

Caracterización de la variabilidad genética de una población de mejora de *Juglans regia* L.

P. Alfonsín, M. Abuín, R. Díaz* y J. Fernández-López

Departamento de Producción Forestal. CIFA Lourizán. Apdo. Correos 127. 36080 Pontevedra. Spain

Resumen

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización genética de una población de mejora de *Juglans regia* L., mediante la técnica de electroforesis con 4 sistemas enzimáticos. Este estudio demuestra el mantenimiento de variabilidad en la población de mejora de primera generación respecto a las poblaciones naturalizadas de un área geográfica próxima, ya que se han obtenido niveles de heterocigosidad en la población de mejora ligeramente superiores (0,197) a los de poblaciones naturalizadas de una zona geográfica cercana (0,177). Por otro lado, también se destaca la técnica de electroforesis con isoenzimas como una herramienta útil en la diferenciación de genotipos de *J. regia*, aunque sería aconsejable incluir en la identificación de la población de mejora algún otro sistema enzimático polimórfico como podría ser diaforasa, que mejora el poder resolutivo de esta técnica de identificación. En cuanto a la elección de un marcador para un mejor estudio de la variabilidad, se ha comprobado que los valores de variabilidad son superiores para isoenzimas (0,202) que para RAPDs (0,060), aunque los RAPDs han discriminado un mayor número de genotipos. Además la utilización conjunta de ambos marcadores ha permitido la identificación individualizada de todos los genotipos estudiados. Por lo tanto, se considera importante la utilización conjunta de ambas técnicas con el objetivo de identificar individuos en los procesos de manejo de la población de mejora, incluida la selección y certificación de clones para la protección de los derechos de obtención de los mismos.

Palabras clave: isoenzimas, RAPDs, identificación genética, diversidad, población de mejora.

Abstract

Characterisation of genetic variability in an breeding population of *Juglans regia* L.

Genetic structure of a breeding population and three naturalised populations of *Juglans regia* L., was investigated by means of starch gel electrophoresis for 4 enzyme systems. This study reveals variability preservation in the breeding population of first generation respect to the naturalised populations, since heterocigosity levels in the breeding population (0.197) are higher than in naturalised populations of the same geographic area (0.177). Isozyme electrophoretic technique is emphasised as well as an useful tool in the genotype differentiation of *J. regia*, and it should be advisable to include in the identification of the breeding population some polymorphic isozyme system, like diaforasa, which improve the resolution of this identification technique. As far as molecular marker election to better study of variability, it has been proved that the diversity values are higher with isozymes (0.202) than RAPDs (0.060), although with RAPDs greater number of individuals has been discriminated. Moreover, the joint use of both markers allow individualised identification of studied genotypes. So, the use of both techniques together is considered important for individual identification in the breeding population process, including selection and certification of clones to protect the obtaining rights of it.

Key words: isozymes, RAPDs, genetic identification, diversity, breeding population.

Introducción

La caracterización de la diversidad genética constituye un importante aspecto en la conservación y mejora de las especies forestales. Su conocimiento permite

identificar y distinguir genotipos diferentes, siendo conveniente desde el inicio de las actividades de selección una verificación de la identidad de los individuos que constituyen la población de mejora (Cheliak, 1993). Por otro lado, una población de mejora seleccionada en un área más o menos amplia, debe tener mayor variabilidad o, al menos, mantener la variabilidad encontrada en las poblaciones naturalizadas (El-Kassaby, 2000).

* Autor para la correspondencia: rdiaz.cifal@siam-cma.org
Recibido: 12-01-04; Aceptado: 01-10-04.

Tanto en el estudio de la variabilidad de la población de mejora como en la documentación del germoplasma deben emplearse caracteres bajo control genético (Mast, 1975). En el caso del nogal (*Juglans regia* L.), los caracteres más utilizados son los isoenzimas, que se han utilizado tanto en estudios de variabilidad poblacional (Malvolti *et al.*, 1993; Fornari *et al.*, 1999) como en identificación clonal (Aleta *et al.*, 1990) de esta especie. También los marcadores de ADN o ARN, que constituyen métodos más resolutivos en la diferenciación genética, como es el caso de los RAPDs (Random amplified polymorphic DNA), han sido empleados para la caracterización genotípica de *J. regia* (Nicese *et al.*, 1998).

