



---

**Universidad de Valladolid**

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL  
Y RECURSOS FORESTALES

TESIS DOCTORAL:

**FLUJO GENÉTICO, DEMOGRAFÍA Y VARIABILIDAD  
GENÉTICA EN UNA CONÍFERA  
MEDITERRÁNEA EMBLEMÁTICA, EL PINO NEGRAL O  
RODENO**

Presentada por Ana Isabel de Lucas Herguedas  
para optar al grado de  
Doctora en Ingeniero de Montes

Dirigida por:  
Dra. Elena Hidalgo Rodríguez  
Dr. Santiago César González Martínez



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias, en primer lugar, a mis directores de tesis los doctores Elena Hidalgo y Santiago C. González. A la primera, por haber confiado plenamente en mí desde que el laboratorio comenzó a funcionar y por haberse dejado “arrastrar” hacia la genética de poblaciones. Por el esfuerzo realizado para que el laboratorio siga adelante. Al segundo, por haberme adoptado, casi a ciegas, cuando la tesis ya había comenzado, y porque con él, cualquier resultado, por insignificante que parezca, puede llegar a decir mucho. A ambos por su paciencia, su apoyo y su amistad.

A Juanjo Robledo y Myriam Heuertz, por su inestimable aportación científica a los artículos publicados y por publicar. Mucha suerte (y justicia!) en vuestra estabilización profesional. A Olivier Hardy, por proporcionarnos los guiones básicos de cálculo para realizar las simulaciones y por sus valiosos comentarios al respecto. A Arantxa Prada, de la D.G. de la Gestión del Medio Natural (Generalitat Valenciana) y Carlos Villar, del Servicio Territorial de Medio Ambiente de Zamora (Junta de Castilla y León), por proporcionarnos la información y recursos necesarios para el establecimiento de las parcelas en campo.

A todos los compañeros del Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, especialmente a Felipe Bravo, por seguir “tirando del carro” en general (ánimo!), y por su constante apoyo emocional y económico en particular. A Charo Sierra, por iniciarme en el mundillo de la investigación dándome la oportunidad de trabajar en su laboratorio mientras estudiaba la carrera. A Julio Díez, porque una simple llamada telefónica suya (allá por el año 2002), fue la “culpable” de mi regreso a la Universidad. A Celia Redondo, por su eficiencia y porque, gracias a ella, cualquier problema burocrático tiene rápida solución.

A los compañeros de tesis con los que más agobios, cafés y cervezas he compartido: Cristóbal, Josu, Andrés, Iñigo, Santa y María João. Animo! ya queda menos. Al resto de doctorandos del Departamento.

A todos aquellos que me han ayudado o han ofrecido su ayuda para las salidas de campo, en el trabajo de laboratorio o en cualquier fase de la tesis: Cristóbal, Andrés, Iñigo, Josu, Santa, Patricia, Peque, Raúl, Fer, Encarna, Elsa, Celia, Fernando, Sara, Nacho, Iñaki, Sonia, Liber, Luis y Wilson (y seguro que se me olvida alguien...).

A los viejos y nuevos amigos (por orden de aparición): Cristina, Lourdes, David, Leticia, Patricia, Mayke, Peque, Raúl, Jorge, Alberto, Cristóbal, Oscar, María, Jesús, Josu, Fer, Andrés, Iñigo, Xabi, Juan, Marta, Sergio, Patri y Santa, porque aunque la mayoría no saben muy bien lo que hago, se han preocupado durante todos estos años por mí (...y por aceptar al ABI como uno más del grupo).

A mi familia y especialmente a mis padres por su apoyo incondicional ante cualquiera de mis decisiones y por aguantar pacientemente mis ausencias físicas y mentales (...y por los *tupper!*).

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>i</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>ii</b>
<b>PRÓLOGO</b>	<b>iii</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1 SISTEMAS DE REPRODUCCIÓN Y FLUJO GENÉTICO	4
1.2 VARIACIÓN GENÉTICA Y DEMOGRAFÍA POBLACIONAL	6
1.3 ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL A ESCALA LOCAL O “FINA” (SGS)	9
1.4 ESTADO DE CONOCIMIENTO DEL SISTEMA REPRODUCTOR, FLUJO GENÉTICO Y VARIACIÓN GENÉTICA DE <i>PINUS PINASTER</i> AIT. EN ESPAÑA	11
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
3.1 ÁREAS DE ESTUDIO, MUESTREOS Y TOMA DE DATOS.	21
3.1.1 Sistemas de reproducción y flujo genético	22
3.1.1.1 <i>Material vegetal</i>	23
3.1.1.2 <i>Variables de masa y de árbol individual</i>	24
3.1.2 Variación genética, demografía poblacional y estructura genética espacial a escala local o “fina” (SGS)	25
3.2 ANÁLISIS CON MARCADORES MOLECULARES	29
3.3 ANÁLISIS DE DATOS	31
3.3.1 Sistemas de reproducción y flujo genético	31
3.3.1.1 <i>Parámetros del sistema reproductor</i>	31
3.3.1.2 <i>Kernel de dispersión polínica</i>	31
3.3.1.3 <i>Variables de masa y de árbol individual que influyen sobre los parámetros del sistema reproductor</i>	32
3.3.1.4 <i>Simulaciones</i>	32
3.3.2 Variación genética, demografía poblacional y estructura genética espacial a escala local o “fina” (SGS)	34
3.3.2.1 <i>Variación genética y demografía poblacional</i>	34
3.3.2.2 <i>Estructura genética espacial a escala local o “fina” (SGS)</i>	36
3.3.2.3 <i>Contribución de semilla vs. polen al flujo genético global</i>	37
3.3.2.4 <i>Simulaciones</i>	38

<b>4 RESULTADOS</b>	<b>43</b>
4.1 TESTADO DE LOS MARCADORES Y DETECCIÓN DE ALELOS NULOS	43
4.2 SISTEMAS DE REPRODUCCIÓN Y FLUJO GENÉTICO	43
4.2.1 Parámetros del sistema reproductor	43
4.2.2 <i>Kernel</i> de dispersión polínica	44
4.2.3 Variables de masa y árbol individual que influyen sobre los parámetros del sistema reproductor	46
4.2.4 Simulaciones	48
4.3 VARIACIÓN GENÉTICA, DEMOGRAFÍA POBLACIONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL A ESCALA LOCAL O “FINA” (SGS)	49
4.3.1 Variación genética y demografía poblacional	49
4.3.2 Estructura genética espacial a escala local o “fina” (SGS)	54
4.3.3 Contribución de semilla vs. polen al flujo genético global	55
4.3.4 Simulaciones	56
<b>5 DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
5.1 SISTEMA DE REPRODUCCIÓN Y FLUJO GENÉTICO	61
5.2 VARIACIÓN GENÉTICA, DEMOGRAFÍA POBLACIONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL A ESCALA LOCAL O “FINA” (SGS)	65
<b>6 CONCLUSIONES</b>	<b>73</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>77</b>
<b>8 ANEJOS</b>	<b>95</b>
[I] Mating system and pollen gene flow in Mediterranean maritime pine	
[II] Spatial gene structure in continuous and fragmented tree populations with contrasting postglacial history	
[III] Use of molecular markers for estimating breeding parameters: a case study in a Maritime pine progeny trial (colaboración)	
[IV] Admixture, one-source colonization or long-term persistence of Maritime pine in the Castilian Plateau? Insights from nuclear microsatellite markers	

## RESUMEN

La correcta gestión de las masas forestales y la conservación de sus recursos genéticos pasan por la necesidad de comprender la biología reproductiva de las especies y de conocer la cantidad y distribución de la variabilidad genética de sus poblaciones, así como las causas que provocan dicha distribución. *Pinus pinaster* Ait. es la segunda especie arbórea en extensión superficial en España, de gran importancia económica en su ámbito atlántico y ecológica en su distribución mediterránea. Su carácter autóctono en la Península Ibérica y la distribución discontinua de poblaciones continuas de gran tamaño y otras fragmentadas, la hacen una especie atractiva para estudios de flujo genético y evolutivos.

En esta Tesis se ha realizado un análisis jerarquizado del sistema reproductor del pino negral con la intención de identificar los factores que afectan al patrón reproductor de la especie y determinar su escala de actuación. Así mismo, y sobre diferentes grupos de poblaciones, se ha realizado un análisis de dispersión polínica. Por otro lado, se ha evaluado el efecto que los procesos derivados de la colonización postglaciar y de la fragmentación hayan podido tener sobre la variación genética, la demografía poblacional y la estructura genética espacial de la especie. Para todo ello, se han utilizado marcadores de ADN (microsatélites cloroplásticos y nucleares) y se han combinado metodologías empíricas y simulaciones numéricas. Las poblaciones de pino negral analizadas han mostrado unas tasas elevadas de polinización cruzada ( $t_m \sim 0,98$  y  $t_s \sim 0,94$ ), unas medias de endogamia biparental bajas ( $t_m - t_s \sim 4\%$ ) y unos valores relativamente bajos de paternidad correlacionada ( $r_p = 0,018$  ó  $0,048$ , en función de la metodología utilizada). Las estimaciones de los parámetros del sistema reproductor han manifestado una gran variación a nivel de árbol individual (99-100%) y, en ningún caso, se han detectado efectos relativos a la masa o a la población. A nivel individual, las tasas de polinización cruzada y la paternidad correlacionada se han relacionado con el tamaño del árbol y de su copa y con las variables de altura, respectivamente. En las simulaciones realizadas, factores como la restricción espacial de la dispersión del polen, la variación en la producción de polen de los individuos masculinos o una asincronía fenológica, no han sido suficientes para explicar los valores de paternidad correlacionada observados, por lo que otros factores, como la posición social de los individuos dentro de la masa podrían jugar un papel relevante sobre el sistema reproductor correlacionado de *Pinus pinaster*. Los *kernels* de dispersión polínica ajustados para la especie han mostrado un patrón leptocúrtico, con unas distancias medias de dispersión desde 78,4 m a 174,4 m. En relación al análisis demográfico del pino negral, se han detectado fuertes signos de contracción en todas las poblaciones consideradas, compatibles con cuellos de botella que coincidirían con el final de la última glaciación (hace unos 22.500 años). La distribución de la variación genética y la intensidad de la estructura genética espacial obtenidos a lo largo de una hipotética ruta de expansión postglaciar no se muestran acordes con el modelo de colonización 'leading edge', que predice menor diversidad y mayor diferenciación y estructuración genética espacial en las poblaciones recolonizadoras que en el refugio glaciar de las especies. Así mismo la variación genética de las poblaciones fragmentadas en relación a las continuas tampoco se ajusta al patrón definido en el modelo 'centro-periferia'. La estructura genética espacial observada en la realidad ha sido mayor que la obtenida en los modelos simulados, lo cual puede ser debido a la gran estocasticidad de los procesos de dispersión, a fuertes reducciones en el tamaño efectivo poblacional o a una selección de individuos debida a la heterogeneidad ambiental de las poblaciones de estudio.

## SUMMARY

For an adequate forest management and the conservation of its genetic resources it becomes necessary to know the reproductive biology of the species, the amount of genetic variability and its distribution in populations, along with the factors that cause this distribution. *Pinus pinaster* Ait. is the second tree species occupying forest areas in Spain, and it is of main economic importance in its Atlantic distribution. In addition, it plays a central ecological role in the Mediterranean region on Iberian Peninsula. The indigenous character of this species in the Iberian Peninsula and the discontinued distribution of central and marginal populations make Maritime pine attractive for genetic flow and evolutionary studies.

In this Thesis, a hierarchical analysis of mating system has been carried out, in order to identify factors affecting reproductive pattern of Mediterranean maritime pine and to determine its action scale; pollen dispersal kernels were fitted using indirect methods, and finally, plausible postglacial colonization and fragmentation effects on genetic variation, population demography and spatial genetic structure have been analyzed. For these purposes, empirical analysis from DNA molecular markers (both chloroplast and nuclear) and computer simulations have been performed.

The populations of Maritime pine analyzed showed high outcrossing rates ( $t_m$  and  $t_s \sim 0.96$ ) and relatively low correlated paternity levels ( $r_p$  between 0.018 and 0.048 according to the approach considered), although higher than in other anemophilous tree species. Mating system parameters had high variation at single-tree level (99-100%) but no stand or population effect was detected. At the single-tree level, outcrossing rates were correlated with tree (diameter and height) and crown size. In addition, correlated paternity showed a significant negative correlation with tree height, height to crown base and height to the largest crown width, probably reflecting the importance of the trees' 'ecological neighborhoods'. The numerical simulations showed that neither restricted pollen dispersal, differences in male fertility nor flowering asynchrony, are sufficient to explain the observed levels of correlated paternity. Therefore, other factors such as within-stand social position could play an important role on the correlated mating system of *P. pinaster*. Indirectly, estimated pollen dispersal kernels were very leptokurtic with mean dispersal distances from 78.4 m to 174.4 m. In all populations of maritime pine considered notable population collapses have been detected which are compatible with bottlenecks dated back on Last Glacial Maximum (~22.500 yr BP). The distribution of genetic variation obtained along postglacial recolonization pathway didn't agree with the 'leading edge' colonization model, which predicts higher levels of diversity and lower genetic differentiation in populations of new colonized areas than in glacial refugia. In addition, spatial genetic structure (SGS) was stronger within fragmented populations than in continuous populations and we did not detect signs of SGS in continuous population at fringe expansion. These results are not in agreement with 'leading edge' model, which predicts higher SGS in recolonized areas. Finally, observed SGS intensity was greater than in simulated scenarios, which could be due to high stochasticity in dispersal parameters, reduction of effective population size or selection due to environmental heterogeneity in the studied populations.



## PRÓLOGO

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el marco de los proyectos de investigación CICYT “*Dinámica de masas maduras y primer desarrollo de pinares Mediterráneos*” (AGL2007-65795-C02-01), “*Dinámica de rodales de pino negral (*Pinus pinaster* Ait.) en el sistema ibérico meridional: Estructura genética, regeneración y dinámica forestal*” (AGL2004-07094-C02-02) y “*Regeneración natural y primer desarrollo de rodales forestales en el centro de España: *Pinus sylvestris* y *Pinus pinaster**” (AGL2001-1780) cuyo investigador responsable en la Universidad de Valladolid ha sido el Dr. Felipe Bravo Oviedo, y con recursos procedentes del proyecto “*Sistemas de reproducción, flujo genético efectivo y efectos parentales: aplicación a la gestión y conservación de recursos genéticos forestales*”, (AGL2005-07440-C02-01/FOR) coordinado por el Dr. Santiago C. González Martínez del CIFOR (INIA), Madrid.

Los resultados de este trabajo han dado lugar a dos publicaciones científicas, a las que se ha hecho referencia a lo largo del texto como Anejos con numeración romana:

**[I]** de-Lucas, AI; Robledo-Arnuncio, JJ; Hidalgo, E and González-Martínez, SC (2008). Mating system and pollen gene flow in Mediterranean maritime pine. *Heredity*. **100**: 390-399.

**[II]** de-Lucas, AI; González-Martínez, SC; Vendramin, GG; Hidalgo, E and Heuertz, M; Spatial gene structure in continuous and fragmented tree populations with contrasting postglacial history. Enviado a *Molecular Ecology* (MEC-08-1188)

Así mismo, el estudio que constituye esta Tesis ha derivado en otras dos publicaciones sometidas a revistas incluidas en el *SCI*. Por un lado, una colaboración científica basada en la aplicación práctica del Anejo I y, por otro, un artículo en el que se amplía la discusión del Anejo II.

**[III]** Gaspar, MJ; de-Lucas, AI; González-Martínez, SC; Alía, R; Paiva, J; Hidalgo, E; Louzada, J and Almeida, H. Use of molecular markers for estimating breeding parameters: a case study in a Maritime pine progeny trial. Enviado a *Tree genetics & genomes* (TGG-2008-0097.R1)

**[IV]** de-Lucas, AI; González-Martínez, SC; Hidalgo, E; Bravo, F and Heuertz, M. Admixture, one-source colonization or long-term persistence of maritime pine in the Castilian Plateau? Insights from nuclear microsatellite markers. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*. En prensa



# 1 INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN

La distribución de la diversidad genética de una especie entre y dentro de poblaciones está influenciada por la interacción de su biología reproductiva y la estructura espacial que presenta, siendo la combinación de estos dos factores junto con procesos de selección natural, lo que provoca, a su vez, variaciones en el patrón reproductor de dicha especie (Hamrick y Murawski 1990; Loveless 1992).

La diversidad genética puede aparecer espacialmente estructurada a diferentes escalas: población, subpoblación o en un grupo de individuos próximos (Escudero *et al.* 2003), y su distribución se ve influenciada, no sólo por la acción de fuerzas evolutivas tales como la selección natural, migración y deriva, sino también, por procesos demográficos y sucesos históricos, que pueden influir sobre el grado de expansión, contracción y fragmentación de las poblaciones, el aislamiento en refugios y la recolonización de las especies (Hewitt 1996; Beaumont 1999; Storz y Beaumont 2002). A pequeña escala, el sistema de reproducción y el flujo genético son los factores que, en mayor medida, condicionan la estructura genética de las poblaciones. Limitaciones en el flujo de polen y la restricción de la dispersión de las semillas, conllevan generalmente el apareamiento preferente entre individuos geográficamente próximos, lo que provoca una estructura genética a escala fina (Wright 1943).

La fragmentación del hábitat afecta en gran medida a la estructura genética de las poblaciones, ya que la disminución del número de individuos y la ruptura de la continuidad de dichas poblaciones, pueden reducir el flujo genético existente entre ellas, lo que incrementa los procesos estocásticos de deriva genética (Young *et al.* 1996). Si estos hechos se producen en poblaciones de pequeño tamaño, la pérdida de variabilidad genética y, en último término, la existencia de un elevado nivel de endogamia, pueden disminuir la capacidad de adaptación de los individuos a los posibles cambios ambientales, reduciéndose enormemente las probabilidades de supervivencia de la población.

El conocimiento del sistema reproductor y del flujo genético de las especies, así como de los procesos implicados en la estructuración genética de las poblaciones, especialmente a pequeña escala, son, por consiguiente, imprescindibles para comprender la distribución de la variabilidad genética entre individuos y/o poblaciones, y van a proporcionar pautas de manejo que favorezcan la conservación de dicha variabilidad.

