



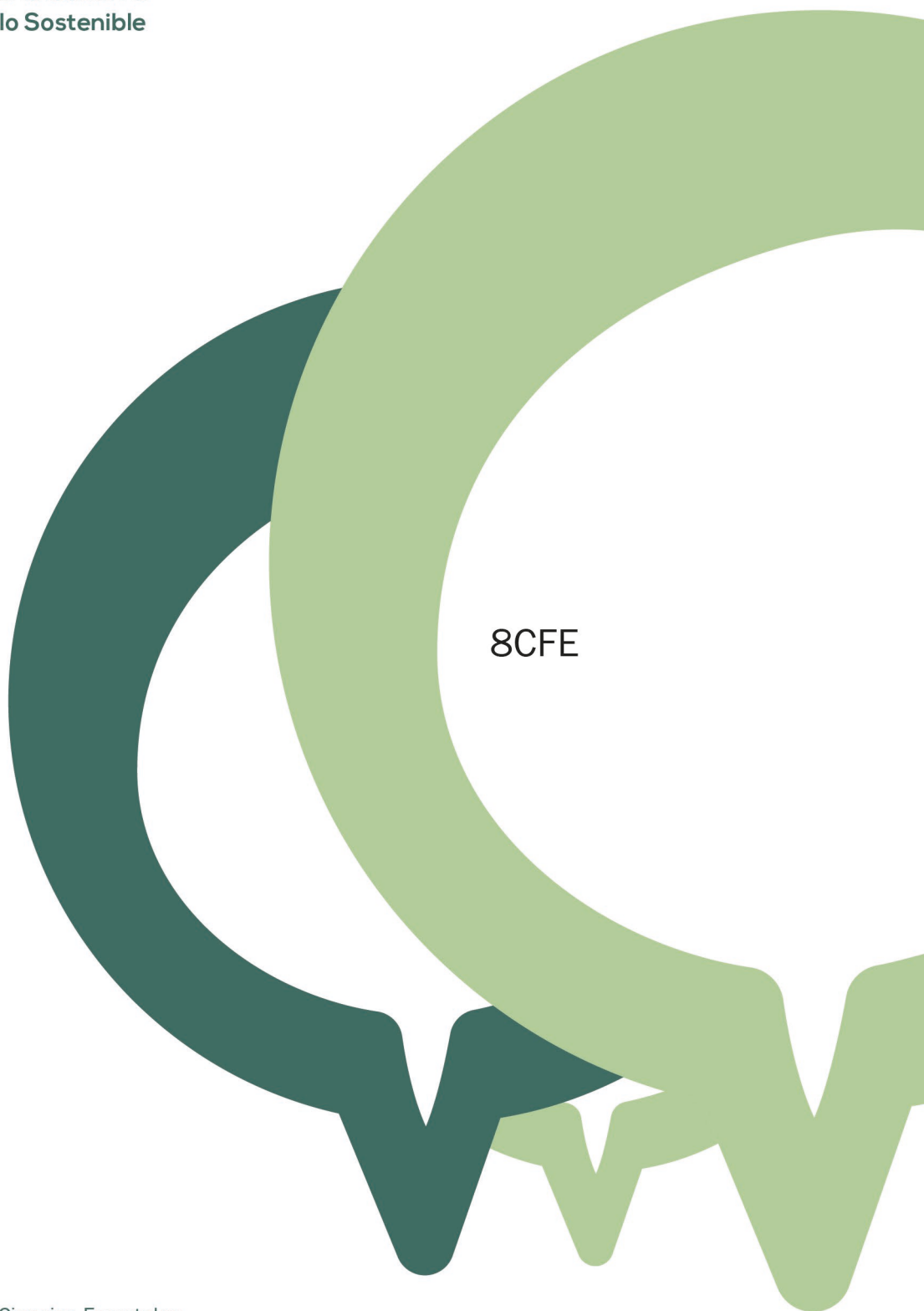
2022
Lleida

27·1
junio · juny
julio · juliol

Cataluña
Catalunya

8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Evaluación de la diversidad genética del género *Populus* en Castilla y León para la propagación vegetativa y restauración natural

TRANQUE PASCUAL, F. J.¹, GONZALEZ-MARTÍNEZ, S.C.², MACAYA-SANZ, D.³, SANTOS DEL BLANCO, L.³, HOWAD, W.⁴, HIDALGO RODRÍGUEZ, E.⁵

¹ Dirección General de Patrimonio Natural y Política Forestal. Junta de Castilla y León.

² Univ. Bordeaux, INRAE

³ Forest Research Center (INIA, CSIC).

⁴ Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) & Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA).

⁵ iuFOR, ETSIIAA-Universidad de Valladolid.

Resumen

Las especies del género *Populus* spp. son ampliamente utilizadas en revegetaciones de riberas, frecuentemente producidas mediante propagación vegetativa. Disponer de información de la variabilidad genética de las poblaciones de partida, así como de los clones propagados, favorece las recomendaciones de utilización en campo y por tanto su conservación.

La Junta de Castilla y León lleva varios años analizando la diversidad de las poblaciones naturales de *Populus* de la región con el propósito de mejorar la utilización del material propagado. Así, se han prospectado poblaciones naturales y analizado genéticamente mediante marcadores microsatélites. En base a sus resultados se recolecta el material vegetal para establecer en vivero campos de plantas madre para su propagación. Con el genotipado de los ejemplares de dichos campos de plantas madre se procederá a su aprobación y aprovechamiento. Se podrá entonces suministrar planta conforme a un sistema alternativo que se elaboró *ad hoc* para la propagación vegetativa de especies reguladas para su utilización en revegetación de riberas. La profusa información genética obtenida en las diferentes fases permite establecer las mezclas de clones que, con una diversidad suficiente y conocida, sean las más recomendables para la zona de utilización según el *pool* genético preasignado.

Palabras clave

Revegetación, chopos, riberas, marcadores microsatélites.

1. Introducción

Las especies del género *Populus*, con gran capacidad de reproducción vegetativa, son muy utilizadas en revegetaciones de riberas. Sin embargo no es demasiado conocida la variabilidad genética que presentan sus poblaciones naturales, lo que condiciona la conservación y la utilización del material obtenido, tanto semilla como partes de planta. Este problema es particularmente importante en estas especies que se propagan vegetativamente de forma natural, llegando a presentar clones de amplia distribución geográfica en muchas de las cuencas riparias (MACAYA-SANZ et al, 2016).

Las recomendaciones de uso habituales del material forestal de reproducción de estas poblaciones, a falta de información sobre la composición genética, son el manejo de varios genotipos procedentes de zonas próximas (GARCÍA DEL BARRIO et al, 2001) y la restricción del uso de los materiales a la cuenca de origen, evitando en lo posible la transferencia de materiales entre cuencas (PRADA y ARIZPE et al, 2008). Sin embargo, esto puede ser insuficiente si no aseguramos variabilidad genética y adecuada proporción de sexos.

Los taxones autóctonos de *Populus* spp. están regulados por el Real Decreto 289/2003, de 7 de marzo, sobre comercialización de los materiales forestales de reproducción (BOE nº 58, 08-III-2003), debiendo cumplir unas normas para su producción y comercialización para uso selvícola, especialmente en cuanto al control de la trazabilidad. Sin embargo, estas especies presentan una serie de singularidades que las diferencian del resto de especies reguladas, como son la difícil adecuación a las regiones de procedencia y utilización generales (ALÍA et al, 2009), y las dificultades normativas en el uso de la propagación vegetativa. Por ello, en el seno del comité para la mejora y conservación de recursos genéticos forestales (órgano de coordinación entre la Administración General del Estado y las comunidades autónomas), se consensuó un sistema alternativo para poder utilizar la propagación vegetativa de estos taxones bajo el amparo de la conservación genética establecido en el artículo 5.4 del RD 289/2003 y que se adapta perfectamente en las revegetaciones de ribera. Este sistema de control específico (PRADA et al, 2012), establece la posibilidad de recogida de partes de planta en campo para su inmediato estaquillado o producción de planta en vivero, así como la recogida de material para la instalación de campos de plantas madre en vivero y la producción vegetativa ulterior.

