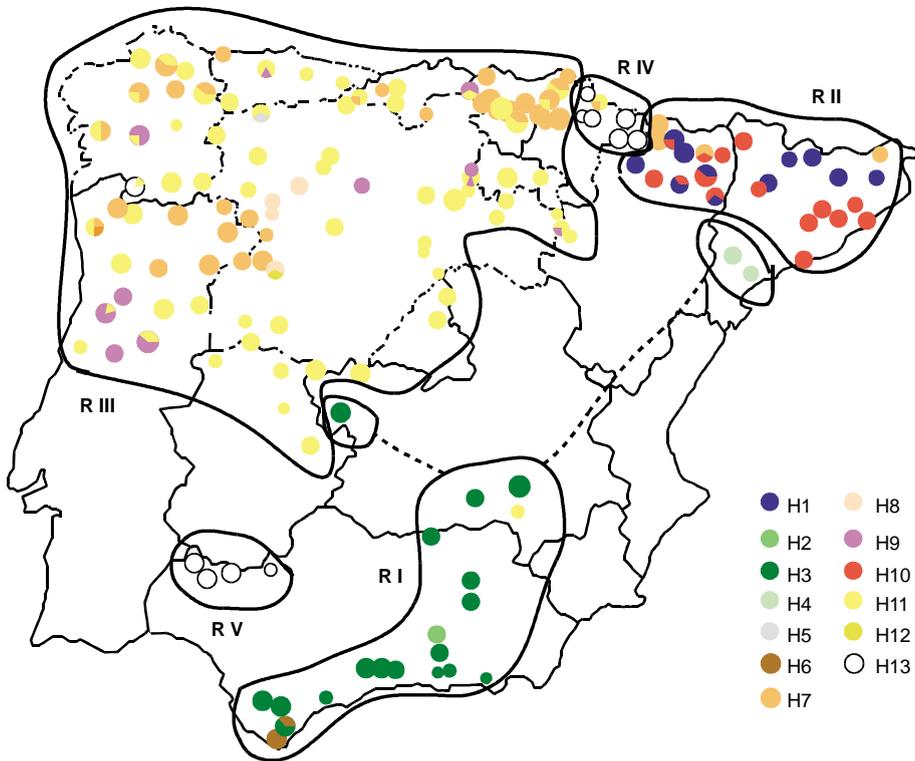


Fig. 2.—Distribución de los 13 haplotipos encontrados en los robles de la península Ibérica entre las 156 poblaciones analizadas. El tamaño de cada punto es proporcional al número de individuos analizados. También se representan las 5 RPMs que explican más varianza entre regiones.

Distribution of the 13 haplotypes found within the oaks of the Iberian Peninsula, among the 156 populations analyzed. The size for each point is proportional to the number of individuals analyzed. The 5 RPMs that explain more variance among regions have also been represented.

ron nueve fragmentos polimórficos que permitieron detectar una mutación puntual y 21 indels. Con los 22 polimorfismos fue posible distinguir 13 haplotipos. La Tabla 1 muestra la composición de los 13 haplotipos identificados entre los robles de la península Ibérica. Para cada zona polimórfica de cada una de las combinaciones PCR-RFLP estudiadas, los diferentes alelos debidos a indels se denominaron con un número según su peso molecular, reservándose el dígito '9' para la ocurrencia de mutaciones puntuales que generaran nuevos cortes de restricción. De esta forma, cada haplotipo puede definirse como un vector que refleja todos los alelos estudiados (Tabla 1, última columna).

La distribución de los haplotipos entre las diferentes poblaciones analizadas se muestra en la Figura 2. De los 13 haplotipos, cinco son comunes en el resto de Europa (H1, H7, H10, H11 y H13), extendiéndose en diferentes áreas longitudinales como consecuencia de la colonización postglacial (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997). Los otros ocho haplotipos no han sido descritos con anterioridad, si bien es casi segura la presencia de uno de ellos (H9)

en algunas poblaciones del Sur de Francia (Petit, *com pers*). Es de destacar la presencia de un haplotipo (H3) muy extendido en el Mediterráneo Suroriental, cuya extensión hacia el Norte de Europa probablemente fue frenada como consecuencia de la colonización de Cataluña por los haplotipos H1 y H10 procedentes de Italia.