## 1.1. SISTEMAS DE REPRODUCCIÓN Y FLUJO GENÉTICO

El sistema de reproducción y el flujo genético son los mecanismos que permiten a las especies mantener una variación genética capaz de adaptarse a diferentes condiciones ambientales a lo largo del espacio y del tiempo (Boshier 2000). Ambos definen el modo de transmisión genética entre generaciones, e influyen de forma determinante en la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones, sobre el tamaño efectivo poblacional y sobre el grado en el que las poblaciones se subdividen debido a la selección natural o a la deriva genética (Schoen y Brown 1991; Holsinger 2000; Glémin *et al.* 2006). Tradicionalmente (ver revisiones en Ledig 1998; Ward *et al.* 2005), el estudio del sistema reproductor de las especies de plantas se ha caracterizado únicamente mediante las tasas de polinización cruzada ( $t_s$ : tasa de polinización cruzada uni-locus y  $t_m$ : tasa de polinización cruzada multi-locus) así como con la tasa de endogamia biparental ( $t_m-t_s$ ; e.d., endogamia debida a la reproducción entre individuos emparentados) obtenida a partir de la diferencia entre las anteriores. Sin embargo, otros factores como la paternidad correlacionada ( $r_p$ ) son de gran interés a la hora de caracterizar los sistemas reproductivos de las plantas.

La tasa de paternidad correlacionada define la probabilidad de que dos granos de polen procedentes de un mismo progenitor masculino fertilicen a un mismo individuo femenino y su inversa representa el tamaño efectivo poblacional considerando únicamente la varianza de la dispersión de los gametos masculinos ( $N_e=1/r_p$ ) (Smouse *et al.* 2001; Austerlitz y Smouse 2001). Diversos estudios han señalado que la combinación de valores elevados de paternidad correlacionada ( $r_p$ ) con una dispersión restringida de semilla, puede dar lugar a una estructura genética a escala fina, lo que promueve la competencia entre plántulas emparentadas y, en último término, una posible depresión por endogamia en generaciones sucesivas (Griffin y Eckert 2003; Degen *et al.* 2004). Además, las estimaciones de paternidad correlacionada pueden proporcionar inferencias valiosas sobre la biología de polinización de las especies de plantas (Hardy *et al.* 2004; Verdú *et al.* 2006).

Numerosos factores demográficos y ecológicos actúan a diferentes escalas sobre el patrón reproductivo de las poblaciones de plantas. A nivel de masa y población son de gran relevancia factores naturales como el tamaño y densidad de la población, el modo de polinización y los patrones de fenología y sincronía floral (El-Kassaby y Jaquish 1996; Robledo-Arnuncio *et al.* 2004a; O'Connell *et al.* 2006; Gérard *et al.* 2006), así como factores asociados al manejo de las masas y las prácticas selvícolas (Murawski *et al.* 1994; El-

Kassaby *et al.* 2003). A nivel de individuo, la forma y el tamaño de la planta, su expresión sexual, el esfuerzo reproductor, tanto femenino como masculino, y la posición social dentro de la masa pueden actuar, a su vez, sobre los patrones de reproducción (Burczyk *et al.* 1996, 2002; Dow y Ashley 1998; O'Connell *et al.* 2004; García *et al.* 2005; Verdú *et al.* 2006).

La identificación de los factores que afectan al sistema reproductor y la determinación de su escala de actuación son, por tanto, necesarias para el correcto manejo de las poblaciones naturales y para el diseño de estrategias de conservación. Sin embargo, los estudios del sistema reproductor raramente se han efectuado sobre diferentes escalas espaciales, y la importancia relativa del fenotipo individual vs. parámetros de masa es, hasta el momento, desconocida.

El patrón de dispersión de polen es un proceso determinante en los sistemas de reproducción de las plantas. En especies anemófilas, como son la mayoría de las coníferas forestales, el flujo genético entre poblaciones vía polen representa el principal factor que contrarresta los efectos de la deriva genética y las adaptaciones locales (Ennos 1994). Dentro de una población, el número efectivo de individuos reproductores condiciona la probabilidad de que se produzcan procesos de deriva genética local (Wright 1943; 1946), y determina la magnitud y escala de las posibles estructuras genéticas espaciales que pueden generarse por este proceso (Epperson 2003). La descripción del movimiento contemporáneo de la dispersión de polen se realiza, en la actualidad, mediante dos grandes grupos de métodos basados en marcadores moleculares (Adams y Burczyk 2000; Smouse y Sork 2004; Smouse y Robledo-Arnuncio 2005; Sork y Smouse 2006). Los métodos directos generalmente se basan en análisis de paternidad, mientras que los métodos indirectos realizan estimaciones de la estructura de la nube de polen observada bajo diferentes hipótesis.

Las estimaciones basadas en análisis de paternidad permiten identificar, de manera más o menos precisa, a la mayor parte de los donantes de polen en una progenie de madre conocida, así como evaluar la proporción de inmigración polínica en un área delimitada (Burczyk *et al.* 1996; 2002; Smouse *et al.* 1999; Schuster y Mitton 2000). Sin embargo, esta metodología requiere un muestreo exhaustivo de los padres potenciales dentro del área de estudio y una elevada resolución genética, lo que generalmente conlleva limitaciones importantes de la escala a la que se realizan las estimaciones. Por otro lado, la dispersión genética a larga distancia puede tener un mayor impacto sobre la estructura genética y

sobre los patrones de colonización que los movimientos de polen a cortas distancias (dado el aumento habitual de la diferenciación genética con la distancia), por lo que la limitación espacial de los métodos basados en los análisis de paternidad se convierte en un gran inconveniente. Por ejemplo, en el trabajo de Klein *et al.* (2006), se muestra la importancia de determinar si la cola de la función de dispersión es más abultada o delgada que la de una función exponencial, ya que esta característica define la velocidad y el tipo de modelo de inmigración ('isla' frente a 'piedra rodante') que se produce desde poblaciones cercanas, así como la distribución y cantidad de diversidad genética de la nube de polen. Para paliar las limitaciones espaciales asociadas a los análisis de paternidad, en los últimos años se han desarrollado diversos métodos que permiten obtener estimaciones de los parámetros de dispersión polínica disminuyendo los esfuerzos de muestreo. Por esta razón, los métodos indirectos, como TwoGener (Smouse *et al.* 2001; Austerlitz y Smouse 2001; 2002) y el reciente KinDist (Robledo-Arnuncio *et al.* 2006), ambos implementados en el software libre POLDISP (<http://poldisp.googlepages.com>, Robledo-Arnuncio *et al.* 2007) son especialmente adecuados para los estudios de dispersión polínica de poblaciones arbóreas continuas y densas, como son la mayoría de las coníferas ibéricas.

Las estimaciones de la función de dispersión (o *kernel*) son de gran utilidad en el análisis de los factores de floración que determinan el sistema reproductor de poblaciones concretas (Oddou-Muratorio *et al.* 2005); para estudiar las pautas direccionales de la dispersión polínica y tratar de predecir las consecuencias de distintos escenarios espaciales y demográficos sobre los parámetros de dispersión efectiva (Robledo-Arnuncio 2004); o para realizar estimaciones sobre el riesgo de contaminaciones polínicas en poblaciones de conservación o mejora.

## **1.2. VARIACIÓN GENÉTICA Y DEMOGRAFÍA POBLACIONAL**

La distribución geográfica actual de las poblaciones y de la variabilidad genética de las especies silvestres son, en gran medida, consecuencia de las oscilaciones climáticas que tuvieron lugar durante la era Cuaternaria (Hewitt 1989; Comes y Kadereit 1998). En particular, en un marco Europeo, diversos estudios paleoecológicos y filogeográficos (Bennet *et al.* 1991; Taberlet *et al.* 1998; Carrión y Van Geel 1999; Carrión *et al.* 2000) apoyados con datos moleculares (Konnert y Bergmann 1995; Demesure *et al.* 1996; King y Ferris 1998; Petit *et al.* 2002, entre otros), muestran que la distribución de numerosas



especies arbóreas durante el Pleistoceno (hace ~1,8 millones de años) se vio restringida a refugios glaciares en la cuenca mediterránea. Posteriormente, los períodos templados favorecieron una expansión más o menos rápida (dependiendo de las especies) a lo largo de amplias zonas del continente.

La Península Ibérica (P.I.) es una de las áreas de la cuenca mediterránea (junto con las Penínsulas Itálica y Balcánica) cuyas características geográficas, fisiográficas y climáticas hacen que se le considere un área de refugio glaciar homogéneo y continuo (Gómez y Lunt 2007). Debido a su gran tamaño y a su posición geográfica, la P.I. comprende un amplio rango de climas gracias a la influencia de los océanos Atlántico y Mediterráneo. Además, al incluir grandes cadenas montañosas, la Península Ibérica ofrece un gran potencial microclimático que ha permitido la supervivencia de poblaciones de plantas y animales a diferentes altitudes en función de los cambios climáticos (Hewitt 1996). En ella se han identificado refugios glaciares para una gran cantidad de organismos (revisado en Taberlet *et al.* 1998; Comes y Kadereit 1998; Hewitt 1999; Gómez y Lunt 2007), entre las que se incluyen diversas especies forestales (e.j. *Alnus glutinosa*, King y Ferris 1998; *Quercus* spp., Petit *et al.* 2002; Olalde *et al.* 2002; *Pinus sylvestris*, Sinclair *et al.* 1999 y *P. pinaster*, Destremau *et al.* 1982; Alía 1989; Carrión *et al.* 2000).

En la última década se han propuesto diferentes modelos de colonización postglaciar para las especies forestales (Ibrahim *et al.* 1996; Le Corre *et al.* 1997; Austerlitz *et al.* 2000; Austerlitz y Garnier-Géré 2003). El modelo de difusión 'leading edge' implica una colonización rápida caracterizada por un número reducido de dispersiones a larga distancia (LDD del inglés *Long-Distance Dispersal*) junto con una dispersión difusa en el frente de colonización, lo que da lugar a un crecimiento exponencial de la población (Hewitt 1996). Este modelo es la forma de expansión sugerida cuando el hipotético refugio glaciar posee valores más altos de diversidad genética y valores más bajos de diferenciación que las poblaciones formadas durante la expansión postglaciar. La variación y estructura genéticas nucleares de las poblaciones de algunas especies forestales se ajustan a las predicciones de este modelo (e.j. *Tsuga mertensiana*, Ally *et al.* 2000; *Pinus coulteri*, Ledig 2000), sin embargo, otras especies arbóreas no siguen el mismo patrón de pérdida de alelos y diversidad en su ruta de colonización en relación a su área de refugio (e.j. *Fagus sylvatica*, Comps *et al.* 2001; *Fraxinus excelsior*, Heuertz *et al.* 2004). En este segundo caso, se ha argumentado la acción de varios procesos como explicación a los desajustes del modelo: i) un efecto fundador menos acusado debido a la extensa fase juvenil de las especies forestales (Austerlitz *et al.* 2000); ii) un incremento del flujo genético en densidades

poblacionales bajas debido a la selección de individuos durante el establecimiento de la población (Comps *et al.* 2001); iii) el llamado efecto '*reshuffling*' o dispersiones frecuentes a larga distancia (Bialozyt *et al.* 2006); y finalmente, iv) la mezcla de poblaciones en la muestra analizada (Heuertz *et al.* 2004).

Por otro lado, los episodios de colonización dan lugar a complejas modificaciones en el tamaño efectivo poblacional, lo que conlleva consecuencias evolutivas (Estoup y Clegg 2003). La estructura y variabilidad genética actual de muchas especies importantes se han definido por sucesos demográficos históricos como las expansiones-retracciones poblacionales dependientes de los cambios climáticos, o los 'cuellos de botella' (Beaumont 1999; Storz y Beaumont 2002; Storz *et al.* 2002), que pueden confundirse con procesos locales (e.j. restricción de la dispersión de semilla), fenómenos de fragmentación contemporáneos (Beaumont 1999; Goossens *et al.* 2006) o mezcla de poblaciones (Heuertz *et al.* 2004).

En los últimos años, la disponibilidad de técnicas eficaces de genotipado basadas en marcadores moleculares de ADN, unido al desarrollo de sofisticados métodos de análisis de genética de poblaciones, que se han implementado en diferentes programas y paquetes estadísticos de fácil uso (revisados en Beaumont 2004 y Excoffier y Heckel 2006), permiten realizar estimaciones precisas sobre el pasado demográfico de una población. Los microsatélites, o *SSRs* (*Simple Sequence Repeats*), considerados como marcadores moleculares neutros o casi-neutros, son una potente herramienta que se utiliza habitualmente para contrastar hipótesis ecológicas, demográficas y evolutivas en poblaciones naturales (DeWoody *et al.* 2006) debido a su elevado polimorfismo y a su carácter codominante. Con el desarrollo de la teoría de la coalescencia (Kingman 1982), la distribución de las frecuencias alélicas obtenidas con este tipo de marcador puede interpretarse desde una perspectiva genealógica, lo que permite realizar inferencias sobre los procesos demográficos que una población ha sufrido recientemente ('cuellos de botella', Cornuet y Luikart 1996; Luikart *et al.* 1998) o en un pasado histórico (expansiones-retracciones poblacionales; Beaumont 1999; King *et al.* 2000; Storz y Beaumont 2002).

La identificación de poblaciones que han experimentado 'cuellos de botella' es importante para efectuar una gestión adecuada y/o definir estrategias de conservación en dichas poblaciones, ya que este proceso puede incrementar la estocasticidad demográfica, la tasa de consanguinidad, la pérdida de variación genética, la fijación de alelos deletéreos y,

cuando dos o más de estos factores convergen, pueden también reducir la probabilidad de supervivencia poblacional de forma acusada (Frankel y Soulé 1981; Luikart y Cornuet 1998).

La fragmentación del hábitat, al disminuir el tamaño efectivo poblacional y la continuidad de las especies, puede reducir el flujo genético, incrementar los procesos estocásticos de deriva genética y favorecer la endogamia (Templeton *et al.* 1990; Young *et al.* 1996), aumentando en último término, el riesgo de extinción de las poblaciones. Así mismo, un elevado grado de aislamiento en el margen del rango de distribución de las poblaciones tendrá consecuencias similares a un proceso de fragmentación (Young *et al.* 1996). Por tanto, y según la hipótesis 'centro-periferia' (Eckert *et al.* 2008), las poblaciones marginales-fragmentadas deberían ser genéticamente menos diversas y estar más diferenciadas entre ellas que las poblaciones centrales, ya que tienden a ocupar hábitats menos favorables y poseen densidades menores y más variables. Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre poblaciones fragmentadas localizadas en el límite contrario al avance de las especies ('*rear edge populations*', sensu Hampe y Petit 2005), a pesar de su importancia ecológica y su creciente interés de conservación. Estas poblaciones relicticas de pequeño tamaño se caracterizan por ser adaptaciones locales con demografías poblacionales más estables que las del frente colonizador. Así mismo, y en cuanto a su estructura genética, suelen presentar bajos niveles de diversidad genética y una elevada diferenciación inter-poblacional. La persistencia a lo largo del tiempo de estas poblaciones, sobreviviendo a los procesos de extinción, hace pensar que han jugado un papel importante en el mantenimiento de la biodiversidad a través del Cuaternario (Hampe y Petit 2005).

### **1.3. ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL A ESCALA LOCAL O "FINA" (SGS)**

La agrupación en el espacio de genotipos emparentados a escala local o 'fina' en poblaciones naturales, también denominada estructura genética espacial (SGS del inglés *Spatial Genetic Structure*), se origina por la interacción compleja de diferentes procesos evolutivos como la selección natural y la deriva genética (Slatkin 1973; Epperson 1990; Aldrich *et al.* 1998), procesos históricos de colonización (Ibrahim *et al.* 1996; Hewitt 2000; Epperson y Chung 2001; Jones *et al.* 2006), perturbaciones antrópicas y/o naturales (Parker *et al.* 2001; Chung *et al.* 2002; Shea y Furnier 2002; Oddou-Muratorio *et al.* 2004; Dutech *et al.* 2005), así como diversas características biológicas intrínsecas a cada especie (ver detalles en Vekemans y Hardy 2004; Troupin *et al.* 2006).

La mayor o menor rapidez de expansión y el modelo de colonización de las especies durante los procesos de colonización postglaciar son factores relevantes que pueden explicar las estructuras espaciales a pequeña y mediana escala, que presentan las poblaciones en la actualidad (Le Corre *et al.* 1997), y en especial, cuando se trata de especies longevas como son los árboles forestales. En general, las estimaciones de velocidad de expansión para las especies forestales basadas en análisis polínicos muestran valores muy elevados (e.j. 150-500 m por año para robles y más de 500 m para fresno, Huntley y Birks 1983; ó 200-300 m por año para *Pinus resinosa*, Davis 1983) difíciles de explicar por modelos sencillos de difusión, lo que sugiere avances poblacionales con dispersiones a larga distancia. Estas LDD promoverían sucesos fundadores locales que atenuarían el patrón clinal inducido por la expansión (Le Corre *et al.* 1997), dando lugar a estructuras genéticas espaciales dentro de una población que podrían establecerse tras el paso de solamente unas pocas generaciones (Epperson 1995) y que podrían persistir a largo plazo (Ibrahim *et al.* 1996; Davies *et al.* 2004). A pesar de las predicciones de estos modelos, la manera en que los procesos de colonización favorecen la aparición de estructuras genéticas espaciales en especies forestales a escala local todavía no está clara, aunque algunos estudios empíricos muestran evidencias de formación de SGS debido a expansiones poblacionales recientes en el frente de colonización (e.j. *Picea sitchensis*, Gapare y Aitken 2005; *Pinus halepensis*, Troupin *et al.* 2006).