En la comunidad autónoma de Castilla y León están presentes de manera natural tres especies de *Populus* (*Populus alba* L., *P. nigra* L. y *P. tremula* L. así como un híbrido de *P. alba* y *P. tremula* (*P. x canescens* (Aiton) Sm). Habitualmente asociadas a cursos fluviales, estas poblaciones sufren las amenazas comunes a esta vegetación intrazonal, como la alteración de los ecosistemas riparios o su sustitución por cultivos agrícolas y, en menor medida, su sustitución por plantaciones forestales. Caso especial es *P. tremula*, que aunque vegeta también en valles fluviales ocupa un amplio rango de estaciones edafoclimáticas de la orla montañosa de Castilla y León. La facilidad para la hibridación interespecífica de los *Populus* y su amplio uso por parte del hombre con objetivos variados, ha supuesto un movimiento del material por muchas subcuencas, favoreciendo que se asilvestren y entremezclen, lo que complica en muchas ocasiones la identificación de las especies e híbridos únicamente mediante caracteres morfológicos.

Disponer de información genética de las poblaciones naturales de las especies de *Populus* permitiría orientar los trabajos de conservación de estas masas, manteniendo los niveles de variabilidad genética existente en las zonas de mayor diversidad e incrementándolos en las más degradadas. Además, se posibilitarían movimientos de material vegetal entre cuencas riparias, favoreciendo adecuadas pautas de gestión y que sin duda deberían contemplar necesariamente un ámbito suprarregional combinando e integrando la información de las distintas poblaciones españolas en las que pudiera existir flujo genético (PRADA, 2013). En este sentido, los marcadores moleculares microsatélites han demostrado ser una valiosa herramienta para el estudio de la diversidad genética, estructura poblacional y evaluación de niveles de clonalidad e hibridación en estas especies (DE-CARVALHO et al, 2010; MACAYA-SANZ et al, 2012, 2016; SANTOS-DEL-BLANCO et al, 2013).

A la luz de la información genética obtenida de las distintas poblaciones de *Populus*, del conocimiento de su diversidad y estructura genética, se posibilita la adopción de unas adecuadas recomendaciones de uso donde la propagación vegetativa, mediante campos de plantas madre o estaquillado directo, podría ser una de las múltiples opciones para el empleo de un material forestal de reproducción apropiado a la zona de utilización, y siempre garantizando unos suficientes niveles de variabilidad genética.

2. Objetivos

Se pretende recopilar y divulgar los trabajos que está desarrollando la Junta de Castilla y León en los últimos años en materia de conservación de los recursos genéticos de los taxones del género *Populus* en el ámbito de esta comunidad autónoma, y que en algunos casos ya han

sido avanzados parcialmente para orientar el manejo de estos materiales (PRADA et al, 2013; TRANQUE et al, 2018).

Se muestran los resultados de diversidad genética, clonalidad y problemas de identidad taxonómica de las poblaciones prospectadas. También se establecen pautas de conservación de estos recursos genéticos, recomendaciones de uso y propagación vegetativa del material forestal de reproducción de estos taxones de acuerdo a criterios de diversidad genética.

3. Metodología

Localización de poblaciones

Se utilizó el catálogo de materiales de base de Material Forestal de Reproducción (MFR) en Castilla y León para la localización de poblaciones, aprovechando la prospección y genotipado para su revisión posterior. Aunque dicho Catálogo se consideraba una base de información válida y actualizada, se decidió completar con otras fuentes (MFE, IFN3, consulta a agentes medioambientales, etc). Se intentaba disponer de una amplia red de muestreo que cubriera, en la medida de lo posible, la distribución en Castilla y León de las especies objeto de estudio (*Populus alba*, *P. nigra*, *P. tremula* y *P. x canescens*). Cada muestra fue asignada, previamente a su confirmación genética, al taxón preestablecido por la fuente de información, basada principalmente en criterios morfológicos, aun cuando en el momento de la colecta ya se sospechara una clasificación errónea.

Recogida de muestras en campo

Durante los años 2012 y 2013 se recolectaron muestras vegetales (hojas) en las diferentes poblaciones de Castilla y León de los 4 taxones de *Populus* contemplados. La recogida se ejecutó aplicando un estricto protocolo que intentaba asegurar el adecuado muestreo en cada rodal y la trazabilidad del material. Así, cada una de las poblaciones se caracterizó previamente mediante una ficha de campo con datos descriptivos y clave única. En cada una de las parcelas muestreadas, que intentaban representar poblaciones distintas, se identificaron 10 ejemplares separados un mínimo de 30 metros entre sí. En poblaciones muy escasas donde no se podía cumplir esa distancia de separación la muestra se reducía hasta un mínimo de 5 ejemplares. De cada individuo se tomaba una muestra vegetal que se guardaba en sobre de papel inequívocamente etiquetado mediante un código alfanumérico. Cada árbol muestreado en campo quedaba georreferenciado con GPS, codificado individualmente, documentado mediante fotografía y asignado al curso fluvial en el que vegetaba. De esta manera se podían obtener resultados de diversidad genética por subcuenca riparia.

Se tomaron muestras en 1996 árboles de 276 poblaciones de Castilla y León (Figura 1). Se intentó que el muestreo por provincia y especie fuera proporcional a su representación territorial. Así, el 25% de las poblaciones muestreadas estaban preasignadas a *P. alba*, el 12% a *P. x canescens*, el 37% a *P. nigra* y el 24% a *P. tremula*. Sin embargo, y como se verá más adelante, algunas muestras asignadas con criterios morfológicos resultaron estar mal clasificadas según los resultados genéticos, modificándose estos porcentajes de muestreo (Figura 2).

Procesado de muestras en laboratorio

El material vegetal recepcionado en el laboratorio se procesaba mediante la selección de fragmentos de hojas sanas y libres de nervios que se conservaba en dos tubos eppendorf de 1,5 ml de capacidad, etiquetados idénticamente, uno para la extracción de ADN y el segundo para posibles repeticiones por fallos o contaminaciones en los análisis. La extracción de ADN se realizó por el método de DOYLE & DOYLE (1990) modificado para pequeños volúmenes por

TORRES et al (1993). Se emplearon 10 marcadores microsatélites (SSRs) para la amplificación del ADN nuclear (Tabla 1).

Para la amplificación de los marcadores microsatélites se utilizó un termociclador modelo SimpliAmp™ (Applied Biosystems) y para su posterior detección el sistema de electroforesis capilar ABI PRISM® 3130xl (Applied Biosystems). Para cada uno de los marcadores se estimó el tamaño de los alelos detectados utilizando el software de análisis GeneMapper® Versión 5.0 (Applied Biosystems) y como marcador de tamaños el marcador GeneScan™ -500 Liz™ Size Standard (Applied Biosystems).

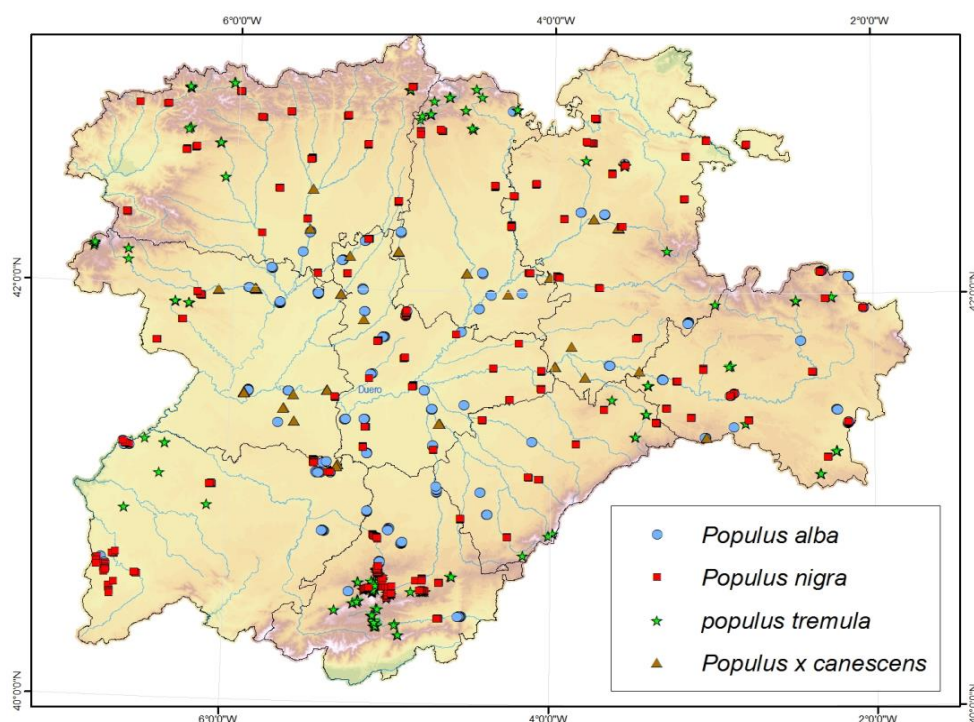


Figura 1. Poblaciones recolectadas por taxón (según asignación morfológica inicial).

