



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-006

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

El uso de variación genética neutral y adaptativa en conservación: el pino negral como caso de estudio

RODRÍGUEZ-QUILÓN, I.¹, SANTOS-DEL-BLANCO, L.², SERRA-VARELA, M.J.^{1,2}, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.^{1,2,3}, ALÍA MIRANDA, R.^{1,3}

¹ Departamento de Ecología y Genética Forestal, Centro de Investigación Forestal, INIA-CIFOR, Carretera A Coruña km 7.5, 28040 Madrid.

² Instituto de Investigación en Gestión forestal Sostenible Uva-INIA, Avda. Madrid, Palencia.

³ BIOGECO, INRA, Univ. Bordeaux, 33610 Cestas, Francia

Resumen

Conservar la diversidad genética intraespecífica es fundamental para la sostenibilidad a largo plazo de nuestros bosques. Utilizamos el pino negral (*Pinus pinaster* Ait.) como caso de estudio para la definición de unidades de conservación en base a datos genéticos. Mediante marcadores moleculares identificamos seis grupos genéticos neutrales asociados a historias evolutivas contrastantes. Además, evaluamos la variación fenotípica de supervivencia y altura y su control genético utilizando un jardín común replicado en ambientes contrastantes (16.544 árboles). Encontramos altos niveles de diferenciación genética cuantitativa entre poblaciones dentro de los grupos neutrales definidos previamente. El posterior análisis clúster de distribuciones de los caracteres estudiados nos permitió identificar diez grupos de poblaciones genéticamente homogéneos y con un elevado potencial evolutivo. Estos grupos constituyen el mínimo a considerar en un programa de conservación dinámico del pino negral. Nuestros resultados confirman que para la identificación de unidades de conservación se deben tener en cuenta los componentes neutrales y adaptativos de la diversidad genética. El enfoque basado en la zonación ambiental utilizado en el programa de conservación genética paneuropeo de árboles forestales (www.euforgen.org) se podría mejorar mediante la integración de información molecular y de caracteres cuantitativos, a medida que los datos vayan estando disponibles.

Palabras clave

Pinus pinaster, genética de la conservación, conservación dinámica, marcadores moleculares, diferenciación genética cuantitativa.

1. Introducción

El cambio climático y ambiental causado por el hombre es ampliamente reconocido como una amenaza para la diversidad global. Cómo poder asegurar la permanencia de las especies bajo un escenario de rápidos cambios ambientales sigue siendo un gran reto para la biología de la conservación (SGRÒ et al., 2011). Los ecosistemas forestales mediterráneos son particularmente sensibles a tales cambios, especialmente los árboles, sus especies clave (FADY et al., 2015). De hecho, las últimas predicciones vaticinan un cambio en su distribución debido al cambio climático (AITKEN et al., 2008). Sin embargo, las rutas exactas que seguirán, así como las respuestas a nivel microevolutivo siguen siendo altamente impredecibles, dados los múltiples factores que las influyen, la incertidumbre sobre los escenarios de cambio climático, los largos tiempos de regeneración y la heterogeneidad espacial y temporal de sus rangos de distribución (ALÍA et al., 2014; FADY et al., 2015). Incendios forestales recurrentes, cambios en el uso del suelo y nuevos riesgos bióticos se suman a las amenazas derivadas directamente del calentamiento global, como el estrés por sequía y aumento de temperaturas. Como respuesta, los árboles pueden adaptarse, migrar o extinguirse (AITKEN et al., 2008). Pero todavía carecemos de datos que integren esos múltiples enfoques con el objetivo de evaluar las consecuencias evolutivas de los cambios ambientales globales y su impacto

en la variación genética, plasticidad fenotípica y la adaptabilidad de las poblaciones de árboles (ALBERTO et al., 2013), siendo éstas consideraciones esenciales para diseñar e implementar estrategias de conservación.

El mantenimiento de la diversidad de especies y sus hábitats ha sido, hasta el momento, el principal objetivo de las políticas de conservación, mientras que la diversidad genética dentro de especies no ha sido considerado (FRANKHAM, 2010). Al mismo tiempo, la conservación de poblaciones particulares dentro de especies, ha sido una tarea central en el Programa Europeo de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (EUFORGEN, www.euforgen.org), dado que las especies de árboles de distribución más amplia no están amenazadas a nivel específico, pero a menudo incluyen poblaciones en peligro. El reducido nivel de domesticación y la existencia común de adaptación local en árboles (ALBERTO et al., 2013) han promovido estrategias de conservación dinámica in situ (KOSKELA et al., 2013; LEFÈVRE et al., 2013a). La conservación dinámica tiene el objetivo de mantener los procesos evolutivos y potencial adaptativo tanto en poblaciones naturales como en rodales artificiales, para mantener su sostenibilidad a largo plazo (NAMKOONG, 1997). Desde que se aplicó por primera vez en árboles (LEDIG, 1986), ha seguido siendo implementado y traducido a estrategias de manejo para la conservación (KOSKELA et al., 2013; LEFÈVRE et al., 2013a). Sin embargo, a pesar de las significativas mejoras de las últimas décadas, quedan todavía cuestiones que necesitan ser atendidas, tales como cómo llevar a cabo la selección de unidades objetivo (*target units*) para la conservación, así como su número, cómo evaluar su viabilidad y cómo gestionárselas.