Relaciones filogenéticas. Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos que también se encuentran en el resto de Europa ya fueron estudiadas por Dumolin-Lapègue *et al.*, (1997), quienes describieron la existencia de al menos tres linajes maternos, correspondiendo uno de ellos a un refugio Ibérico y los otros dos a un refugio en Italia.

Para analizar la relación entre los 13 haplotipos identificados en la península Ibérica, se construyó una matriz de distancias fenéticas entre haplotipos a partir del número de diferencias en los patrones de restricción. El programa 'Neighbor' produjo el árbol filogenético representado en la Figura 3. Los resultados muestran claramente que los haplotipos H1 y H10 se encuentran muy alejados entre ellos y del resto de haplotipos, tal como se espera por su pertenencia a linajes diferentes. El resto de haplotipos se encuentran relativamente cercanos, si bien los haplotipos H2, H3 y H4 podrían constituir un sublinaje dentro del grupo Ibérico. Estas características se mantienen en el árbol filogenético construido mediante el método de máxima parsimonia de Wagner con el programa 'Fitch' (datos no mostrados). Sin embargo, las relaciones entre el grupo de haplotipos pertenecientes al linaje Ibérico deben tomarse con precaución, ya que la mayoría de polimorfismos detectados en este estudio son pequeñas variantes de longitud, probablemente indels, que contribuyen cierto grado de homoplasia (Downie, Palmer, 1992; Clegg *et al.*, 1994).

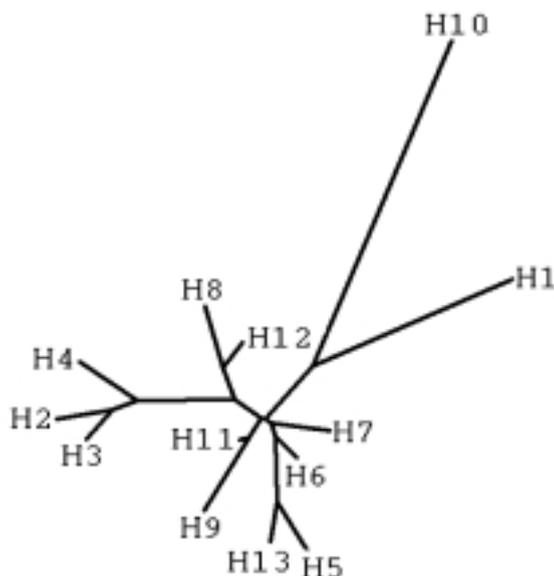


Fig. 3.—Relaciones filogenéticas de los 13 haplotipos presentes en la península Ibérica obtenidas a partir de la matriz de distancias fenéticas, mediante el método N-J. Los haplotipos se indican como en la Tabla 1.
Phylogenetic relationships among the 13 haplotypes found in the Iberian Peninsula. Relationships have been obtained from the phenetic distance matrix, using the Neighbour-Joining algorithm. Haplotypes are indicated as in Table 1.

AMOVA. La partición de la varianza se analizó en dos matrices de distancias cuadradas entre haplotipos. Estas dos matrices se obtuvieron al utilizar las distancias: D1, métrica equidistante basada en la idea de que los haplotipos son meramente distinguibles, y D2, la distancia fenética basada en las diferencias de los patrones de PCR-RFLP. Los agrupamientos en regiones se realizaron teniendo en cuenta las Figuras 2 y 3.

La Tabla 2 muestra los resultados de la partición de la varianza al considerar las cinco regiones delimitadas en la Figura 2, y al considerar únicamente tres grupos (regiones I, II, III+IV+V). Ninguno de los otros agrupamientos que se realizaron produjo mejores resultados que los obtenidos con las cinco regiones indicadas (datos no mostrados). Considerando los resultados concernientes a la distancia D1, el porcentaje de la varianza debido al componente 'entre grupos' no llega al 50% en ninguna de las dos particiones, aunque es mucho mejor en el caso de cinco regiones que en el de tres. La varianza explicada por el componente 'entre poblaciones/dentro de grupos' es en el primer caso superior a la varianza explicada por el componente 'entre regiones', y en el segundo solo ligeramente inferior.