Tabla 1. Marcadores microsatélites empleados en los diferentes taxones.

MARCADOR SSR	ESPECIE EN LA QUE AMPLIFICA
PMGC 2852	<i>P. alba</i> , <i>P. canescens</i> y <i>P. tremula</i>
ORMP 30	<i>P. alba</i> , <i>P. canescens</i> y <i>P. tremula</i>
WPMS 5	Todas
PMGC 433	<i>P. nigra</i>
PMGC 2156	<i>P. nigra</i>
PMGC 486	<i>P. nigra</i>
PMGC 14	<i>P. nigra</i>
WPMS 14	Todas
WPMS 16	Todas
WPMS 18	Todas

Análisis de datos

La asignación genética de taxones y la estructura poblacional general se realizó mediante el método de agrupación Bayesiana implementado en el programa STRUCTURE versión 2.3.4 (PRITCHARD et al, 2000). Análogamente, la identidad taxonómica del híbrido *P. x canescens* también se calculó con este software, con probabilidad de asignación (Q) situada en la franja intermedia de la asignación establecida para parentales puros ($Q > 0.10$ ó $Q < 0.90$), considerando que cada uno de ellos representa un *pool* genético distinto ($K=2$).

Mediante el programa SpaGeDi (HARDY & VEKEMANS, 2002) se obtuvieron los parámetros genéticos F_{st} : diferenciación genética (WEIR & COCHERHAM, 1984) y D_s : distancias genéticas (NEI, 1978) entre subcuencas. La riqueza alélica (A) y el número de alelos únicos (A^P) se determinó mediante la aplicación HP-Rare (KALINOWSKI, 2005). Se empleó el software GenAIEx versión 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012) para obtener la heterocigosidad esperada corregida con el tamaño muestral (H_e), el número de alelos efectivos (N_e), el porcentaje de *loci* polimórficos (P%), así como para estimar la correlación entre la distancia genética y geográfica mediante el test de Mantel (MANTEL, 1967).

Instalación de campo de plantas madre

A partir de los resultados de diversidad genética obtenido de los análisis de laboratorio, y de la correcta asignación de especies, se está recolectando desde el año 2015 partes de planta (estaquillas) de las diferentes poblaciones naturales del género *Populus* para el establecimiento de campos de plantas madre. El material vegetal recogido se recepciona en el vivero forestal central de Valladolid, conservándose en cámara fría (3°C) hasta su posterior estaquillado en parcelas de dicho vivero (Figura 3).

Hasta el momento se han recolectado muestras de más de 100 poblaciones distintas, intentando evitar réplicas clonales y captar la mayor diversidad de cada una de ellas. Se siguieron las directrices de recogida establecidas en PRADA et al (2012), especialmente en lo referente a distancia entre ejemplares. Este mismo protocolo se ha seguido en la instalación y etiquetado del campo de plantas madre para asegurar la trazabilidad del material.

Para tener información de la diversidad genética recogida en el campo de plantas madre, y por tanto la de la planta producida a partir de él, se realizó un análisis genético de sus componentes. De esta manera se podían detectar posibles genotipos repetidos por clonalidad de las masas de origen, así como el grado de diversidad efectivo captado en el campo de plantas madre respecto al de las poblaciones de las que proceden.

Actualmente los análisis genéticos se han completado en *Populus nigra*, que es la especie en la que más se ha avanzado para dotar el campo de plantas madre de suficientes genotipos, con más de 40 poblaciones recopiladas. En el caso de *Populus alba* aún queda por recolectar material vegetal en numerosas zonas de la región, habiéndose estaquillado material de 25 poblaciones distintas que también se ha analizado genéticamente. Por su parte, las muestras de *P. tremula* y *P. canescens* instaladas en el vivero aún no se han analizado a la espera de disponer de una colección suficiente.

La metodología empleada para el genotipado de los ejemplares del campo de plantas madre fue idéntica a la descrita anteriormente para las masas naturales.

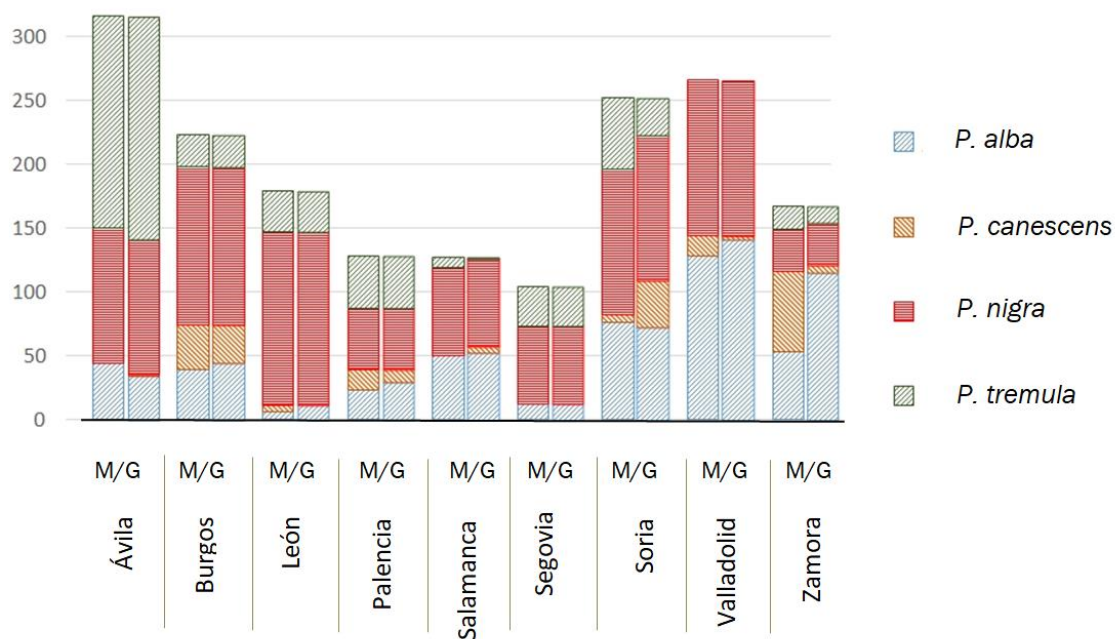


Figura 2. Número de muestras analizadas por provincia y especie, según asignación morfológica inicial (M) y genética posterior (G).



Figura 3. Campo de plantas madre de *Populus nigra* instalado a partir de estaquilla recolectada en campo.

4. Resultados

Los análisis genéticos permitieron comprobar la correcta asignación taxonómica de las muestras recolectadas, identificando errores que en algunos casos resultaron ser notables (Figura 3). Así, según el programa STRUCTURE, casi el 22,2% de los individuos pertenecientes al complejo taxonómico compuesto por *alba-canescens-tremula* ($n=210$) fueron mal pre-asignados

aplicando criterios morfológicos. Los mayores errores fueron detectados en *P. x canescens*, que mayoritariamente resultaron ser *P. alba*, y en menor medida en *P. tremula* y *P. alba*.

A continuación se presentan los principales resultados de los análisis genéticos desglosados para cada uno de los taxones.

Populus nigra

De las 813 muestras analizadas se han identificado 463 genotipos distintos, de los cuales 429 ejemplares presentaban un perfil genético único. Un clon no comercial (codificado como N01) fue identificado en 212 muestras repartidas por todas las provincias de Castilla y León y sin ningún tipo de patrón geográfico aparente. Así, aparece en 30 subcuencas distintas, en algunas de las cuales de forma muy predominante como en la de los ríos Porma, Luna, Águeda, Arlanzón y Cabrera. Por otra parte, diversos clones comerciales aparecieron en el muestreo; por ejemplo, el clon Canadá Blanco se detectó en 34 muestras, en 3 ejemplares el clon I-214, y 50 individuos resultaron ser chopo Lombardo (*P. nigra* var. *italica*).