La importancia de la diversidad genética forestal para la sostenibilidad de los bosques está ampliamente reconocida, pero sin embargo también es comúnmente ignorada cuando se desarrollan indicadores y referencias para el manejo forestal bajo el cambio climático (SGRÒ et al., 2011; FADY et al., 2015). Un punto de partida razonable es considerar que una red de conservación debería abarcar toda la diversidad genética actual de una especie. A partir de ahí, se han usado dos principales enfoques para definir unidades de conservación en árboles: i) métodos basados en la contribución de poblaciones particulares a la diversidad genética neutral total o diferenciación de la especie (PETIT et al., 1998), y ii) métodos basados en información ecológica y geográfica (HAMANN et al., 2005; LEFÈVRE et al., 2013a). La actual red europea de unidades de conservación dinámica se basa en gran medida en este segundo enfoque (LEFÈVRE et al., 2013a), asumiendo que los principales tipos de clima en Europa están estrechamente relacionados con la diferenciación genética, incluyendo de forma indirecta procesos adaptativos bajo la hipótesis de adaptación local y variación clinal o ecotípica (ver revisión de ALBERTO et al., 2013). Los marcadores moleculares neutrales se consideran como un buen punto de partida para designar unidades de conservación (SAGNARD et al., 2002), ya que aportan información sobre divergencia evolutiva a escala histórica y procesos demográficos, aunque a menudo no son adecuados para cuantificar cambios genéticos en respuesta a presiones selectivas particulares (REED & FRANKHAM, 2001). Los patrones detectados en caracteres adaptativos de naturaleza cuantitativa normalmente difieren de aquellos revelados por loci neutros o bajo selección débil (SAGNARD et al., 2002; FRANKHAM, 2010). Sin embargo, la dificultad de medir la diversidad genética adaptativa ha dificultado su integración en la planificación y manejo para la conservación. Es urgente revertir esta situación, en especial para especies de árboles con distribuciones fragmentadas, con estructura histórica y patrones de adaptación local, para las que la diversidad intraespecífica cobra gran relevancia. Un enfoque combinado que incluya información molecular, cuantitativa y ecológica, aunque raramente utilizado, es fundamental y permitiría integrar los procesos evolutivos en la planificación de la conservación (SAGNARD et al., 2002; SGRÒ et al., 2011).

El pino negral es una especie de polinización cruzada, anemófila y de larga vida que tiene una gran relevancia tanto ecológica como económica, encontrándose en un amplio rango de altitudes, sustratos y regímenes climáticos. Ha sobrevivido a las glaciaciones en múltiples refugios (BUCCI et al., 2007), manteniendo una elevada diversidad genética a pesar de su distribución fragmentada, particularmente en el área mediterránea. Como resultado de su compleja historia evolutiva, tiene una fuerte estructura genética poblacional (SANTOS DEL BLANCO et al., 2012; JARAMILLO-CORREA et al., 2015) y muestra signos de adaptación local (e.g. diferencias genéticas entre poblaciones para caracteres adaptativos, ALÍA et al. 1997, SANTOS DEL BLANCO ET. AL 2012; o correlaciones entre frecuencias alélicas de polimorfismos en genes candidato para adaptación cliática variables ambientales JARAMILLO-CORREA et al. 2015). Todo ello le postulan con un interesante sujeto de estudio en el campo de la genética de conservación.

2. Objetivos

En este trabajo, utilizamos el pino negral (*Pinus pinaster* Ait.) como un caso de estudio para mostrar la utilidad de considerar simultáneamente la variación neutral y cuantitativa en la identificación de unidades de conservación dinámica es especies de árboles forestales. A partir del mismo, presentamos una metodología de toma de decisiones en cascada para la identificación de poblaciones para la conservación dinámica y sugerimos parámetros genéticos clave a considerar en futuros planes de conservación genética, basados tanto en marcadores moleculares como en caracteres cuantitativos.

3. Metodología

Se muestrearon semillas de polinización abierta de 35 poblaciones naturales a lo largo de todo el rango de distribución del pino negral. En cada población se muestrearon entre 30 y 40 árboles separados al menos 50 metros, y una sola semilla de cada árbol fue utilizada para su posterior multiplicación en vivero. Cada plántula (plantas madre) se multiplicó mediante estaquilla para obtener clones. Estos clones (media de 15 por población) se utilizaron para establecer un ensayo de ambiente común replicado en cuatro sitios con 16.544 árboles en 2010. Cada una de las cuatro réplicas comprendió 4.136 árboles, con 517 clones (genotipos) y ocho réplicas por clon en un diseño de bloques completos al azar. Los cuatro sitios de ensayo se ubicaron en sitios con condiciones ambientales muy contrastadas. Los ensayos de Asturias y Portugal estaban en la región atlántica, con una alta precipitación anual (1.160 y 950 mm respectivamente) y temperaturas suaves (11,3 y 14,2 °C respectivamente). Los ensayos en Madrid y Cáceres están situados en áreas continentales bajo influencia mediterránea (precipitación anual de 443 y 898 mm, y temperaturas medias de 13,7 y 15,5°C respectivamente), con oscilaciones estacionales de temperatura muy amplias y una marcada sequía estival.

Se recogieron acículas de los 517 genotipos a partir de las plantas madre. Se secaron con gel de sílice y fueron posteriormente utilizadas para la extracción de ADN. Cada muestra se genotipo para 12 marcadores microsatélite y 266 marcadores SNP. Los detalles sobre la extracción de ADN, amplificación y asignación de alelos se encuentran en SANTOS DEL BLANCO et al., (2012) y JARAMILLO-

CORREA et al., (2015). Ambos conjuntos de marcadores moleculares han demostrado ser mayoritariamente neutrales en estudios previos (JARAMILLO-CORREA et al., 2015). En este estudio, utilizamos ambos conjuntos de marcadores para evaluar la estructura poblacional usando el método de agrupación Bayesiana implementado en el programa STRUCTURE 2.3.4, ejecutando un modelo de mezcla (*admixture*) con frecuencia alélicas correlacionadas entre grupos. Se ejecutaron diez carreras independientes por cada número de grupos desde 1 hasta 10, con un periodo de precalentamiento de 10000 iteraciones y una longitud total de 1.000.000 de iteraciones. El número óptimo de grupos de poblaciones se calculó según EVANNO et al., (2005). Además, estudiamos la existencia de diferenciación genética neutra dentro de cada grupo siguiendo el mismo procedimiento. Estimamos la riqueza alélica, y el índice de diversidad genética insesgado de Nei (*H_e*; Nei 1978) para ambos tipos de marcadores usando el software SPAGeDi v1.4 (HARDY & VEKEMANS, 2002). También estimamos el F_{ST} para ambos marcadores y a distintos niveles jerárquicos (especie, entre y dentro de grupos poblacionales). Las distribuciones de F_{ST} se estimaron siguiendo el método de bootstrap paramétrico para permitir la comparación con valores de Q_{ST} .