Las poblaciones de *Juglans regia* L. que hoy se encuentran en el oeste europeo están constituidas por individuos aislados o bien por pequeños grupos en los bordes de tierras de cultivos cercanos a poblaciones humanas. La distribución geográfica de esta especie se ha ampliado desde la antigüedad, debido principalmente a la utilización de su fruto en alimentación. A pesar de ser una especie muy ligada al hombre, la mayoría de los autores consideran que las poblaciones actuales del sudoeste europeo están adaptadas a los ambientes locales. Así, en España, se han encontrado diferencias significativas entre poblaciones en cuanto a supervivencia y crecimiento en altura (Fernández-López y Pereira, 1997), así como en vigor y abscisión foliar (Aleta y Ninot, 1997) y en resistencia a *Xantomonas arboricola* pv. *juglandis* (Germain *et al.*, 1997). Por otro lado, ensayos de progenies llevados a cabo en Europa mostraron un elevado control genético de los caracteres fenológicos y de crecimiento, indicando además la existencia de una elevada variabilidad (Fady *et al.*, 2003; Díaz y Fernández-López, 2004). Actualmente, la variabilidad genética de *J. regia* en el oeste de Europa se ve amenazada por tres factores. Por un lado la tala selectiva de los árboles considerados mejores para madera (Becquey, 1997), que favorece la proliferación de los utilizados para el cultivo de nuez reduciendo así, la variabilidad de la especie. Por otro lado, la introducción de poblaciones de *J. nigra*, y especialmente de híbridos como Ng23, Mj209 y Ng38 (Díaz y Fernández-López, 2004) o de variedades injertadas para la producción de nuez y madera (Becquey, 1997), que podría afectar a la variabilidad genética de *J. regia* en áreas de plantación intensiva. Finalmente, las poblaciones naturalizadas podrían verse influidas por el proceso de abandono del entorno rural, debido a la

competencia con otras especies en un medio asilvestrado. Por consiguiente, la diversidad genética de las poblaciones de nogal del oeste de Europa estaría condicionada tanto por la selección natural y como por la acción humana (Malvolti *et al.*, 1997). Por todo ello, esta especie se ha considerado en la Red Europea de Frondosas Nobles del programa europeo de conservación, EUFORGEN (European Forest Genetics Resources), cuyo objetivo principal es salvaguardar el potencial evolutivo de las especies (Erickson, 2000).

Dentro de este marco, se estableció en el Centro de Investigaciones Forestales y Ambientales de Lourizán un programa de mejora genética a largo plazo del nogal para uso forestal en el área noroccidental de la Península Ibérica. Este programa se inició con la selección de una población de mejora para la producción de madera, estableciéndose un banco clonal por injertado para la conservación de la diversidad genética. El método de selección empleado y los caracteres evaluados en campo para seleccionar la población de mejora se describen en Díaz (2001). La población de mejora formará parte de la Red Europea de Conservación de Frondosas Nobles, como una de las poblaciones de conservación siguiendo el modelo MPBS (Sistema de Mejora en Múltiples Poblaciones) (Erickson, 2000)

El presente estudio tiene como objeto el estudio de la variabilidad recogida en la población de mejora, así como la documentación del material que constituye dicha población. Para ello, se establecen como objetivos concretos: (1) comparar la diversidad molecular de la población de mejora con la de poblaciones locales naturalizadas (2) determinar la capacidad de los isoenzimas para la identificación clonal en relación con la de los RAPDs.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de 61 individuos que forman parte de la población de mejora de nogal establecida en el CIFA de Lourizán. Esta población procede de una selección fenotípica de individuos realizada en el noroeste español (Galicia, Asturias y León). En cada zona prospectada, se escogieron «de visu» varios nogales con buen porte forestal y entre ellos se seleccionó solo uno como ár-

bol superior. Para ello se empleó un método de comparación fenotípica en el que se evaluaron caracteres relacionados con la producción de madera. Una descripción completa de la selección en campo y los caracteres evaluados se encuentran en Díaz (2001). De estos árboles seleccionados en campo se recogió púa que, tras ser injertada, se plantó en un banco de germoplasma, estableciéndose así la población de mejora.

Así mismo, se han estudiado tres poblaciones naturalizadas de nogal localizadas en el oeste peninsular, dos de ellas situadas en Galicia. En la provincia de Lugo se encuentra la población de Valadouro a una altitud de 91 m y en ella se estudiaron mediante isoenzimas 49 individuos. En la provincia de Pontevedra se eligió la población de Silleda, a una altitud de 493 m, en la que se estudiaron 41 individuos. Ambas poblaciones presentan un clima húmedo y templado. De la tercera población, situada en la provincia de Ávila (Burgohondo), se escogieron 50 individuos, se encuentra a 834 m de altitud y presenta un clima seco y con elevada incidencia de heladas.

En todos los casos, la recolección de las muestras de hoja para el análisis enzimático se llevó a cabo en los meses de septiembre y octubre.

Técnicas de electroforesis

Se realizó la caracterización genética de la población de mejora, así como de las tres poblaciones naturalizadas, mediante cuatro sistemas isoenzimáticos: malato deshidrogenasa (MDH, E.C.1.1.1.137), shikimato deshidrogenasa (SDH, E.C.1.1.1.25), fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD, E.C.1.1.1.44) y fosfoglucomutasa (PGM, E.C.2.7.5.1).

Por otro lado, de las tres poblaciones naturalizadas, dos de ellas (Valadouro y Burgohondo) se estudiaron además, mediante los isoenzimas diaforasa (DIA, E.C.1.6.4.3) y manosa fosfo-isomerasa (MPI, E.C.5.3.1.8).