La diversidad genética de las poblaciones analizadas, con una media $H_e=0.49$, presentó gran variación entre las subcuencas riparias (Tabla 2). El test de Mantel reflejó una ausencia de correlación entre la distancia geográfica y genética ($R_{xy} = -0,064$; $p=0.39$). Atendiendo a los valores medios de diferenciación y distancia genética, las subcuencas del Adaja, Alberche, Almar, Porma, Luna, Tera y Manzanas presentaron unos valores superiores a la media ($F_{st}=0.122$; $D_g=0.184$) de acuerdo a la matriz de comparaciones entre ellas (datos no mostrados). En algunas de estas zonas (por ejemplo Porma y Luna), esta diferenciación genética se combina con una baja diversidad y la masiva presencia del clon N01 antes citado, por lo que la utilización directa del material es conflictiva.

Tabla 2. Diversidad genética por subcuenca riparia de *Populus nigra* después de eliminar los genotipos de clones comerciales y del chopo Lombardo. n: número de individuos; H_e : Diversidad genética, corregida por el tamaño muestral; A: Riqueza alélica y A^p : número de alelos únicos. Resaltado en **negrita** valores de cada parámetro superiores al promedio de toda la región.

subcuenca	n	H_e	A	A^p	subcuenca	n	H_e	A	A^p
ADAJA	42	0.685	2.66	0.18	ESCALOTE	10	0.487	2.08	0.02
AGUEDA	29	0.353	1.75	0.02	ESLA	20	0.399	1.86	0.06
ARLANZA	16	0.593	2.34	0.07	LUNA	20	0.192	1.37	0
ARLANZON	30	0.348	1.71	0.01	MANZANAS	7	0.285	1.60	0.09
BERNESGA	15	0.419	1.88	0.03	ORBIGO	12	0.429	1.92	0.02
BOEZA	14	0.506	2.11	0.02	PEDRO	9	0.438	1.93	0.05
CARACENA	10	0.490	1.97	0.03	PISUERGA	25	0.636	2.43	0.10
CARRION	9	0.653	2.56	0.12	PORMA	10	0.131	1.23	0
CEA	13	0.632	2.45	0.15	RIAZA	11	0.305	1.63	0.02

CEGA	27	0.594	2.34	0.21	TERA	9	0.664	2.53	0.13
DUERO	201	0.562	2.37	0.10	UCERO	10	0.489	2.05	0.05
DURATON	12	0.571	2.24	0.09	VALDAVIA	15	0.671	2.58	0.16
ERESMA	10	0.618	2.35	0.08	VOLTOYA	10	0.616	2.41	0.25
					YUSO	10	0.421	1.90	0.04
					TOTAL	726	0.493	2.08	0.09

Con un óptimo de 4 grupos según el programa STRUCTURE, se aprecia una falta de diferenciación clara entre cuencas, con dos grupos genéticos mayoritarios representados de forma pura o casi pura en pocas poblaciones (Porma, Luna y Cabrera por un lado y Arlanza, Ancares y Voltoya, por otro), y con otras muchas poblaciones formando un continuo en cuanto a la contribución de cada grupo genético (Figura 4). Se observa también la presencia minoritaria de otro *pool* genético, de forma pura en la población del Alberche y en hibridación normalmente en baja frecuencia en muchas otras cuencas, a excepción del Carrión, Tera y Valdavia, donde aparece casi al 50%. Finalmente, se aprecia un cuarto grupo genético correspondiente al chopo lombardo (*Populus nigra* cv. *italica*). Este genotipo fue detectado en todas las muestras de la cuenca del río Almar, así como en 32 de 54 individuos de 5 poblaciones de la cuenca del Adaja, y en dos individuos de la cuenca del Duero, en la provincia de Valladolid.

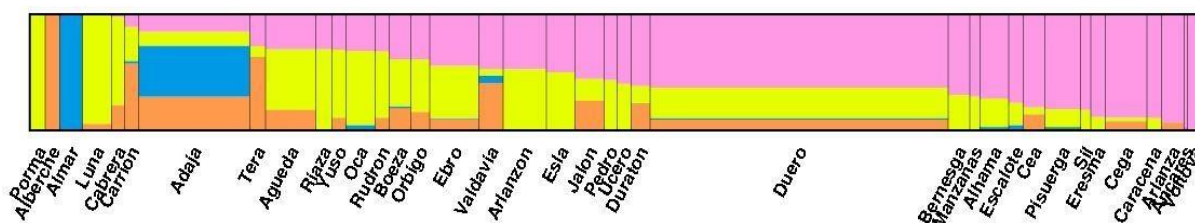


Figura 4. Representación gráfica de la estructura poblacional agrupado por subcuencas (K=4).

A partir de la distribución geográfica de las poblaciones, de los resultados de diferenciación y distancia genética entre subcuencas, y de la sectorización propuesta en base a los trabajos de LARA et al (2004) y GARILLETI et al (2012), se definieron una serie de grupos genéticos homogéneos que sirvieran de base para su utilización en labores de revegetación (Figura 5). Estos grupos permitirán, en una primera aproximación, orientar las recomendaciones de uso del material vegetativo propagado a partir de ellos permitiendo combinar *ad hoc* los grupos según objetivo y localización concreta de la plantación, priorizando conservación en su caso, o aumentando diversidad. Conforme se disponga de una información genética más completa estos grupos podrán modificarse, fusionándose en algunos casos o subdividiéndose en otros.

Los análisis genéticos realizados en el material instalado en el vivero forestal central de Valladolid detectaron un total de 112 clones distintos de *Populus nigra*, con unos valores de heterocigosidad similares a los de las poblaciones de las que procedían. Los valores de diversidad genética de los distintos grupos genéticos establecidos para orientar las recomendaciones de uso se indican en la Tabla 3.

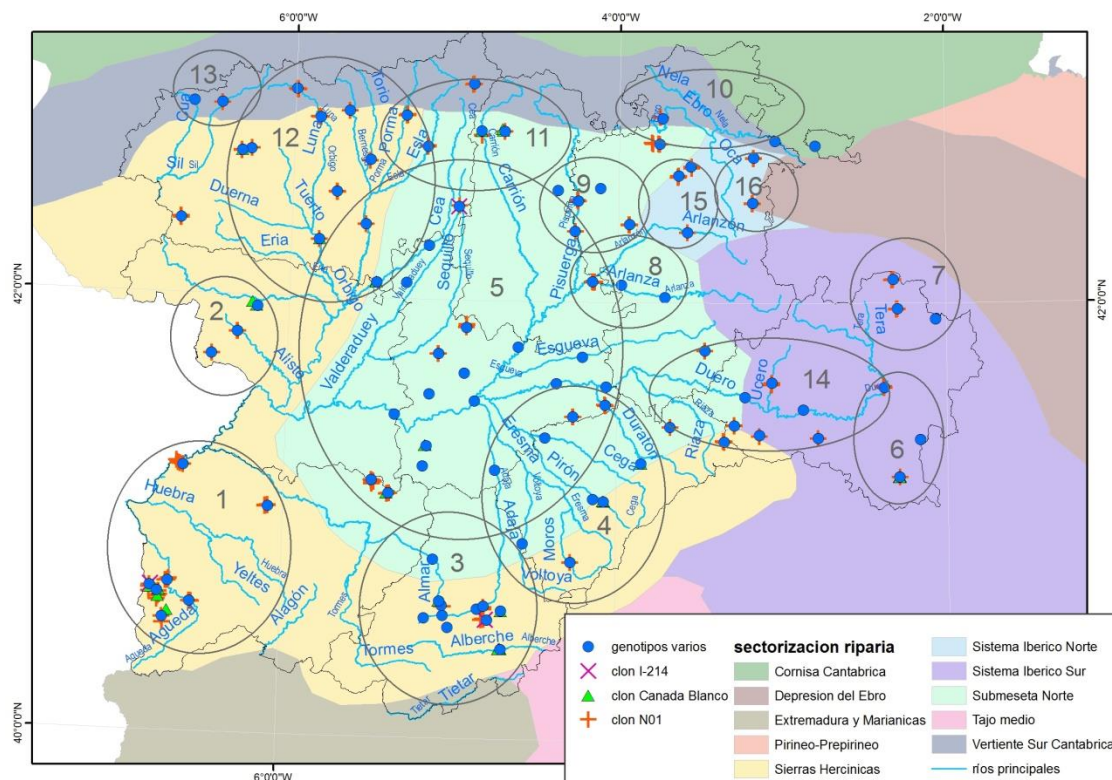


Figura 5. Localización de las poblaciones de *Populus nigra* recolectadas para el campo de plantas madre. Se representan los clones comerciales detectados I-214, Canadá blanco, así como el superclon N01. Delimitada la sectorización riparia de PRADA et al (2012) e identificados con círculos y números los grupos genéticos preestablecidos para recomendaciones de uso.