Tres años después de implantar los ensayos de campo se registraron datos de supervivencia y altura. Las variables fenotípicas se analizaron mediante modelos mixtos Bayesianos en R (R, 2015). La altura se trató como una variable normal mientras que la supervivencia fue analizada con modelos binarios con función de enlace logit. Las variables población y clon se consideraron como aleatorias para así obtener su varianza asociada. De estos modelos se derivaron parámetros de genética cuantitativa (varianza clonal y poblacional) y estimadores de valores medios a nivel de genotipo y población. Seguidamente calculamos correlaciones entre sitios de ensayo a nivel de clon y población para estimar la interacción genotipo x ambiente (GxE). La heredabilidad en sentido amplio (H^2) de cada población para supervivencia y altura se calculó como el ratio entre la varianza clonal entre la varianza clonal más el error. Para la estimación de heredabilidad en sentido amplio de la supervivencia incluimos un término adicional en el denominador ($\pi^2/3$) para tener en cuenta la varianza implícita debida a la distribución logit. El índice de diferenciación genética cuantitativa entre poblaciones, Q_{ST} (SPITZE, 1993), se estimó como el ratio de la varianza entre poblaciones dividido entre la varianza entre poblaciones más dos veces la varianza dentro de poblaciones. Los modelos Bayesianos proporcionaron 1000 estimadores independientes de Q_{ST} . Para distinguir los efectos de la deriva genética de aquellos de la selección, las distribuciones de probabilidad de Q_{ST} se compararon con las de F_{ST} , usando un test no paramétrico. Tanto el Q_{ST} como el F_{ST} se calcularon a nivel de especie y dentro de grupo genético.

Consideramos los grupos de poblaciones derivados de los marcadores moleculares como un punto de partida en conservación, dado que reflejan la historia demográfica de las especies, Sin embargo, encontramos una alta diferenciación genética cuantitativa para caracteres adaptativos dentro de esos grupos (ver resultados). Por lo tanto, llevamos a cabo un subsiguiente análisis clúster jerárquico con los datos de caracteres cuantitativos: supervivencia y altura en cada uno de los cuatro sitios de ensayo. Utilizamos el paquete *pvclust* (SUZUKI & SHIMODAIRA, 2006) en R (R CORE TEAM, 2015), con una duración de carreras de 10.000 iteraciones usando el método aglomerativo medio y con la correlación como medida de distancia. Para cada uno de los grupos poblacionales identificados, calculamos la heredabilidad y evolvabilidad (ratio entre varianza clonal y media para cada carácter), dos parámetros clave relacionados con el potencial evolutivo. El tamaño efectivo poblacional de cada grupo se calculó con el método de exceso de heterocigotos de Pudovkin (PUDOVKIN et al., 2009), implementado en NeEstimator V2 (Do et al., 2014). Para conocer los niveles de consanguinidad, también calculamos un estimador multilocus de autopolinización con el software RMES (DAVID et al., 2007).

La estrategia de conservación genética de árboles a nivel europeo se basa principalmente en la clasificación climática de Europa (METZGER et al., 2005). Quisimos comprobar la utilidad de los límites climáticos a escala amplia como una aproximación de la diferenciación genética en el pino negral. Para ello, superpusimos la clasificación climática de Europa (METZGER et al., 2005), la distribución de los grupos poblacionales neutros de pino negral, la situación de las 42 unidades de conservación que existen en la actualidad (ver <http://portal.eufgis.org>) y los grupos poblacionales propuestos en este trabajo. Además, estudiamos la existencia de correlaciones entre altura y variables ambientales continuas.

4. Resultados

Tanto los marcadores microsatélite como los SNPs revelaron patrones de diferenciación genética similares a los ya descritos para la especie (BUCCI et al., 2007), permitiéndonos definir seis grupos poblacionales: Costa atlántica francesa, Costa atlántica ibérica, España central, sur de España, este del Mediterráneo y Marruecos. No hayamos señales de estructura dentro de esos grupos. La heterocigosidad esperada para cada los microsatélites y SNPs fue $0,65 \pm 0,01$ y $0,30 \pm 0,00$, respectivamente. La riqueza alélica varió entre 2,20 y 3,19 para los microsatélites y entre 1,39 y 1,63 para los SNPs en las poblaciones estudiadas, no hallándose diferencias significativas entre los grupos poblacionales. Las estimaciones de F_{ST} a nivel de especie fueron moderadas tanto para los microsatélites (0,099, CI: 0,085-0,117) como para los SNPs (0,130, CI: 0,118-0,142). El F_{ST} entre grupos de poblaciones explicó la mayor parte de la diferenciación neutra entre poblaciones (0,070 microsatélites y 0,116 SNPs). Como era esperable, detectamos un bajo nivel de diferenciación genética neutral entre poblaciones dentro de los grupos neutrales.

La supervivencia varió ente el 3y el 98% a lo largo de los cuatro sitios de ensayo (98% CI: 0,97-0,99 en Asturias, 66% CI: 0,60-0,70 en Portugal, 21% CI: 0,18-0,26 en Madrid, y 3% CI: 0,20-0,40 en Cáceres). La altura media por cada sitio fue desde los 27,7 cm (CI: 25,9-28,8) en el ambiente más favorable (Asturias) a los 17,0 (CI: 14,8-18,9) del menos favorable (Cáceres). Ambos caracteres pusieron de manifiesto unos niveles de estrés ambiental muy contrastados entre los sitios de ensayo. La variación fenotípica para la supervivencia estuvo influenciada de forma casi exclusiva por la variación ambiental, como se deriva de una baja diferenciación entre clones. La altura fue por lo tanto un carácter más adecuado que la supervivencia para el estudio de la diferenciación de poblaciones en nuestro trabajo. Identificamos fuertes correlaciones entre sitios para ambos caracteres en aquellos sitios de ensayo con características ambientales similares (e.g. correlación para altura en sitios de ensayo en condiciones atlánticas: $r = 0,49$, $p < 10^{-10}$, y bajo condiciones mediterráneas: $r = 0,24$, $p < 10^{-3}$). Globalmente, las correlaciones entre sitios fueron más fuertes para la altura, siendo todas las correlaciones significativamente diferentes de cero ($P < 0,01$).