Finalmente, 51 de los 61 genotipos de la población de mejora, fueron caracterizados mediante 14 RAPD polimórficos, siguiendo la metodología descrita en Abuín *et al.*, (2002).

Para la caracterización genética mediante isoenzimas, se tomaron pequeñas porciones de hoja, que fueron procesadas en el tampón de extracción de Arulsekhar y Parfit (1986) [(1,3x cantidad de peso fresco,

4°C): 0,05M de Tris, 0,007M de ácido cítrico, 10% de cisteína, 10% de ácido ascórbico, 1% de polietilenglicol, 0,001M de 2'-mercaptoetanol, y 8% de PVP-40]. Tras el homogeneizado de las muestras, estas se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de almidón en los 4 sistemas isoenzimáticos relacionados. La separación de los isoenzimas en MDH, SDH y 6-PGD se llevó a cabo con el sistema de tampón desarrollado por Wendel y Weeden (1989), en almidón al 12% (Sigma) con 35 mA constante y durante 3 horas (*tampón electrodo*: ácido cítrico 0,04M a pH 8,1 con N-morfolina; *tampón gel*: 1 parte de tampón electrodo: 19 partes de agua). El isoenzima PGM, se resolvió de acuerdo con el protocolo de Shields *et al.* (1983) a una corriente de 100/200 V manteniéndolo a menos de 40 mA durante 3,5 horas en almidón al 12% de Starch Art Corporation (*tampón electrodo*: Tris-citrato 0,1m pH 7 con NaOH 2N; *tampón gel*: DL-Histidina 0,005m pH 7,0). Los isoenzimas diaforasa (DIA, E.C.1.6.4.3) y manosa fosfo-isomerasa (MPI, E.C.5.3.1.8) se resolvieron de acuerdo al protocolo modificado de Müller Starck (1984) en almidón al 12% (Sigma) a 160 V sin superar los 80 mA y durante 5 horas (*tampón electrodo*: tris (0,15M) a pH 7,3 con ácido cítrico; *tampón gel*: 1 parte de tampón electrodo: 3,3 partes de agua). El tamaño del gel es de 19 × 15,5 × 1 cm. Los seis isoenzimas fueron teñidos de acuerdo con Vallejos (1983).

La metodología de la técnica con RAPDs se desarrolla en el artículo de Abuín *et al.* (2002).

Análisis Estadístico

A partir de los valores de frecuencias alélicas de los datos aportados por isoenzimas se calculó la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), el número observado de alelos (n_a), el número efectivo de alelos (n_e) y el F_{IS} o índice de fijación (Wright, 1978). A partir de la matriz de distancias de Nei y Roychoudhury (1973) se construyó un dendrograma, para la clasificación de individuos de la población de mejora. Para el cálculo de todos ellos se utilizó el paquete estadístico Popgene (Yeh y Yang, 1999).

Mediante el cálculo del sesgo de la distribución alélica (S_k) se determinó el grado de desviación entre el número de alelos observado y efectivo, como: $S_k = (n_a n_e) / (n_a - 1)$ (Fornari *et al.*, 1999).

En cuanto a la estructura genotípica de la población de mejora, el cálculo de los genotipos teóricos

para todos los loci estudiados es según Cheliak y Pitel (1984):

$$\text{Ngt} = \prod_{i=1}^L \{n_i(n_i + 1)/2\} = \prod_{i=1}^L n g_i$$

donde Ngt es el número de genotipos diferentes para todos los loci, ng_i es el número de genotipos diferentes en el locus i , n_i es el número de alelos en el locus i y L es el número de loci analizados.

En el estudio de la población de mejora mediante 14 RAPD polimórficos (Abuín *et al.*, 2002) se calculó el número de loci polimórficos, el número efectivo de alelos, el grado de equifrecuencia de los alelos (S_k), la diversidad genética (Nei y Roychoudhury, 1973), y la matriz de distancias genéticas (Nei, 1987) entre individuos mediante el programa Popgene (Yeh y Yang, 1999). Por otro lado, la correlación de las distancias genéticas entre los genotipos estudiados con ambos tipos de marcadores se analizó mediante el test multivariante de Mantel de comparación de matrices (Mantel, 1967), utilizando la herramienta informática NTSYS-pc 2,1 (Exeter Software, Setauket, New York).

Resultados

Estudio de la diversidad de la población de mejora

En los cuatro sistemas enzimáticos estudiados tanto en la población de mejora como en las poblaciones naturalizadas se distinguieron 9 loci diferentes, siendo el 44,4% de los mismos polimórficos (Tabla 1).

El número de alelos observados en la población de mejora (Tabla 1), presentó idéntico valor medio al de las poblaciones naturalizadas (1,56). Sin embargo, el número efectivo de alelos fue superior en la población de mejora (1,42) frente a las poblaciones naturalizadas (1,34). De esta manera, el valor medio del parámetro S_k para la población de mejora

(0,25) fue inferior al de las poblaciones naturalizadas (0,39).

