



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

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

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-296

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

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Diversidad genética en lotes de semillas de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Betula pubescens* Ehrh., *Fraxinus angustifolia* Vahl y *Sorbus aucuparia* L. en Castilla y León

RUEDA, J.¹, PRADA, M.A.³, AGUILAR, S.⁴, RODRÍGUEZ VILLAFRUELA, R.⁴, VILLAMEDIANA, I.⁴, HIDALGO, E.², EZQUERRA, F.J.¹, DE LUCAS, A.I.²

¹ Dirección General del Medio Natural, Junta de Castilla y León

² ETS de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid

³ VAERSA

⁴ TRAGSA

Resumen

En el contexto de las repoblaciones forestales es imprescindible tener en cuenta la diversidad genética de los materiales forestales de reproducción que se van a utilizar, ya que juega un papel fundamental en la adaptabilidad de las nuevas poblaciones a factores abióticos y bióticos. En este trabajo se presenta la evaluación de los niveles de diversidad genética mediante microsatélites nucleares de lotes de semillas de *Alnus glutinosa*, *Betula pubescens*, *Fraxinus angustifolia* y *Sorbus aucuparia* almacenados en el banco de conservación de semillas forestales de la Junta de Castilla y León. Se han estimado valores medios de diversidad genética (H_e) de 0,81 para el aliso, de 0,766 para el abedul, para el fresno de 0,669 y de 0,745 para el serbal. El parámetro de distancia genética D_s es de 0,2 para todas las especies excepto para el serbal, que muestra un valor superior ($D_s=0,438$). Se establecen conclusiones respecto de la calidad de los diferentes lotes en términos de diversidad y diferenciación genética y se ofrecen algunas otras consideraciones que permiten reorientar las acciones de gestión y conservación *ex situ* de los recursos genéticos de las cuatro especies para aumentar su eficiencia.

Palabras clave

Variación intraespecífica, marcadores moleculares, recursos genéticos, reforestaciones.

1. Introducción

En las últimas décadas, las actuaciones de restauración del medio natural han conllevado un aumento en la demanda de materiales forestales de reproducción de un mayor número de especies respecto de las empleadas en este ámbito en épocas anteriores. Sin embargo, en ocasiones se ha detectado cierta falta de criterio en la elección de su origen geográfico y escasa o nula consideración de los aspectos genéticos que favorecen la conservación de las poblaciones naturales y la estabilidad de las de nueva implantación.

En el ámbito de las especies forestales, son conocidas las consecuencias que pueden derivarse de una homogeneización genética de las plantaciones, como, por ejemplo, la mayor proliferación de plagas y enfermedades, hecho común en las plantaciones genéticamente homogéneas de origen antrópico (BURDON, 2001; GIL *et al.*, 2004). Este requisito de diversidad genética es particularmente relevante en especies longevas, como las arbóreas, cuyas poblaciones se ven sometidas a circunstancias ambientales cambiantes, muchas veces divergentes, y a relaciones con múltiples organismos a lo largo de su vida (HAMRICK, 2004). Por ello, resulta indispensable producir lotes de semillas con cierta diversidad genética, como medio para promover la adaptación y la evolución de las nuevas poblaciones que se establezcan. Asimismo, cabe destacar la conveniencia de considerar la variación interpoblacional a la hora de gestionar los materiales de reproducción de las especies, por la posible existencia de adaptaciones a ambientes concretos fruto de la historia evolutiva de cada especie y para evitar introgresiones genéticas con consecuencias impredecibles en las poblaciones naturales existentes.

En este contexto, la Junta de Castilla y León está realizando un importante esfuerzo en la localización de poblaciones naturales de diferentes especies como posibles fuentes de materiales de reproducción y en la recolección y conservación de lotes de semillas para su posterior uso a corto, medio o largo plazo en forestaciones. Las poblaciones de las especies sometidas a regulación en el marco del Real Decreto 289/2003, sobre comercialización de materiales forestales de reproducción son autorizadas como materiales de base. Sin embargo, hasta la fecha no se ha llevado a cabo una caracterización genética de los lotes de semillas, recolectados de manera rutinaria como lotes comerciales. Por otra parte, resulta difícil concluir criterios concretos de gestión y conservación de los recursos genéticos de las cuatro especies objeto de este análisis a partir de los datos ofrecidos por la literatura. Estos trabajos, salvo contadas excepciones (por ejemplo, ciertos resultados de FRAXIGEN (2005) para el fresno), son de tal naturaleza o escala que no permiten extrapolar sus resultados al contexto de esta comunidad autónoma. Por ello, de manera colateral, el presente estudio pretende ser una primera aproximación a la diversidad genética de las citadas especies en Castilla y León.

2. Objetivos

Los objetivos concretos son: (i) la evaluación de la calidad relativa de los lotes de semillas en términos de diversidad genética; (ii) la estimación de la idoneidad y del valor marginal de las poblaciones muestreadas como materiales de base y para la conservación de los recursos genéticos y (iii) finalmente, ofrecer unas indicaciones sobre las líneas de trabajo que deberían abordarse para aumentar la eficiencia en la gestión y conservación de los recursos genéticos de las cuatro especies.

3. Metodología

Los genotipos incluidos en este estudio proceden de lotes de semillas almacenados en el Banco de Conservación de Semillas de la Junta de Castilla y León que fueron recolectados en diferentes poblaciones situadas en el territorio de esta comunidad autónoma. Estas poblaciones, la mayoría de ellas autorizadas como fuentes semilleras en el contexto de la normativa de comercialización de materiales forestales de reproducción, cubren gran parte de los rangos de distribución de las especies en la región. El término municipal en el que se localizan y el código asignado a cada una de ellas se muestran en la Tabla 1. En esta tabla se señala, en caso de conocerse, el número de pies aproximado de los que se recolectó material. Como es propio en las recolecciones de lotes comerciales, particularmente las de especies de distribución puntual y tamaños de población adulta relativamente bajos, la distancia entre pies recolectados ha sido muy variable. Asimismo, el valor de la distancia media entre pies muestreados ha variado significativamente entre poblaciones (desde 3 a 200 metros).