La heredabilidad en sentido amplio (H^2) varió dependiendo del carácter y sitio de ensayo. La heredabilidad de la supervivencia fue muy baja, estando entre 0,02 (CI: 0,01-0,02) en Portugal y 0,05 (CI: 0,04-0,06) en Asturias. La heredabilidad de la altura fue sustancialmente mayor (rango 0,15-0,28), en especial en los ambientes más estresantes (e.g, 0,28 CI: 0,13-0,41 en Cáceres). Los grupos poblacionales neutros mediterráneos mostraron una mayor heredabilidad en comparación con los atlánticos. La diferenciación genética cuantitativa varió entre 0,11 (CI: 0,08-0,16) en

Asturias y 0,39 (CI: 0,30-0,48) en Madrid para la supervivencia, y entre 0,31 (CI: 0,23-0,50) en Portugal y 0,45 (CI: 0,31-0,58) en Asturias para la altura. En los cuatro sitios, las estimaciones de Q_{ST} fueron significativamente mayores a las de F_{ST} a nivel de especie (Figura 1). La diferenciación genética cuantitativa era aún alta dentro de los grupos poblacionales neutros sugiriendo la existencia de distintos grupos fenotípicos ($Q_{ST}=0,10$ a 0,87 para altura, Figura 1, y $Q_{ST}=0,01$ a 0,35 para supervivencia).

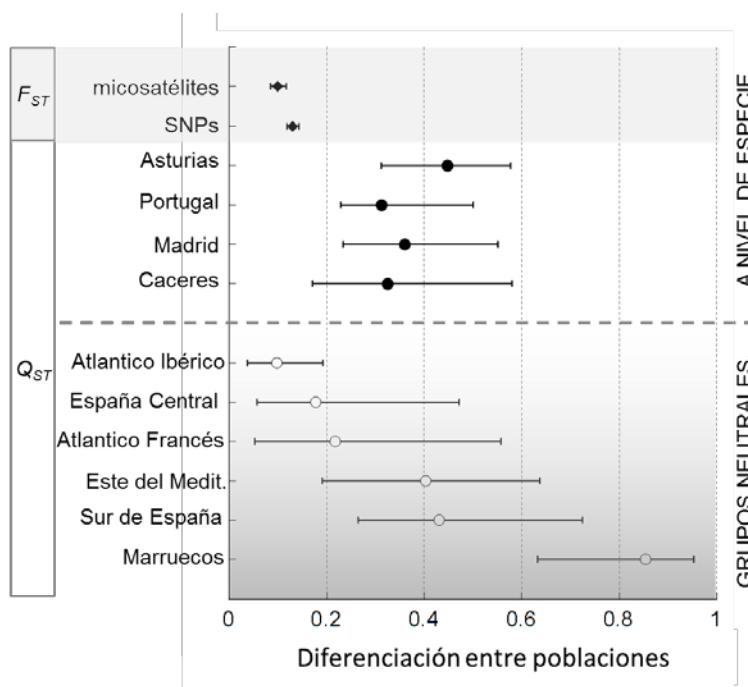


Figura 1. Diferenciación genética molecular (F_{ST}) y cuantitativa para altura (Q_{ST}) entre poblaciones de *Pinus pinaster* de todo el rango de distribución de la especie. Se dan los resultados a nivel de especie en los cuatro sitios de ensayo, así como dentro de grupos neutros para el ensayo de Asturias.

El análisis clúster jerárquico nos permitió hacer una segunda división de los grupos poblacionales neutros, basándonos en caracteres cuantitativos (Figura 2a). Entre las variables utilizadas en el análisis clúster, la altura medida en Asturias fue la de mayor relevancia. Se subdividieron los grupos poblacionales Atlántico francés y España central pero no Atlántico ibérico (Figura 2b, c, d). Los grupos poblacionales neutros restantes (Sur de España, Este del Mediterráneo y Marruecos) mostraron una diferenciación significativa para todas las poblaciones incluidas en el estudio. De acuerdo con esto, a partir de los seis grupos poblacionales neutros iniciales pasamos a proponer diez grupos de poblaciones relevantes para la conservación de la especie, considerados como un mínimo que debería ser tenido en cuenta en un programa preliminar de conservación genética de la especie. Todos los grupos de poblaciones relevantes para la conservación mostraron altos niveles de diversidad genética neutra tanto para microsatélites como para SNPs, reducidos niveles de consanguinidad y tamaños poblacionales grandes. También mostraron una alta evolvabilidad en los cuatro sitios de ensayo. Como era esperable, las estimaciones de Q_{ST} y F_{ST} fueron marcadamente inferiores dentro de los grupos de poblaciones relevantes para la conservación que dentro de los grupos neutros iniciales.