Tabla 3. Valores de diversidad genética de los grupos genéticos preestablecidos en *P. nigra* para su utilización en revegetaciones riparias. n: número de individuos, H_e : heterocigosidad esperada corregida con el tamaño muestral, N_e : número de alelos efectivos, P%: porcentaje de loci polimórficos.

Grupo	n	N_e	H_e	%P	Grupo	n	N_e	H_e	%P
1	3	2,243	0,600	87,50%	9	3	1,939	0,500	87,50%
2	3	3,648	0,783	100,00%	10	6	2,517	0,563	87,50%
3	7	2,669	0,643	100,00%	11	9	3,092	0,628	87,50%
4	12	3,414	0,707	100,00%	12	8	2,203	0,554	100,00%
5	33	2,916	0,634	100,00%	13	2	1,508	0,354	62,50%
6	5	3,403	0,719	100,00%	14	6	2,382	0,605	100,00%
7	3	2,530	0,642	100,00%	15	3	2,437	0,667	100,00%
8	6	2,102	0,552	100,00%	16	3	1,875	0,525	87,50%
Total	112	2,555	0,605	93,75%					

Populus alba

Se identificaron 45 genotipos distintos de *Populus alba*, 19 de los cuales presentaron un único ejemplar, y 24 una horquilla de 2 a 18 individuos.

Uno de los clones, codificado como A01, apareció de forma masiva representando el 61% de las muestras analizadas de la especie (Figura 6). Este clon, trialélico para el marcador PMGC2852, ya había sido identificado y descrito en un estudio previo de la misma zona geográfica (SANTOS-DEL-BLANCO et al, 2013). Aparece en todas las provincias de Castilla y León a excepción de Soria, Segovia y Burgos, siendo extremadamente abundante en la parte oeste de la región. Así, presenta un carácter dominante, o en algunos casos exclusivo, en las subcuencas de los ríos Adaja, Esla, Órbigo, Tera y Tormes, Cea y mitad oeste de la subcuenca del río Duero. También se detectó otro clon (A02), que aunque no tan masivo ($n=20$) como el A01, aparece distribuido en subcuencas tan distantes como son las del Alberche, Pisuerga, Duero y Cea.

El valor medio de heterocigosidad resultó ser de $H_e=0.35$ si se consideran todos los clones, y de $H_e=0.33$ si se excluye el clon A01 (Tabla 4), con mucha variación entre subcuencas.

Tabla 4. Diversidad genética por subcuenca de *Populus alba* después de eliminar el clon A01. n : número de individuos; H_e : diversidad genética, corregida por el tamaño muestral; A : Riqueza alélica y A^p : número de alelos únicos. Resaltado en **negrita** aquellos valores de cada parámetro superiores al promedio de toda la región.

subcuenca	n	H_e	A	A^p	subcuenca	n	H_e	A	A^p
AGUEDA	3	0.257	1.26	0.19	CEGA	3	0.257	1.26	0
ALBERCHE	10	0.150	1.15	0	DUERO	55	0.542	1.54	0.07
ALHAMA	25	0.447	1.43	0.09	ERESMA	4	0.245	1.24	0.14
ALMAR	4	0.520	1.52	0.11	JALON	20	0.265	1.27	0.13
ARLANZA	1	0.571	1.57	0.14	OCA	2	0.286	1.29	0.01
ARLANZON	22	0.321	1.32	0	PISUERGA	1	0.286	1.29	0.01
CARACENA	6	0.390	1.39	0.22	RIAZA	3	0.171	1.17	0
CARRION	3	0.248	1.25	0	UCERO	4	0.270	1.27	0.03
CEA	6	0.323	1.32	0	VOLTOYA	4	0.327	1.33	0.13
					TOTAL	176	0.325	1.33	0.07

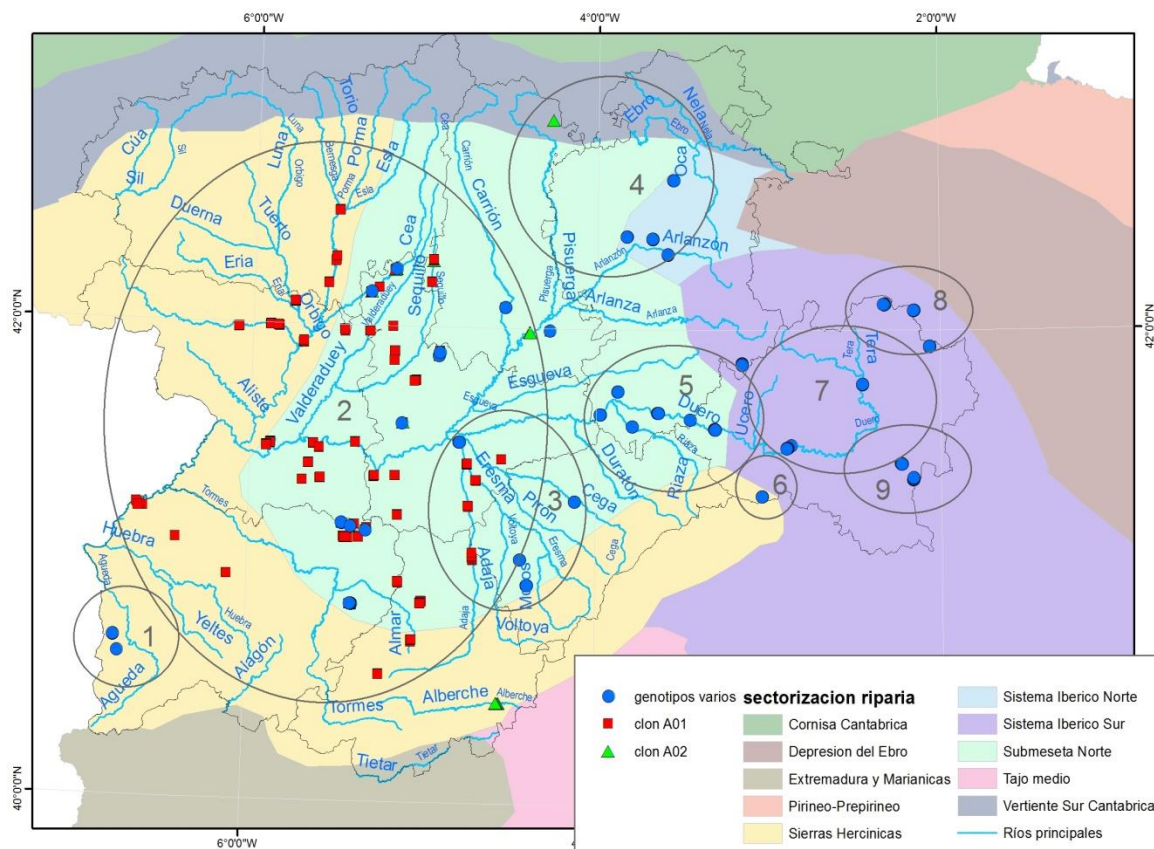


Figura 6. Localización de las poblaciones de *P. alba* recolectadas para el campo de plantas madre. Se diferencian los clones A01 y A02 del resto de genotipos identificados. Se representa con círculos numerados los grupos genéticos preestablecidos para recomendaciones de uso.