TABLA 2
ANALISIS JERARQUICO DE LA VARIANZA REALIZADO
EN DOS MATRICES CUADRADAS DE DISTANCIA ENTRE HAPLOTIPOS
Y EN DOS AGRUPAMIENTOS EN REGIONES

Jerarquic variance analysis performed from two different squared distance matrixes among haplotypes (D1 and D2), using three and five regions

Componente	Distancia D1				Distancia D2				
	Partición en 3 regiones		Prob	Estadísticos-F	Partición en 3 regiones		Prob	Estadísticos-F	
	Varianza	% total			Varianza	% total			
Entre regiones	Va	0,204	40,24	< 0,0001	$F_{CT} = 0,402$	1,087	64,85	< 0,0001	$F_{CT} = 0,649$
Entre poblaciones/regiones	Vb	0,245	50,23	< 0,0001	$F_{SC} = 0,841$	0,477	28,44	< 0,0001	$F_{SC} = 0,809$
Dentro de poblaciones	Vc	0,048	9,53	< 0,0001	$F_{ST} = 0,905$	0,112	6,70	< 0,0001	$F_{ST} = 0,933$
		Partición en 5 regiones			Partición en 5 regiones				
Entre regiones	Va	0,246	48,39	< 0,0001	$F_{CT} = 0,484$	1,002	65,37	< 0,0001	$F_{CT} = 0,654$
Entre poblaciones/regiones	Vb	0,214	42,09	< 0,0001	$F_{SC} = 0,815$	0,419	27,30	< 0,0001	$F_{SC} = 0,788$
Dentro de poblaciones	Vc	0,048	9,52	< 0,0001	$F_{ST} = 0,905$	0,112	7,33	< 0,0001	$F_{ST} = 0,927$

Cuando se utilizó la distancia D2, la varianza explicada por el componente 'entre grupos' fue mucho mayor en ambas particiones, disminuyendo la proporción del componente 'entre poblaciones/dentro de grupos' hasta cerca del 25%. Si se compara los grupos de tres y cinco regiones, los porcentajes de varianza explicadas por cada componente son bastante similares, pero la partición en cinco grupos ofrece un mayor porcentaje de varianza 'entre grupos' y menor porcentaje de varianza 'entre poblaciones/dentro de grupos' que la partición en tres regiones. En ambos casos, el porcentaje de varianza debido al componente 'dentro de poblaciones' se mantiene bajo. En todos los casos, los componentes de la varianza son altamente significativos.

DISCUSION

Estructura Genética. En las plantas, el nivel de estructuración de los genes heredados por vía materna es muy elevado, especialmente comparado al de los genes nucleares (Ennos; 1994, Demesure *et al.*, 1996, Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997). El análisis de la varianza (AMOVA) proporciona parámetros de estructura genética en forma de estadísticos-F (Wright, 1951, Cockerham, 1969, Excoffier *et al.*, 1992): F_{ST} , la correlación entre haplotipos dentro de poblaciones, relativa a la de pares de haplotipos en toda la especie; F_{CT} , la correlación de haplotipos dentro de grupos de poblaciones, relativa a la de pares de haplotipos en toda la especie; y F_{SC} , la correlación entre haplotipos dentro de poblaciones, relativa a la de pares de haplotipos en la región. La Tabla 2 muestra estos coeficientes, para ambas distancias en las dos particiones. La significación de estos estadísticos se mide con las distribuciones nulas de los componentes de la varianza, puesto que ambas están altamente correlacionadas (Excoffier *et al.*, 1992).

El coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones (F_{ST}) es mayor de 0,9 en todos los casos, lo que indica un alto grado de estructuración del cpADN. Esta elevada estructuración es similar a la encontrada por Dumolin-Lapègue *et al.*, (1997), utilizando los estadísticos G_{ST} y N_{ST} , en un grupo de 283 poblaciones de robles europeos. La diferencia entre los coeficientes obtenidos con las distancias D2 y D1 (ΔF_{ST}), puede utilizarse como medida de la contribución de la divergencia ente haplotipos al coeficiente de diferenciación. El valor positivo de este parámetro ($\Delta F_{ST}=0,022$ y $\Delta F_{ST}=0,028$ para las particiones en cinco y tres grupos respectivamente) indica que, en promedio, los pares de haplotipos diferentes en una misma población son más similares que los pares de haplotipos diferentes en poblaciones diferentes (Pons, Petit, 1996).