El valor medio de la heterocigosidad observada para la población de mejora es de 0,197. Este valor es ligeramente superior a los obtenidos en las poblaciones naturalizadas (Tabla 1). De la misma manera, la heterocigosidad esperada presentó valores inferiores en las poblaciones naturalizadas.

En la misma Tabla 1, se recogen también los valores de F_{IS} , que apenas se apartaron de 0 (0,069) en la población de mejora, siendo muy similares a los obtenidos para las poblaciones naturalizadas, aunque estos ligeramente inferiores (0,055).

En la Tabla 2 aparecen reflejados los valores correspondientes a los loci polimórficos estudiados en la población de mejora. En ella se observa que el locus MDH-3 presenta un valor máximo de S_k (0,75), ya que el número efectivo de alelos es muy inferior al número de alelos observados. Además, los valores de heterocigosidad presentaron un valor mínimo del 0,131 para MDH-3, que también se refleja en el valor de F_{IS} (0,354). Este locus se aleja del equilibrio acercándose al monomorfismo.

Sin embargo, aunque 6PGD-2 presenta valores de S_k bastante bajos, lo que indicaría que sus alelos se aproximan a la equifrecuencia, se observa que uno de los alelos aparece en inferior frecuencia que los otros dos. Este isoenzima 6PGD-2 refleja además el mayor valor de heterocigosidad observada (0,66), superando incluso a la esperada, y presentando también el valor de F_{IS} más bajo.

Dos de las poblaciones naturalizadas (Valadouro y Burgohondo) fueron analizadas con tres loci más (DIA-1, DIA-2 y MPI), de los cuales dos son polimórficos (DIA-1 y DIA-2). Ambas poblaciones fueron de nuevo analizadas añadiendo los dos nuevos loci polimórficos (Tabla 3). Al aumentar el número de isoenzimas estudiados, el grado de polimorfismo se incrementó hasta el 50%, y el parámetro S_k disminuyó ligeramente (0,27), siendo el número efectivo de alelos superior en ese caso (1,41). Los valores de he-

Tabla 1. Parámetros genéticos para poblaciones naturalizadas (Valadouro, Burgohondo y Silleda) y la población de mejora

Poblaciones	%P	na	ne	S_k	Ngt	Ngo	Ho	He	F_{IS}
Población de mejora (9 isoz)	44,4	1,56	1,42	0,25	2,2	2,1	0,197	0,202	0,069
3 poblaciones naturalizadas (9 isoz)	44,4	1,56	1,34	0,39	2,2	2,1	0,177	0,186	0,055

%P: porcentaje de loci polimórficos; na: número observado de alelos; ne: número efectivo de alelos; S_k : sesgo de la distribución alélica; Ngt: número de genotipos teóricos; Ngo: número de genotipos observado; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada; F_{IS} : índice de fijación.

Tabla 2. Parámetros genéticos para los isoenzimas de la población de mejora

Isoenzima	Tamaño muestra	na	ne	S _k	Alelo			Ho	He	F _{IS}
					A	B	C			
PGM-1	120	2	1,99	0,01	0,475	0,525	—	0,483	0,503	0,031
PGM-2	120	1	1,00	1,00	1,000	—	—	0,0	0,0	0,0
SDH-1	122	2	1,91	0,09	0,606	0,393	—	0,492	0,481	-0,030
SDH-2	122	1	1,00	1,00	1,000	—	—	0,0	0,0	0,0
MDH-1	122	1	1,00	1,00	—	1,000	—	0,0	0,0	0,0
MDH-2	122	1	1,00	1,00	1,000	—	—	0,0	0,0	0,0
MDH-3	122	2	1,25	0,75	0,115	0,885	—	0,131	0,205	0,354
6PGD-1	102	1	1,00	1,00	1,000	—	—	0,0	0,0	0,0
6PGD-2	102	3	2,62	0,19	0,196	0,500	0,304	0,667	0,625	-0,077
Media	102	1,5	1,42	0,26				0,197	0,202	0,069

Ver abreviaturas en Tabla 1.

Tabla 3. Parámetros genéticos para poblaciones naturalizadas (Valadouro y Burgohondo) analizadas con distinto número de isoenzimas

Poblaciones naturalizadas	%P	na	ne	S _k	Ngt	Ngo	Ho	He	F _{IS}
9 isoenzimas	44,4	1,56	1,35	0,37	2,2	2,1	0,182	0,189	0,038
12 isoenzimas	50	1,56	1,41	0,27	2,2	2,1	0,206	0,219	0,058

Ver abreviaturas en Tabla 1.

terocigosidad, tanto observada (0,206) como esperada (0,219) se vieron incrementados en este nuevo análisis, así como el parámetro F_{IS}, que también incrementa su valor (0,058).