Se identificaron dos grupos genéticos ($K=2$) bien diferenciados, uno al este de la región, donde el clon A01 tiene escasa o nula presencia, y otro más al oeste donde, salvo alguna excepción en los ríos Águeda y Almar en Salamanca, todas las muestras pertenecen a dicho “clon del oeste” (A01). Entre ambos grupos existe una zona de transición donde el clon A01 aparece con otros genotipos (Figura 7). El test de Mantel ($R_{xy}=0,411$; $p=0.010$) no rechaza la ausencia de correlación entre la distancia geográfica y genética, incluso si eliminamos del análisis las poblaciones del clon A01 ($R_{xy}=0,503$; $p=0.010$).

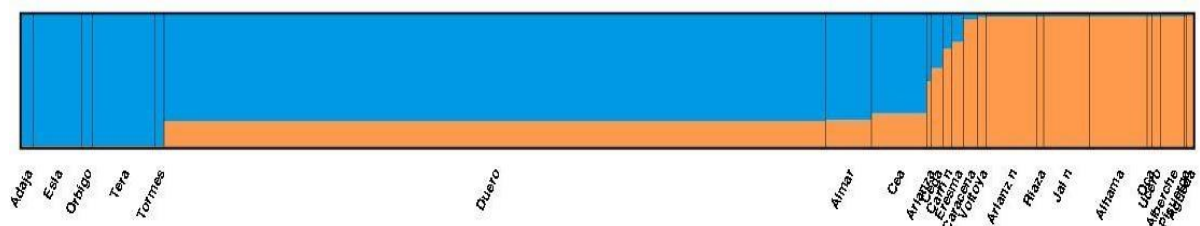


Figura 7. Representación gráfica del agrupamiento por subcuencas para una k óptima igual a 2.

El valor medio del índice de fijación resultó bastante elevado ($F_{st}=0.312$), siendo las subcuencas del Alberche, Pisuegra, Águeda, Voltoya, Jalón y Caracena las que presentaron los valores más altos con respecto a la mayoría de las cuencas enfrentadas. Este coeficiente de subestructuración poblacional puede emplearse en combinación con la distancia genética para

realizar recomendaciones específicas de uso entre subcuencas, según proximidad genética y geográfica de sus poblaciones. De esta manera se pueden definir, de manera análoga al caso de *P. nigra*, grupos genéticos que orienten la utilización del material forestal (Figura 7).

Tras el análisis genético de los ejemplares establecidos en el campo de plantas madre, y que solamente recoge aún una parte de todas las poblaciones prospectadas en Castilla y León, se identificaron 35 genotipos diferentes, con un valor medio de heterocigosidad $H_e=0.485$, y que oscilaba entre el mínimo $H_e=0.304$ del grupo genético del suroeste de Salamanca (identificado como nº 1 en la Figura 7), y el máximo $H_e=0.692$ del grupo genético nº 4, en la provincia de Burgos. De manera análoga a las poblaciones naturales, los grupos procedentes del este de la comunidad presentaban mayores niveles de diversidad genética.

Populus tremula

Los análisis genéticos realizados en las muestras recolectadas detectaron 85 clones distintos de *P. tremula*. Las poblaciones se distribuyen en rodales no excesivamente extensos y en los que se identificaron generalmente de 1 a 3 clones, llegando hasta los 8 en algún caso. Los clones son prácticamente exclusivos de cada rodal, salvo algún genotipo que aparece ampliamente representado en numerosas poblaciones muestreadas de la provincia de Ávila.

La diversidad genética resultó muy variable entre poblaciones, siendo en general baja dentro de cada población. Las subcuencas de los ríos Luna, Razón, Sil y Tera fueron las que presentaron los valores más bajos de heterocigosidad (Tabla 5).

Tabla 5. Diversidad genética por subcuenca de *Populus tremula*. n: número de individuos; H_e : diversidad genética, corregida por el tamaño muestral; A: Riqueza alélica y A^p : número de alelos únicos. Resaltado en negrita aquellos valores de cada parámetro superiores al promedio de toda la región.

subcuenca	n	H_e	A	A^p	subcuenca	n	H_e	A	A^p
ADAJA	77	0.495	2.07	0.07	OCA	10	0.437	1.87	0.10
ALBERCHE	48	0.554	2.21	0.04	PISUERGA	19	0.600	2.40	0.22
ALMAR	16	0.544	2.21	0.13	RAZON	10	0.075	1.13	0.00
ARLANZA	6	0.483	2.00	0.13	RIAZA	9	0.479	1.91	0.29
ARLANZON	2	0.714	2.71	0.32	RUDRON	7	0.573	2.15	0.15
BOEZA	3	0.746	1.92	0.14	SIL	7	0.154	1.27	0
CARRION	3	0.448	1.91	0.21	TERA	5	0.381	1.81	0.05
DUERO	26	0.746	2.81	0.63	TORMES	24	0.624	2.40	0.07
ERESMA	22	0.575	2.28	0.04	TUERTO	11	0.486	2.08	0.04
LUNA	4	0.327	1.56	0.11	YUSO	26	0.629	2.45	0.20
					TOTAL	335	0.444	1.96	0.11

Populus x canescens

La asignación basada en criterios morfológicos tuvo en *P. x canescens* la mayor tasa de error y tan sólo 91 de las muestras analizadas, repartidas en 27 poblaciones distintas, resultaron ser *P. x canescens* según el programa STRUCTURE. Cerca del 80% de las muestras preasignadas por su aspecto a este híbrido resultaron ser en realidad *P. alba*, con 20 parcelas en las que no se detectó ni un sólo ejemplar de este taxón a pesar de ser la especie esperada. Por el contrario, algunas parcelas muestreadas como *P. alba* o *P. tremula* resultaron ser *P. x canescens* (10% de las muestras en cada caso). Cabe la posibilidad, no obstante, de que algunos ejemplares con fenotipos intermedios pero asignación genética a alguna de las especies parentales sean retrocruzamientos de varias generaciones, situación que podría resolverse con información genética de mayor profundidad. Excepto en las provincias de Burgos y Soria se detectó un único genotipo por población, cohabitando en ocasiones con ejemplares de *P. tremula*, y sobre todo de *P. alba*.

El valor medio de diversidad genética encontrado en la región ($H_e=0.50$) supera el obtenido en ambos parentales.

5. Discusión

Populus nigra

La diversidad genética de las poblaciones de *P. nigra* es inferior a la obtenida en otros trabajos en la península ibérica ($H_e=0.65$, PRADA et al, 2013) y europeos ($H_e=0.76$; heterocigosidad promedio de 16 poblaciones de *P. nigra* distribuidas por Europa entre las que se encuentran dos poblaciones de la cuenca del río Ebro, SMULDERS et al, 2008).

El gran número de genotipos distintos detectados en los análisis, y la baja diferenciación entre poblaciones, puede obedecer a una masiva propagación sexual, con un escaso número de clones que se repiten o comparten por población, lo que es indicador de un elevado flujo genético. Por otra parte, la amplia y aleatoria distribución de algunos clones, como es el caso del N01, con unos elevados niveles de homocigosis para los marcadores moleculares utilizados, pudieran tener una explicación antrópica. Sería recomendable mantener un principio de precaución evitando extraer material vegetativo de las poblaciones en las que se ha detectado de forma predominante. Por otra parte, la utilización de material local en algunas subcuencas (por ejemplo Porma y Luna), podría ser conflictiva dada la baja diversidad genética y la masiva presencia del clon N01 antes citado. Por ello, los movimientos del material de reproducción deberían atender a criterios de diversidad genética y diferenciación entre subcuencas, recomendando emplear el grupo genético más próximo a la zona de revegetación, o combinándolo con otro, u otros, con los que presente proximidad genética y geográfica. También se desaconseja emplear en restauraciones riparias el chopo Lombardo, procedente de Italia y ampliamente utilizado y extendido por todo el mundo. Este clon macho y de porte característico ha sido localizado en varias parcelas muestreadas mezclado con poblaciones naturales.

Populus alba

La especie *Populus alba* presenta en la región un valor de diversidad algo inferior al de otros estudios en la misma zona ($H_e = 0,46$, SANTOS-DEL-BLANCO et al, 2013, $H_e = 0.405$, MACAYA-SANZ et al, 2016) y otras zonas europeas, $H_e=0.45$ en Austria (LEXER et al, 2005) y $H_e=0.61$ en Italia (BRUNDU et al, 2008). En un estudio en el que se analizaron numerosas poblaciones de Comunidad Valenciana, Aragón, Cataluña y Castilla y León (PRADA et al, 2013),

se obtuvo un valor mucho más elevado ($H_e=0.57$) si bien muy heterogéneo en diversidad y composición entre zonas.