Es de destacar que, tal y como ocurre en otros estudios con poblaciones de robles europeos, la estructura genética descrita es independiente de las especies (Petit *et al.*, 1993, Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997). En las poblaciones donde se encontraron varias especies, normalmente todas ellas compartían el mismo haplotipo. Además, los haplotipos más comunes son compartidos por varias especies

Regiones de Procedencia Materna. El elevado grado de estructura genética que muestra el cpADN de los robles de la península Ibérica ha permitido utilizar los diferentes haplotipos para definir RPMs. La delimitación de las regiones se ha realizado mediante criterios de semejanza de los haplotipos y de su distribución geográfica (Fig. 2). La región I, que se extiende por el Sur del Mediterráneo, está dominada por el haplotipo H3. También aparecen dos variantes (H2 y H4) y el haplotipo encontrado en las sierras gaditanas más meridionales (H6). Este último parece estar más alejado de H3 que de H11 y H7, los dos haplotipos dominantes en la RPM III. La inclusión de las dos poblaciones del Sur de Tarragona en esta RPM debe tomarse con cautela hasta después de analizar poblaciones intermedias. La región II, que comprende casi toda Cataluña y la mayoría del Pre y el Pirineo Oscense, está dominada por dos haplotipos muy diferentes (H1 y H10), pertenecientes a dos linajes distintos con origen en Italia. Además, se pueden encontrar algunas poblaciones que presentan el haplotipo H7. Las regiones III, IV y V comprenden el resto de la Península y están representadas por el resto de haplotipos del linaje Ibérico (H5, H7, H8, H9, H11, H12 y H13). La partición de la varianza considerando cinco regiones muestra que la separación de las poblaciones del Pirineo Navarro (región IV) y de la Sierra de Aracena (región V) del grupo principal (región III) explica más varianza entre grupos y menos entre poblaciones dentro de gru-

pos que la partición de la varianza considerando únicamente tres regiones. La ausencia del haplotipo H13 entre las RPMs IV y V apoya la idea de la existencia de un refugio glacial en los valles pirenaicos, alejado del área del Sur de la Península generalmente reconocida como único refugio ibérico (Huntley, Birks, 1983; Bennett et al., 1991). Las agrupaciones de otros haplotipos en ciertas zonas (vg., H7 en los Arribes del Duero, H1 y H10 en Cataluña, etc.) parece más acorde con una primera etapa de colonización a partir de varios refugios costeros (tal y como se describe en Blanco Castro et al., 1997) que a partir de un único refugio en el Sur.

En España existen Regiones de Procedencia definidas conjuntamente para las especies *Q. robur*, *Q. petraea* y *Q. humilis* (Díaz-Fernández et al., 1995b), que debido a la ausencia de datos genéticos han sido elaboradas mediante criterios geográficos, climáticos y edáficos-geomorfológicos. La comparación de esas regiones con los resultados obtenidos en este trabajo se ve dificultada por la ausencia de un número suficiente de muestras en algunas de las regiones. Sin embargo, pueden adelantarse algunas conclusiones:

- Las regiones de procedencia 1-6 están comprendidas dentro de la misma RPM (región III),
- La región de procedencia 7 prácticamente corresponde con la RPM IV, si bien parece que sus límites se extienden hasta el Valle del Echo (Huesca),
- Las regiones de procedencia 8-9 se encuentran dentro de la misma RPM (región II), pero sus límites no parecen los más apropiados basándose en la diferenciación interhaplotípica,
- Todas las RPMs, excepto la RPM V, muestran alguna población cuyo haplotipo no corresponde a la región, lo que podría indicar movimientos de semillas o zonas de confluencia entre poblaciones procedentes de diferentes refugios,
- La aportación de nuevos datos en las regiones de procedencia poco representadas, y en las áreas de transición entre haplotipos, podría permitir mejorar la partición de la varianza mediante el establecimiento de subregiones de procedencia materna,
- Se han identificado siete haplotipos representados por muy pocas poblaciones, o incluso individuos, que pueden correr grave riesgo de desaparición. Si bien es posible que algunos de ellos provengan de hibridaciones con robles de hoja perenne, otros sin duda representan reliquias genéticas que sería necesario conservar.