A pequeña escala (rodales) y en ausencia de selección, la estructura genética está muy relacionada con el sistema reproductor de cada especie, siendo las limitaciones de flujo genético (dispersión de polen y semilla), que generalmente conllevan el apareamiento preferencial de los individuos más próximos, la principal causa de la existencia de estructura genética a escala fina (Vekemans y Hardy 2004). Sin embargo, otros muchos factores pueden influir sobre la SGS aumentando o disminuyendo su intensidad. La densidad efectiva de las poblaciones y las características biológicas de las especies (e.j. tipo de sistema reproductor, forma de vida o el modo de dispersión de polen y semilla) son factores ampliamente analizados en numerosos estudios (revisado en Vekemans y Hardy 2004). Así mismo, factores como el solapamiento generacional, el solapamiento de las nubes de semillas, las agregaciones espaciales de los individuos reproductores o la selección microambiental se consideran promotores principales de agrupaciones espaciales de individuos emparentados (Troupin *et al.* 2006). Por otro lado, las variaciones en el éxito reproductor, tanto femenino como masculino, influyen sobre el tamaño efectivo poblacional a escala local (Schnabel *et al.* 1998; Dow y Ashley 1998) y sobre la diversidad genética entre y dentro de poblaciones (Burczyk y Prat 1997) pudiendo dar lugar a estructuras genéticas

espaciales pronunciadas y endogamia biparental, es decir, al apareamiento entre individuos emparentados (Vekemans y Hardy 2004; González-Martínez *et al.* 2006).

La importancia ecológica y evolutiva de la SGS es notable ya que provoca efectos trascendentes sobre la dinámica de las poblaciones: Al influir sobre el tamaño efectivo poblacional, puede promover los procesos de endogamia y reducir, consecuentemente, la supervivencia de la progenie (Hamrick y Nason 1996; Schnabel *et al.* 1998; Ishihama *et al.* 2005). Además, su existencia también puede influir sobre los niveles de adaptación a posibles cambios microambientales (Epperson 1992), sobre los patrones de reproducción (Young y Merriam 1994) y sobre la intensidad de los procesos demográficos denso-dependientes (Hamrick *et al.* 1993).

La fragmentación de un hábitat no sólo puede favorecer la reducción de la cantidad de la variabilidad genética de las poblaciones, sino que, además, influye sobre la distribución espacial de esa diversidad genética, acentuando o disminuyendo la probabilidad de formación de SGS. Por ejemplo, Gapare y Aitken (2005), no encontraron signos de SGS en las poblaciones continuas y centrales de *Picea sitchensis*, pero sí en las poblaciones fragmentadas y periféricas de la especie, mientras que Born *et al.* (2008) obtuvieron en una población recientemente fragmentada niveles inferiores de SGS que en las masas continuas de *Aucoumea klaineana*, sugiriendo que el incremento de la dispersión en un hábitat abierto puede compensar los efectos de la fragmentación.

Por tanto, el conocimiento de los factores que promueven la formación de estructura genética espacial (determinación de factores históricos y/o factores locales) y sus efectos sobre las poblaciones naturales (tanto continuas como marginales), pueden proporcionar una valiosa orientación a la hora de definir estrategias de muestro ya sea con fines conservacionistas (conservación *ex situ* de las poblaciones) o para mejorar el manejo de los recursos genéticos en especies de importancia económica y ecológica.

#### **1.4. ESTADO DE CONOCIMIENTO DEL SISTEMA REPRODUCTOR, FLUJO GENÉTICO Y VARIACIÓN GENÉTICA DE *Pinus pinaster* Ait. EN ESPAÑA**

A pesar de que *P. pinaster* se encuentra catalogada como una de las 100 especies invasoras más problemáticas del mundo fuera de su rango de distribución natural,

(<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?fr=1&si=43&sts>), en el Suroeste del Mediterráneo se la contempla como una especie de gran importancia ecológica y económica. La Península Ibérica se considera una de las áreas más importantes de distribución natural del pino negral, y en ella ocupa una superficie de aproximadamente 1.600.000 ha, de las que más de medio millón son masas naturales. En este área, la especie presenta una distribución discontinua debida sobre todo a la acción del fuego, la interacción con otras especies forestales (e.j. *Pinus halepensis*) y el impacto de la actividad humana a lo largo de la historia. Su importancia ecológica reside en su capacidad de adaptación a diferentes condiciones edafoclimáticas: tolera un amplio rango de regimenes pluviométricos, más o menos repartidos a lo largo del año, o con fuertes sequías estivales; soporta tanto los rigurosos fríos invernales del interior peninsular como los climas templados en las proximidades de las costas; y puede establecerse sobre una gran variedad de sustratos, aunque su preferencia son los terrenos sueltos y arenosos, pobres en nutrientes. Por otro lado, los experimentos y ensayos realizados han demostrado una variabilidad fenotípica y genética notables en relación con la forma y el crecimiento de los individuos, así como con diferentes rasgos adaptativos, como la tolerancia a la sequía o la adaptación a la frecuencia de incendios (Alía *et al.* 1995; 1996; Sierra-de-Grado *et al.* 1997; Tapias *et al.* 2004; Chambel 2006).

El sistema reproductor y el patrón de flujo genético de *P. pinaster* han sido analizados a escala local en diversos trabajos realizados en una parcela intensiva de ensayo (*ISP* del inglés *Intensive Sampling Plot*) ubicada en Coca (Segovia), dentro de la región de procedencia 'Meseta Castellana'. Los resultados obtenidos en estos estudios muestran que la especie posee unos niveles de endogamia efectivos (e.d. basados en regeneración natural ya establecida) en esta *ISP* inferiores al 3.8% y un elevado flujo genético local efectivo, donde más del 40% de las semillas y del 85% del polen provenían de fuera de un vecindario arbitrario de 30 m de radio (González-Martínez *et al.* 2003; 2006). En este último estudio (González-Martínez *et al.* 2006) se pone de manifiesto que el éxito reproductor femenino de la especie en esta misma zona está positivamente correlacionado con el diámetro normal (a 1,30 m de altura) y con la producción de piña, y revela una gran variación en el éxito reproductor efectivo (el 10% de los individuos adultos muestreados en la parcela son los parentales responsables del 50% del regenerado). A pesar de que el sistema reproductor de la especie se ha estudiado en profundidad en la *ISP* de Coca, la generalidad de dichos resultados es cuestionable, dado el amplio rango de condiciones ecológicas y de manejo en el que se encuentra el pino negral.

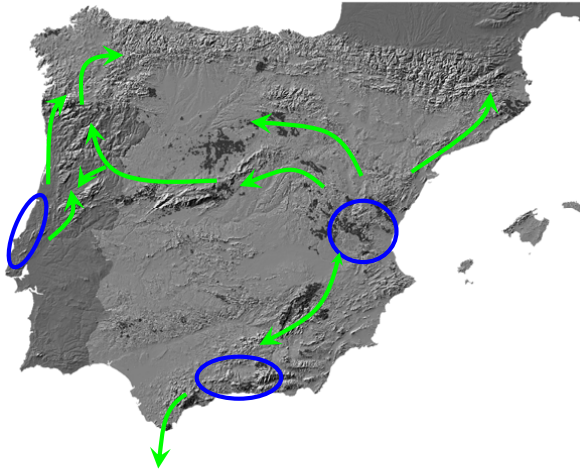
Los *kernels* (o funciones de probabilidad) de dispersión de semilla ajustados para la especie, muestran una variación interanual en las distancias medias de dispersión obtenidas (~12 m en el año 2000, González-Martínez *et al.* 2006; y ~25 m en el año 2006, Juez 2007) fuertemente correlacionadas con las precipitaciones caídas en el período de diseminación y con la velocidad máxima del viento (Juez 2007). A su vez, se han encontrado grandes diferencias entre las distancias medias de dispersión de semilla y las del regenerado avanzado (~50 m para este último), siendo la mortalidad denso-dependiente de semillas y plántulas, los sucesos de predación, y las interacciones entre genotipo-microambiente, los principales factores que pueden dar lugar a estas discrepancias (González-Martínez *et al.* 2006).

El análisis del sistema reproductor del pino negral realizado sobre diferentes escalas espaciales (y en otros rangos de su distribución, fuera de la región de procedencia 'Meseta Castellana'), la evaluación de los factores que le afectan y su escala de actuación, así como la obtención de estimaciones de *kernels* de dispersión, tanto para polen como para semillas, proporcionarían nuevos datos a la información existente para la especie.

La cantidad y distribución de la diversidad genética de *P. pinaster* en la Península Ibérica parece estar estrechamente relacionada con las oscilaciones climáticas y con los procesos de colonización postglaciar acontecidos durante la era Cuaternaria. Numerosos estudios realizados sobre el rango completo de distribución natural de la especie, llevados a cabo con diferentes marcadores moleculares, coinciden en que los valores más altos de riqueza alélica, diversidad genética y diferenciación se observan en la Península Ibérica y que, dentro de ella, existe una tendencia clinal de variación en las direcciones sur-norte y este-oeste (Salvador *et al.* 2000; González-Martínez *et al.* 2001; Derory *et al.* 2002; Gómez *et al.* 2005; Bucci *et al.* 2007). La persistencia de las poblaciones y la acumulación de la variación genética a lo largo del tiempo, parecen ser las causas directas de los patrones de variación encontrados. Así mismo, el hecho de que algunas poblaciones marginales del pino negral, en especial aquellas de área restringida situadas en el Sur y Este peninsulares, muestren valores de diversidad similares a los de poblaciones centrales próximas, manifiesta la aparente importancia de los procesos históricos regionales frente a factores locales tales como el tamaño efectivo poblacional actual (González-Martínez *et al.* 2005).

En base a los datos palinológicos que constatan la supervivencia de *P. pinaster* durante la última glaciación en el Oeste, Este y Sur peninsulares (Figueiral 1995; Carrión *et al.* 2000; Carrión 2002) y a los resultados obtenidos en los estudios moleculares

previamente citados, las zonas de refugio glacial y las teóricas rutas de colonización postglacial definidas para la especie en la Península Ibérica son las que aparecen reflejadas en la Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Distribución natural de *Pinus pinaster* Ait. (zonas sombreadas). Hipotéticos refugios glaciares y rutas de colonización postglacial para la especie en la Península Ibérica (construcción propia en base a las citas referidas en el texto)

Los únicos datos disponibles sobre estructura genética espacial a escala local en pino negral (obtenidos en una masa continua de gran tamaño en la región de procedencia 'Meseta Castellana'), muestran valores significativos en el regenerado analizado pero no en los individuos adultos (González-Martínez *et al.* 2002). En este caso, la formación de agrupaciones de genotipos próximos a edades tempranas parece ser debida a una dispersión restringida de semilla, ya que se encontraron grupos de regenerados emparentados en un radio de 15 m a partir de los progenitores. La pérdida de SGS a edades avanzadas se debe, probablemente, a la elevada mortalidad de los regenerados motivada por los rigores climáticos de la zona de estudio y a una dispersión secundaria de semilla llevada a cabo por roedores y pájaros durante el periodo estival (Miguel-Pérez *et al.* 2002; Juez 2007).



## 2 OBJETIVOS





## 2. OBJETIVOS

Con este trabajo de investigación se pretende ampliar el conocimiento actual que existe sobre el sistema reproductor y flujo genético de una especie de importancia ecológica y económica como es el *Pinus pinaster*. Así mismo, se pretende realizar un análisis sobre los posibles efectos que los procesos históricos y los procesos locales tienen sobre la variación genética, la demografía poblacional y la estructura genética espacial de la especie. Para la consecución de estos dos objetivos generales se han combinando análisis experimentales con simulaciones numéricas.

- El análisis del sistema reproductor y flujo genético en el pino negral se ha llevado a cabo mediante los siguientes objetivos específicos:
  - Estimación de los principales parámetros que caracterizan el sistema reproductor de una especie: tasas de óvulos sin fertilizar y semillas abortadas, tasas de polinización cruzada, endogamia biparental y paternidad correlacionada.
  - Determinación de los factores ecológicos, parámetros de masa y variables a nivel individual que podrían influir sobre los patrones de reproducción de la especie utilizando observaciones directas y simulaciones numéricas.
  - Ajuste de los *kernels* de dispersión polínica mediante métodos indirectos basados en marcadores moleculares.
  
- El estudio de la variación genética, la demografía poblacional y la estructura genética espacial se ha realizado en un teórico refugio glacial y en un área de reciente colonización de pino negral en la Península Ibérica, contrastando, a su vez, poblaciones continuas con poblaciones fragmentadas. Esta labor se ha estructurado en los siguientes objetivos concretos:
  - Estimación de parámetros que caracterizan la variación genética de una especie.
  - Análisis demográfico de las poblacionales en las áreas objeto de estudio.
  - Evaluación de los niveles de estructura genética espacial a escala fina existentes en cada población y determinación de sus posibles causas.
  - Determinación de la relevancia de los efectos locales frente a los procesos históricos en la formación de estructura genética espacial a través de simulaciones.



# 3 MATERIAL Y MÉTODOS

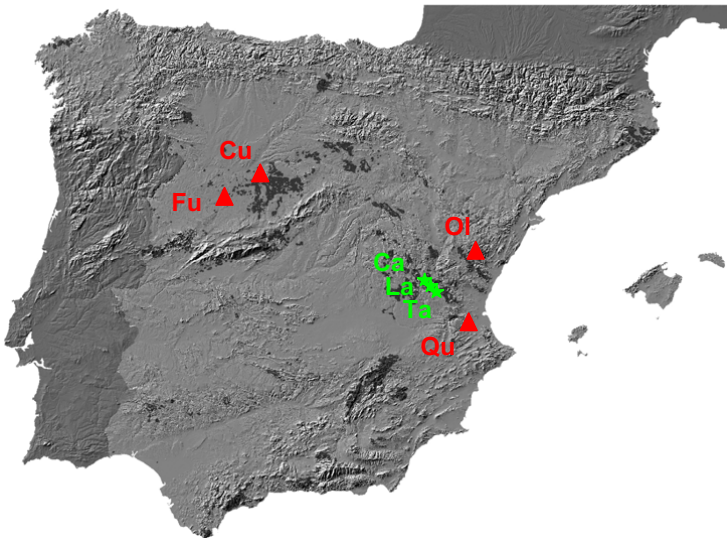




### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. ÁREAS DE ESTUDIO, MUESTREOS Y TOMA DE DATOS

Las siete poblaciones de estudio analizadas en este trabajo de investigación se encuentran localizadas a lo largo de la distribución natural de *Pinus pinaster* Ait. en España y aparecen incluidas en tres de las 20 regiones de procedencia y una de las siete procedencias de área restringida definidas para la especie en Alía *et al.* (1996) (Figura 3.1).

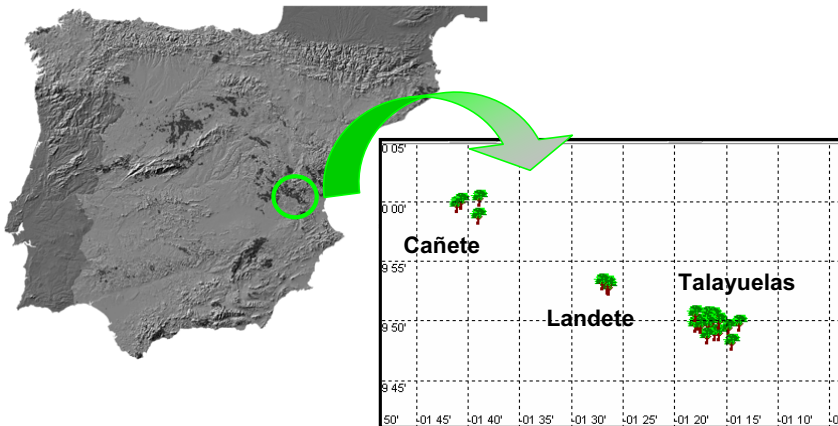


**Figura 3.1.** Distribución natural de *Pinus pinaster* Ait. (zonas sombreadas). Poblaciones analizadas: **Cu**: Cuéllar; **Fu**: Fuentelapeña (Región de procedencia 'Meseta Castellana'); **Ol**: Olba (Región de procedencia 'Maestrazgo'); **Qu**: Quatretonda (Procedencia de área restringida 'La Safor'); **Ca**: Cañete; **La**: Landete y **Ta**: Talayuelas (Región de procedencia 'Serranía de Cuenca'). En verde, las poblaciones utilizadas para el análisis del sistema reproductor correlacionado y flujo genético. En rojo, las poblaciones distribuidas en los extremos de la ruta de colonización objeto de análisis.

### 3.1.1. Sistemas de reproducción y flujo genético

El análisis del sistema reproductor y del flujo polínico de *P. pinaster* a escala regional se llevó a cabo en 24 parcelas situadas en la Región de Procedencia 'Serranía de Cuenca', que representa uno de los núcleos más importantes para la especie en la Península Ibérica (Alía *et al.* 1996). Esta región de gran extensión (más de 75.000 ha), que reúne masas naturales de pino negral más o menos fragmentadas y con elevadas densidades poblacionales (entre 800 y 1.100 pies/ha en las poblaciones de estudio), presenta altos valores de diversidad genética y una gran variación intra-poblacional según muestran los análisis realizados con diferentes marcadores moleculares (isoenzimas, Salvador *et al.* 2000; González-Martínez *et al.* 2005; cpSSRs, Gómez *et al.* 2005; y nSSRs, Derory *et al.* 2002).

Las parcelas se establecieron en tres núcleos ó poblaciones (Figura 3.2): Talayuelas (16 parcelas), Landete (4 parcelas) y Cañete (4 parcelas) separados aproximadamente entre sí por unos 10-15 km. La ubicación exacta de las parcelas y las variables de masa que las caracterizan pueden observarse en la Tabla 3.1.



**Figura 3.2.** Localización y distribución geográfica de las 24 parcelas de pino negral instaladas en la región de procedencia 'Serranía de Cuenca'. En cada masa, se tomaron muestras de dos a tres árboles madre sumando un total de 61 individuos. Las zonas sombreadas representan la distribución natural de *P. pinaster* en España.



**Tabla 3.1.** Localización geográfica y variables de masa de las 24 parcelas instaladas en 3 poblaciones naturales de *P. pinaster*.