El número de genotipos teóricos (Ngt) (Cheliak y Pitel, 1984), para todos los loci estudiados fue de 162. Sin embargo, en el conjunto de la población de mejora de 61 individuos, se observaron sólo 38 genotipos distintos, lo que supone un 62,2% de genotipos identificados como diferentes. En la Tabla 4 se muestran

los genotipos teóricos y observados para cada isoenzima en la población de mejora. En todos los casos el número teórico (Ngt) y el observado (Ngo) de genotipos se mantuvo para todos los loci estudiados, excepto en el caso de 6PGD-2 donde el genotipo CC no aparece representado por ninguno de los individuos de la población de mejora. En general las frecuencias genotípicas de los heterocigotos fueron superiores a las de los homocigotos, excepto en el locus MDH-3. En el caso del locus 6PGD-2 la proporción de heteroci-

Tabla 4. Estructura genotípica de la población de mejora

Isoenzimas	Ngt	Ngo	Genotipo					
			AA	AB	AC	BB	BC	CC
PGM-1	3	3	0,234	0,483	—	0,283	—	—
PGM-2	1	1	1	—	—	—	—	—
SDH-1	3	3	0,361	0,492	—	0,147	—	—
SDH-2	1	1	1	—	—	—	—	—
MDH-1	1	1	—	—	—	1	—	—
MDH-2	1	1	1	—	—	—	—	—
MDH-3	3	3	0,049	0,131	—	0,82	—	—
6PGD-1	1	1	1	—	—	—	—	—
6PGD-2	6	5	0,039	0,059	0,294	0,255	0,353	0,000
Media	2,2	2,1						

Ngt: número de genotipos teóricos; Ngo: número de genotipos observados.

gotos no apareció de una manera uniforme, sino en una menor proporción para uno de ellos (AC).

Por otro lado, el porcentaje de genotipos identificados como distintos en las tres poblaciones naturalizadas estudiadas con 4 loci polimórficos resultó ser inferior al obtenido en la población de mejora (50,7%). Sin embargo, al analizar solamente las poblaciones de Valadouro y Burgohondo resultó un valor del 70,5%, lo que nos indica que la población excluida en este análisis (Silleda) presentó menor variabilidad. Por otro lado, estas mismas poblaciones analizadas con dos isoenzimas polimórficos más, el número de genotipos identificados se incrementó hasta un 91,5%.

Estudio comparativo entre isoenzimas y RAPD

Como se observa en la Tabla 5, el grado de polimorfismo fue superior en el caso de isoenzimas, así como en el número efectivo de alelos (n_e) y el número de alelos por locus (n_a), por lo que el valor de S_k es superior (0,54) en el análisis con RAPDs. En cuanto a los valores de diversidad genética, también se observó una clara superioridad en los valores obtenidos por isoenzimas (0,202) frente a los obtenidos con RAPD (0,060).

Al comparar los dendrogramas elaborados para los dos marcadores, se observa que la variabilidad aportada por los 4 loci polimórficos, nos permite identificar individualmente 38 de los 51 genotipos estudiados (74,5%), produciéndose agrupaciones de hasta cuatro individuos como pertenecientes al mismo clon. Sin embargo, en el estudio realizado con RAPD se obtuvieron 46 genotipos diferentes, de los 51 estudiados (90,2%). Por otro lado se realizó el análisis conjunto de los resultados de isoenzimas y RAPDs de manera conjunta, obteniéndose un dendrograma en el que se observa una discriminación del 100% de los genotipos estudiados.

Con el fin de determinar la posible relación entre los dos tipos de marcadores, se llevó a cabo la correlación entre las matrices de distancia genética, generadas a partir de las bases de datos de ambos marcadores mediante el test de Mantel. El coeficiente de correlación resultante fue bajo, y poco significativo ($r = 0,034$; $P = 0,32$).

Discusión

Estudio de la diversidad de la población de mejora

El grado de polimorfismo encontrado en las poblaciones de mejora y naturalizadas está por debajo del 59% obtenido para especies de amplia distribución (Hamrick *et al.*, 1991), lo que evidencia una menor diversidad para esta especie. Los valores obtenidos en nuestro estudio son más parecidos a los encontrados anteriormente por Fornari *et al.* (1999) y Malvolti, *et al.* (1994) en estudios realizados para la distribución europea y asiática de *J. regia*, donde se han encontrado valores de polimorfismo del 47% y 31,3% respectivamente para esta especie.