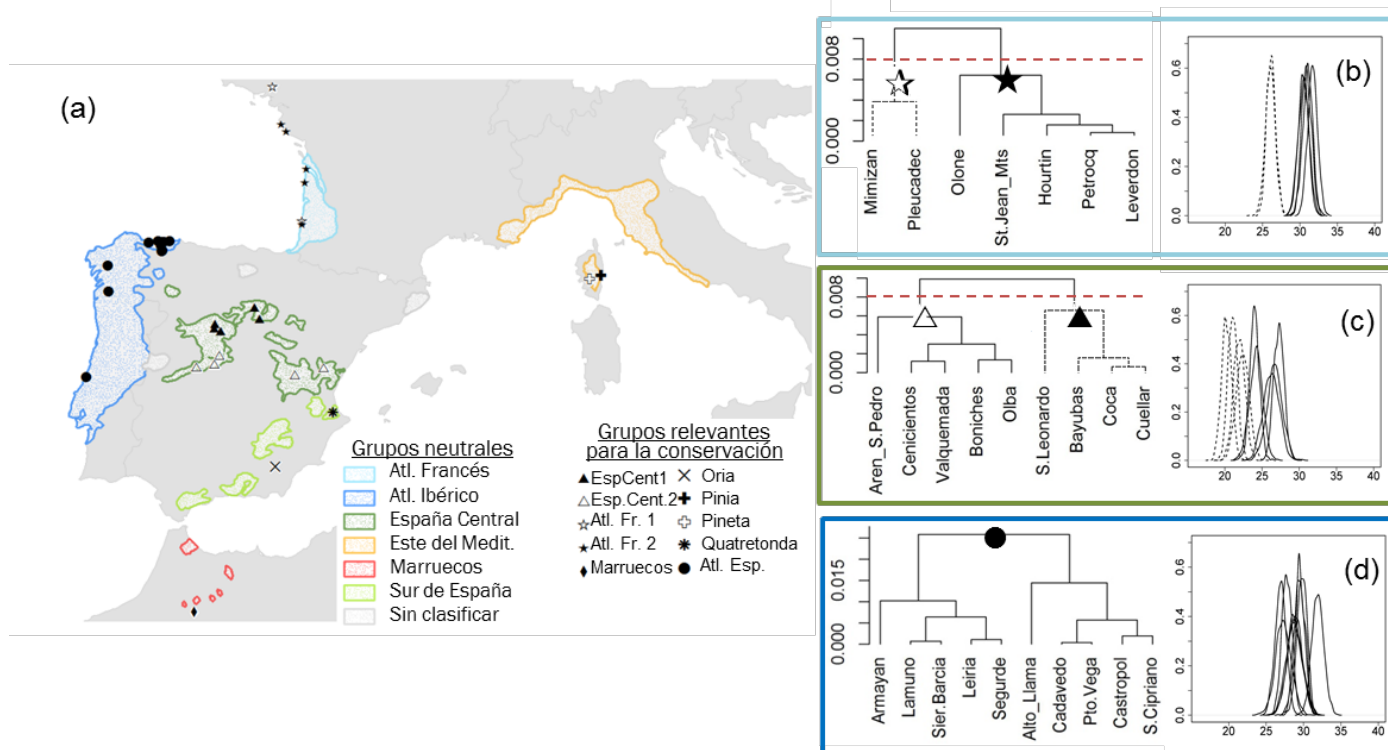


Figura 2. Propuesta de grupos de poblaciones relevantes para la conservación de *Pinus pinaster* en base a diferenciación genética y límites geográficos de los grupos neutrales (a). Agrupación basada en datos de altura y supervivencia tomados en cuatro ensayos de ambiente común en sitios de ambientes contrastados y distribuciones de altura en el sitio de ensayo de Asturias para grupos de poblaciones de la costa atlántica francesa (b), España central (c) y costa atlántica ibérica (d). Cada subfigura de la derecha muestra un dendrograma de cluster jerárquico en la izquierda y un gráfico con la función de distribución de Alturas a nivel de población a la derecha. Las poblaciones representadas con línea de puntos corresponden a grupos de conservación diferentes.

El rango de distribución del pino negral está comprendido dentro de seis zonas climáticas. La red de conservación genética existente en la actualidad comprende poblaciones de las seis zonas climáticas en las que se encuentra la especie, pero no siguen un patrón uniforme dentro de las mismas, existiendo huecos en la implementación de la estrategia europea. El clima mediterráneo norte está claramente sobrerrepresentado (el 52% de las unidades de conservación pertenece a este clima), mientras que el atlántico central, lusitano y mediterráneo sur están infrarrepresentados (7, 10 y 10% del total, respectivamente). Además, solo incluye poblaciones de cuatro de los seis grupos poblacionales neutros identificados para la especie, con el grupo del Este del Mediterráneo claramente sobrerrepresentado, mientras que las poblaciones de los grupos atlántico Ibérico o Marruecos no se consideran. De hecho, algunas poblaciones dentro de la misma zona climática pertenecen a grupos neutrales diferentes y al revés, ciertos grupos neutrales están distribuidos en diferentes zonas climáticas. Los límites climáticos tampoco fueron capaces de distinguir entre grupos genéticamente diferentes para caracteres adaptativos dentro de grupos neutrales. Sin embargo, sí encontramos correlaciones significativas entre altura y variables geográficas y ambientales en los sitios de ensayo en condiciones atlánticas (e.g. $r=0,55$, $p=6,2 \times 10^{-4}$ con precipitación anual en Asturias; $r=-0,37$, $p=2,9 \times 10^{-2}$, con temperatura media del mes más cálido en Portugal). No se hallaron correlaciones significativas en sitios de ensayo en condiciones mediterráneas (Madrid y Cáceres), con una supervivencia mucho menor.

5. Discusión

La mayor parte de los árboles europeos de amplia distribución, incluyendo el pino negral, están incluidos en la categoría de la IUCN “preocupación menor” o están todavía bajo evaluación (FARJON, 2013). Sin embargo, la necesidad de conservar la variación genética intraespecífica en árboles está ampliamente reconocida por la comunidad científica (Ledig 1986). Algunas poblaciones particulares de pino negral (e.g. Tramuntana en las islas Baleares o las de la subespecie *P. pinaster* ssp. *renoui* en el Norte de África) se encuentran amenazadas como resultado de la sobreexplotación y degradación de su hábitat. El análisis de la estructura genética poblacional gracias a los marcadores moleculares ha permitido la definición de seis grupos de poblaciones. Esto es consistente con la ampliamente conocida historia filogeográfica de la especie (SANTOS DEL BLANCO et al., 2012; JARAMILLO-CORREA et al., 2015). Encontramos altos niveles de variación genética a nivel de especie, grupo poblacional neutro y grupo de especies relevante para la conservación, lo que sugiere la existencia de suficiente potencial de cambio evolutivo como para afrontar nuevas presiones selectivas. Al mismo tiempo nuestras estimaciones de Q_{ST} consistentemente más altas que las de F_{ST} indican también la existencia de una selección divergente generalizada (Figura 1). Por lo tanto, caben esperar cambios evolutivos contrastados en diferentes partes del rango de distribución del pino negral, en particular bajo condiciones ambientales adversas. Todo esto pone de relieve la necesidad de seguir desarrollando estrategias de conservación genética a nivel intraespecífico para el pino negral, así como para la mayoría de especies de árboles de amplia distribución.