La correlación significativa entre la distancia genética y geográfica refleja el patrón de dispersión de la especie, asociado a su carácter pionero y colonizador (ORIA DE RUEDA, 2002).

De acuerdo a los resultados obtenidos, es preciso manejar con cuidado los materiales de reproducción de esta especie, teniendo en cuenta la correcta proporción de sexos. El reducido número de genotipos, en comparación al resto de taxones, su agrupación espacial, y la masiva distribución del clon A01, condicionará la recogida, propagación y movimiento del material vegetal. La introducción en la parte occidental de la región de clones provenientes de poblaciones adyacentes, con valores de diferenciación genética bajos, incrementaría la variabilidad genética de las poblaciones. La propagación vegetativa debería garantizar, en cualquier caso, el empleo de suficientes genotipos diferentes, no emparentados, y con proporción equilibrada de sexos, en la medida de lo posible. Se recomienda emplear clones del *pool* genético local siempre que se garantice suficiente diversidad genética; pero si la subcuenca de utilización presenta bajos niveles de diversidad, tal y como se ha detectado en el presente trabajo, sería preferible recurrir a grupos genéticos de cuencas próximas genéticamente.

Se debería profundizar en las razones de la masiva distribución del clon A01. Las causas antrópicas se consideran poco probables dada la extensión y la ausencia de otros clones. Además, clones de amplia distribución en esta misma zona han sido datados en varios miles de años (MACAYA-SANZ et al, 2016) lo que haría poco probable la exclusiva influencia humana en la dispersión de estos materiales mediante propagación vegetativa. Una posible hipótesis estaría en una reciente colonización postglacial según una ruta este-oeste y otros procesos de origen natural asociados a la historia evolutiva de la especie en la región (MACAYA-SANZ et al, 2016; SANTOS-DEL-BLANCO et al, 2013). En cualquier caso, sería interesante analizar su naturaleza genética (posible triploidía o trisomía) y su aparente buena adaptabilidad en la región.

Populus tremula

La diversidad genética resultó muy variable entre poblaciones aun cuando éstas se localizaban relativamente próximas entre sí, lo que ya había sido constatado en trabajos previos (SIERRA DE GRADO et al, 2002) así como el hecho de que los bosquetes no compartieran los mismos genotipos. Probablemente la gran capacidad colonizadora de la especie por la vía sexual, y su posterior reproducción vegetativa masiva por rebrotes de raíz, provoca el avance de la masa y configura bosquetes homogéneos, pero diferentes entre sí. La diversidad genética de las zonas muestreadas es algo inferior a la encontrada en diferentes poblaciones de álamo temblón distribuidas por Europa ($H_e=0.52$; DE-CARVALHO et al, 2010), pero similar a otros trabajos en España (GÓMEZ et al, 2003).

La elevada tasa de monoclonalidad de las poblaciones analizadas puede deberse al escaso número de muestras por parcela (se priorizaba ampliar las zonas de muestreo) y a la alta capacidad de la especie para propagarse vegetativamente. Así, estudios en la provincia de Palencia, donde se analizaron con isoenzimas un mayor número de ejemplares, obtuvieron numerosos genotipos por población (CRISTÓBAL et al, 2014; LÓPEZ-DE-HEREDIA et al, 2004). Por el contrario, sí parece existir una gran variación entre poblaciones, por lo que se mantiene la recomendación general de recolectar material de varias poblaciones próximas para aumentar la variabilidad genética. En el caso de propagación vegetativa, se debería asegurar la recolección en individuos de ambos sexos para favorecer una reproducción sexual en las poblaciones futuras, así como intentar capturar el máximo número de genotipos tomando el material vegetal distanciado entre sí a falta de información genética. Por otra parte, avanzar en el conocimiento de la diversidad intrapoblacional de esta especie orientaría en mayor medida su conservación.

Populus x canescens

La alta tasa de error en la clasificación taxonómica de *P. x canescens* pone de manifiesto la complejidad, en ciertas ocasiones, en la asignación de especies aplicando únicamente criterios morfológicos. Los marcadores moleculares han demostrado ser una potente herramienta para la discriminación de taxones, especialmente en el caso de híbridos. También permiten cuantificar el grado de introgresión genética de poblaciones y retrocruzamientos entre parentales. Así, en MACAYA-SANZ et al (2016), ejemplares de *P. x canescens* de la cuenca del Duero analizados con microsatélites resultaron ser híbridos de primera generación (F1) y retrocruzamientos con *P. alba*. En este mismo trabajo detectaron principalmente una hibridación unidireccional de *P. tremula* (como macho) en *P. alba* (como hembra).

El valor de heterocigosidad medio resultante de los análisis genéticos es algo inferior al obtenido por SANTOS-DEL-BLANCO et al (2013) en la misma zona de estudio aunque con menos poblaciones muestreadas, y está por encima de los observados en otros estudios realizados en el Danubio (Austria), con $H_e=0.42$ y 0.43 , VAN-LOO et al, 2008 y LEXER et al, 2005 respectivamente.

El taxón híbrido *P. x canescens* es sumamente interesante desde el punto de vista de su estudio y conservación, especialmente en un contexto de cambio climático, ya que supone un ejemplo de adaptación y de superación de barreras ecológicas entre especies (LEXER et al, 2005, 2007). Como en el resto de *Populus*, se recomienda prestar especial atención a las cuencas que cuentan con las poblaciones más diversas y las que tienen valores altos de riqueza alélica y de alelos privados, como son las subcuencas de los ríos Bibey, Arlanzón o Ucero.

6. Conclusiones

La información genética recopilada en este trabajo aumenta el conocimiento para la conservación de las poblaciones de *Populus* de Castilla y León, así como orienta la recolección de material vegetal para su utilización en revegetaciones, tanto *in situ* por estaquillado directo como a través de planta producida en vivero. Dicha información permite hacer recomendaciones de uso según similitud entre subcuencas, asegurando variabilidad genética. Esto es especialmente importante en aquellos casos donde se ha detectado escasa diversidad genética o presencia masiva de algún clon distribuido a grandes distancias.

La asignación taxonómica de estas especies con criterios exclusivamente morfológicos se ha demostrado como método poco eficiente, especialmente en el complejo *alba-canescens-tremula*. Sin embargo, el empleo de marcadores microsatélites ha permitido detectar poblaciones mal identificadas, hibridadas, o con escasa variabilidad, lo que permite orientar la conservación de estos recursos genéticos.

La propagación vegetativa, como método de producción eficaz en estos taxones, debe asegurar en todo caso variabilidad genética, empleando el material vegetal adecuado a la zona de utilización y siguiendo el protocolo y el sistema de control establecido a tal efecto. A la vista de la poca diversidad genética que presentan algunas poblaciones de acuerdo a los resultados del presente trabajo, puede que la práctica de estaquillado directo favorezca la propagación de uno o pocos genotipos en algunas cuencas concretas, debiéndose valorar en estos casos la posibilidad de utilizar material procedente de campos de plantas madre que representen adecuadamente la variabilidad requerida de las masas naturales.

Los campos de plantas madre establecidos permiten suministrar un material vegetal de diversidad conocida, a la vez que sirven de colecciones de conservación *ex situ* de las poblaciones prospectadas, por lo que es importante seguir incrementando su número de genotipos y aumentar así la diversidad de la mezcla de clones a emplear en cada caso concreto.

Se debería avanzar en las recomendaciones de uso de estos materiales para la restauración y conservación de poblaciones riparias, muy especialmente en aquellas subcuencas muy degradadas donde no exista posibilidad de recoger material en cantidad ni diversidad suficiente, o en aquellas dominadas solamente por unos pocos clones, de origen antrópico o natural. Así mismo, sería deseable profundizar en el estudio de las posibles introgresiones genéticas de chopos productivos y ornamentales en las poblaciones naturales.