Tabla 1. Origen y código de los lotes muestreados por especie; entre paréntesis, nº aproximado de pies madre recolectados.

| <i>Betula pubescens</i> | | <i>Fraxinus angustifolia</i> | |
|----------------------------------|------|---------------------------------------|------|
| C011 Merindad de Sotoscueva - BU | | C019 Molezuelas de la Carballada - ZA | |
| C177 Riofrío de Riaza - SG | (20) | C020 Gallegos - SG | |
| C181 Puebla de Lillo - LE | (25) | C021 Arcones - SG | |
| C188 Garray - SO | (20) | C199 Pedro Bernardo - AV | (7) |
| C375 Villafranca del Bierzo - LE | (7) | C204 Garray - SO | (40) |
| C439 Navalonguilla - AV | (19) | C212 Segovia - SG | (10) |
| C441 Castrocontrigo - LE | (21) | C373 Segovia - SG | (15) |
| C524 Riaño - LE | (21) | C475 Velamazán - SO | |
| C627 Riaza - SG | (12) | C542 Torre Val de San Pedro - SG | (11) |
| C628 Puebla de Lillo - LE | (15) | C860 Tenebrón - SA | (3) |
| C856 Murias de Paredes - LE | | C861 La Alberguería de Argañán - SA | (9) |

Tabla 1 (cont.). Origen y código de los lotes muestreados por especie; entre paréntesis, n° aproximado de pies madre recolectados.

| <i>Alnus glutinosa</i> | <i>Sorbus aucuparia</i> |
|--|--|
| C231 San Esteban de Gormaz - SO (12) | C079 Villafranca del Bierzo - LE |
| C467 Merindad de Valdeporres - BU | C080 Puebla de Lillo - LE |
| C480 La Alberca - SA (19) | C081 Pradoluengo - BU |
| C540 Frías - BU (7) | C083 San Juan de Gredos - AV |
| C683 Rebollar - SA | C175 Cervera de Pisuerga - PA (20) |
| C693 Hermisende - ZA | C185 Puebla de Lillo - LE (30) |
| C697 Rosinos de la Requejada - ZA | C195 Villafranca del Bierzo - LE (40) |
| C716 Pías - ZA | C339 Merindad de Sotoscueva - BU (3) |
| C734 Villanázar, Milles de la Polvorosa - ZA | C340 Cervera de Pisuerga - PA (6) |
| C737 Gallegos del Río, Vegalatrave - ZA | C363 Villafranca del Bierzo - LE (7) |
| C743 Figueruela de Arriba - ZA | C444 Villafranca del Bierzo - LE (20) |
| C760 Santa María del Cubillo - AV | C450 Porto - ZA (23) |
| C761 Mingorría - AV | C525 Solana de Ávila - AV (14) |
| C767 Navarredonda - AV | C637 Nava del Barco - AV (7) |
| C768 Piedrahita - AV | C638 Prioro - LE (22) |
| C778 Ferreras de Arriba - ZA | C639 Velilla del Río Carrión - PA (30) |
| C798 Hoyo de Pinares - AV | C850 Candelario - SA (15) |
| C800 Cebreros - AV | C853 La Póveda de Soria - SO |
| C810 Pedro Bernardo - AV | C854 Murias de Paredes - LE |
| C827 Candelario - SA | C855 Brañosera - PA |
| C846 Vegas del Condado - LE | |

El ADN se extrajo de las radículas de plántulas obtenidas a partir de semillas tomadas de manera aleatoria de cada uno de los lotes. Se sometió a las semillas a los tratamientos pregerminativos y a las condiciones ambientales de germinación más adecuados, según la especie, con el fin de obtener entre 10 y 20 plántulas de cada población con una elongación radicular de unos 1,5 cm. De éstas, se seleccionaron 10 de manera aleatoria, de tal manera que en este estudio cada lote está representado por 10 genotipos.

El ADN de las muestras se obtuvo siguiendo un protocolo modificado a partir del de DOYLE y DOYLE (1990) para pequeños volúmenes (TORRES *et al.*, 1993). El análisis genético se realizó a través de microsatélites nucleares (SSRs específicos). Se han empleado 6 marcadores para *Alnus glutinosa* (Ag05, Ag09, Ag13, Ag14, Ag30 y Ag35; LEPAIS y BACLES, 2011), *Betula pubescens* (Bo.F330, Bo.F394, L5.4, L2.3, L021 y L2.5; WANG *et al.*, 2014) y *Fraxinus angustifolia* (FEMSATL4, FEMSATL11, FEMSATL12, FEMSATL16, FEMSATL19 y M2-30; LEFORT *et al.*, 1999; BRACHET *et al.* 1999). *Sorbus aucuparia* ha sido la especie que más problemas ha generado a la hora de realizar los análisis genéticos, debido a la falta de marcadores específicos y a que no existen estudios publicados que proporcionen marcadores transferibles, con condiciones adaptadas y polimórficos. En este caso, se han utilizado 6 microsatélites diseñados o probados para *Sorbus torminalis* (ODDOU-MURATORIO *et al.*, 2001) y *Malus domestica* (GIANFRANCESCHI *et al.*, 1998; LIEBHARD *et al.*, 2002) (CH01h10, MSS16, CH02c09, CH02d08, CH02B03b y MS14H03), si bien uno de ellos se desechó por no funcionar en esta especie y otro por mostrarse monomórfico.

Los parámetros genéticos estándar, como la riqueza alélica (A), el número de alelos únicos (A^U) y las estimaciones de heterocigosidad esperada de Nei (H_e), se calcularon utilizando los programas SPAGeDi (HARDY y VEKEMANS, 2002) y HP-Rare (KALINOWSKI, 2005). Así mismo, se comprobó la posible existencia de una estructura poblacional a nivel general utilizando un método de agrupación bayesiana implementado en el programa Structure (PRITCHARD *et al.*, 2000). Este programa asigna los individuos de una muestra a una población de manera probabilística sin ser necesaria ninguna información de la localización geográfica de los individuos *a priori*. El número óptimo de unidades genéticas presentes en la muestra (K) se determinó según PRITCHARD *et al.* (2004).