Treinta años después de la definición de unidades Evolutivamente Significativas por parte de RYDER (1986), todavía se está debatiendo sobre cómo se deberían definir y elegir las unidades de conservación, y la importancia relativa que habría que dar a los componentes neutro y adaptativo de la variación genética (FRASER & BERNATCHEZ, 2001). Nuestra propuesta es una metodología de decisión en cascada, usando límites climáticos cuando no se dispone de otra información, pero gradualmente incorporando datos de marcadores moleculares y fenotípicos a medida que estén disponibles. En la actualidad hay profundos estudios en los que se usan marcadores moleculares para muchas especies de árboles (e.g. *Eucalyptus*, *Pinus*, *Populus*, *Quercus*) (NEALE & KREMER, 2011). La mera incorporación de esa información en la planificación de la conservación representaría un avance significativo respecto al tradicional uso de las regiones de procedencia (ALÍA et al., 1996). Los marcadores moleculares son efectivos a la hora de definir grandes grupos de poblaciones con un limitado flujo genético entre ellos (FRASER & BERNATCHEZ, 2001). Sin embargo, son a menudo inadecuados para cuantificar la variación adaptativa o el potencial evolutivo (REED & FRANKHAM, 2001), dado que la capacidad de una especie para evolucionar está determinada principalmente por la variación genética cuantitativa (FRANKHAM, 2010).

Por lo tanto, en la medida en que haya datos disponibles, los caracteres fenotípicos deberían ser tenidos en cuenta en un segundo paso para poder diferenciar subgrupos de poblaciones bajo diferentes presiones selectivas. En la actualidad existe una gran cantidad de datos de caracteres cuantitativos obtenidos gracias a experimentos de ambiente común (ensayos de procedencia). Éstos están disponibles para la mayoría de especies de árboles relevantes desde un punto de vista económico y ecológico (PÂQUES et al., 2013). Esta información podría ser utilizada en un segundo paso para la identificación de poblaciones relevantes para la conservación, pero desconocemos la existencia de ningún programa de conservación que utilice esta información. Al mismo tiempo, la falta de información de este tipo podría dificultar la implementación a gran escala de la metodología propuesta para aquellas especies de menor valor económico y ecológico.

Una vez que los grupos de poblaciones relevantes para la conservación han sido definidos, se debe afrontar el complejo problema de evaluar hasta qué punto van a ser capaces de mantener el potencial evolutivo de la especie. Esto también puede ser afrontado mediante la integración de datos de marcadores moleculares y caracteres cuantitativos (LEFÈVRE et al., 2013b). Para el pino negral, los grupos propuestos en este trabajo albergan una alta diversidad genética, altos tamaños efectivos poblacionales y muy baja consanguinidad, sugiriendo una alta resiliencia a nuevas condiciones ambientales. La baja diferenciación cuantitativa entre poblaciones dentro de estos grupos facilita la subsiguiente selección de poblaciones dentro de los mismos como unidades de conservación, al tiempo que se mantiene la variación genética y el potencial evolutivo.

La cuenca Mediterránea está considerada como un punto caliente de biodiversidad y un objetivo principal en el que centrar esfuerzos de conservación (FADY-WELTERLEN, 2005). Sin embargo, (LEFÈVRE et al., 2013a) recientemente detectaron huecos en los esfuerzos de conservación genética de árboles forestales en las zonas climáticas mediterráneas. La estrategia europea de conservación de árboles forestales usa zonas climáticas (METZGER et al., 2005) como un indicador de la existencia de procesos adaptativos. Aun así, esta estrategia de uso de zonas climáticas tan amplias nos resulta cuestionable, incluso para aquellas especies para las que se conoce la existencia de clinas de variación fenotípica a lo largo de gradientes ambientales. Nuestros resultados corroboran la existencia de clinas de variación fenotípica a lo largo de gradientes de temperatura y precipitación (SANTOS DEL BLANCO et al., 2012; JARAMILLO-CORREA et al., 2015), y la importancia del papel del ambiente en la adaptación local del pino negral (SERRA-VARELA et al., 2015). Sin embargo, ni la variación neutral ni la adaptativa son capturadas por la zonificación climática de METZGER et al., (2005), probablemente por su amplia escala espacial o por una inadecuada selección de las variables clasificatorias en el caso del pino negral. Las clasificaciones ambientales a gran escala pueden suponer un buen punto de partida, pero deberían ser tomadas con precaución a la hora de definir prioridades de conservación, en particular cuando existe una gran cantidad de datos de carácter genético. Este es el caso de algunas de las principales especies de árboles forestales en Europa, incluyendo el pino silvestre, pino carrasco, fresno, haya, cerezo silvestre y picea entre otros (PÁQUES et al., 2013).