Finalmente, cabe destacar que se han analizado cinco de los nueve rodales semilleros de *Q. robur*, y tres de los cinco rodales semilleros de *Q. petraea* (ICONA-INIA, 1995); así como cuatro de las cinco procedencias de área restringida (Díaz-Fernández et al., 1995b). La Tabla 3 muestra los haplotipos encontrados en cada uno de estos rodales, y las regiones de procedencia y de procedencia materna a las que pertenecen. Los rodales semilleros de *Q. robur* y *Q. petraea* muestran haplotipos que los hacen apropiados como fuente de semilla para sus respectivas RPMs. Sin embargo, la utilización de semilla de las RPMs limítrofes no parece tan adecuada, al menos en el caso de las regiones II y IV.

TABLA 3

**HAPLOTIPOS MOSTRADOS POR LOS RODALES SEMILLEROS
DE *Q ROBUR* Y *Q PETRAEA* ANALIZADOS, ASI COMO
POR LAS POBLACIONES DE LAS REGIONES
DE PROCEDENCIA RESTRINGIDA**

*Haplotypes found among the selected seed stands of *Q. robur* and *Q. petraea*,
and among the populations from restricted provenance regions*

Rodal selecto	Haplotipos	RP	RPM
Procedencia Restringida			
ES-41/01/001	H7, H11	1a	III
ES-41/01/002	H9, H11	1b	III
ES-41/01/003	H7, H11	1a	III
ES-41/03/002	H11	3	III
ES-41/06/003	H7	6	III
ES-42/05/001	H7	5	III
ES-42/07/001	H13	7	IV
ES-42/09/002	H10	9	II
S Ibérico Septentrional	H9, H11	A	III
Moncayo	H9, H11	B	III
Ayllón	H11	C	III
Las Batuecas	H11	D	III

También se indica la región de procedencia (RP) y la región de procedencia materna (RPM) a la que pertenecen. *We have also indicated the provenance region (RP) and the maternal provenance region (RPM) where they belong.*

Las RPMs definidas en este trabajo seguramente indican grupos de poblaciones originadas a partir de un mismo refugio glacial (excepto la RPM III que podría haberse originado a partir de varios refugios). En ese caso, el aislamiento prolongado podría haber creado variedades locales con estructuras genéticas muy diferentes que, dado el prolongado ciclo generacional de estas especies, es posible que aún hoy persistan.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos de investigación FAIR1 PL95-0297 (UE) y AGF96-1428 (CICYT). A. Herrán agradece al Departamento de Industria, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco la concesión de una beca de Formación de Tecnólogos durante parte de la cual participó en este proyecto. Deseamos expresar nuestro agradecimiento a los Drs. A. Kremer y R.J. Petit (INRA) por su generosidad y por las fructíferas estancias en su laboratorio. Asimismo, agradecemos a D. A. González y a Doña A. Aragonés su colaboración en la recogida de muestras.

SUMMARY

Use of chloroplast DNA polymorphisms to define maternal provenance regions for the white oaks of the Iberian Peninsula

We present here the results obtained after the study of 156 oak populations collected along the Iberian Peninsula. Six oak species were present in the sample: *Quercus canariensis*, *Q. faginea*, *Q. humilis*, *Q. pyrenaica*, *Q. robur* and *Q. petraea*. Five trees from each population were analyzed with four cpDNA specific pairs of primers that allowed the distinction of 13 haplotypes. In populations with several species, all of them shared the same haplotype, and none of the common haplotypes was restricted to a single species. Analysis of molecular variance in the data revealed a strong genetic structure. Maternal provenance regions were defined that maximize the among groups variance and minimize the among populations/within groups variance. The distribution of the haplotypes suggests the existence of several distinct refugia, not restricted to the South of the Peninsula.