Por otro lado, el número de alelos observados está por debajo de los encontrados para nogal en el noroeste de la península ($n_a = 2$, Fornari *et al.*, 1999), y por encima de los encontrados para poblaciones italianas (1,37; Malvolti *et al.*, 1994). Con relación a este parámetro, los valores de S_k , se situaron por debajo de los encontrados en la distribución europea de la especie (0,5; Fornari *et al.*, 1999; Malvolti *et al.*, 1993). En otras especies S_k alcanzó valores de 0,38 (calculado a partir de los resultados encontrados en la literatura) en *Castanea sativa* Mill. (Villani *et al.*, 1991), valor parecido al obtenido en las poblaciones naturalizadas aquí estudiadas, hasta un máximo de 0,83 en el caso de *Quercus ilex* L. (Yacini y Lumaret, 1989). En cualquier caso estos resultados son superiores a los

Tabla 5. Tabla comparativa de la diversidad genética de la población de mejora para isoenzimas y RAPD

Marcadores	Tamaño muestra	%P	n_a	n_e	S_k	He
Isoenzimas	51	44,44%	1,56	1,42	0,25	0,202
RAPD	51	21,54%	1,22	1,10	0,54	0,060

Ver abreviaturas en Tabla 1.

encontrados en la población de mejora del presente estudio, lo que se interpreta como una mayor equifrecuencia alélica en la población de mejora.

Los valores de heterocigosidad observada encontrados en la población de mejora y en las poblaciones naturalizadas fueron inferiores a los hallados en el noroeste de la península (0,385) (Fornari *et al.*, 1999), e incluso inferiores a la mitad del valor calculado para esta especie en Italia ($H_o = 0,409$; Malvolti *et al.*, 1995). También, los resultados de F_{IS} contrastaron con los obtenidos por Malvolti *et al.* (1993, 1994) en poblaciones del centro de Italia (-0,20), aproximándose más nuestros valores a un defecto de heterocigotos.

La variación observada en los parámetros de polimorfismo y el número de alelos entre las poblaciones de mejora y naturalizadas, se obtuvo también en otras especies como es el caso de *Picea sitchensis* (Bong) Carr., en la que el grado de polimorfismo ascendió de 66,6% al 100%, y el número de alelos se duplicó (Chaurisri y El-Kassaby, 1994). Sin embargo, en el estudio de otras especies como *Thuja plicata* Donn., los valores de ambos parámetros coincidieron (El-Kassaby *et al.*, 1993). También el incremento de la heterocigosidad observada en la población de mejora frente a las poblaciones naturalizadas, se presenta de manera generalizada para otras especies, como en *Picea abies* L., donde se vió incrementada la heterocigosidad en la población de mejora (0,32 frente a 0,23), aunque no de manera destacada (Bergman y Ruetz, 1991).

El incremento de la variabilidad en la población de mejora se explica por la diversa procedencia de los individuos que la forman, ya que representan un área geográfica amplia que aporta variabilidad al conjunto. Sin embargo, las poblaciones naturalizadas se componen de individuos próximos y por tanto, más emparentados, por lo que presentan una menor variabilidad, debido al elevado grado de cruzamientos entre parientes, y de autopolinización de esta especie (Luza y Polito, 1987). La cantidad de variación que se retiene en una población de mejora está sujeta mayoritariamente al método de selección de los individuos en campo, y a la estructura de las poblaciones en que se realiza dicha selección. Es decir, la selección fenotípica de los árboles superiores determina que puedan quedar incluidas en la población de mejora individuos genéticamente distantes, incrementando, o al menos manteniendo la variabilidad en el conjunto de la población de mejora. En la población de mejora que aquí se estudia, es posible que la selección fenotípica no favorezca a los heterocigotos, como se refleja en el valor

de F_{IS} , ligeramente superior a los encontrados para las poblaciones naturalizadas que se han analizado.

Atendiendo a todos los datos analizados podemos decir que la variabilidad de la población de mejora fue superior a la encontrada en poblaciones naturalizadas de localización similar. Sin embargo, estos valores de diversidad no se consideran elevados, debido a la disminución de la variabilidad de *J. regia* en el Oeste de Europa indicada por Fornari *et al.* (1999). Por otro lado, hay que destacar el papel del locus 6PGD-2 en la capacidad de la técnica de electroforesis para discernir entre genotipos diferentes, contrariamente al locus MDH-3. Además, observamos que la utilización de mayor número de isoenzimas polimórficos en el análisis, incrementa la capacidad de discernir entre individuos diferentes.

Estudio comparativo entre isoenzimas y RAPD

A pesar de que los RAPDs han demostrado una mayor capacidad de diferenciar entre individuos, pues los resultados de los dendrogramas para RAPDs rinden un mayor número de grupos que para los isoenzimas, estos últimos presentan valores de diversidad superiores a los obtenidos con RAPDs.

Estos resultados del estudio de la población de mejora con ambos marcadores, contrastan con los obtenidos por otros autores, que han revelado valores de polimorfismo y diversidad muy parecidos entre ambos marcadores (Bartish *et al.*, 2000) para la especie *Chaenomeles japónica* Lindl, o en otras especies como *Populus grandidentata* Michx., donde se han detectado valores superiores de diversidad en RAPD frente a los encontrados para isoenzimas (0,08/0,31) (Liuz y Furnier, 1993).