4. Resultados y discusión

Alnus glutinosa

Todos los genotipos de *Alnus glutinosa* analizados en este estudio son tetraploides, en concordancia con los resultados ofrecidos por HAVRDOVA *et al.* (2015) y MANDÁK *et al.* (2015). Ambas referencias ponen de manifiesto que el nivel de ploidía en esta especie es variable, siguiendo además una clara distribución geográfica. Así, las poblaciones atlánticas y mediterráneas de la Península Ibérica se muestran como tetraploides. También se encuentran poblaciones tetraploides en el Norte de África y en los Alpes Dináricos, además de poblaciones diploides, mientras que las poblaciones del resto de Europa, incluida la región pirenaica en sus dos vertientes, son diploides. Son raras las poblaciones mixtas en las que se mantiene más de un nivel de ploidía (diploides o tetraploides, y puntualmente, triploides), que podrían originarse por simpatría e hibridaciones puntuales de los diferentes citotipos o por la fusión de gametos con o sin reducción cromosómica a partir de genotipos diploides (MANDÁK *et al.*, 2015). En *Flora Iberica* se indica que los genotipos diploides presentan 28 cromosomas, mientras que la dotación cromosómica de los tetraploides es de 56 (ROCHA AFONSO, 1990). Más allá de la historia evolutiva de la especie y del impacto que las glaciaciones pudieron tener en la distribución geográfica de los citotipos, hay que tener en cuenta que este tipo de mutación numérica resulta ser un mecanismo de diversificación genética, que puede dar lugar a eventos de especiación (WOOD *et al.*, 2009) y que podría jugar un papel relevante en la capacidad para establecerse y adaptarse a un mayor rango de condiciones ecológicas o a ambientes más variables respecto de los genotipos diploides (RAMSEY, 2011).

En este estudio, *Alnus glutinosa* muestra niveles de diversidad genética en términos de heterocigosidad (nivel medio de $H_e=0,810$) (Tabla 2) ligeramente superiores a los obtenidos en Marruecos por LEPAIS *et al.* (2013) ($H_e= 0,76$) y bastante superiores a los encontrados en Escocia e Irlanda ($H_e=0,67$, LEPAIS *et al.*, 2013; BEATTY *et al.*, 2015) o en el centro de Europa ($H_e = 0,65$, MINGEOT *et al.*, 2016). No obstante, cabe señalar que esta superioridad podría deberse en gran parte al mayor nivel de ploidía. En efecto, los mayores niveles de diversidad de las poblaciones, expresada en el número de alelos por locus y en el nivel de heterocigosidad en correlación con su nivel de ploidía, se revela claramente en el trabajo de MANDÁK *et al.* (2015). Más allá del nivel de ploidía, que implica un mayor número de posibles combinaciones alélicas para un mismo locus en el proceso de recombinación, en *Alnus glutinosa* es esperable estimar altos niveles de diversidad genética, ya que se reproduce normalmente por semillas, es anemófila y anemócora, aunque secundariamente las semillas pueden ser dispersadas por el agua, y es autoincompatible (McVEAN, 1953; STEINER y GREGORIUS, 1999), lo que promueve la diversidad genética de sus poblaciones, como se observa en los resultados obtenidos.

Si bien estos resultados reflejan la diversidad genética de lotes de semillas de diferentes poblaciones obtenidos sin un protocolo homogéneo de muestreo, como es habitual en la obtención de lotes comerciales, resulta interesante observar que la diversidad genética no muestra correlación con el número de pies madre representados en cada lote (19 en la población C540, 12 en C231 y sólo 7 en C480).

Por otra parte, en la Figura 2 puede observarse el resultado aportado por el programa Structure que refleja una baja diferenciación genética entre lotes de semillas, en concordancia con las estimaciones de diferenciación y distancias genéticas obtenidas (datos no mostrados), con valores medios de $F_{ST}= 0,052$ y de $D_s=0,201$. Este resultado concuerda con los obtenidos en otros trabajos (BEATTY *et al.*, 2015) que indican que la diferenciación genética entre poblaciones de aliso relativamente próximas es baja (en este caso a escala de Castilla y León). No obstante, algunos lotes parecen mostrar una mayor diferenciación, como ocurre, por ejemplo, con C767, C768 y C800, que proceden de tres poblaciones ubicadas en el Sistema Central, más concretamente en la provincia de Ávila. Atendiendo a este resultado, esta área parece mostrar cierta singularidad genética, por lo que

resultaría prioritaria a la hora de abordar un programa de conservación de recursos genéticos de la especie, y, desde luego, para el mantenimiento de accesiones de esta procedencia en el banco de semillas, a pesar de que muestren valores de diversidad intrapoblacional relativamente bajos.

Tabla 2. Diversidad genética de las poblaciones de *Alnus glutinosa* en términos de *A*: Riqueza alélica y *H_e*: Diversidad genética (NEI, 1978). En negrita resaltados los valores superiores al promedio.

| Población | <i>A</i> | <i>H_e</i> |
|-----------|--------------|----------------------|
| C231 | 6,50 | 0,795 |
| C467 | 7,17 | 0,802 |
| C480 | 8,00 | 0,814 |
| C540 | 8,67 | 0,828 |
| C683 | 8,83 | 0,847 |
| C693 | 7,00 | 0,787 |
| C697 | 7,33 | 0,766 |
| C716 | 8,00 | 0,855 |
| C734 | 8,17 | 0,829 |
| C737 | 8,17 | 0,837 |
| C743 | 10,00 | 0,862 |
| C760 | 7,17 | 0,755 |
| C761 | 8,00 | 0,804 |
| C767 | 5,83 | 0,795 |
| C768 | 7,00 | 0,790 |
| C778 | 8,33 | 0,830 |
| C798 | 7,50 | 0,788 |
| C800 | 5,83 | 0,747 |
| C810 | 7,50 | 0,811 |
| C827 | 8,17 | 0,832 |
| C846 | 8,17 | 0,832 |
| MEDIA | 7,68 | 0,810 |