Los diez grupos de poblaciones relevantes para la conservación del pino negral definidos aquí (Figura 2) son el resultado de la integración de toda la información disponible hasta la fecha, pero constituyen un mínimo a ser considerado. La obtención de datos genéticos de regiones aún por explorar y la inclusión de un rango mayor de caracteres adaptativos, como por ejemplo la resistencia a plagas y enfermedades, germinación y capacidad de establecimiento de las plántulas y supervivencia de árboles adultos y reproducción, podrían incrementar el número de grupos de poblaciones a ser considerado para una efectiva conservación del pino negral. Aunque sería ideal contar con tantos caracteres fenotípicos como fuera posible, en esta especie la altura se ha mostrado como un carácter altamente integrador, estrechamente relacionado con resistencia a caracteres bióticos y abióticos (SANTOS DEL BLANCO et al., 2012; ALÍA et al., 2014; JARAMILLO-CORREA et al., 2015). Esto hace nuestra clasificación basada en datos de altura una aproximación fiable.

Los esfuerzos de conservación deberían además considerar el establecimiento de unidades de conservación en poblaciones que se encuentren en los límites de distribución o en condiciones ecológicas extremas (FADY et al., 2015). El rango de distribución del pino negral se ha dividido en regiones de procedencia (e.g. Alía et al. 1996 en España, CEMAGREF 2003 en Francia) que corresponden a áreas con condiciones ecológicas uniformes y fuentes semilleras con fenotipos o características genéticas putativamente (i.e. no comprobado experimentalmente) similares para objetivos de gestión forestal y repoblación. Estas regiones de procedencia pueden ser utilizadas para establecer límites geográficos para los grupos de poblaciones relevantes para la conservación. Esta estrategia funcionaría bien por ejemplo en España, donde se ha establecido un gran número de regiones de procedencia aisladas entre sí (ALÍA et al., 1996). Sin embargo, estudio también muestra

que las regiones de procedencia de Las Landas y Córcega (CEMAGREF 2003) deberían ser subdivididas con fines de conservación (Figura 2). Esto pone de manifiesto la necesidad de estandarizar los criterios de selección de las unidades de conservación en diferentes países.

6. Conclusiones

Este es el primer trabajo que considera de forma conjunta la información proveniente de marcadores moleculares, caracteres cuantitativos y variación ambiental para el estudio de la conservación de árboles. Sugerimos indicadores moleculares y cuantitativos clave a la hora de evaluar la diferenciación entre poblaciones e identificar grupos de poblaciones con el propósito de su conservación dinámica. Nuestros resultados muestran que la variación ambiental supone un buen primer punto de partida para estrategias de conservación genética in-situ, pero también que ni una estrategia basada puramente en datos climáticos ni tampoco una estrategia basada sólo en datos moleculares podrán capturar toda la variabilidad que debería ser tenida en cuenta en la planificación de la conservación.

Las estrategias de conservación actuales fallan a la hora de integrar la información genética disponible, a pesar de la identificación de poblaciones singulares ha mostrado ser una estrategia efectiva. La incorporación de información genética cuantitativa en programas de conservación de organismos tan longevos como los árboles supone un complejo reto, pero la integración de datos de calidad en lo relativo a demografía, y diversidad genética neutra y adaptativa son esenciales para el diseño de estrategias de conservación genética adaptativa, de forma que se minimicen las pérdidas de biodiversidad como resultado del cambio climático.

7. Agradecimientos

Agradecemos a Juan Majada (SERIDA) su implicación en el diseño experimental y mantenimiento de los ensayos y a D. Barba y F. del Caño (INIA-CIFOR) su apoyo en el campo. Los datos utilizados en este estudio son parte de la Red Española de Ensayos Genéticos Forestales (GENFORED, <http://www.genfored.es>). Agradecemos a todas las personas e instituciones relacionadas con el establecimiento y medición de los ensayos, así como el mantenimiento de la red. IRQ y MJSV disfrutaron de becas de doctorado de los programas FPI-INIA y FPU-AP2010-1286 respectivamente.

8. Bibliografía

AITKEN, SN.; YEAMAN, S.; HOLLIDAY, JA.; WANG, T.; CURTIS-MCLANE, S; 2008. Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evol Appl* 1: 95–111.

ALBERTO, FJ.; AITKEN, SN.; ALÍA, R.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, SC.; HÄNNINEN, H.; KREMER, A.; LEFÈVRE, F.; LENORMAND, T.; YEAMAN, S.; WHETTEN, R.; SAVOLAINEN, O; 2013. Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Glob Chang Biol* 19: 1645–61.

ALÍA, R.; CHAMBEL, R.; NOTIVOL, E.; CLIMENT, J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, SC; 2014. Environment-dependent microevolution in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Aiton). *BMC Evol Biol* 14: 200.

ALÍA, R.; MARTÍN, S.; DE MIGUEL, J.; GALERA, R.; AGÚNDEZ, D.; GORDO, J.; SALVADOR, L.; CATALÁN, G.; GIL, L; 1996. Las regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Aiton. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, Spain.

ALÍA, R.; MORO, J.; DENIS, J; 1997. Performance of *Pinus pinaster* provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. *Can J For Res* 27: 1548–1559.

BUCCI, G.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, SC.; LE PROVOST, G.; GRÉGOIRE PLOMION, C.; CHRISTOPHE RIBEIRO, M.; MARIA MARGARIDA M.; SEBASTIANI, F.; FEDERICO ALIA, R.; VENDRAMIN, GG; 2007. Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Mol Ecol* 16: 2137–2153.

DAVID, P.; PUJOL, B.; VIARD, F.; CASTELLA, V.; GOUDET, J; 2007. Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Mol Ecol* 16: 2474–2487.

DO, C.; WAPLES, RS.; PEEL, D.; MACBETH, GM.; TILLET, BJ.; OVENDEN, JR; 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Mol Ecol Resour* 14: 209–214.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J; 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611–2620.

FADY-WELTERLEN, B; 2005. Is there really more biodiversity in Mediterranean forest ecosystems? *Taxon* 54: 905–910.

FADY, B.; COTTRELL, J.; ACKZELL, L.; ALÍA, R.; MUYS, B.; PRADA, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, SC; 2015. Forests and global change: what can genetics contribute to the major forest management and policy challenges of the twenty-first century? *Reg Environ Chang* 9: 927-939

FARJON, A; 2013. *Pinus pinaster*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2.

FRANKHAM, R; 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biol Conserv* 143: 1919–1927.