Población	Código Parcela	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Exposición	Pendiente (1)	Densidad (pies/ha)	FCC*
Talayuelas	P16001	39° 49' 43" N	01° 13' 38" W	1118	W	49	763,94	0,84
	P16002	39° 49' 39" N	01° 17' 57" W	1323	NW	12	1924,01	0,55
	P16008	39° 48' 56" N	01° 15' 36" W	920	S	0	1142,38	0,90
	P16101	39° 50' 23" N	01° 16' 40" W	993	S	0	2249,39	1,14
	P16102	39° 48' 53" N	01° 16' 02" W	956	SE	12	976,15	1,04
	P16103	39° 49' 55" N	01° 15' 37" W	954	N	16	1262,63	0,77
	P16104	39° 49' 24" N	01° 14' 42" W	928	NW	44	753,33	0,83
	P16106	39° 50' 18" N	01° 16' 11" W	970	NE	38	774,55	0,82
	P16201	39° 50' 06" N	01° 16' 37" W	1078	NE	36	1170,67	1,11
	P16202	39° 49' 49" N	01° 17' 39" W	1135	NW	44	1655,21	0,97
	P16203	39° 49' 48" N	01° 16' 47" W	1191	N	29	594,18	1,03
	P16204	39° 49' 36" N	01° 16' 36" W	1249	W	8	866,51	0,90
	P16205	39° 48' 37" N	01° 16' 46" W	942	S	2	760,41	0,95
	P16206	39° 48' 05" N	01° 14' 23" W	880	S	0	689,67	0,89
	P16207	39° 49' 32" N	01° 17' 25" W	1293	SE	33	555,27	0,80
	P16208	39° 50' 28" N	01° 17' 55" W	1090	S	0	954,93	0,76
	Landete	P16006	39° 52' 45" N	01° 26' 18" W	1112	E	21	466,85
P16007		39° 52' 51" N	01° 26' 25" W	1168	NE	23	1068,11	0,81
P16105		39° 53' 02" N	01° 26' 24" W	1175	E	0	1092,86	0,77
P16107		39° 53' 12" N	01° 26' 57" W	1139	S	11	611,86	0,77
Cañete	P16003	39° 59' 38" N	01° 41' 01" W	1150	E	40	827,61	0,77
	P16004	39° 58' 39" N	01° 38' 54" W	1078	W	12	611,86	0,68
	P16209	40° 00' 13" N	01° 38' 49" W	1067	NE	44	1011,52	0,89
	P16210	40° 00' 13" N	01° 38' 49" W	1049	NE	11	502,22	0,62

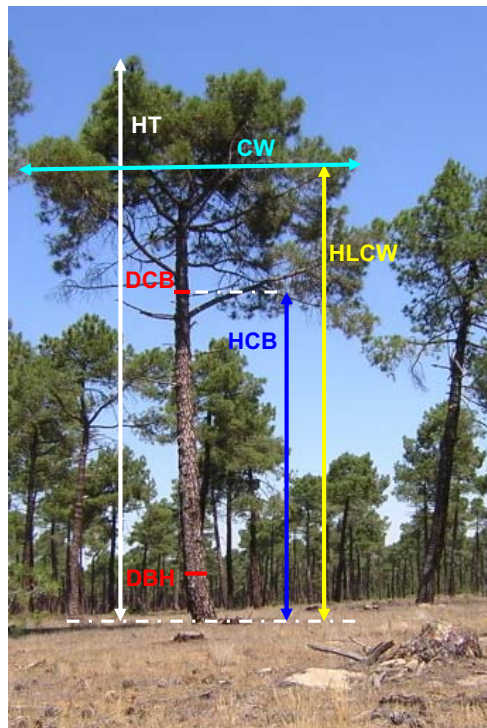
1 La pendiente de las parcelas está medida en grados sexagesimales; \*FCC: Fracción de cabida cubierta

### 3.1.1.1. *Material vegetal*

En cada una de estas parcelas se seleccionaron y aparearon entre dos y tres árboles al azar y de cada uno de ellos se recolectaron de una a seis piñas, sumando un total de 61 árboles (denominados en lo sucesivo madres) y 188 conos. Tras el secado en estufa de las piñas, se extrajeron las semillas y se contabilizó el número total de piñones por piña, el número de óvulos sin fertilizar (*UO*) y, mediante flotación, el número de semillas abortadas (*AS*). Los porcentajes obtenidos para *UO* y *AS* por árbol vienen reflejados en la tabla S2 (*Supplementary Information*) del **Anejo I**. De entre las semillas potencialmente viables, se seleccionaron 30 al azar por parcela ( $N=720$ ) y tras su germinación en cámara de cultivo, se extrajo el embrión y se congeló a  $-20^{\circ}$  C para su posterior análisis genético. A su vez, y para el análisis genético de las 61 madres, se recogió material vegetal (en este caso cilindros de madera, mediante barrena Pressler) que también fue almacenado a  $-20^{\circ}$  C.

### 3.1.1.2. *Variables de masa y de árbol individual*

La caracterización de las 24 parcelas muestreadas, se realizó mediante la toma o cálculo de las siguientes variables: Latitud, longitud, altitud, exposición, pendiente y fracción de cubierta cubierta (*FCC*), como muestra la Tabla 3.1. Por otro lado, las 61 madres apeadas se caracterizaron mediante la toma de datos de las siguientes variables biométricas: altura total (*HT*), diámetro a la altura de 1,30 m (*DBH*), diámetro en la base de la copa (*DCB*), altura del árbol a la base de la copa (*HCB*), anchura de copa (*CW*) y altura del árbol donde la copa alcanza la anchura máxima (*HLCW*) (Figura 3.3). A partir de estas dos últimas variables, se calculó la superficie del casquete superior de un elipsoide de revolución para la copa de cada madre. Con esta medida se pretende representar la superficie de copa expuesta a la radiación solar como indicador del vigor del árbol. Los datos de las mediciones y cálculos de estas variables se recogen en la tabla *S2 (Supplementary Information)* del **Anejo I**.



**Figura 3.3.** Variables biométricas medidas en cada una de las 61 madres apeadas.

### 3.1.2. Variación genética, demografía poblacional y estructura genética espacial a escala local o “fina” (SGS)

El análisis de variación genética, de demografía poblacional y de SGS en una teórica ruta de colonización de la especie se ha llevado a cabo en dos poblaciones centrales y dos poblaciones marginales de pino negral (Figura 3.1). Dos de ellas (Olba: población central y Quatretonda: población marginal, Figuras 3.4.a y b) se localizan en el Este peninsular, cerca de uno de los hipotéticos centros de origen de *P. pinaster* durante su expansión post-glacial (Destremau *et al.* 1982; Alía 1989; Carrión *et al.* 2000). Las otras dos poblaciones consideradas (Cuéllar: población central y Fuentelapeña: población marginal, Figuras 3.4.c y d) se sitúan en una teórica ruta de colonización en dirección centro y noroeste peninsular planteada por diversos autores (Salvador *et al.* 2000; González-Martínez *et al.* 2001).

- **Olba (Teruel)**

Situada en el Este peninsular y dentro de la región de procedencia de ‘Maestrazgo’, esta población se encuentra dentro de una masa continua de pino negral de unas 18.500 ha de superficie. Estas masas, mayoritariamente puras, se caracterizan por presentar altas densidades y una distribución irregular de edades debido al tipo de manejo selvícola utilizado en la zona (Figura 3.5.a).

- **Quatretonda (Valencia)**

La población de Quatretonda, de aproximadamente 50 ha, se localiza en el límite oriental de la distribución de *Pinus pinaster* en la Península Ibérica y conforma, junto a la también población aislada de Pinet (~10 ha), la procedencia de área restringida de ‘La Safor’. Los análisis de registros polínicos realizados en la localidad de Navarrés, a unos 30 km de la población de Quatretonda, ponen de manifiesto la supervivencia de *P. pinaster* en esta zona durante la última glaciación (hace ~33.000 años) junto con especies de los géneros *Corylus*, *Fraxinus* y *Quercus spp* (Carrión y Van Geel 1999; Carrión *et al.* 2000). El tamaño reducido de estas masas, junto con el efecto que han provocado los incendios recurrentes sufridos durante siglos (regeneración post-incendio en favor de *Pinus halepensis*), hacen peligrar su persistencia, ya que se encuentran en paulatina regresión. Por otro lado, la existencia de repoblaciones artificiales de pino negral en los alrededores, hace pensar que pueda existir una posible introgresión genética (vía polen de origen desconocido) (Figura 3.5.b).

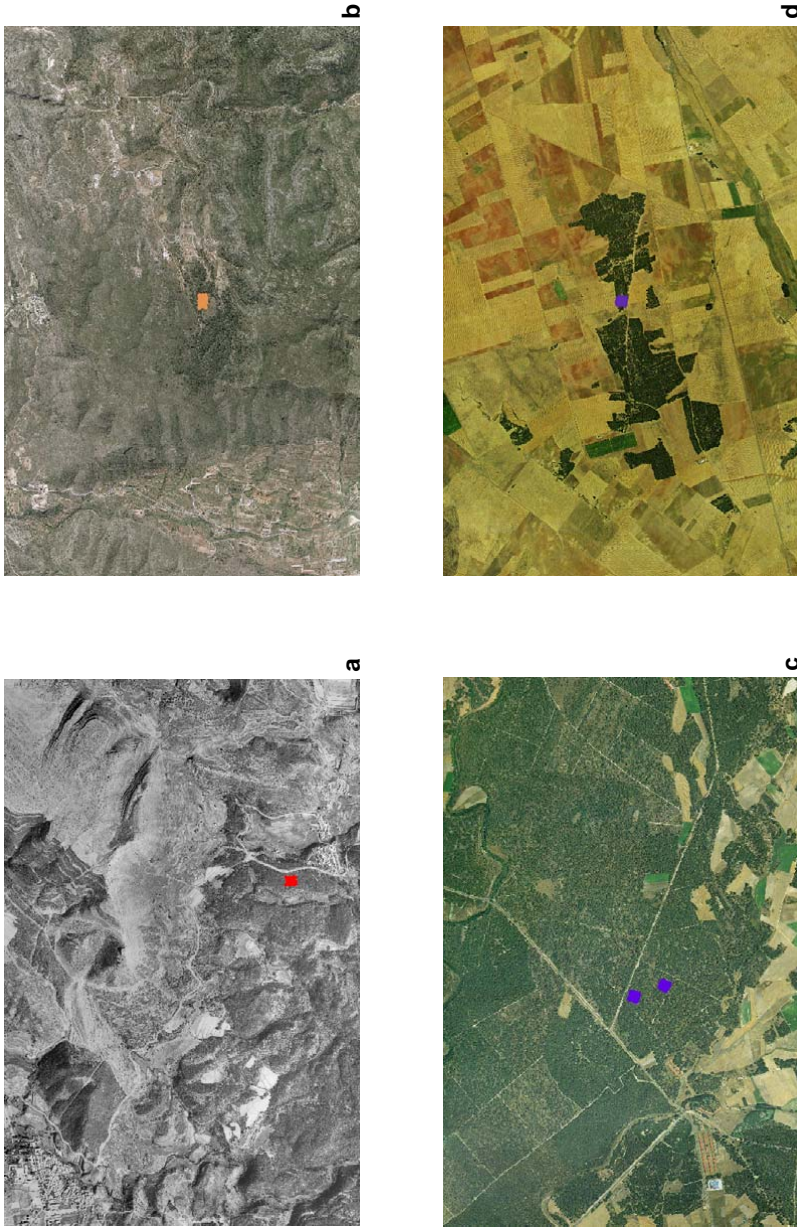
- **Cuéllar (Segovia)**

Dentro de la distribución natural de la especie en España, *P. pinaster* posee su máxima representación en la Meseta Norte, donde ocupa, solo en la región de procedencia 'Meseta Castellana' una superficie de aproximadamente 120.000 ha. La persistencia del género *Pinus* a lo largo del periodo Holocénico (hace 9.000-10.000 años) en la Meseta Norte del Duero ha sido verificada mediante estudios polínicos y de microfósiles (Franco-Múgica *et al.* 2001; 2005). Estos autores sugieren que probablemente, *P. pinaster* fuera junto con *P. pinea*, *P. sylvestris* y *P. nigra* uno de los pinos más importantes en la zona durante el Holoceno. Sin embargo, a pesar de esta conjetura más o menos plausible, la única datación constatada de la especie se remonta a finales del Holoceno (hace 1.400 años) en un yacimiento en Hontalbilla (Segovia), situado a unos 30 km de la zona de estudio (Alcalde *et al.* 2004), mientras que para *P. nigra* las dataciones alcanzan el Holoceno medio (hace 3.500 años, Roig *et al.* 1997) e incluso el Pleistoceno superior (hace 29.000 años, Alcalde *et al.* 2003) para *P. sylvestris*.

Los extensos pinares de las provincias de Valladolid, Ávila y Segovia incluidos en la mencionada región de procedencia, son, generalmente, mezcla de pino piñonero y pino negral, donde este último ha sido objeto de una selvicultura adaptada a la obtención de resina desde el siglo XVIII, lo que ha dado lugar al aspecto artificial y a las bajas densidades que presentan actualmente las masas de esta especie (Figura 3.5.c).

- **Fuentelapeña (Zamora)**

Por último, la población marginal de Fuentelapeña, situada en el límite occidental de la región de procedencia 'Meseta Castellana', consiste en una masa mezclada con pino piñonero, de unas 100 ha de superficie, posiblemente reducida por roturaciones agrícolas. Actualmente, la población se encuentra en aparente estado de regresión debido a la fuerte regeneración natural que presenta *P. pinea* frente al escaso regenerado de *P. pinaster* que sobrevive con dificultad (Figura 3.5.d).



**Figura 3.4.** Ortofotos (Escala 1:20.000) de las cuatro poblaciones de *P. pinaster* seleccionadas para el estudio. **a)** Olba (Teruel); **b)** Cuatretonda (Valencia); **c)** Cuéllar (Segovia) y **d)** Fuentelapeña (Zamora).



**Figura 3.5.** Aspecto de las cuatro masas de *P. pinaster* seleccionadas para el estudio. **A)** Olba (Teruel); **b)** Quatretonda (Valencia); **c)** Cuéllar (Segovia) y **d)** Fuentelapeña (Zamora).

Se establecieron cuatro parcelas de aproximadamente media hectárea de superficie ( $70 \times 70 \text{ m}^2$ ) en las cuatro áreas indicadas previamente, manteniendo en todas ellas el criterio de uniformidad en el número de pies de la cohorte muestreada (80-90 años). En Cuéllar además se estableció una segunda parcela réplica con el fin de comprobar la existencia de variación de estructura genética espacial dentro de poblaciones. En la instalación de las parcelas de Fuentelapeña y Quatretonda se tuvo un cuidado especial de que *Pinus pinaster* no apareciera mezclado con *P. pinea* o *P. halepensis*, respectivamente.

La distribución espacial de todos los individuos adultos se obtuvo mediante la toma de sus coordenadas espaciales relativas al centro de la parcela utilizando para ello una estación total (Topcon GTS-229). Posteriormente, mediante la toma del punto central de cada parcela con un navegador GPS (Garmin), se realizó la transformación de coordenadas relativas a coordenadas UTM. El material vegetal recolectado fueron acículas de cada individuo, que se liofilizaron y almacenaron a  $-80^\circ \text{ C}$  hasta el momento de la extracción de ADN. Las características geográficas, demográficas y ecológicas de estas parcelas se reflejan en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Localización geográfica y características de las poblaciones de pino negral donde se establecieron las parcelas (70x70 m<sup>2</sup>) para el estudio de variación genética, demografía poblacional y estructura genética espacial.

Región	Pob.	Tipo	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Densidad (pies/ha)	Nº pies	Tª (°C)	P (mm)	Suelo
Meseta Castellana	Cu	C	41° 22' 22" N	4° 29' 00" W	740	155,10*	76*	10,5	500	Silíceo-Arenoso
	Fu	F	41° 15' 12" N	5° 25' 14" W	802	159,18	78	11,5	400	Silíceo-Arenoso
Este peninsular	OI	C	40° 10' 22" N	0° 37' 21" W	990	163,27	80	6,5	600	Franco-Silíceo
	Qu	F	38° 58' 17" N	0° 21' 33" W	444	173,47	85	16	600	Silíceo-Arenoso

OI: Olba; Qu: Quatretonda; Cu: Cuéllar; Fu: Fuentelapeña; C: Población continua; F: Población fragmentada;

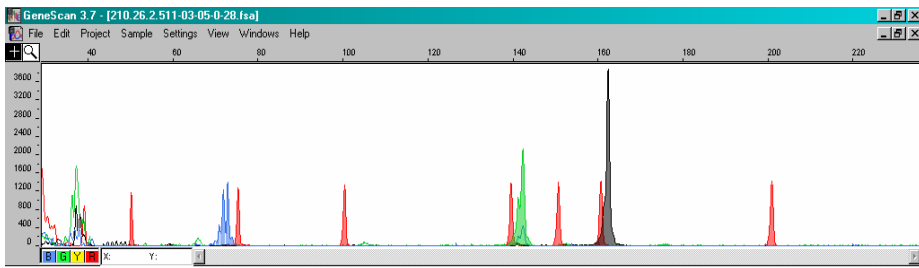
\* Promedio de las dos parcelas réplicas instaladas en Cuéllar.

### 3.2. ANÁLISIS CON MARCADORES MOLECULARES

El ADN total de las acículas recolectadas (N=394), de los embriones (N=720) y de las muestras de madera extraídas con barrena Pressler (N=61) se aisló siguiendo el protocolo de Doyle y Doyle (1990) modificado por Torres *et al.* (1993) para volúmenes pequeños, utilizando un molinillo Mixer Mill MM 301 (Retsch), para homogeneizar el material vegetal en el tampón de extracción.

Para el análisis de los individuos adultos de las poblaciones de Cuéllar, Fuentelapeña, Olba y Quatretonda se utilizaron seis microsatélites nucleares (nSSRs: *Frpp91*, *Frpp94*, *ltp4516*, *Rptest11*, *Ctg275* y *Ctg4363*) seleccionados por los altos niveles de polimorfismo que han mostrado en trabajos previos (Derory *et al.* 2002; Chagné *et al.* 2004) y que presentan un poder de exclusión conjunto (PE) superior al 99%. Las 61 madres y los embriones utilizados en el análisis del sistema de reproducción y flujo genético, se genotiparon para tres loci microsatélites nucleares (nSSRs: *ltp4516*, *Ctg275* y *Ctg4363*) seleccionados de entre los anteriores por su capacidad de ser analizados en una reacción múltiple de PCR y por la facilidad de interpretación de sus cromatogramas. A su vez, los embriones fueron analizados para tres regiones microsatélites polimórficas del cloroplasto, que ofrecen una probabilidad de exclusión (PE) superior al 95%, y permiten realizar análisis a nivel haplotípico por combinación de fragmentos (cpSSRs: *Pt1254*, *Pt30204*, *Pt87268*, Vendramin *et al.* 1996)

Los cloroplastos son orgánulos de herencia paterna en pinos, por lo que el análisis del ADN total extraído de los embriones mediante cpSSRs (genotipo haploide) permite la identificación directa de los gametos paternos (Figura 3.6). En cambio, para deducir la contribución paterna aportada a los embriones utilizando nSSRs (genotipo diploide), fue necesario utilizar la información genética obtenida del análisis de cada madre para lo que se siguió la metodología desarrollada por Hardy *et al.* (2004).