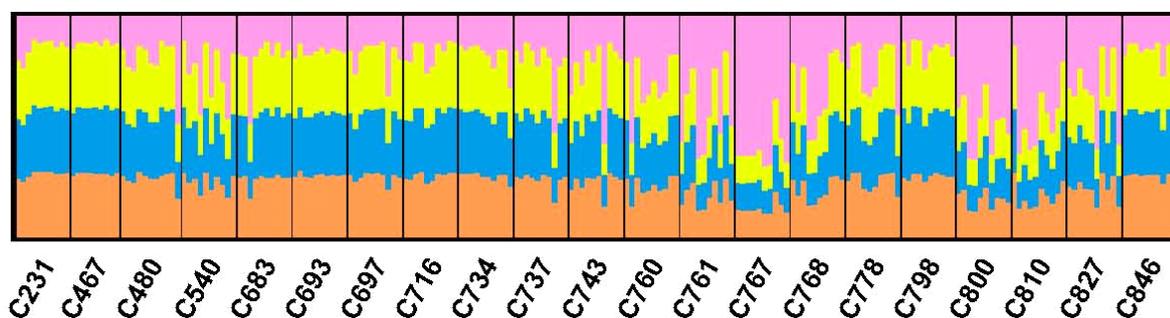


Figura 2. Representación gráfica del agrupamiento Bayesiano realizado de las muestras de *Alnus glutinosa* con el programa Structure para una *k* óptima igual a 4.

Betula pubescens

Los análisis genéticos efectuados en individuos procedentes de lotes de semillas recolectados en Castilla y León indican que todos ellos son tetraploides. Este resultado es el esperable, teniendo en cuenta que *Betula pubescens* se distingue de *B. pendula* Roth, entre otros rasgos, por su nivel de ploidía (BROWN y AL-DAWOODY, 1979; BROWN y WILLIAMS, 1984), si bien no se ha establecido con precisión si su origen se debe a una duplicación cromosómica o a hibridaciones interespecíficas (HOWLAND et al., 1995; ELKINGTON, 1968). En cualquier caso, la poliploidía característica de esta especie podría promover su carácter pionero y una gran capacidad de adaptarse a un rango de

condiciones ecológicas amplias, desde áreas subárticas en los países escandinavos e Islandia hasta zonas bajo clima mediterráneo, como es el Sistema Central de la Península Ibérica.

Los lotes analizados muestran un nivel medio de diversidad genética (H_e de 0,766) (Tabla 3, similar al obtenido por TRUONG *et al.* (2007) en 3 poblaciones de *Betula pubescens* subsp. *tortuosa* en Suecia ($H_e= 0,73$), pero inferiores a los obtenidos para la especie en Gran Bretaña ($H_e= 0,862$, WANG *et al.*, 2014). Los menores valores de heterozigosidad y de riqueza alélica, bastante por debajo de la media observada, se corresponden con los lotes de las poblaciones C439 (Navalonguilla–AV), C441 (Castrocontrigo–LE), situadas ambas en zonas marginales de distribución de la especie. Por el contrario, el lote de la población C011, situada en los Montes Vasco-Navarros, y los dos lotes recolectados en Puebla de Lillo–LE (C181 y C628), presentan los mayores niveles de diversidad genética, comparables con los ya mencionados en Gran Bretaña. Se debe tener en cuenta que la biología reproductiva de esta especie promueve el cruzamiento entre individuos, ya que es autoincompatible y el polen es transportado por el viento (TRUONG *et al.*, 2007), y estas últimas poblaciones se encuentran localizadas precisamente en la Cornisa Cantábrica, donde la especie es abundante, hecho que promovería el flujo génico en esta área.

En esta especie, se ha registrado el número de pies recolectados en 9 de los 11 lotes analizados. No se observa correlación consistente entre el número de pies recolectados en cada población y los valores de diversidad genética estimados; así, lotes en los que están representados un número similar de pies (entre 19 y 21) muestran distintos niveles de diversidad genética (C439, C441, C188, C524, C177). Asimismo, el lote de la población C628, en la que se recolectaron 15 pies, muestra un valor de diversidad genética superior a cualquiera de los anteriores.

Tabla 3. Diversidad genética de las poblaciones de *Betula pubescens* en términos de A : Riqueza alélica y H_e : Diversidad genética (NEI, 1978). En **negrita** resaltados los valores superiores al promedio.

| Población | A | H_e |
|--------------|-------------|--------------|
| C011 | 9,83 | 0,843 |
| C177 | 8,33 | 0,798 |
| C181 | 9,33 | 0,802 |
| C188 | 7,50 | 0,743 |
| C375 | 7,33 | 0,713 |
| C439 | 6,50 | 0,682 |
| C441 | 6,00 | 0,737 |
| C524 | 7,33 | 0,747 |
| C627 | 7,00 | 0,760 |
| C628 | 8,00 | 0,803 |
| C856 | 7,67 | 0,794 |
| MEDIA | 7,71 | 0,766 |

Al igual que han indicado otros autores (TRUONG *et al.*, 2007), las estimaciones de divergencia genética obtenidas (datos no mostrados), con valores medios de $F_{ST}= 0,068$ y de $D_s=0,200$, muestran bajos niveles de diferenciación genética. Este hecho puede atribuirse a altas tasas de flujo génico entre poblaciones, ya que el polen y las semillas de esta especie se dispersan por el viento. A pesar de ello y observando los resultados obtenidos, destacan como diferentes los lotes correspondientes a las poblaciones C439, C441, C627 y, en menor medida, C177, que representan áreas marginales para la especie (Sierra del Teleno y Sistema Central), hecho que queda parcialmente reflejado en la salida gráfica del programa Structure (Figura 3). Al respecto, cabría comprobar en qué medida la singularidad genética de estas poblaciones se debería a aislamiento genético conjugado con eventos de hibridación interespecífica, actuales o históricos (WALTERS, 1964; PALME *et al.*, 2004).

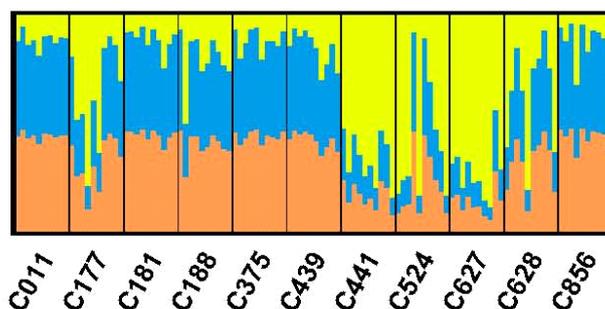


Figura 3. Representación gráfica del agrupamiento Bayesiano de las muestras de *Betula pubescens* realizado con el programa Structure para una k óptima igual a 3.