FRASER, D.; BERNATCHEZ, L; 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Mol Ecol* 10: 2741–2752.

HAMANN, A.; SMETS, P.; YANCHUK, AD.; AITKEN, SN; 2005. An ecogeographic framework for in situ conservation of forest trees in British Columbia. *Can J For Res* 35: 2553–2561.

HARDY, OJ.; VEKEMANS, X; 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2: 618–620.

JARAMILLO-CORREA, JP.; RODRÍGUEZ-QUILÓN, I.; GRIVET, D.; LEPOITTEVIN, C.; SEBASTIANA, F.; HEUERTZ, M.; GARNIER-GÉRÉ, P.; ALIA, R.; PLOMION, C.; VENDRAMIN, GG.; GONZALEZ-MARTINEZ, SC; 2015. Molecular proxies for climate maladaptation in a long-lived tree (*Pinus pinaster*). *Genetics* 199: 793–807.

KOSKELA, J.; LEFÈVRE, F.; SCHUELER, S.; KRAIGHER, H.; OLRİK, DC.; HUBERT, J.; LONGAUER, R.; BOZZANO, M.; YRJÄNÄ, L.; ALIZOTI, P.; ROTACH, P.; VIETTO, L.; BORDÁCS, S.; MYKING, T.; EYSTEINSSON, T.; SOUVANNAVONG, O.; FADY, B.; DE CUYPER, B.; HEINZE, B.; VON WÜHLISCH, G.; DUCOUSSO, A.; DITLEVSEN, B; 2013. Translating conservation genetics into management: Pan-European minimum requirements for dynamic conservation units of forest tree genetic diversity. *Biol Conserv* 157: 39–49.

LEDIG, FT; 1986. Conservation strategies for forest gene resources. *For Ecol Manage* 14: 77–90.

LEFÈVRE, F.; KOSKELA, J.; HUBERT, J.; KRAIGHER, H.; LONGAUER, R.; OLRİK, DC.; SCHÜLER, S.; BOZZANO, M.; ALIZOTI, P.; BAKYS, R.; BALDWIN, C.; BALLIAN, D.; BLACK-SAMUELSSON, S.; BEDNAROVA, D.; BORDÁCS, S.; COLLIN, E.; DE CUYPER, B.; DE VRIES, SMG.; EYSTEINSSON, T.; FRÝDL, J.; HAVERKAMP, M.; IVANKOVIC, M.; KONRAD, H.; KOZIOL, C.; MAATEN, T.; NOTIVOL PAINO, E.; OZTÜRK, H.; PANDEVA, ID.; PARNUTA, G.; PILIPOVIČ, A.; POSTOLACHE, D.; RYAN, C.; STEFFENREM, A.; VARELA, MC.; VESSELLA, F.; VOLOSANCHUK, RT.; WESTERGREN, M.; WOLTER, F.; YRJÄNÄ, L.; ZARIŃA, I; 2013a. Dynamic conservation of forest genetic resources in 33 European



countries. *Conserv Biol* 27: 373–84.

LEFÈVRE, F.; BOIVIN, T.; BONTEMPS, A.; COURBET, F.; DAVI, H.; DURAND-GILLMANN, M.; FADY, B.; GAUZERE, J.; GIDOIN, C.; KARAM, M.-J.; LALAGÜE, H.; ODDOU-MURATORIO, S.; PICHOT, C; 2013b. Considering evolutionary processes in adaptive forestry. *Ann For Sci* 71: 723–739.

METZGER, MJ.; BUNCE, RGH.; JONGMAN, RHG.; MÜCHER, CA.; WATKINS, JW; 2005. A climatic stratification of the environment of Europe. *Glob Ecol Biogeogr* 14: 549–563.

NAMKOONG, G; 1997. A gene conservation plan for loblolly pine. *Can J For Res* 27: 433–437.

NEALE, DB.; KREMER, A; 2011. Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nat Rev Genet* 12: 111–122.

NEI, M; 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.

PÂQUES, LE.; FOFFOVÁ, E.; HEINZE, B.; LIESEBACH, M.; PHILIPPE, G; 2013. Forest Tree Breeding in Europe. (Pâques LE, ed.). Springer Netherlands, Dordrecht.

PETIT, RJ.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O; 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv Biol* 12: 844–855.

PUDOVKIN, A. I.; ZHDANOVA, OL.; HEDGECOCK, D; 2009. Sampling properties of the heterozygote-excess estimator of the effective number of breeders. *Conserv Genet* 11: 759–771.

R DEVELOPMENT CORE TEAM; 2015. R: A language and environment for statistical computing. *R Found Stat Comput Vienna Austria*.

REED, D.; FRANKHAM, R; 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution (N Y)* 55: 1095–1103.

RYDER, OA; 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends Ecol Evol* 1: 9–10.

SAGNARD, F.; BARBEROT, C.; FADY, B; 2002. Structure of genetic diversity in *Abies alba* Mill. from southwestern Alps: multivariate analysis of adaptive and non-adaptive traits for conservation in France. *For Ecol Manage* 157: 175–189.

SANTOS DEL BLANCO, L.; CLIMENT, J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, SC.; PANNELL, JR; 2012. Genetic differentiation for size at first reproduction through male versus female functions in the widespread Mediterranean tree *Pinus pinaster*. *Ann Bot* 110: 1449–1460.

SERRA-VARELA, MJ.; GRIVET, D.; VINCENOT, L.; BROENNIMANN, O.; GONZALO-JIMÉNEZ, J.; ZIMMERMANN, NE; 2015. Does phylogeographical structure relate to climatic niche divergence? A test using maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Glob Ecol Biogeogr* 24: 1302–1313.

SGRÒ, CM.; LOWE, AJ.; HOFFMANN, AA; 2011. Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evol Appl* 4: 326–337.

SPITZE, K; 1993. Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* 135: 367–374.

SUZUKI, R.; SHIMODAIRA, H; 2006. PvcIust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* 22: 1540–1542.