**Figura 3.6.** Reacción múltiple para los marcadores microsatélites cloroplásticos ensayados sobre los 720 embriones: *Pt1254* (azul), *Pt30204* (verde) y *Pt87268* (negro).

Las condiciones de amplificación ensayadas y el análisis del tamaño de los fragmentos para todas las muestras vienen reflejadas en los apartados de *Material and Methods* de los **Anejos I y II** de este documento.

Cuando se trabaja con microsatélites, la presencia de alelos nulos o errores de lectura (causados por muchos factores, ver revisión en Pompanon *et al.* 2005) pueden ocasionar confusión respecto a la discriminación entre individuos homocigóticos y heterocigóticos. Los errores de lectura más frecuentes son los debidos a la amplificación preferencial de los alelos de pequeño tamaño frente a los de mayor tamaño en un mismo locus y los asociados con el 'tartamudeo de picos' (*Stutter peaks*), típico de los marcadores microsatélites (Van Oosterhout *et al.* 2004; DeWoody *et al.* 2006). Se ha utilizado el programa MicroChecker (Van Oosterhout *et al.* 2004) para calcular las frecuencias de alelos nulos según el método de Brookfield (1996) y detectar los posibles errores de lectura descritos.



### 3.3. ANÁLISIS DE DATOS

#### 3.3.1. Sistemas de reproducción y flujo genético

##### 3.3.1.1. Parámetros del sistema reproductor

La caracterización del sistema de reproducción se efectuó mediante seis variables: porcentaje de óvulos sin polinizar ( $UO$ ), porcentaje de semillas abortadas ( $AS$ ), tasa de polinización cruzada multilocus ( $t_m$ ), tasa de polinización cruzada uni-locus ( $t_s$ ), tasa de endogamia biparental ( $t_m-t_s$ ) y paternidad correlacionada ( $r_p$ ). Las estimaciones de  $t_m$  y  $t_s$  se realizaron a partir de los datos obtenidos con los nSSRs mediante un método de momentos en el caso de las madres individuales y mediante un método de máxima verosimilitud en el caso de las poblaciones (Ritland 2002). Las estimaciones de  $r_p$  se han realizado mediante el método multilocus de máxima verosimilitud (Ritland 2002) y mediante el método basado en el co-ancestro de los gametos de polen inferidos en las familias (Hardy *et al.* 2004) (ver detalles en *Material and Methods* del **Anejo I**). A pesar de haberse comprobado que el método de Ritland (2002) subestima la tasa de paternidad correlacionada, en particular con valores de  $r_p$  inferiores al 15% (Hardy *et al.* 2004), su uso está ampliamente extendido, por lo que se presenta en este trabajo para su comparación con trabajos ya existentes en otras especies.

Para determinar si existen correlaciones significativas entre las variables del sistema reproductor consideradas, o si la variación obtenida puede estar estructurada a nivel de población, parcela o de individuos dentro de cada parcela, se han efectuado los análisis de varianza correspondientes a cada una de las variables del sistema reproductor estimados en pino negral. Todos los análisis se han realizado utilizando los programas MLTR versión 3.0 (Ritland 2002), SPAGeDi v.1.2 (Hardy y Vekemans 2002) y SAS ver. 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

##### 3.3.1.2. Kernel de dispersión polínica

Los *kernels* de dispersión polínica de los tres núcleos estudiados (Talayuelas, Landete y Cañete) se ajustaron mediante dos métodos indirectos basados en la estructura genética espacial de la nube de polen: TwoGener (Smouse *et al.* 2001, Austerlitz y Smouse 2002) y KinDist (Robledo-Arnuncio *et al.* 2006).

El primero de los métodos está basado en la estimación del grado de diferenciación genética de la nube de polen ( $\Phi_{it}$ ) que ha fertilizado a las madres objeto de estudio, y necesita de una estimación independiente de  $d_e$  (densidad efectiva poblacional de los árboles que aportan polen a la nube) (Austerlitz y Smouse 2002), dato complicado de obtener en campo ya que implica la estimación de la varianza del éxito reproductor. Por otro lado, el método TwoGener asume uniformidad en la fecundidad masculina y sincronía de floración, aspectos que generalmente no ocurren en las poblaciones de árboles forestales, como es el caso de estudio. El método KinDist está basado en una medida normalizada de paternidad correlacionada ( $r_p$ ) entre parejas de madres (Robledo-Arnuncio *et al.* 2006) y las estimaciones realizadas con este método se espera que sean más exactas que las obtenidas con TwoGener, porque además de ser independientes de  $d_e$ , KinDist no asume uniformidad en la fecundidad masculina ni sincronía floral.

#### 3.3.1.3. Variables de masa y de árbol individual que influyen sobre los parámetros del sistema reproductor

Se elaboró un análisis de componentes principales (PCA), para reducir el número de variables consideradas en cada árbol a un número inferior de variables derivadas que resuman la información de las originales. Los parámetros del sistema reproductor obtenidos ( $UO$ ,  $AS$ ,  $t_s$ ,  $t_m$ ,  $t_m-t_s$  y las dos estimaciones de  $r_p$ ) se correlacionaron mediante regresión lineal simple con las variables que caracterizan a cada masa, las variables biométricas medidas para cada árbol y con los dos ejes ( $PC1$  y  $PC2$ , que explican el 90,42% de la varianza observada) del PCA elaborado.

#### 3.3.1.4. Simulaciones

Con el objeto de investigar la posible influencia de otras variables, a nivel de árbol, sobre los valores de paternidad correlacionada ( $r_p$ ) obtenidos en las poblaciones analizadas, se han realizado varias series de simulaciones (descritas con detalle en *Material and Methods* del **Anejo I**). El escenario de partida es una población figurada con una densidad de 1.000 pies/ha y que ocupa una superficie cuadrada de 25 ha. En el centro de la masa se han generado 61 madres y a lo largo de la superficie se han distribuido 25.000 padres potenciales, separados una distancia mínima de 2 m. Además, se han considerado 720 descendientes muestreados en 61 familias, lo que representa el diseño de muestreo real.

1. En la primera serie de simulaciones se han tenido en cuenta, únicamente, diferencias en la **dispersión de polen** para la estimación de los valores de paternidad correlacionada. Para ello se han utilizado los parámetros de escala y forma ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que condicionan los *kernels* de dispersión ajustados en las poblaciones de Talayuelas y Landete (ver apartado 4.2.2. en *Resultados* de este documento) y los de un *kernel* de dispersión polínica que presenta una distancia de dispersión intermedia entre ambas poblaciones ( $\alpha=0,0150$  y  $\beta=0,2490$  para  $\delta=125,3$  m).
2. La segunda serie de simulaciones, añade al modelo variaciones en el **éxito reproductor** de los individuos masculinos. Estas diferencias han sido calculadas de manera proporcional a la altura total de los árboles y utilizando una función exponencial (como en Burczyk *et al.* 1996)

Finalmente, se introducen en el modelo variaciones fenológicas de los individuos en los escenarios simulados de dos formas diferentes:

3. **Variación fenológica simple** que considera dos situaciones respecto a la sincronización de los períodos de floración individual: i) solapamiento total para árboles sincronizados y ii) 20% de solapamiento al comienzo y al final de la floración masculina para aquellos individuos con una floración temprana o tardía. En este caso se ha seguido la metodología propuesta para *P. sylvestris* en Robledo-Arnuncio *et al.* (2004a) adaptada al pino negral en base a observaciones fenotípicas en esta especie.
4. **Variación fenológica compleja** que genera, mediante una distribución de Poisson, el número de flores femeninas susceptibles a la reproducción en un día dado del periodo de floración (similar a Hardy *et al.* 2004).

La parametrización de los modelos fenológicos se realizó a partir de observaciones tomadas durante los años 1999 y 2000 sobre *Pinus pinaster* en la Meseta Castellana (Miguel-Pérez *et al.* 2002).

### 3.3.2. Variación genética, demografía poblacional y estructura genética espacial a escala local o “fina” (SGS).

#### 3.3.2.1. Variación genética y demografía poblacional

Para cada población se ha calculado la riqueza alélica ( $A^s$ ) y el número de alelos únicos ( $A^U$ ) siguiendo un método de rarefacción que compensa la disparidad del tamaño de muestreo en las diferentes poblaciones analizadas, implementado en el programa HP-Rare (Kalinowski 2005). Las estimaciones de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ; Nei 1978), de la diferenciación genética entre poblaciones ( $F_{ST}$ ; Weir y Cocherham 1984) y del coeficiente de endogamia ( $F$ ) se realizaron mediante el programa SPAGeDi versión 1.2 (Hardy y Vekemans 2002). A su vez, se ha calculado para cada locus, y en cada población, el parámetro  $\theta=4N_e\mu$  (donde  $N_e$  es el tamaño efectivo poblacional y  $\mu$  es la tasa de mutación) que representa la tasa de mutación escalada por el tamaño efectivo poblacional y que se ha calculado siguiendo el método de Kimmel *et al.* (1998).

Por otro lado, se ha comprobado la existencia de una posible estructura poblacional tanto a nivel global como a nivel local utilizando un método de agrupación Bayesiana implementado en el programa STRUCTURE versión 2.2 (Pritchard *et al.* 2000). Este programa asigna los individuos de una muestra a una población de manera probabilística, sin ser necesaria, *a priori*, la información de la localización geográfica de dichos individuos. El número óptimo de unidades genéticas presentes en la muestra ( $K$ ) se ha determinado según Pritchard y Wen (2004) y en base a un estudio de simulación de Evanno *et al.* (2005). Las características de las iteraciones simuladas, los programas utilizados en la obtención del promedio de  $K$  y su representación gráfica vienen reflejados en el apartado *Material and Methods* del **Anejo II** de este documento.

El análisis demográfico de las poblaciones muestreadas se ha realizado mediante dos métodos diferentes que permiten la detección de cambios recientes o históricos en el tamaño efectivo de las poblaciones. El primero de ellos, desarrollado por Cornuet y Luikart (1996) e implementado en el programa BOTTLENECK, detecta reducciones recientes y bruscas en el tamaño efectivo de una población ('cuellos de botella') y se basa en la comparación entre la heterocigosidad esperada calculada y la heterocigosidad esperada si la población se encontrase en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los 'cuellos de botella' generan en las poblaciones un exceso temporal de heterocigotos, ya que al disminuir bruscamente el tamaño poblacional, los alelos raros se pierden a una tasa mucho mayor que la

heterocigosidad. Así, en una población que haya sufrido un 'cuello de botella' reciente, la heterocigosidad esperada calculada es mayor que la esperada en equilibrio (Luikart *et al.* 1998). Para detectar si en las poblaciones de estudio existen desviaciones significativas respecto a la hipótesis nula de población estable se han generado 10.000 valores de  $H_e$  a partir del número de alelos observado en cada población. Los valores de  $H_e$  simulados y los valores de  $H_e$  calculados se han comparado bajo dos modelos mutacionales: *IAM* (*Infinite Allele Model*) y *SMM* (*Stepwise-Mutation Model*) mediante el test no-parámtrico de los signos de Wilcoxon indicado para un número moderado tanto de loci (>4) como de individuos (15-40) (Piry *et al.* 1999).

El segundo procedimiento utilizado se apoya en un análisis de inferencia Bayesiana basado en la estimación de la probabilidad posterior de una distribución, es decir, la probabilidad de que dicha distribución sea la correcta. El cálculo de la probabilidad posterior implica evaluar todas las posibles distribuciones, y para cada una de ellas, investigar todas las posibles combinaciones de los parámetros demográficos y mutacionales del modelo. Esta estimación no se puede obtener analíticamente, pero se puede generar una aproximación de la probabilidad posterior mediante cadenas de Markov y métodos Monte Carlo (*Markov Chain Monte Carlo* ó *MCMC*). El método desarrollado por Beaumont (1999), e implementado en el programa MSVAR versión 0.4.1, asume que una población de tamaño inicial ( $N_i$ ), crece o disminuye hasta alcanzar su tamaño actual ( $N_0$ ) en el transcurso de  $t_a$  generaciones. El cambio demográfico puede realizarse de forma lineal o exponencial y se asume, a su vez, que los loci se comportan bajo un modelo mutacional paso a paso (*SMM*) con una tasa haplotípica de mutación escalada,  $\theta = 2N_0\mu$ , donde  $\mu$  es la tasa de mutación de cada locus. Bajo estas premisas de partida, y utilizando un enfoque Bayesiano basado en la teoría de la coalescencia, se puede estimar la distribución de la probabilidad posterior de los parámetros mutacionales y demográficos del modelo  $\phi = \{\theta, r, t_r\}$ , donde la tasa de cambio de tamaño poblacional ( $r = N_0/N_i$ ) y el tiempo transcurrido desde que comenzó el cambio ( $t_r = t_a/N_0$ ) están referidos al tamaño actual de la población ( $N_0$ ). Los valores y los límites de partida de los parámetros  $\theta$ ,  $r$  y  $t_r$ , del modelo, el cálculo de los cuantiles de las distribuciones posteriores de  $\log(r)$  y  $\log(t_r)$ , así como las características de las diferentes cadenas *MCMC* simuladas vienen especificados en el apartado *Material and Methods* del **Anejo II**.

La comprobación de la convergencia de las distintas *MCMC* de cada distribución posterior para los parámetros  $\log(r)$  y  $\log(t_r)$  se ha realizado de forma visual, ajustando la

distribución de cada cadena con el programa LOCFIT (Loader 2007) disponible como un paquete del software libre R (R Development Core Team 2007).

### 3.3.2.2. Estructura genética espacial a escala local o “fina” (SGS)

La estructura genética espacial (SGS) a escala fina de las cuatro zonas muestreadas se ha estimado mediante un análisis de las relaciones genéticas existentes entre los individuos de la muestra en relación al logaritmo de la distancia que los separa, a través de la construcción de autocorrelogramas (ver detalles en el apartado *Material and Methods* del **Anejo II**). El análisis fue llevado a cabo utilizando el coeficiente de parentesco (o estimador de coancestro  $\hat{F}_{ij}$ ), calculado como la correlación entre estados alélicos propuesta por J. Nason (Loiselle *et al.* 1995) para marcadores codominantes, que incluye una corrección para tamaños muestrales pequeños.

Las distancias espaciales entre individuos, entre 0 y 80 m, se dividieron en siete clases de distancia, y el  $\ln(\text{distancia})$  medio se calculó como el logaritmo natural de la distancia existente entre parejas de individuos dentro del intervalo. Los intervalos de confianza (al 95%) se han obtenido a partir de los errores estándar aproximados para las estimaciones multi-locus en cada clase de distancia. Estos cálculos se han efectuado mediante un procedimiento de remuestreo (*jackknife*), que elimina la información de un locus en cada iteración. Los cálculos de SGS se realizaron con el software SPAGeDi v.1.2 (Hardy y Vekemans 2002)

Por otro lado, la SGS se cuantificó utilizando el estadístico ‘ $Sp$ ’ que se define como la relación  $-\hat{b}_F / (1 - \hat{F}_{(1)})$ , donde  $\hat{b}_F$  es la pendiente de la regresión de los coeficientes  $\hat{F}_{(r)}$  frente al logaritmo de la distancia y  $\hat{F}_{(1)}$  es la media del coeficiente  $\hat{F}_{ij}$  entre los individuos incluidos en el primer intervalo de distancia y que suele contener a todas las parejas de vecinos (Vekemans y Hardy 2004). Por tanto, este estadístico ‘ $Sp$ ’ representa la tasa de disminución del coeficiente de parentesco con la distancia y está poco influenciado por el tipo de estrategia de muestreo utilizada, lo que es una ventaja respecto a otros estadísticos (e.j. Moran’s  $I$ ). A su vez, este estimador está relacionado con el sistema de reproducción característico de cada especie, su forma de vida, el tipo de dispersión de polen y semilla y con la densidad, y debido a su independencia del escenario de muestreo, permite una comparación de la SGS entre poblaciones, entre especies (Vekemans y Hardy 2004) y dentro de la misma población a lo largo del tiempo (Troupin *et al.* 2006). Asumiendo un

patrón de aislamiento por distancia y equilibrio entre la deriva y el flujo genéticos, el estadístico 'Sp' puede utilizarse también para estimar los parámetros de dispersión, y se espera que sea igual a  $1/N_b$  (siendo  $N_b$  el tamaño de vecindario de Wright) cuando se analiza en una escala adecuada (Heuertz *et al.* 2003).

### 3.3.2.3. Contribución de semilla vs. polen al flujo genético global

Los modelos teóricos de aislamiento por distancia predicen que las relaciones de parentesco entre los individuos de una población decrecen de forma lineal en relación a la distancia en escala logarítmica, a una tasa inversamente proporcional a  $N_b = 4\pi D_e \sigma_g^2$ , donde  $D_e$  es la densidad efectiva poblacional,  $\sigma_g^2$  es la distancia axial media de la dispersión genética al cuadrado, y  $N_b$  es el tamaño de vecindario de Wright (Wright 1943). Sin embargo, está demostrado que esta relación lineal sólo es válida cuando las relaciones de parentesco se observan dentro del intervalo de distancia  $\sigma_g - \sigma_g / (2\mu)^{1/2}$ , donde  $\mu$  es la tasa de mutación (Rousset 1997; 2000). Fuera de este rango de distancias, especialmente a distancias inferiores a  $\sigma_g$ , las desviaciones de la relación lineal dependen en gran medida de la contribución relativa de la dispersión de semilla vs. la dispersión de polen al flujo genético total (Heuertz *et al.* 2003). En concreto, cuando el alcance de la dispersión de semilla es mucho más reducido que el del polen, los coeficientes de parentesco decrecen más rápidamente con el logaritmo de la distancia cuanto más cortas son esas distancias, dando lugar a unas curvas de dispersión iniciales cóncavas, que a medida que la contribución de la dispersión de semilla frente a la de polen se va incrementando, pasan a ser convexas.