Fraxinus angustifolia

Según se puede apreciar en la Tabla 4, los lotes de fresno presentan niveles medios de heterozigosis y riqueza alélicas (0,669 y 5,64, respectivamente); valores ligeramente inferiores a los obtenidos para la especie en otras regiones europeas, tales como Grecia ($H_e = 0,726$, PAPI *et al.*, 2012), Francia ($H_e = 0,750$, GERAD *et al.*, 2006) o frente a una media europea estimada en el trabajo de TEMUNOVIC *et al.* (2013) ($H_e = 0,716$). Una hipótesis que podría explicar estos menores valores de diversidad sería el hecho de que las poblaciones representadas en este estudio se encuentran, en su mayoría, en afluentes localizados en tramos altos de los ríos, por lo que el flujo génico mediante dispersión secundaria de las semillas estaría limitado. Esta idea podría explicar, también, el hecho de que el lote de la población C204 (Garray-SO), situada a orillas del Duero, muestre menores valores de diversidad respecto del lote recolectado aguas abajo (C475, Velamazán-SO).

Analizados individualmente, los lotes de las poblaciones segovianas C020 y C021 destacan por su alto nivel de diversidad genética en términos de heterozigosis y de riqueza alélica, y en el caso del recolectado en C019, la única población del cuadrante noroccidental estudiada, además de por dichos estadísticos, también por el número de alelos únicos. Asimismo, y en el otro extremo, los de las poblaciones C204 y C212, de Soria y Segovia respectivamente, muestran valores de variabilidad genética por debajo de la media para los dos estadísticos calculados. Como en el caso del aliso y el abedul, la diversidad genética de los lotes no guarda relación con el número de pies recolectados. De hecho, la población C204, en las que se ha recolectado un número de genotipos sensiblemente superior (40) a otras poblaciones (entre 3 y 15), muestra los menores valores de diversidad.

Tabla 4. Diversidad genética de las poblaciones de *Fraxinus angustifolia* en términos de A : Riqueza alélica, A^p : Número de alelos únicos y H_e : Diversidad genética (NEI, 1978). En **negrita** resaltados los valores superiores al promedio.

| Población | A | A^p | H_e |
|--------------|-------------|-------------|--------------|
| C019 | 6,83 | 1,17 | 0,753 |
| C020 | 6,83 | 0,67 | 0,758 |
| C021 | 6,50 | 0,17 | 0,754 |
| C199 | 5,17 | 0,00 | 0,538 |
| C204 | 4,83 | 0,17 | 0,525 |
| C212 | 4,17 | 0,17 | 0,559 |
| C373 | 5,50 | 0,33 | 0,661 |
| C475 | 5,83 | 0,50 | 0,689 |
| C542 | 5,83 | 0,00 | 0,747 |
| C860 | 5,83 | 0,00 | 0,744 |
| C861 | 4,67 | 0,33 | 0,628 |
| MEDIA | 5,64 | 0,32 | 0,669 |

A pesar de que los valores medios de diferenciación genética entre poblaciones han sido bajos ($D_s= 0,202$ y $F_{ST}= 0,079$), llama la atención que éstos, en este estudio que abarca una escala espacial menor, se encuentran levemente por encima de la media calculada para toda Europa ($F_{ST}= 0,050$) o también de los hallados entre poblaciones ubicadas en diferentes regiones biogeográficas de Croacia ($F_{ST}= 0,012$, región continental y $F_{ST}= 0,027$, región mediterránea) (TEMUNOVIC *et al.*, 2012). Los bajos valores de diferenciación genética obtenidos en este trabajo resultan coherentes si se tiene en cuenta que se trata de una especie anemófila relativamente abundante en las zonas recolectadas, en donde no es esperable encontrar limitaciones para el flujo génico vía polen.

No obstante todo ello, cabe resaltar la diferente composición genética, aunque leve, que presentan el grupo de poblaciones C860/C861, correspondientes a los dos lotes recolectados en la Sierra de Gata (SA), poblaciones ciertamente alejadas del resto, y el grupo C199/C212/C204 (que no representa una unidad geográfica coherente: Sierra de Gredos, Sierra de Guadarrama y Sistema Ibérico en Soria), respecto del resto de poblaciones (Figura 4). De hecho, llama la atención que la población C212 muestra valores de distancia y diferenciación genética relativamente altos respecto de las poblaciones C020 y C021, ubicadas muy próximas a aquella en la vertiente segoviana del Sistema Central, ya que en esta especie, como ya se indicó anteriormente, se esperan altos niveles de flujo génico entre rodales próximos y, por ello, baja diferenciación (FRAXIGEN, 2005).

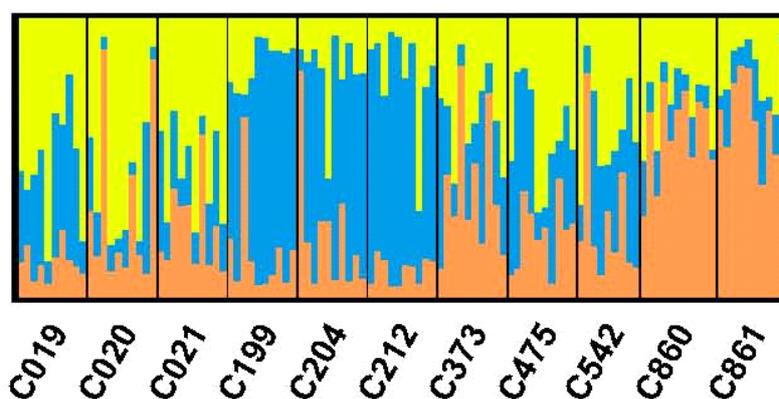


Figura 4. Representación gráfica del agrupamiento Bayesiano de las muestras de *Fraxinus angustifolia* realizado con el programa Structure para una k óptima igual a 3.