Al igual que en nuestro trabajo, se han encontrado valores bajos de correlación entre ambos marcadores en otras especies, como *Prosopis glandulosa* L. ($r = 0,08$; $P = 0,69$), aunque en este caso los valores de variabilidad fueron superiores para RAPD (Bessega, *et al.*, 2000). Sin embargo, en la evaluación de la diversidad genética de un banco de germoplasma de *Allium sativum* L. se determinó una elevada correlación entre ambos marcadores ($r = 0,57$) indicando una significativa asociación entre ambos (Ipek y Simon, 2002). En nuestro estudio, las diferencias en los valores de variabilidad entre ambos marcadores, y el bajo coeficiente de correlación entre ellos, confirman un alto grado de dis-

crepancia entre estas dos clases de marcadores, lo que refleja que ambos marcadores refieren, en este caso, información sobre distintos fragmentos del genoma.

Por otro lado se ha visto que al incrementar el número de loci polimórficos en el análisis genético se consigue una diferenciación del 91,5% de los individuos, valor bastante elevado. Si además tenemos en cuenta que el desarrollo de la técnica de electroforesis es más económico y menos trabajoso que la resolución con RAPDs se puede considerar sobradamente útil el empleo de isoenzimas en la identificación y diferenciación de genotipos.

Sien embargo, algunos autores han concluido que la aplicación simultánea de ambas técnicas proporciona el método más fiable para determinar los parámetros de diversidad genética de poblaciones, así como sus relaciones filogenéticas (Chan y Sun, 1997; Ayres y Ryan, 1999). Esto, unido al hecho de que el estudio conjunto de ambos marcadores amplía el rango de discriminación al 100%, ratifica la idea de que la utilización conjunta de ambos marcadores mejor los resultados de identificación clonal.

Bibliografía

- ABUIN M., DÍAZ R., FERNÁNDEZ-LÓPEZ J., 2002. Identification of *Juglans regia* L. genotypes using RAPDs molecular markers. *Forest Genetics* 9(1), 31-37.
- ALETA N., NINOT A., 1997. Field evaluation of *Juglans regia* selected clones from seedlings populations of Mediterranean and Atlantic Spanish Coast. III International Walnut Congress, Alcobaca, *Acta Horticulturae* 411, 63-67.
- ALETA N., OLARTE C., TRUCO M.J., ARUS P., 1990. Identification of walnut cultivars by isozyme analysis. *Acta Horticulturae* 284, 91-96.
- ARULSEKAR S., PARFITT D.E., 1986. Isozyme analyses procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *Host Science* 21, 928-933.
- AYRES D.R., RYAN E.J., 1999. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. *Am J Bot* 86, 344-353.
- BARTISH J.V., GARKAVA L.P., RUMPUNEN K., 2000. Phylogenetic relationships and differentiation among and within populations of *Chaenomeles* Lindl. (Rosaceae) estimated with RAPDs and isozymes. *Theoretical and Applied Genetics* 101, 554-563.
- BECQUEY J., 1997. Les noyers à bois. Troisième ed., Institut pour le Developpement Forestier Paris, pp. 144.
- BERGMAN F., RUETZ W., 1991. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random trees samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations. *Forest Ecology and Management* 46, 39-47.
- BESSEGA C., SAIDMAN B.O., VILARDI J.C., 2000. Isozyme and RAPD studies in *Prosopis glandulosa* and *P. velutina* (Leguminosae, Mimosidae). *Genetics and Molecular Biology* 23(3), 639-648.
- CHAISURISRI K., EL-KASSABY Y.A., 1994. Genetic diversity in a seed production population vs natural populations of *Picea sitchensis*. *Biodiversity and Conservation* 3, 512-23.
- CHAN K.F., SUN M., 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of the crop and wild species of *Amaranthus*. *Theor Appl Genet* 95, 865-873.
- CHELIAK W.M., 1993. Clone identification. In: *Clonal Forestry I, Genetics and Biotechnology*. Ed. By M.R. Ahuja and W.J. Libby. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 107-164.
- CHELIAK W.M., PITEL J.A., 1984. Electrophoretic identification of clones in trembling aspen. *Canadian Journal of Forestry Research* 14, 740-743.
- DÍAZ R., 2001. Mejora genética de *Juglans regia* L. para uso forestal. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- DÍAZ R., FERNÁNDEZ-LÓPEZ J., 2004. Genetic variation at early ages for several traits interesting for timber production breeding of *Juglans regia*. *Canadian Journal of Forestry Research*. (In press).
- EL-KASSABY Y.A., 2000. Effect of forest tree domestication on gene pools. In: *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. Ed. Young, A., D. Boshier and T. Boyle. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO). CSIRO Publishing-CABI Publishing, Canberra, Australia 13, pp. 197-213.
- EL-KASSABY Y.A., RUSSELL J., RITLAND K., 1993. Mixed-mating in an experimental population of western redcedar, *Thuja plicata*. *Journal of Heredity* 85, 27-31.
- ERIKSSON G., 2000. Red europea de conservación de recursos genéticos de frondosas nobles. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Fuera de Serie n° 2*, 59-69.
- FADY B.D.F., ALETA N., BECKEY J., DÍAZ-VÁZQUEZ R., FERNÁNDEZ LÓPEZ F., JAY-ALLEMAND C., LEFEVRE F., NINOT A., PANETSOS K., PARIS P., PISANELLI A., RUMPF H., 2003. Walnut demonstrates strong variability for adaptive and wood quality traits in a network of juvenile field tests across Europe. *New Forest* 25, 211-225.
- FERNÁNDEZ J., PEREIRA S., 1997. Genetic control of growth in *Juglans regia* seedlings from open families of different provenances. III International Congress. Alcobaca 1995. Ed. Gomes-Pereira. *Acta Horticulturae* 411, 69-75.
- FORNARI B., CANNATA F., SPADA M., MALVOLTI M.E., 1999. Allozyme analysis of genetic diversity and differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations. *Forest Genetics* 6(2), 115-127.
- GERMAIN E., ALETA N., NINOT E., ROUSKAS D., ZAKHINTINOS G., PEREIRA J.G., MONASTRA F., LIMONGELLI F., 1997. Prospection in walnut seedling populations of Spain, Greece, Italy and Portugal:

- Characterization of populations and description in collections of preselections issued from the prospection. Options Mediterraneennes. Serie B, Etudes et Reserches, 16, 9-40.
- HAMRIK J.L., GODT M.J.W., MURAWSKI D.A., LOVELESS M.D., 1991. Correlation between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Genetics and conservation of rare plants. Eds. D.A. Falk & K.E. Holsinger, Oxford University Press. New York-Oxford, pp. 75-86.
- IPEK M., SIMON P., 2002. Evaluation of genetic diversity among clones using molecular markers: comparison of AFLPs, RAPDs and isozymes. Plant and Animal Genome X Meeting. <http://www.intl-pag.org/> [Consulta: 20 de Noviembre].
- LIU Z., FURNIER G.R., 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. Theoretical Applied Genetics 87, 97-105.
- LUZA J.G., POLITO V.S., 1987. Cryoconservation of English walnut (*Juglans regia* L.) pollen. Euphytica 37, 141-148.
- MALVOLTI M.E., FINESCHI S., MORGANTE M., VENDRAMIN, G.G., 1995 Mating system of a naturalized *Juglans regia* L. population Italy. Populations Genetics and Genetic Conservation of Forest Trees, pp. 305-308.
- MALVOLTI M.E., FINESCHI S., PIGLIUCCI M., 1994. Morphological integration and genetic variability in *Juglans regia* L. Journal of Heredity 85, 389-394.
- MALVOLTI M.E., VILLANI E., CANNATA F. 1997. Genetic resources of multipurpose tree species in Mediterranean basin: the case of *Juglans regia* L. and *Castanea sativa* Mill. In C. Pichot (ed). Resources Genetiques Forestieres. 2nd meeting. Avignon, 24-26 April. pp. 44-47
- MALVOLTI M.E., PIGLIUCCI M., CANNATA F, FINESCHI S., 1993. Genetic variation in Italian populations of *Juglans regia*. Acta Horticulturae 311, 86-94.
- MANTEL N., 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. Cancer Research 27, 209-220.
- MAST H., 1975. The organization and Work of UPOV. Seed Science Technology 3, 377-386.
- MULLER-STARCK, 1984. Recipes for starch gel electrophoresis. (Pro manuscripto), 4 pp.
- NEI M., ROYCHOUDHURY A.K., 1973. Sampling variances of heterocigosity and genetic distance. Genetics 76, 379-390.
- NEI M., 1987: Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press.
- NICESE F.P., HORMAZA J.I., MCGRANAHAN G.H., 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. Euphytica 101, 199-206.
- SHIELDS C.R., 1983. In: Isozymes in plant genetics and breeding. Part A, Eds. Tanksley S.D., Orton T.J. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam, 425-468.
- VALLEJOS C.E., 1983. Enzyme activity staining in isozymes in plant genetics and breeding. Part A S. D. Eds. Tanksley and T.J. Orton, Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam, pp. 469-516.
- VILLANI F., BENEDETTELLI S. PACIUCCI M. CHERUBINI M., PIGLIUCCI M., 1991. Genetic variation and differentiation between natural populations of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) from Italy. In: Biochemical markers in the populations genetics of forest trees, Eds. S. Fineschi, M.E. Malvolti, F. Cannata & H.H. Hattemer., SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands. pp.91-103.
- WENDEL J.F., WEEDEN N.F., 1989. Visualisation and interpretation in plant isozymes. In: Isozymes in plant biology. Eds. Soltis D.E., Soltis P.S. Dudley, T.R. Discorides press, ISBN 0-412-36500 6:1-45.
- WRIGHT S., 1978. Evolution and the genetics of natural populations. Vol. 6: variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press.
- YACINI A., LUMARET R., 1989. Genetic diversity in holmoak (*Quercus ilex* L.): insight from several enzyme markers. Silvae Genetica 38(3-4), 140-148.
- YEH F.C., YANG R., 1999. POPGENE versión 1.31.