KEY WORDS: *Quercus*
cpDNA
AMOVA
Provenances
Glacial refugia

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BENNET K.D., TZEDAKIS P.C., WILLIS K.J., 1991. Quaternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography* n.º 18: 103-115.
- BLANCO CASTRO E., CASADO M.A., COSTA M., ESCRIBANO R., GARCIA M., GENOVA M., GOMEZ A., GOMEZ F., MORENO J.C., MORLA C., REGATO P., SAINZ H., 1997. Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica. Editorial Planeta, Barcelona.
- CATALAN BACHILLER G. (Ed), 1991. Las regiones de procedencia de *Pinus sylvestris* L. Y *Pinus nigra* Arn subsp *salzmannii* (Dunal) Franco en España. MAPA, Madrid.
- CLEGG M.T., GAUT B.S., LEARN G.H., MORTON B.R., 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 91: 6795-6801.
- COCKERHAM C.C., 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-84.
- DEMESURE B., SODZI N., PETIT R.J., 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol Ecol* 4: 129-131.
- DEMESURE B., COMPS B., PETIT R.J., 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L) in Europe. *Evolution* 50: 2515-2520.
- DIAZ-FERNANDEZ P.M., JIMENEZ SANCHO M.P., CATALAN BACHILLER G., MARTIN ALBERTOS S., GIL SANCHEZ L.A., 1995a. Regiones de procedencia de *Quercus suber* L. MAPA, Madrid.
- DIAZ-FERNANDEZ P.M., JIMENEZ SANCHO M.P., MARTIN ALBERTOS S., DE TUERO Y REYNA M., GIL SANCHEZ L.A., 1995b. Regiones de procedencia de *Quercus robur* L, *Quercus petraea* (Matt) Liebl y *Quercus humilis* Miller. MAPA, Madrid.
- DOWNIE S.R. AND PALMER J.D., 1992. Use of chloroplast DNA rearrangements in reconstructing plant phylogeny, pp 14-35 in *Molecular Systematics of Plants*, Eds PS Soltis, DE Soltis and JJ Doyle. Chapman and Hall, New York.
- 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.
- ENNOS R.A., 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250-259.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P.E., QUATTRO J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- FELSENSTEIN J., 1993. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

- FERRIS C., OLIVER R.P., DAVY A.J., HEWITT G.M., 1995. Native oak chloroplasts reveal an ancient divide across Europe. *Mol Ecol* 2: 337-344.
- HUNTLEY B., BIRKS H.J.B., 1983. An atlas of past and present pollen map for Europe: 0-13.000 BP. Cambridge University Press, Cambridge.
- KREMER A., ZANETTO A., 1997. Geographic structure of gene diversity in *Quercus petraea* (Matt) Liebl. II. Multilocus patterns of variation. *Heredity* (in press).
- LE CORRE V., MACHON N., PETIT R.J., KREMER A., 1997. Colonisation with long distance seed dispersal and genetic structure of maternally inherited genes in forest trees: a simulation study. *Genet Res Cambridge* (in press).
- LI C.C., 1976. *Population Genetics*. Boxwood, Pacific Grove, California.
- LONG J.C., 1986. The allelic correlation structure of Gaij- and Kalam-speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-statistics. *Genetics* 112: 629-647.
- LYNCH M., CREASE T.J., 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol Biol Evol* 7: 377-394.
- PETIT R.J., KREMER A., WAGNER D.B., 1993. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphism in European oaks. *Theor Appl Genet* 87: 122-128.
- PONS O. AND PETIT R.J., 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered vs unordered alleles. *Genetics* 144: 1237-1245.
- SCHNEIDER S., KUEFFER J.M., ROESSLI D., EXCOFFIER L., 1997. Arlequin version 1.1: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneve, Switzerland.
- TABERLET P., GIELLY L., BOUVET J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17: 1105-1109.
- WRIGHT S., 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 1: 323-334.
- ZANETTO A., KREMER A., 1995. Geographic structure of gene diversity in *Quercus petraea* (Matt) Liebl. I. Monolocus patterns of variation. *Heredity* 75: 506-517.
- ZANETTO A., ROUSSEL G., KREMER A., 1994. Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus robur* L and *Quercus petraea* (Matt) Liebl. *Forest Genetics* 1(2): 111-123.