Sorbus aucuparia

Los datos de diversidad genética obtenidos para el comúnmente llamado serbal de los cazadores son moderados (Tabla 5). A pesar de no haberse encontrado estudios en otras regiones para esta especie en concreto, se pueden utilizar como referencia los calculados para otros taxones del género, como *Sorbus aria* en la Península Ibérica e Islas Canarias ($H_e= 0,733$, SOSA *et al.*, 2014), o para poblaciones amenazadas de *Sorbus torminalis* al Sur del mar Báltico ($H_e= 0,526$; RASMUSSEN y KOLLMANN, 2008). En cualquier caso, los lotes analizados destacan por sus elevados valores de diversidad, tanto en términos de heterozigosidad como de riqueza alélica, lo que respondería, en parte, al hecho de que la especie es autoincompatible (RASPÉ y KOHN, 2002).

Los lotes con los valores de heterozigosidad más elevados se han recolectado en la zona noroccidental de la región (poblaciones C450, C639, C638 y C854), donde la especie es relativamente abundante; pero también en esta región se han recolectado diferentes lotes con valores por debajo de la media. Lo mismo puede decirse de otras regiones en las que se ha recolectado más de un lote (vertiente septentrional de la Cornisa Cantábrica, Sistema Ibérico o Sierra

de Gredos-Gata). En esta especie se observa una tendencia, aunque débil, al aumento de la diversidad genética al hacerlo el número de pies madre recolectados ($r=0,51$). El rango de genotipos muestreado en lotes con H_e por debajo y por encima de la media es de 7 a 40 y de 3 a 23, respectivamente.

Tabla 5. Diversidad genética de las poblaciones de *Sorbus aucuparia* en términos de A : Riqueza alélica, A^p : Número de alelos únicos y H_e : Diversidad genética (NEI, 1978). En negrita resaltados los valores superiores al promedio.

| Población | A | A^p | H_e |
|-----------|-------------|-------------|--------------|
| C079 | 8,25 | 0,00 | 0,825 |
| C081 | 7,00 | 0,00 | 0,811 |
| C083 | 6,50 | 0,25 | 0,713 |
| C185 | 7,00 | 0,00 | 0,751 |
| C195 | 6,75 | 0,00 | 0,768 |
| C339 | 5,75 | 0,00 | 0,629 |
| C340 | 4,75 | 0,25 | 0,593 |
| C363 | 6,50 | 0,00 | 0,767 |
| C525 | 7,75 | 0,00 | 0,718 |
| C637 | 6,75 | 0,50 | 0,778 |
| C638 | 7,25 | 0,00 | 0,826 |
| C639 | 9,50 | 0,25 | 0,834 |
| C853 | 3,50 | 0,00 | 0,503 |
| C080 | 7,25 | 0,25 | 0,695 |
| C175 | 8,00 | 0,25 | 0,783 |
| C855 | 6,00 | 0,00 | 0,704 |
| C444 | 5,25 | 0,25 | 0,704 |
| C450 | 8,50 | 0,25 | 0,843 |
| C850 | 7,25 | 0,5 | 0,812 |
| C854 | 7,50 | 0,00 | 0,833 |
| MEDIA | 6,85 | 0,14 | 0,745 |

Los valores medios de distancia y de diferenciación genéticas se han estimado en $D_s = 0,438$ y $F_{ST} = 0,102$. Se carece de referencias para la especie con las que se puedan comparar estos resultados. Sin embargo, es patente la mayor diferenciación genética de las poblaciones de serbal en comparación con las tres analizadas anteriormente. Al respecto, queda claro que la biología reproductiva de esta rosácea, de polinización entomófila y dispersión facilitada por animales frugívoros, promueve un mayor aislamiento de sus poblaciones respecto de las de las especies con flujo génico asociado al viento.

A pesar de ello, los lotes de las poblaciones C339 y C340 no muestran diferenciación genética entre sí, aunque estén relativamente alejadas espacialmente (Merindad de Sotoscueva-BU y Cervera de Pisuerga-PA), pero sí respecto del resto (Figura 4). Este hecho podría deberse a un flujo génico efectivo entre ambas, debido principalmente al movimiento de semillas efectuado por las aves (BACLES *et al.*, 2004). También posee una composición genética muy diferente del resto el lote recolectado en la población C853 del Sistema Ibérico soriano. Las tres poblaciones mencionadas se corresponden con los lotes que han mostrado menor diversidad genética. Tanto los altos valores de diferenciación como los bajos niveles de diversidad responderían a una situación de aislamiento reproductivo y endogamia.

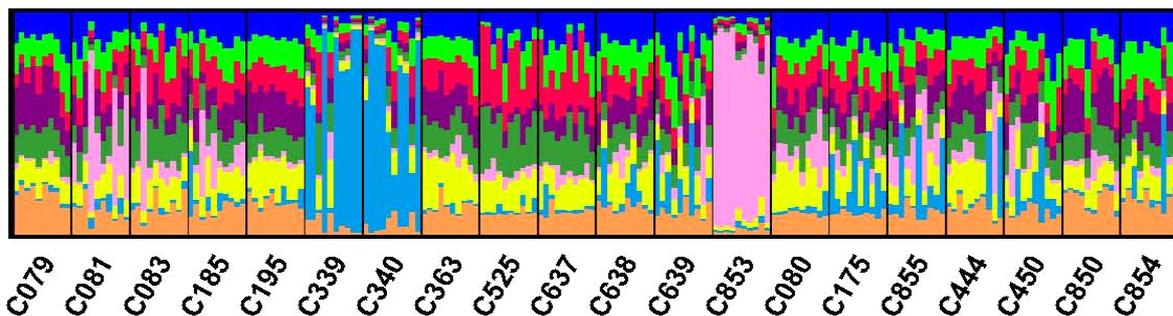


Figura 4. Representación gráfica del agrupamiento Bayesiano de las muestras de *Sorbus aucuparia* realizado con el programa Structure para una k óptima igual a 9.