7. Agradecimientos

Los autores desean agradecer a todos los compañeros que han colaborado en las diferentes fases del proyecto, y muy especialmente a Miguel Reinares, Jose M^o Gonzalez, Ángel Iglesias, Javier González, José Ceballos, Marino Saiz, Mar Lejárraga, Oscar Cisneros, Javier Ligos, Pablo Galende, Pablo Calderón, José Antonio Peral, Virginia Escudero y Luis Carlos Jovellar, así como al personal del Vivero Forestal Central de la Junta de Castilla y León. Charo Sierra y Arancha Prada mejoraron el texto con sus aportaciones. Especial reconocimiento a la labor de Ana Isabel de Lucas que desarrolló la mayor parte de los trabajos de laboratorio y participó activamente en la interpretación de los resultados.

La parte inicial de los trabajos descritos estaban incluidos en el proyecto *Actuaciones de Conservación de los recursos genéticos forestales en RN2000 Castilla y León*, financiado con fondos FEDER, con acuerdo de colaboración entre el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente y la Junta de Castilla y León.

8. Bibliografía

ALÍA, R.; GARCÍA DEL BARRIO, J. M.; IGLESIAS, S.; MANCHA, J. A.; DE MIGUEL, J.; NICOLÁS, J. L.; PÉREZ, F.; SANCHEZ DE RON, D. (2009). Regiones de procedencia de especies forestales en España. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. Organismo Autónomo Parques Nacionales. pp 363. Madrid.

BRUNDU, G., LUPI, R.; ZAPELLI, I.; FOSSATI, T.; PATRIGNANI, G.; CAMARDA, I.; SALA, F.; CASTIGLIONE, S. (2008). The origin of clonal diversity and structure of *Populus alba* in Sardinia: evidence from nuclear and plastid microsatellite markers. *Ann. Bot.*, 102(6), 997–1006.

CRISTÓBAL, D.; MARTÍNEZ-ZURIMENDI, P.; VILLAMEDIANA, I.; CIRIZA, J.; VILLAR, J.; NANOS, N.; SIERRA-DE-GRADO, R. (2014). Clonal structure and dynamics of peripheral *Populus tremula* L. populations. *IFOREST.*, 7(3), 140.

DE CARVALHO, D.; INGVARSSON, P. K.; JOSEPH, J.; SUTER, L.; SEDIVY, C.; MACAYA SANZ, D.; COTTRELL, J.; HEINZE, B.; SCHANZER, I.; LEXER, C. (2010). Admixture facilitates adaptation from standing variation in the European aspen (*Populus tremula* L.), a widespread forest tree. *Mol. Ecol.*, 19(8), 1638–1650.

DOYLE, J.J.; & DOYLE, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.

GARCÍA DEL BARRIO, J. M.; DE MIGUEL, J.; ALÍA, R.; IGLESIAS, S. (2001). Regiones de Identificación y Utilización de material forestal de reproducción. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.

GARILLETI, R.; CALLEJA, J. A.; LARA, F. (2012). Vegetación ribereña de los ríos y ramblas de la España meridional (península y archipiélagos). Ministerio de Agricultura,

Alimentación y Medio Ambiente. Madrid.

GÓMEZ, A.; MANZANERA, J. A.; AGUIRIANO, E.; GRAU, J. M.; BUENO, M. A. (2003). SSR markers for monitoring an in vitro core collection of *Populus tremula*. *Silvae Genet.*, 52(5-6), 224-228.

HARDY O.J.; VEKEMANS, X. (2002). SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol.*, 2: 618-620.

KALINOSKY, ST. (2005). HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol. Ecol.*, 5: 187-189.

LARA, F.; GARILLETI, R.; CALLEJA, J. A. (2004). La vegetación de ribera de la mitad norte española. Centro de Estudios de Técnicas Aplicadas del CEDEX.

LEXER, C.; FAY, M. F.; JOSEPH, J.A.; NICA, M.-S.; HEINZE, B. (2005). Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. *Mol. Ecol.*, 14(4), 1045-1057.

LEXER, C.; BUERKLE, C.A.; JOSEPH J.A.; HEINZE, B.; FAY, M. (2007). Admixture in European *Populus* hybrid zones makes feasible the mapping of loci that contribute to reproductive isolation and trait differences. *Hered.*, 98, 74-84.

LOPEZ-DE-HEREDIA, U.; SIERRA-DE-GRADO, R.; CRISTÓBAL, M.D.; MARTÍNEZ-ZURIMENDI, P.; PANDO, V.; MARTÍN, M.T. (2004). A comparison of isozyme and morphological markers to assess the within population variation in small populations of European aspen (*Populus tremula* L.) in Spain. *Silvae Genet.*, 53, 227-233.

MACAYA-SANZ, D.; HEUERTZ, M.; LÓPEZ-DE-HEREDIA, U.; DE-LUCAS, A. I.; HIDALGO, E.; MAESTRO, C.; PRADA, A.; ALÍA, R.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C. (2012). The Atlantic-Mediterranean watershed, river basins and glacial history shape the genetic structure of Iberian poplars. *Mol. Ecol.*, 21(14), 3593-3609.

MACAYA-SANZ, D.; HEUERTZ, M.; LINDTKE, D.; VENDRAMIN, G.; LEXER, C.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C. (2016). Causes and consequences of large clonal assemblies in a poplar hybrid zone. *Mol. Ecol.*, 25(21), 5330-5344.

MANTEL, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*, 27(2 Part 1), 209-220.

NEI, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genet.*, 89: 583-590.

ORIA DE RUEDA, J. A. (2002). Guía de árboles y arbustos de Castilla y León. Cálamo, Palencia, 381.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. (2012) GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinf.*, 28: 2537-2539.

PRADA, A.; ARIZPE, D. (2008). Manual de propagación de árboles y arbustos de ribera. Una Ayuda Para La Restauración de Riberas En La Región Mediterránea. Generalitat Valenciana, Valencia.

PRADA, A.; CUBERO, D.; RUEDA, J.; MAGDALENO, F.; PÉREZ, F.; MARTÍNEZ, R.; BELLERA, M.; NICOLÁS, J.; APARICIO, M.; TRANQUE, J.; HERRERO, A.; MARTÍNEZ, S.; MARTÍN, E.

(2012). Guía técnica para la gestión de materiales forestales de reproducción en la revegetación de riberas. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

PRADA, A.; HIDALGO, E.; TRANQUE, F. J.; BELLERA, M. C.; CUBERO, D. (2013). La diversidad genética en el manejo de *Populus* spp.: lo esencial es invisible a los ojos. 6° Congreso Forestal Español.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genet.*, 155, 945–959.

SANTOS-DEL-BLANCO, L.; DE-LUCAS, A. I.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; SIERRA-DE-GRADO, R.; HIDALGO, E. (2013). Extensive Clonal Assemblies in *Populus alba* and *Populus x canescens* from the Iberian Peninsula. *Tree Genet. Genomes*, 9(2), 499–510.

SIERRA DE GRADO, R.; ZURIMENDI, P. M.; DE HEREDIA, U. L. (2002). Reproducción sexual y diversidad genética de *Populus tremula*. En Sierra de Grado R (coord.). El álamo temblón (*Populus tremula* L.). Bases para su cultivo, gestión y conservación. Mundi-Prensa, Madrid.

SMULDERS, M. J. M.; COTTRELL, J. E.; LEFÈVRE, F.; VAN DER SCHOOT, J.; ARENS, P.; VOSMAN, B.; TABBENER, H. E.; GRASSI, F.; FOSSATI, T.; CASTIGLIONE, S. (2008). Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: consequences for conservation and restoration. *For. Ecol. Manage.*, 255(5–6), 1388–1399.

TORRES, A. M.; WEEDEN, N. F.; MARTIN, A. (1993). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.*, 85(8), 937–945.

TRANQUE, F.J.; DE LUCAS, A.I.; HIDALGO, E. (2018). Diversidad genética de las poblaciones del género *Populus* en Castilla y León y su aplicación en las recomendaciones de uso. En II Simposio del chopo (pp 157-172).

VAN LOO, M.; JOSEPH, J. A.; HEINZE, B.; FAY, M. F.; LEXER, C. (2008). Clonality and spatial genetic structure in *Populus x canescens* and its sympatric backcross parent *P. alba* in a Central European hybrid zone. *New Phytol.*, 177(2), 506–516.

WEIR BS.; COCHERHAM CC. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evol.*, 38: 1358-1370.