Para estimar la contribución de semilla vs. polen al flujo genético total a partir de la SGS obtenida en las poblaciones muestreadas, se ha llevado a cabo la metodología propuesta por Heuertz *et al.* (2003), descomponiendo los autocorrelogramas en dos factores: pendiente y forma. La pendiente obtenida informa sobre el nivel global del flujo genético, mientras que la forma aporta información respecto a las contribuciones relativas de semilla y polen al flujo genético total. La forma de la curva de dispersión se ha examinado a través de los residuos del coeficiente de parentesco en función de la distancia. El cálculo de los errores residuales se ha efectuado para cada pareja de individuos, a partir de la diferencia entre los valores observados y estimados del coeficiente de parentesco, donde las estimaciones de  $\hat{F}_i$  se han obtenido a partir del ajuste, a una regresión lineal, de los coeficientes de parentesco a lo largo del rango completo de distancia. Según esta

metodología, las funciones de regresión polinómicas de tercer grado (e.d.  $y = a + bx + cx^2 + dx^3$ ) nos proporcionan información sobre la forma de la curva parentesco-distancia, por lo que en un segundo paso, los residuales obtenidos se han ajustado a dicha función.

#### 3.3.2.4. *Simulaciones*

Con el objeto de determinar si los procesos históricos (e.j. tiempo de colonización) poseen una mayor o menor influencia que los factores locales (e.j. tamaño poblacional, aislamiento o éxito reproductor de los individuos adultos) en la formación de la estructura genética espacial, se han simulado diferentes escenarios poblacionales, utilizando para ello el programa SIMNEW desarrollado por el Dr. Olivier Hardy (Universidad Libre de Bruselas, Bélgica) y utilizado en (Heuertz *et al.* 2003) (ver detalles en *Material and Methods* del **Anejo II**).

Las poblaciones teóricas de partida mantienen una densidad constante de 173 pies/ha (densidad máxima con que se cuenta en las poblaciones reales, ver Tabla 3.2 de este documento) cuyos individuos están dispuestos sobre una malla cuadrada con una separación entre ellos de 7,6 m, diseño que mantiene la densidad real de las poblaciones. Los genotipos de los individuos simulados son asignados por el programa de forma aleatoria (20 loci y 20 alelos por locus) y presentan frecuencias alélicas similares. Cada individuo posee una tasa de supervivencia a la siguiente generación del 80% (ver detalles en Heuertz *et al.* 2003, sobre la forma de reemplazar un suceso de mortalidad por un nuevo individuo) y una tasa de polinización cruzada del 100%. La forma de dispersión genética en las poblaciones simuladas se ha definido mediante los parámetros de escala y de forma ( $\alpha$  y  $\beta$ ) obtenidos a partir de sendos ajustes de los *kernels* de dispersión de semilla y polen de *P. pinaster* a una función exponencial-potencial en trabajos empíricos previos. Así, para las semillas se han utilizado  $\alpha=6.09$  y  $\beta=1$  (Tabla 2 en González-Martínez *et al.* 2006), que corresponden a una distancia media de dispersión de 12,19 m, y para el polen  $\alpha=0,0028$  y  $\beta=0,2229$  (de-Lucas *et al.* 2008) que corresponden a una distancia media de dispersión de 111,9 m.

A partir de estos parámetros iniciales se han simulado 1.000 generaciones (100 réplicas por generación) de diversos escenarios poblacionales creados a partir de las combinaciones de los siguientes factores locales:



1. **Tamaño poblacional.** Se han considerado seis tamaños poblacionales que representan desde una población con menos individuos que la población marginal de menor tamaño muestreada (Fuentelapeña) hasta una población continua con un elevado número de árboles (Cuéllar u Olba) y que se corresponden con los siguientes números de individuos: 100 (10x10), 225 (15x15), 900 (30x30), 4.900 (70x70), 22.500 (150x150) y 90.000 (300x300).
2. **Aislamiento genético.** Se han definido cuatro situaciones de variación de flujo genético en las poblaciones simuladas, que describen desde poblaciones completamente aisladas (sin flujo genético) hasta poblaciones con un elevado flujo genético (inmigración del 40% de la semilla y del 85% del polen, ver González-Martínez *et al.* 2006). También se ha considerado dos situaciones intermedias entre ambas (inmigración del 5% y 20% de la semilla y del 20% y 40% del polen).
3. **Variación en el éxito reproductor.** Debido al elevado tiempo y recursos informáticos que consumen las simulaciones elaboradas, y a que este parámetro no muestra gran influencia en la SGS generada (ver Resultados) la variación en el éxito reproductor únicamente se ha simulado sobre la población de 225 individuos y en las condiciones más restrictivas de flujo genético (sin inmigración de semilla y polen). En este caso se ha considerado un amplio rango de variación en el éxito reproductor (de 5 a 35), estimado como la varianza del número total de descendientes por individuo.

Posteriormente, la SGS de las poblaciones simuladas se ha cuantificado mediante el estadístico  $S_p = -\hat{b}_F / (1 - \hat{F}_{(1)})$ , donde  $\hat{F}_{(1)}$  se ha calculado como el promedio del coeficiente  $\hat{F}_{ij}$  entre los individuos incluidos en el primer intervalo de distancia de las 100 repeticiones de cada generación simulada, y la pendiente de las regresiones se ha calculado a partir de la siguiente expresión:

$$b_r = \frac{\sum n_k (x_k - \bar{x})(\bar{F}_k - \bar{F})}{\sum n_k (x_k - \bar{x})^2}$$

donde,  $n_k$  es el número de individuos incluidos en la clase de distancia  $k$ ;  $x_k$  es la media en metros del  $\ln(\text{distancia})$  entre individuos;  $\bar{x}$  es la media de  $x_k$  ponderada por el

número de individuos de cada clase de distancia ( $\bar{x} = \sum_k n_k x_k / \sum_k n_k$ );  $\bar{F}_k$  es la media de las 100 réplicas del coeficiente de parentesco ( $\hat{F}_{ij}$ ) de cada generación simulada y  $\bar{F}$  es la media de  $\hat{F}_{ij}$  ponderada por el número de individuos existentes en cada clase de distancia ( $\bar{F} = \sum_k n_k \bar{F}_k / \sum_k n_k$ ).

La estructura genética espacial se ha calculado sobre el rango completo de distancia de las poblaciones, y, con el objeto de detectar divergencias con los análisis efectuados cuando la SGS se estudia en las distancias más cortas, en la clase de distancia 0-100 m, muestreo común en los estudios empíricos de SGS y similar al de este estudio.

## 4 RESULTADOS





## 4. RESULTADOS

### 4.1. TESTADO DE LOS MARCADORES Y DETECCIÓN DE ALELOS NULOS

De los seis marcadores microsatélites nucleares utilizados, *Frpp91* muestra una deficiencia significativa de heterocigosis ( $p < 0,01$ ) en las cuatro poblaciones en las que se ha analizado la variación genética, la demografía poblacional y la estructura genética espacial a escala local o "fina" (SGS) del pino negral. El programa MicroCheker no ha detectado, en ningún caso, potenciales errores de lectura, por lo que el exceso de homocigosis que manifiesta este marcador es atribuible únicamente a la presencia de alelos nulos. Para evitar que las desviaciones de las frecuencias alélicas de este microsatélite debidas a la existencia de alelos nulos se confundan con procesos genéticos de interés, como la existencia de endogamia dentro de poblaciones, se ha eliminado de todos los análisis.

### 4.2. SISTEMA DE REPRODUCCIÓN Y FLUJO GENÉTICO

#### 4.2.1. Parámetros del sistema reproductor

Los porcentajes de  $UO$  y de  $AS$  de los 61 individuos analizados varían entre 0,9%-51,0% y 0,7%-16,6% respectivamente (ver Tabla S2 en *Supplementary Information* del **Anejo I**), sin embargo, los rangos de variación disminuyen notablemente a nivel de parcela y de población. Los valores medios de las tasas de polinización cruzada en las tres poblaciones de estudio son elevadas ( $t_m \sim 98\%$  y  $t_s \sim 94\%$ ) y las medias de endogamia biparental bajas ( $t_m - t_s \sim 4\%$ ). Las tasas de paternidad correlacionada calculadas oscilan entre 0,018 y 0,048 dependiendo de la población y del método de estimación, lo que puede ser trasladado a un número efectivo poblacional de padres ( $N_{ep} = 1/r_p$ ) de entre 21 y 56 aproximadamente. Las estimaciones de  $r_p$  realizadas mediante los métodos de Ritland y Hardy guardan una correlación significativa, en especial con valores de  $r_p$  superiores a 0,07 (Pearson  $r > 0,82$ ), y, en todas las poblaciones, las estimaciones realizadas con el método de Ritland (2002) revelan valores inferiores a las realizadas con el método de Hardy *et al.* (2004). En la Tabla 4.1 puede observarse un resumen de las medias de las seis variables calculadas por población.

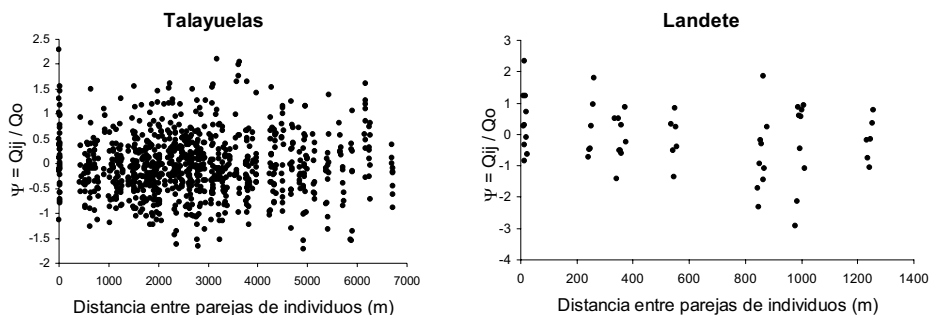
**Tabla 4.1.** Parámetros del sistema reproductor en tres poblaciones de pino resinero.  $UO$ : porcentaje de óvulos sin fertilizar;  $AS$ : porcentaje de semillas abortadas;  $t_m$ : tasa de polinización cruzada multi-locus;  $t_s$ : tasa de polinización cruzada uni-locus;  $t_m-t_s$ : endogamia biparental y  $r_p$ : paternidad correlacionada entre individuos de progenie materna.

Población	$UO$ (%)	$AS$ (%)	$t_m$ (SD)	$t_s$ (SD)	$t_m-t_s$	$r_p$	
						Hardy et al. (2004)	Ritland (2002)
Talayuelas	8,55	5,10	0,979 (0,011)	0,911 (0,019)	0,068	0,057	0,033
Landete	6,46	6,28	0,951 (0,040)	0,941 (0,043)	0,010	0,023	0,010
Cañete	7,61	4,15	1,000 (0,000)	0,960 (0,020)	0,040	0,063	0,010
Media (SD)	7,54 (1,05)	5,18 (1,07)	0,977 (0,025)	0,937 (0,025)	0,040 (0,030)	0,048 (0,022)	0,018 (0,013)

A pesar de que la población de Landete refleja valores medios más altos de  $AS$  y valores medios más bajos en  $t_m$ ,  $t_m-t_s$  y  $r_p$  que Talayuelas y Cañete, estas diferencias no son significativas según manifiesta el análisis de la varianza realizado. Por otro lado, el análisis jerarquizado de componentes de la varianza llevado a cabo, muestra que el 99-100% de la variación de los parámetros del sistema reproductor analizados se recoge a nivel de individuo, no encontrándose variabilidad significativa debida a la parcela o a la población.

#### 4.2.2. Kernel de dispersión polínica

El análisis de la estructura de la nube de polen muestra similares resultados con los dos métodos indirectos utilizados: TwoGener y KinDist. Los *kernels* de dispersión polínica se han conseguido ajustar en las poblaciones de Talayuelas y Landete (Figura 4.1), pero no se alcanzó la convergencia en Cañete debido, posiblemente, a la ausencia de parejas de individuos intermedios en la distribución de las madres de esta población. Según las predicciones teóricas, bajo una dispersión restringida de semilla, las tasas normalizadas de paternidad correlacionada ( $\psi$ ) entre parejas de madres muestran una correlación negativa con la distancia. Aplicando el test de Mantel, esta correspondencia es estadísticamente significativa en Talayuelas ( $r=-0,16$ ,  $P=0,019$ ), pero no en Landete ( $r=-0,15$ ;  $P=0,147$ ), debido probablemente al reducido número de madres muestreadas en esta localidad (43 madres en Talayuelas frente a 11 madres en Landete).



**Figura 4.1.** Relaciones de paternidad correlacionada ( $\psi$ ) en función de la distancia entre parejas de madres en las poblaciones de Talayuelas y Landete.

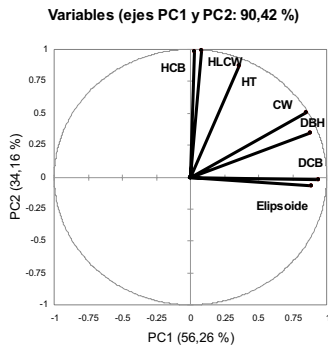
Las estimaciones de los parámetros de escala ( $\alpha$ ) y de forma ( $\beta$ ) obtenidos para la función exponencial-potencial ajustada, así como las distancias medias de dispersión ( $\delta$ ) de las dos poblaciones donde el ajuste converge, y de un análisis conjunto de las mismas, vienen reflejadas en la Tabla 4.2. El parámetro de forma es prácticamente similar en las tres funciones estimadas ( $\beta \sim 0,24$ ), lo que indica distribuciones leptocúrticas con un apuntamiento mayor al de una distribución exponencial ( $\beta=1$ ). Las distancias medias de dispersión obtenidas varían entre 78,4 m en Talayuelas y 174,4 m en Landete, con una distancia intermedia de 111,9 m para el análisis conjunto de las poblaciones.

**Tabla 4.2.** Parámetros de escala ( $\alpha$ ), forma ( $\beta$ ) y distancias medias de dispersión polínica ( $\delta$ ) obtenidos con el método KinDist para Talayuelas, Landete y para un análisis conjunto de estas dos poblaciones.

	$\alpha$	$\beta$	$\delta$ (m)
Talayuelas	0,0074	0,2445	78,4
Landete	0,0244	0,2520	174,4
Todas las poblaciones	0,0028	0,2229	111,9

#### 4.2.3. Variables de masa y de árbol individual que influyen sobre los parámetros del sistema reproductor

El 90,42% de la variación total de los datos biométricos que caracterizan las 61 madres muestreadas queda resumida en los dos primeros factores del análisis de componentes principales realizado (Figura 4.2). La componente *PC1* explica el 56,26% de la varianza y en ella se agrupan las variables relativas a los diámetros y a la copa, mientras que el factor *PC2* explica el 34,16% de la variación y está relacionado con las variables de altura. Los factores de carga de cada una de las variables en los dos ejes del *PCA* tras rotación Varimax vienen reflejados en la Tabla 4.3.



**Tabla 4.3.** Contribución de las variables biométricas analizadas tras rotación varimax en los dos ejes que en total explican el 90,42% de la variación.

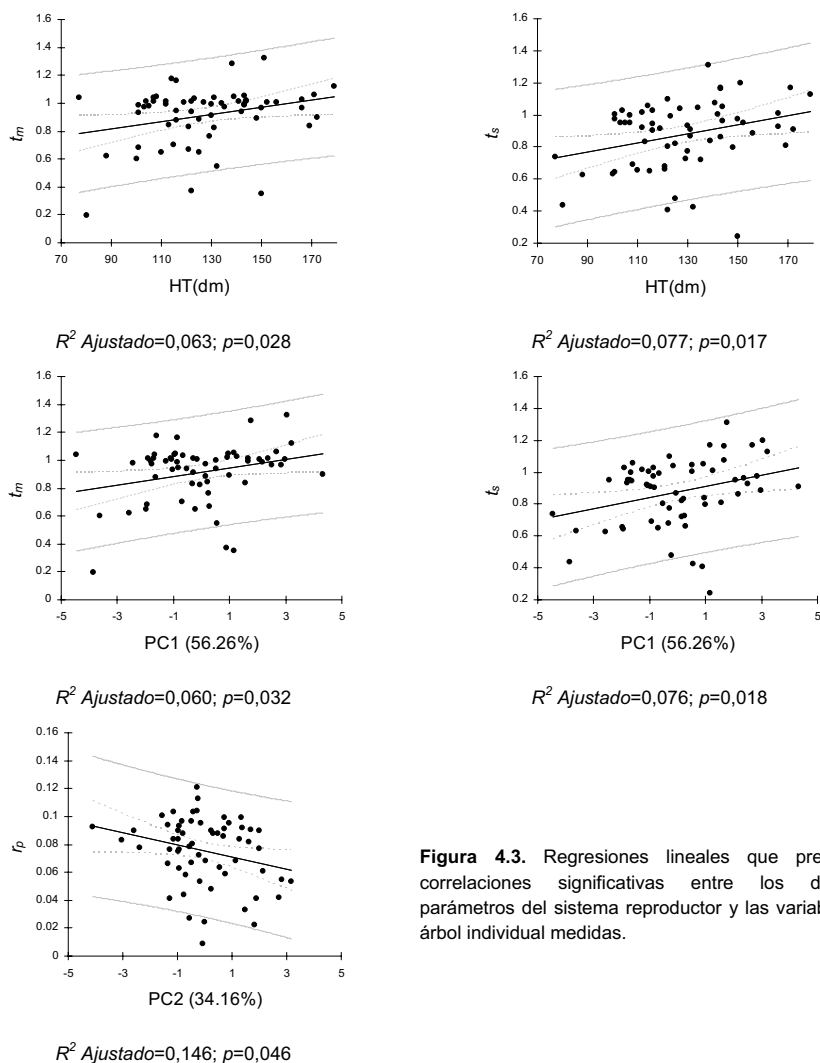
	PC1 (56,26%)	PC2 (34,16%)
HCB	-0,015	0,985
HLCW	0,036	0,989
DCB	0,932	0,020
DBH	0,853	0,379
HT	0,334	0,892
CW	0,609	0,510
Elipsoide	0,907	-0,025

**Figura 4.2.** Análisis de componentes principales de las siete variables biométricas consideradas en los individuos adultos.