5. Conclusiones

Combinando la información proporcionada por los estadísticos de variabilidad genética intrapoblacional (heterozigosidad, riqueza alélica y número de alelos únicos en las especies diploides), y de diferenciación interpoblacional (F_{st} y D_s), se puede concluir que:

- Las poblaciones analizadas en este estudio (en forma de lotes de semillas almacenados en el Vivero Central de la Junta de Castilla y León) recogen fielmente la diversidad genética de cada especie, como se deduce de la comparación entre los resultados obtenidos y los publicados en otros estudios realizados a escala europea.
- La diversidad genética que han mostrado los lotes de semillas analizados son moderados, destacando las siguientes poblaciones por sus elevados o bajos valores promedio de diversidad:
 - *Alnus glutinosa*: valores altos: C683, C716 y C743; valores bajos: C231, C767 y C800.
 - *Betula pubescens*: valores altos: C011, C177, C181 y C628; valores bajos: C439.
 - *Fraxinus angustifolia*: valores altos: C019, C020 y C021; valores bajos: C204 y C212.
 - *Sorbus aucuparia*: valores altos: C079, C639, C450, C850 y C854; valores bajos: C340 y C853.
- La diferenciación genética entre poblaciones de todas las especies analizadas, excepto el serbal, es baja debido muy posiblemente a la proximidad entre ellas y a la gran capacidad de dispersión polínica que presentan. Aun así, destacan por su relativa singularidad los siguientes lotes (poblaciones):
 - *Alnus glutinosa*: C467, C767, C798 y C800.
 - *Betula pubescens*: C441 y C627.
 - *Fraxinus angustifolia*: C860/C861 y C199/C204/C212.
 - *Sorbus aucuparia*: C079, C339/C340 y C853.
- Con vistas a mejorar la calidad de las accesiones que muestran baja diversidad genética, se pueden efectuar mezclas de ellas, pero siempre teniendo en cuenta los valores de diferenciación genética obtenidos entre cada par de lotes (poblaciones) (matrices no mostradas en esta comunicación), sin perjuicio de las limitaciones impuestas por la normativa para las especies reguladas al respecto. No obstante, por su singularidad genética, algunas poblaciones poco diversas deben mantenerse individualizadas. Al respecto de las poblaciones de origen de dichas accesiones, se debería procurar recolectar semillas del mayor número de pies posible, en particular si se demuestra, mediante nuevos análisis, que la curva de acumulación de alelos o de incremento de heterozigosidad fuera creciente con cada muestra adicional.
- Resulta interesante efectuar un estudio complementario a éste, en el que se estimen los niveles de diversidad y diferenciación genética de las poblaciones origen de los lotes con el fin de comparar los resultados obtenidos en ambas aproximaciones.

- La estrategia estándar de mantenimiento de lotes recolectados de un gran número de pies en diferentes poblaciones y procedencias, tanto para la conservación *ex situ* de los recursos genéticos como para la producción de lotes con una amplia base genética, se manifiesta como poco eficiente en estas especies, por lo menos en lo que se refiere a la diversidad genética neutral y en el ámbito regional estudiado. Al respecto, se considera indispensable abordar estudios a escala regional para la caracterización de los niveles y patrones de distribución de la diversidad genética en especies utilizadas en las repoblaciones o que requieren programas específicos de conservación.

6. Bibliografía

BACLES C.F.; LOWE, A.J.; ENNOS, R.A.; 2004. Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* deforested Scottish landscape. *Mol. Ecol.* 13: 573-584.

BEATTY, G.E.; MONTGOMERY, W.I., TOSH, D.G., PROVAN, J.; 2015. Genetic provenance and best practice woodland management: a case study in native alder (*Alnus glutinosa*). *Tree Genet. Genomes* 11: 92.

BRACHET, S.; JUBIER, M.F.; RICHARD, M.; JUNG MULLER, B.; FRASCARIA LACOSTE, N.; 1999. Rapid identification of micro satellite loci using 5' anchored PCR in the common ash *Fraxinus excelsior*. *Mol. Ecol.* 8: 157-168.

BROWN, I.R.; AL-DAWOODY D.; 1979. Observations on meiosis in three cytotypes of *Betula alba* L. *New Phytol.* 83: 801-811.

BROWN, I.R.; WILLIAMS, D.A.; 1984. Cytology of *Betula alba* L. complex. *P. Roy. Soc. Edinb. B* 85: 49-64.

BURDON R.D.; 2001. Genetic diversity and disease resistance: some considerations for research, breeding, and deployment. *Can. J. For. Res.* 31, 596-606.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

ELKINGTON, T.T.; 1968. Introgressive hybridization between *Betula nana* L. and *Betula pubescens* Ehrh. in North-West Iceland. *New Phytol.* 67: 109-118.

FRAXIGEN, 2005. Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK. 128 pp.

GERARD, PR.; FERNÁNDEZ-MANJARRÉS, JF.; FRASCARIA-LACOSTE, N.; 2006. Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Mol. Ecol.* 15: 3655-3667.

GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R.; KOMJANE, M., GESSLER, C.; 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076.

GIL, L.; FUENTES-UTRILLA, P.; SOTO, A.; CERVERA, M.T.; COLLADA, C.; 2004. Phylogeography: English elm is a 2,000-year-old Roman clone. *Nature* 431, 1053.

HAMRICK, J.L.; 2004 Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecol. Manag.* 197, 323-335.

- HARDY, O.J.; VEKEMANS, X.; 2002. SPAGED1: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* 2: 618-620.
- HAVRDOVÁ, A.; DOUDA, J.; KRAK, K.; VÍT, P.; HADINCOVÁ, V.; ZÁKRAVSKÝ, P.; MANDÁK, B.; 2015. Higher genetic diversity in recolonized areas than in refugia of *Alnus glutinosa* triggered by continent-wide lineage admixture. *Mol. Ecol.* 24: 4759-4777.
- HOWLAND, D.E.; OLIVER, R.P.; DAVY, A.J.; 1995. Morphological and molecular variation in natural populations of *Betula*. *New Phytol.* 130: 117-124.
- KALINOWSKI, S.T.; 2005. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol. Ecol. Notes* 5: 187-189.
- LEFORT, F.; BRACHET, S.; FRASCARIA-LACOSTE, N.; DOUGLAS, G.; 1999. Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L. and their conservation in the olive family (*Oleaceae*). *Mol. Ecol.* 8: 1075-1092.
- LEPAIS, O.; BACLES, C.F.E.; 2011. De novo discovery and multiplexed amplification of microsatellite markers for black alder (*Alnus glutinosa* and related species using SSR-enriched shotgun pyrosequencing. *J. Hered.* 102: 627-632.
- LEPAIS, O.; MULLER, S.D.; BEN SAAD-LIMAM, S.; BENSLAMA, M.; RHAZI, L.; BELOUAHEM-ABED, D.; DAOUD-BOUATTOR, A.; MOKHTAR GAMMAR, A.; GHRABI-GAMMAR, Z.; BACLES, C.F.E.; 2013. High genetic diversity and distinctiveness of rear-edge climate relicts maintained by ancient tetraploidisation for *Alnus glutinosa*. *PLOS ONE* 8: e75029.
- LIEBHARD, R.; GIANFRANCESCHI, L.; KOLLER, B.; RYDER, C.D.; TARCHINI, R., VAN DE WEG, E., GESSLER, C.; 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Mol. Breeding* 10: 217-241.
- MANDÁK, B.; VÍT, P.; KRAK, K.; TRÁVICEK, P.; HAVRDOVÁ, A.; HADINCOVÁ, V.; ZÁKRAVSKÝ, P.; JAROLÓMOVÁ, V.; BACLES, C.F.E.; DOUDA, J.; 2015. Flow cytometry, microsatellites and niche models reveal the origins and geographic structure of *Alnus glutinosa* populations in Europe. *Ann. Bot.* 117: 107-120.
- McVEAN, DN.; 1953. *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *J. Ecol.* 41: 447-466.
- MINGEOT, D.; HUSSON, C.; MERTENS, P.; WATILLON, B.; BERTIN, P.; DRUART, P.; 2016. Genetic diversity and genetic structure of black alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn) in the Belgium-Luxembourg-France cross-border area. *Tree Genet. Genomes* 12: 24.
- NEI, M.; 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- ODDOU-MURATORIO, S.; PETIT, R.J.; LE GUERROUE, B.; GUESNET, D.; DEMESURE, B.; 2001. Pollen versus seed-mediated gene flow in a scattered forest tree species. *Evolution* 55: 1123-1135.
- PALME, A.E.; SU, Q.; PALSSON, S.; LASCOUZ, M.; 2004. Extensive sharing of chloroplast haplotypes among *Betula pendula*, *B. pubescens* and *B. nana*. *Mol. Ecol.* 13: 167-178.
- PAPI, RM.; SPANOS, KA.; KYRIAKIDIS, DA.; 2012. Genetic variation of *Fraxinus angustifolia* natural populations in Greece based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Eur. J. Forest Res.* 131: 1151-1161.

- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P.; 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- PRITCHARD, J.K.; WEN, W.; FALUSH, D.; 2010. Documentation for STRUCTURE software: Versión 2.3.
- RAMSEY, J.; 2011. Polyploidy and ecological adaptation in wild yarrow. *PNAS* 26: 7096-7101.
- RASPÉ O.; KOHN, J.R.; 2002. S-allele diversity in *Sorbus aucuparia* and *Crataegus monogyna* (Rosaceae: Maloideae). *Heredity* 88: 458-465.
- RASSMUSSEN, K.K.; KOLLMANN, J.; 2008. Low genetic diversity in small peripheral populations of a rare European tree (*Sorbus torminalis*) dominated by clonal reproduction. *Conserv. Genet.* 9: 1533-1539.
- ROCHA AFONSO, M.L.; 1990. *Alnus* Miller. En: CASTROVIEJO, S.; LAÍNIZ, M.; LÓPEZ GONZÁLEZ, G.; MONTSERRAT, P.; MUÑOZ GARMENDIA, F.; PAIVA, J.; VILLAR, L. (eds). Flora Iberica. Vol. II. Real Jardín Botánico-CSIC, Madrid. Pp 43-46.
- SOSA, P.A.; GONZÁLEZ GONZÁLEZ, E.A.; GONZÁLEZ PÉREZ, M.A.; NARANJO CIGALA, A.; CARQUÉ, E.; ACEVEDO, A.; 2014. Reproductive strategy and ploidy determine the genetic variability of *Sorbus aria*. *Tree Genet. Genomes* 10: 679-688.
- STEINER, W.; GREGORIUS, H-R.; 1999. Incompatibility and pollen competition in *Alnus glutinosa*: Evidence from pollination experiments. *Genetica* 105: 259-271.
- TEMUNOVIC, M.; FRANJIC, J.; SATOVIC, Z.; GRGUREV, M.; FRASCARIA-LACOSTE, N.; FERNÁNDEZ-MANJARRÉS J.F.; 2012. Environmental heterogeneity explains the genetic structure of continental and mediterranean populations of *Fraxinus angustifolia* Vahl. *PLOS ONE* 7: e42764.
- TEMUNOVIC, M.; FRASCARIA-LACOSTE, N.; FRANJIC, J.; SATOVIC, Z.; FERNÁNDEZ MANJARRÉS, J.F.; 2013. Identifying refugia from climate change using coupled ecological and genetic data in a transitional Mediterranean-temperate tree species. *Mol. Ecol.* 22: 2128-2142.
- TORRES, AM.; WEEDEN, NF.; MARTIN, A.; 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor. Appl. Genet.* 93: 613-617.
- TRUONG, C.; PALMÉ, A.E.; FELBER, F.; 2007. Recent invasion of the mountain birch *Betula pubescens* ssp. *tortuosa* above the treeline due to climate change: genetic and ecological study in northern Sweden. *J. Evolution. Biol.* 20: 369-380.
- WALTERS, S.M.; 1964. *Betulaceae*. En: TUTIN, T.G.; HEYWOOD, V.H.; BURGESS, N.A.; VALENTINE, D.H.; WALTERS, S.M.; WEBB, D.A. (eds.) Flora Europaea Vol.1. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 57-59.
- WANG, N.; BORRELL, J.S.; BODLES, W.J.A.; KUTTAPITYA, A.; NICHOLS, R.A.; BUGGS, R.J.; 2014. Molecular footprints of the Holocene retreat of dwarf birch in Britain. *Mol. Ecol.* 23: 2771-2782.
- WOOD, T.E.; TAKEBAYASHI, N.; BARKER, M.S.; MAYROSE, I.; GREENSPOON, P.B.; RIESEBERG, L.H.; 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106: 13875-13879.