Los análisis de regresión lineal efectuados entre los parámetros del sistema reproductor ( $UO$ ,  $AS$ ,  $t_m$ ,  $t_s$ ,  $t_m-t_s$  y  $r_p$ ) y las variables de masa consideradas (altitud, pendiente, exposición, densidad y  $FCC$ ) únicamente muestran una correlación significativa entre las tasas de polinización cruzada multi-locus ( $R^2$  Ajustado=0,143;  $p=0,038$ ) y uni-locus ( $R^2$  Ajustado=0,146;  $p=0,037$ ) y el número de pies por hectárea. Sin embargo, estas correlaciones negativas, además de débiles, dejan de ser significativas cuando se eliminan del análisis dos parcelas de Talayuelas que presentan una elevada densidad (P16101=2.249 pies/ha y P16002=1.924 pies/ha) y unas tasas de polinización cruzada inusualmente bajas ( $t_m=0,784$  y  $t_s=0,790$  en P16101;  $t_m=0,618$  y  $t_s=0,600$  en P16002).



A nivel individual (árbol), las tasas de polinización cruzada se correlacionan de forma positiva con la altura total de los individuos y con el eje *PC1* que está relacionado con las variables relativas al diámetro y a la copa. Por otro lado, la tasa de paternidad correlacionada estimada según el método de Ritland muestra una correlación negativa con el eje *PC2* que agrupa la información relativa a las variables de altura (Figura 4.3). Sin embargo, estas correlaciones son muy débiles y no explican gran cantidad de la varianza total como muestran los bajos coeficientes de  $R^2$  Ajustado.



**Figura 4.3.** Regresiones lineales que presentan correlaciones significativas entre los distintos parámetros del sistema reproductor y las variables de árbol individual medidas.

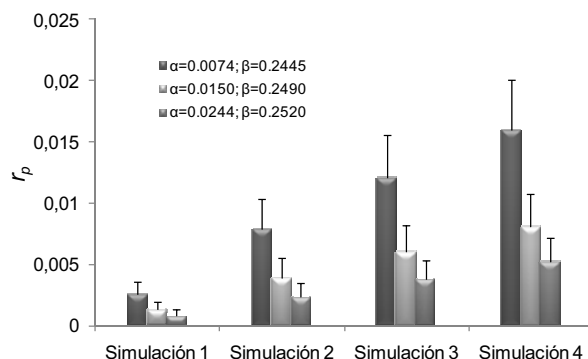
#### 4.2.4. Simulaciones

La posible influencia de factores no considerados hasta el momento sobre la paternidad correlacionada de *Pinus pinaster*, se ha examinado mediante un conjunto de simulaciones. Los resultados de los valores de  $r_p$  obtenidos en las simulaciones vienen reflejados en la Tabla 4.4 y en la Figura 4.4.

**Tabla 4.4.** Estimaciones de  $r_p$  obtenidas en los diferentes escenarios simulados con los tres *kernel*s de dispersión polínica ajustados en a) Talayuelas, c) Landete y b) *kernel* ajustado para una distancia de dispersión polínica intermedia entre los *kernel*s a y b. Los valores medios de  $r_p$  y su desviación estándar para las 61 familias simuladas han sido calculados mediante 1.000 iteraciones en cada caso.

Escenarios simulados	$r_p$		
	<i>Kernel a</i>	<i>Kernel b</i>	<i>Kernel c</i>
0 Panmixia Homogeneidad en sucesos reproductivos entre parentales	0,000033±0,000248		
1 Restricción en la dispersión de polen Producción de polen constante entre adultos Sincronía fenológica y floral	0,0026 ±0,0076	0,0013 ±0,0050	0,0008 ±0,0037
2 Restricción en la dispersión de polen Variación en la producción de polen de los adultos Sincronía fenológica y floral	0,0079 ±0,0188	0,0039 ±0,0113	0,0023 ±0,0079
3 Restricción en la dispersión de polen Variación en la producción de polen de los adultos Variación fenológica simple	0,0120 ±0,0286	0,0060 ±0,0165	0,0037 ±0,0116
4 Restricción en la dispersión de polen Variación en la producción de polen de los adultos Variación fenológica compleja	0,0160 ±0,0360	0,0081 ±0,0209	0,0052 ±0,0147

El primer conjunto de datos simulados (1) da lugar a unos valores de  $r_p$  muy bajos (0,0026-0,0008), por lo que una dispersión restringida de polen no es causa suficiente para explicar los valores de paternidad correlacionada observados en nuestras poblaciones, dados los *kernel*s de dispersión ajustados. La introducción en el modelo de variaciones en el éxito reproductor masculino, hace que las estimaciones de paternidad correlacionada aumenten, pero siguen permaneciendo muy por debajo de los valores de  $r_p$  observados. Sólo se consiguen alcanzar valores de paternidad correlacionada próximos a los reales, cuando se consideran, además de las premisas anteriores, variaciones en la sincronía de floración de los individuos simulados ( $r_p=0,0120-0,0037$  en el caso en que la variación fenológica se simula de forma simple y  $r_p=0,0160-0,0052$  en el caso de la simulación sea más compleja).



**Figura 4.4.** Representación gráfica de los valores de  $r_p$  obtenidos en los cuatro escenarios simulados con los tres *kernels* de dispersión polínica ajustados,  $\alpha$  y  $\beta$  son los coeficientes de escala y forma de los *kernels* de dispersión.

### 4.3. VARIACIÓN GENÉTICA, DEMOGRAFÍA POBLACIONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL A ESCALA LOCAL O “FINA” (SGS)

#### 4.3.1. Variación genética y demografía poblacional

La variación genética nuclear encontrada en las cuatro poblaciones de pino negral analizadas no se ajusta a las predicciones del modelo de colonización ‘*leading edge*’, al menos, en términos de heterocigosidad esperada, ya que este parámetro presenta valores muy similares en todas ellas ( $H_e \sim 0,75$ ). En cambio, sí que existe una ligera pérdida de riqueza alélica ( $A$  y  $A^S$ ) en las poblaciones del frente colonizador en relación a las poblaciones del Este peninsular, tendencia que se detecta con mayor intensidad en el caso del número de alelos únicos ( $A^U$ ), especialmente en la población de Quatretonda. Este patrón también se ve reflejado en los valores medios del parámetro de mutación escalada poblacional, ya que mientras las poblaciones cercanas al refugio alcanzan un valor medio de  $\hat{\theta}_H = 14,45$ , la zona de Meseta Castellana disminuye hasta un valor medio de  $\hat{\theta}_H = 11,11$  (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5.** Estimadores de variación genética calculados con cinco microsatélites nucleares en las cuatro poblaciones de estudio. *N*: Número de observaciones; *A*: Riqueza alélica; *A<sup>S</sup>* y *A<sup>U</sup>*: Riqueza alélica y número de alelos únicos calculados según un método de rarefacción (Kalinowski 2005); *H<sub>e</sub>*: Heterocigosidad esperada según Nei (1978);  $\hat{\theta}_n$ : parámetro de mutación escalada poblacional (Kimmel *et al.* 1998); *F*: coeficiente de endogamia (Hardy y Vekemans 2002); *F<sub>ST</sub>*: Coeficiente de diferenciación genética según Weir y Cocherham (1984).

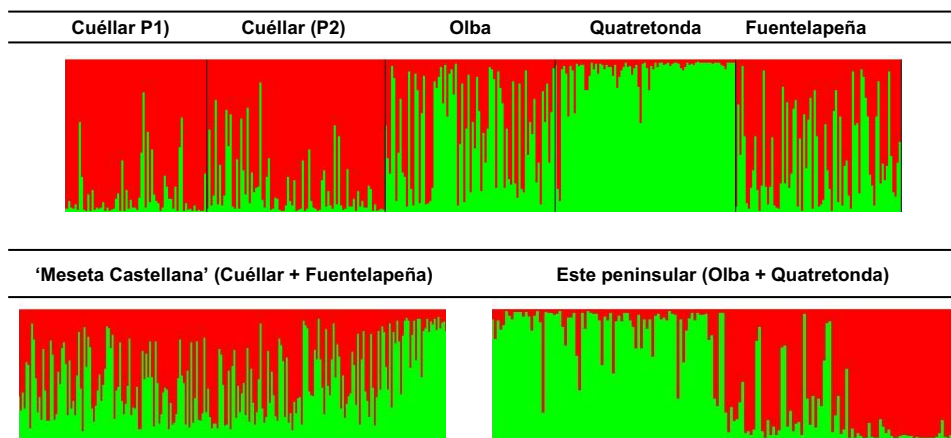
		Localidad	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>A<sup>S</sup></i>	<i>A<sup>U</sup></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	$\hat{\theta}_n$	<i>F</i>	<i>F<sub>ST</sub></i>		
										Cu	Fu	OI
Meseta Castellana	Central	Cu	151	10,2	8,9	0,6	0,758	12,00	0,117	-	-	-
	Marginal	Fu	59	8,0	7,9	0,4	0,734	10,22	0,181	0,028	-	-
<b>Media Regional</b>				<b>9,1</b>	<b>8,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,746</b>	<b>11,11</b>	<b>0,149</b>			
Este peninsular	Central	OI	70	10,0	9,7	0,8	0,754	12,82	0,065	0,020	0,023	-
	Marginal	Qu	67	10,8	10,4	2,3	0,743	16,08	0,028	0,041	0,090	0,060
<b>Media Regional</b>				<b>10,4</b>	<b>10,05</b>	<b>1,6</b>	<b>0,748</b>	<b>14,45</b>	<b>0,047</b>			
<b>Media Global</b>				<b>9,8</b>	<b>9,2</b>	<b>1,0</b>	<b>0,747</b>	<b>12,78</b>	<b>0,098</b>			<b>0,044</b>

Los valores de *F<sub>ST</sub>* obtenidos indican que las poblaciones cercanas al refugio glaciar están más diferenciadas entre sí (*F<sub>ST</sub>*=0,060) que las del Oeste (*F<sub>ST</sub>*=0,028), lo que tampoco es acorde con las predicciones del modelo 'leading edge', que prevé una mayor diferenciación genética regional en las poblaciones de nueva colonización que en las situadas en el origen.

Los resultados obtenidos tampoco concuerdan en su totalidad con el modelo de fragmentación 'centro-periferia', ya que, aunque no existen claras diferencias en los valores de heterocigosidad entre las cuatro poblaciones analizadas, sí que existe una mayor diferenciación entre las poblaciones marginales que entre las continuas (*F*=0,090 vs. 0,020).

Los valores que presenta el coeficiente de endogamia son moderados (*F*=0,028-0,117), salvo en la población de Fuentelapeña (*F*=0,181), lo que podría estar relacionado con una fuerte estructura familiar posiblemente debida a una reciente fragmentación.

El análisis de agrupación de individuos realizado con el programa STRUCTURE ha diferenciado claramente las dos regiones estudiadas (Este de España y 'Meseta Castellana'), cuando se consideran dos grupos (valor óptimo de *K* según el método de Evanno). Al realizar el análisis dentro de regiones el programa sólo fue capaz de encontrar diferencias entre Olba y Quatretonda, poblaciones ubicadas en el hipotético refugio glaciar (Figura 4.5). Por último, la metodología empleada no ha detectado signos de sub-estructuraciones poblacionales, lo que sugiere que cada población está compuesta por un único 'pool' genético (ver *Supplementary Material* del **Anejo II**).



**Figura 4.5.** Análisis de agrupación de individuos realizado con el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) y visualizado con el programa DISTRUCT (Rosenberg 2004), para un número óptimo de agrupaciones  $K=2$  (Pritchard y Wen 2004; Evanno *et al.* 2005).

El análisis demográfico realizado con el programa BOTTLENECK refleja que, bajo un modelo mutacional de alelos infinito (*IAM*), las poblaciones de 'Meseta Castellana' podrían encontrarse bajo los efectos de un 'cuello de botella' reciente, aunque no se detectan signos significativos de exceso de heterocigosis ( $p < 0,05$ ) bajo un modelo mutacional *SMM* (Tabla 4.6). Por otro lado, los valores negativos de los cuantiles al 5% y 95% de la tasa de cambio poblacional ( $\log_{10}(r)$ ) obtenidos con el método de Beaumont (1999), muestran claras contracciones en todas las poblaciones analizadas, independientemente del modelo (exponencial o lineal) utilizado (ver Tabla 4.6 y Figura 4.6 para el modelo exponencial y *Supplementary Material* del **Anejo II** para el modelo lineal).

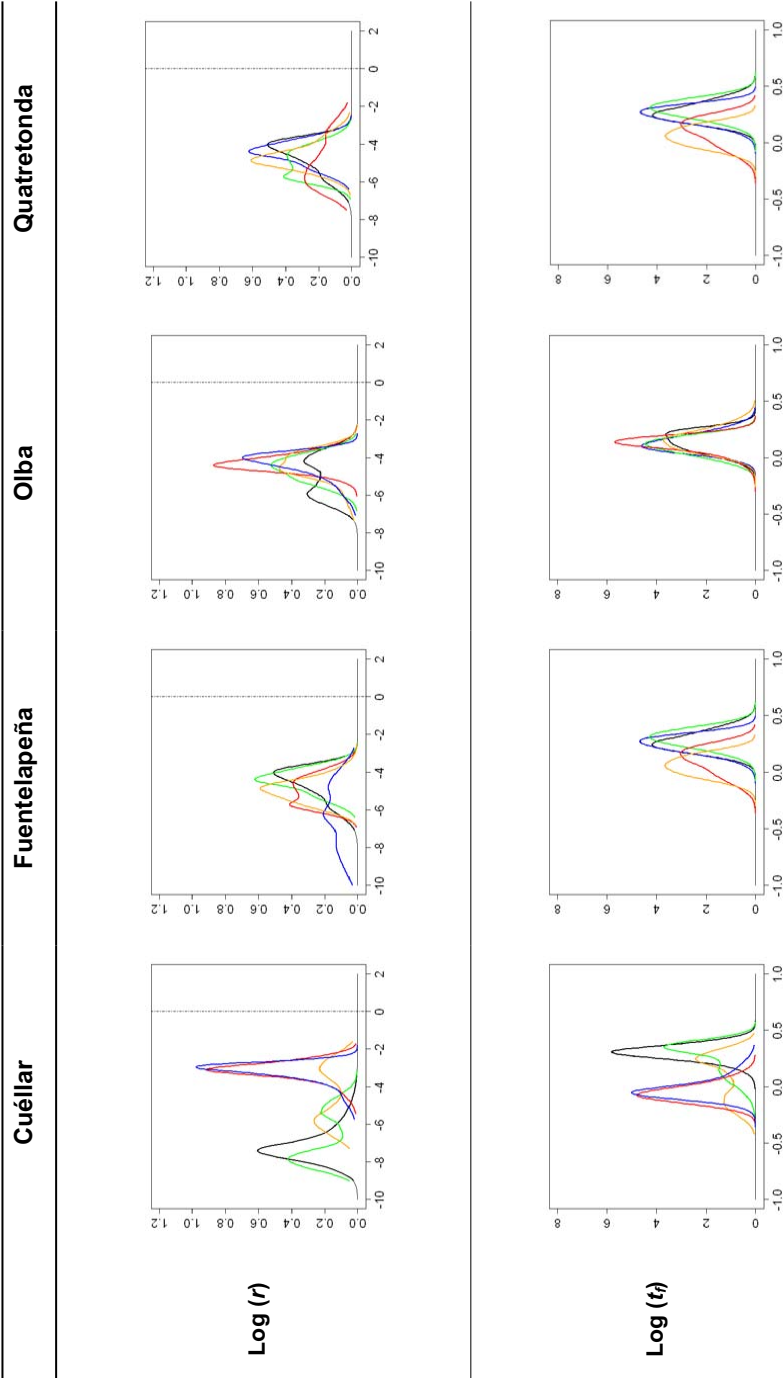
Según este último método, el tamaño actual ( $N_0$ ) de las poblaciones localizadas cerca del refugio glacial es del orden de  $\sim 46.000$  veces inferior al tamaño a partir del cual comenzó su colapso poblacional ( $N_T$ ), alcanzando en el caso de las poblaciones de 'Meseta Castellana' una intensidad de contracción media de  $\sim 125.000$ . Además, si se considera una tasa de mutación escalada poblacional media para todas las poblaciones de  $\hat{\theta}_n = 12,78$  (Tabla 4.5), un valor medio del tiempo transcurrido desde el comienzo del cambio de  $t_f = 1,57$  y se asume una tasa de mutación media para microsatélites nucleares  $\mu = 5,5 \cdot 10^{-3}$  (promedio entre los valores  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  indicados para especies de plantas, Cloutier *et al.* 2003), este 'cuello de botella' histórico pudo ocurrir aproximadamente hace unas 900 generaciones, o

hace 22.500 años, si consideramos 25 años/generación para *Pinus* como en Brown *et al.* (2004) o Willyard *et al.* (2006).

**Tabla 4.6.** Probabilidad de exceso de heterocigosidad según el Test de Wilcoxon asumiendo que los loci se ajustan a un modelo de alelos infinitos (IAM) y a un modelo de mutación paso a paso (SMM). Cuantiles al 5%, 50% y 95% (desviaciones estándar entre paréntesis) de la distribución posterior de los parámetros demográficos  $\log(r)$  y  $\log(t)$  calculados a partir de las 5 simulaciones independientes de MCMC asumiendo un cambio de tamaño poblacional exponencial y un modelo mutacional paso a paso (SMM).

Pop	Probabilidad exceso $H_e$ ( $p < 0,05$ )		Modelo exponencial						$r = N_0/N_1$	$t = t_a/N_0$
			$\text{Log}_{10}(r)$			$\text{Log}_{10}(t)$				
			IAM	SMM	5%	50%	95%	5%		
Cu	0,031	ns	-6,689 (1,939)	-5,163 (2,117)	-3,387 (1,441)	-0,089 (0,172)	0,129 (0,175)	0,309 (0,143)	$6,86 \cdot 10^{-6}$	1,35
Fu	0,047	ns	-6,780 (1,482)	-5,015 (0,707)	-3,581 (0,148)	0,139 (0,031)	0,308 (0,061)	0,466 (0,095)	$9,66 \cdot 10^{-6}$	2,04
OI	ns	ns	-6,114 (0,726)	-4,505 (0,286)	-3,351 (0,099)	-0,028 (0,020)	0,131 (0,017)	0,278 (0,043)	$3,12 \cdot 10^{-5}$	1,35
Qu	ns	ns	-6,224 (0,449)	-4,777 (0,351)	-3,223 (0,437)	0,024 (0,130)	0,197 (0,105)	0,351 (0,100)	$1,67 \cdot 10^{-5}$	1,57

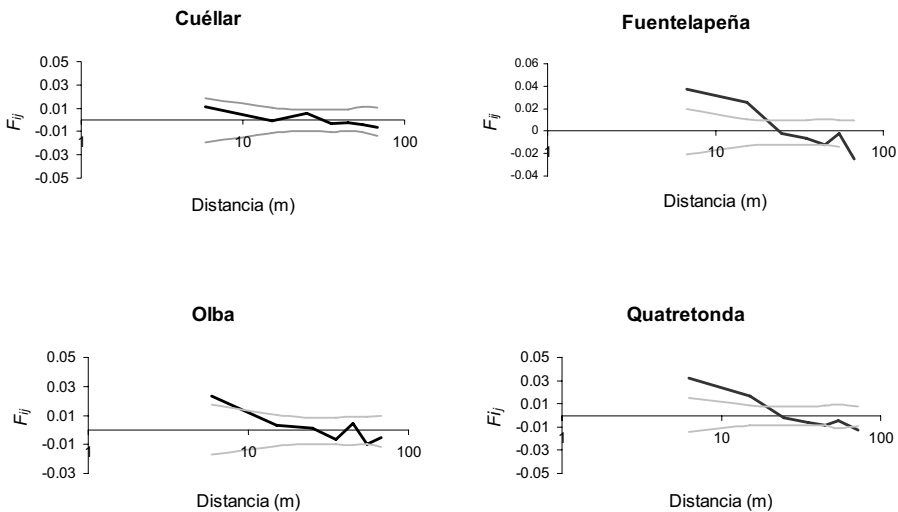
ns: no significativo



**Figura 4.6.** Distribuciones posteriores para un modelo exponencial **a)** de la tasa de cambio del tamaño efectivo poblacional,  $\log(N_e/N_t)$ . La línea vertical discontinua representa una población sin cambios ( $\log(N_e/N_t)=0$ ), **b)** del tiempo transcurrido desde que la población comenzó a decrecer ( $\log(t_i)$ ).

### 4.3.2. Estructura genética espacial a escala local o “fina” (SGS)

Los patrones de SGS que muestran los autocorrelogramas elaborados (Figura 4.7) son diferentes entre las poblaciones estudiadas, obteniéndose una distribución no aleatoria de genotipos en las dos poblaciones marginales (Fuentelapeña y Quatretonda) y, de forma menos intensa, en la población continua situada cerca del refugio glaciar (Olba), pero no en la población continua del frente colonizador (Cuéllar). Las poblaciones marginales presentan valores similares del coeficiente de co-ancestro ( $F_{ij}$ ) y éstos son significativos en las dos primeras clases de distancia (20 m;  $p < 0,05$ ) mientras que en la población continua de Olba, la estructura intrapoblacional es ligeramente inferior y se limita a distancias más cortas (10 m;  $p < 0,05$ ). Por otro lado, no se han observado diferencias en la SGS de las dos réplicas instaladas en la población continua de Cuéllar.



**Figura 4.7.** Autocorrelogramas de las cuatro poblaciones de *P. pinaster* analizadas. Las líneas negras representan las relaciones genéticas existentes entre los individuos de la muestra en relación a la distancia logarítmica que los separa y las líneas grises representan los intervalos al 95% de confianza. El autocorrelograma de la población de Cuéllar muestra la estructura genética espacial media de las dos parcelas instaladas.

La cuantificación de la SGS mediante el estadístico  $S_p$  revela resultados similares a los mostrados en los autocorrelogramas, obteniéndose valores significativos de  $b\text{-log}$  ( $p < 0,05$ ) en las dos poblaciones marginales y en la población continua de Olba (Tabla 4.7). Los valores significativos de  $S_p$  varían entre 0,0104 (Olba) y 0,0264 (Fuentelapeña), lo que



trasladado a un tamaño de vecindario de Wright ( $S_p=1/N_b$ ) se corresponde con un número de individuos de ~97 y ~38 respectivamente.

**Tabla 4.7.** Estructura genética espacial en las poblaciones cercanas al refugio glaciario (Este peninsular) y las del frente colonizador (Meseta Castellana).  $b\text{-log}(\hat{b}_F)$ : Pendiente de la regresión del coeficiente de parentesco  $\hat{F}_{ij}$  con el logaritmo natural de la distancia en metros;  $\hat{F}_{(1)}$  y  $\hat{F}_{(2)}$ : promedio del coeficiente de parentesco de los individuos pertenecientes a la primera y segunda clase de distancia respectivamente;  $S_p$ : estadístico definido por el ratio  $-\hat{b}_F / (1 - \hat{F}_{(1)})$ , donde  $\hat{b}_F$  es la pendiente de regresión del autocorrelograma y  $\hat{F}_{(1)}$  es la media de  $\hat{F}_{ij}$  en la clase de distancia que incluye a todas las parejas de individuos vecinos (Vekemans y Hardy 2004);  $N_b$ : Tamaño de vecindario de Wright ( $N_b=1/S_p$ ).

Región	Pop	Tipo	$b\text{-log}(\hat{b}_F)$	$p\text{-valor}$ ( $b\text{-log}$ )	$\hat{F}_{(1)}$	$p\text{-valor}$	$\hat{F}_{(2)}$	$p\text{-valor}$	$S_p$	$N_b$
Meseta Castellana	Cu	C	-0,0065*	ns	0,0115*	ns	0,0040*	ns	0,0065*	153,84
	Fu	M	-0,0254	0,000	0,0370	0,000	0,0260	0,000	0,0264	37,86
Este peninsular	OI	C	-0,0101	0,003	0,0233	0,015	0,0033	ns	0,0104	96,54
	Qu	M	-0,0190	0,000	0,0319	0,000	0,0165	0,000	0,0196	51,03

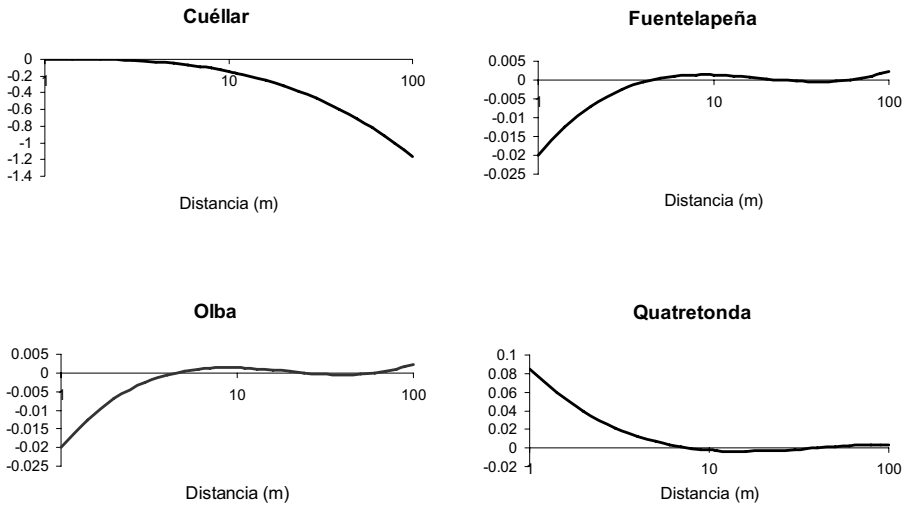
ns: no significativo; **C**: Población continua; **F**: Población fragmentada; \* Promedio de las dos parcelas réplicas instaladas en Cuéllar.

Los valores medios de  $S_p$  obtenidos en las poblaciones continuas ( $S_p=0,0157$ ) se corresponden en general con los valores de clasificación que se proponen para especies forestales de zonas templadas (Vekemans y Hardy 2004). Sin embargo, las poblaciones fragmentadas de Quatretonda y Fuentelapeña mostraron unos valores elevados en este estadístico ( $S_p=0,0196$  y  $S_p=0,0264$  respectivamente), que son superiores a los esperados para árboles con una dispersión de semilla realizada mediante viento (media de  $S_p=0,012$ , Tabla 3 en Vekemans y Hardy 2004).

### 4.3.3. Contribución de semilla vs. polen al flujo genético global

La contribución al flujo genético total de las semillas frente al polen en las poblaciones objeto de estudio viene representada mediante los gráficos de los residuales de los coeficientes de parentesco ( $\hat{F}_{ij}$ ) ajustados a una función polinomial de tercer grado (Figura 4.8). Según estas curvas, existe una dispersión restringida de semilla frente a la dispersión de polen únicamente en Quatretonda (curva cóncava), lo que podría explicar, al menos en parte, la

SGS encontrada en esta población. En el resto de las poblaciones analizadas, la restricción del flujo genético debido a las semillas no parece ser la causa de la SGS encontrada (Fuentelapeña y Olba).



**Figura 4.8.** Representación gráfica de la forma de las curvas de dispersión mediante el ajuste de los residuales de los coeficientes de parentesco ( $\hat{F}_{ij}$ ) a una función polinómica de tercer grado ( $y = a + bx + cx^2 + dx^3$ ).

#### 4.3.4. Simulaciones

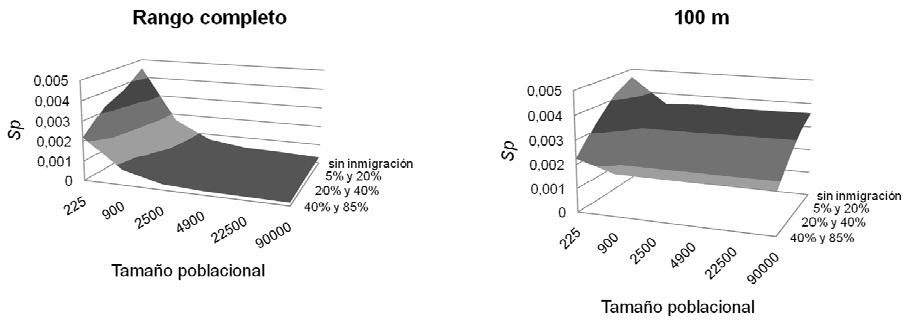
Los diferentes escenarios simulados se caracterizan por una rápida creación y estabilización de la SGS (tras sólo 10 ó 20 generaciones) y una alta estocasticidad. A su vez, muestran claramente que el tamaño poblacional influye más en la formación y en el mantenimiento de estructuras genéticas espaciales que el aislamiento genético. El valor más pequeño de  $S_p$  (0,00016) se ha obtenido en la población de mayor tamaño y con los niveles de inmigración de polen y semilla más altos (40% y 85% respectivamente), mientras que el valor más grande de  $S_p$  ( $\sim 0,007$ ) se ha obtenido para la población aislada más pequeña (100 individuos) o la de 225 árboles cuando se considera aislada y con una gran variación en el éxito reproductor de sus individuos (Tabla 4.8 y Figuras 4.9 y 4.10). En todos los escenarios poblacionales simulados la SGS obtenida en las poblaciones aisladas fue de algo más del doble de magnitud que la obtenida con grandes inmigraciones de semilla y polen (40% y 85% respectivamente). Además, el decrecimiento de los valores del estadístico  $S_p$  con altas

tasas de inmigración es más rápido cuando se tienen en cuenta tamaños poblacionales pequeños.

Al comparar las estimaciones obtenidas cuando se muestrea el rango completo de distancia en relación al muestreo realizado en los 100 primeros metros, encontramos que, en este último caso, se produce un sesgo sistemático unido a una sobreestimación de la SGS. Esta sobreestimación de los valores de  $S_p$  es aproximadamente 10 veces mayor cuando se consideran tamaños poblacionales superiores a 4.900 individuos pero sólo del doble de magnitud en los escenarios poblacionales más pequeños (<2.500 individuos),

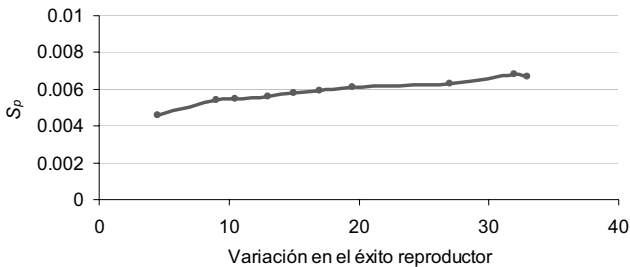
**Tabla 4.8.** Valores del estadístico  $S_p$  obtenidos en los diferentes escenarios simulados.

Número de individuos	Flujo genético							
	Sin flujo genético		Inmigración de semilla y polen del 5% y 20% respectivamente		Inmigración de semilla y polen del 20% y 40% respectivamente		Inmigración de semilla y polen del 40% y 85% respectivamente	
	Rango completo	100 m	Rango completo	100 m	Rango completo	100 m	Rango completo	100 m
<b>100</b>	0,00724	-	0,00605	-	0,00510	-	0,00346	-
<b>225</b>	0,00451	0,00465	0,00373	0,00419	0,00324	0,00333	0,00219	0,00225
<b>900</b>	0,00165	0,00354	0,00151	0,00335	0,00115	0,00257	0,00076	0,00176
<b>2.500</b>	0,00070	0,00361	0,00062	0,00331	0,00048	0,00258	0,00029	0,00177
<b>4.900</b>	0,00043	0,00355	0,00039	0,00328	0,00030	0,00261	0,00020	0,00177
<b>25.000</b>	0,00039	0,00357	0,00035	0,00326	0,00026	0,00258	0,00018	0,00179
<b>90.000</b>	0,00031	0,00359	0,00028	0,00324	0,00023	0,00258	0,00016	0,00178



**Figura 4.9.** Representación gráfica de la variación del estadístico  $S_p$  en función de los diferentes escenarios simulados.

Finalmente, se observa que el valor más alto de  $S_p \sim 0,007$ , obtenido en los escenarios más favorables para la formación de SGS (poblaciones aisladas, con tamaños poblacionales pequeños y con una elevada variación en el éxito reproductor de los individuos), únicamente se asemeja al valor de  $S_p$  observado en la población de Cuéllar, donde la estructura genética espacial no ha resultado significativa ( $S_p = 0,0065$ ) (Tablas 4.7, 4.8 y Figura 4.10). Este hecho sugiere que los factores tenidos en cuenta en las simulaciones realizadas pueden favorecer la creación de una SGS poblacional, pero por sí solos, no son capaces de incrementar de forma substancial su intensidad.



**Figura 4.10.** Valores de  $S_p$  en función de la variación del éxito reproductor de los individuos simulados en la población de 25 x 25 y sin inmigración de polen y semilla. La variación del éxito reproductor ha sido estimada como la varianza del número total de descendientes por individuo.

## 5 DISCUSIÓN





## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. SISTEMA DE REPRODUCCIÓN Y FLUJO GENÉTICO

En la región de procedencia de 'Serranía de Cuenca', donde el pino negral aparece distribuido en masas densas y continuas, la especie se caracteriza por poseer unas elevadas tasas de polinización cruzada (~96%) y unos niveles relativamente bajos de paternidad correlacionada ( $r_p = -0,018-0,048$ ;  $N_{ep} = 1/r_p$  de ~21-56 individuos) y de endogamia biparental ( $t_m - t_s = 0,040$  de media). Valores elevados de las tasas de polinización cruzada (multi y uni-locus) es una característica común en las especies de coníferas, en particular en pinos (Burczyk *et al.* 1996; Boshier 2000; Wasielewska *et al.* 2005). Sin embargo, el número efectivo de padres estimado para la especie es menor que los valores obtenidos para muchas coníferas cuya polinización se realiza a través del viento, y que, como es el caso de estudio, crecen a altas densidades ( $N_{ep} = 83-125$  en *P. sylvestris*, Robledo-Arnuncio *et al.* 2004b;  $N_{ep} = 62-143$  en *Picea glauca*, O'Connell *et al.* 2006; ver también revisiones en Smouse y Sork 2004; Hardy *et al.* 2004). El-Kassaby y Jaquish (1996) encontraron valores de paternidad correlacionada cinco veces superiores en las poblaciones naturales más densas de *Larix occidentalis* que a bajas densidades (huertos semilleros) y sugieren que el menor número de donantes potenciales puede compensarse con un mayor movimiento de polen que se ve favorecido en doseles arbóreos más abiertos. Los niveles relativamente bajos de paternidad correlacionada y endogamia biparental encontrados en las poblaciones de pino negral concuerdan con estudios realizados sobre un ensayo de progenies (Gaspar *et al.* enviado) y sobre poblaciones naturales de la especie que, a su vez, muestran una estructura genética a escala local débil pero significativa (González-Martínez *et al.* 2002; Nanos *et al.* 2004).

La variación encontrada en los parámetros analizados del sistema reproductor en el pino negral, ( $UO$ ,  $AS$ ,  $t_m$ ,  $t_s$ ,  $t_m - t_s$  y  $r_p$ ) no se ha conseguido explicar a nivel de parcela o población. A pesar de que se ha obtenido una correlación negativa significativa entre la densidad y las tasas de polinización cruzada, esta correlación se debe exclusivamente a dos rodales que presentan una densidad excepcionalmente alta (P16002 y P16101 con ~2.000 pies/ha) y, a su vez, unas tasas de polinización cruzada inusualmente bajas. El hecho de que el tamaño que poseen los individuos de esas dos poblaciones sea inferior al promedio del resto de poblaciones ( $DBH$  de 19,1 cm y  $HT$  de 8,96 m, comparados con medias de 27,7 cm y 13,11 m, respectivamente) unido a la correlación positiva que existe entre el tamaño

del árbol (y de su copa) con las tasas de polinización cruzada a nivel individual (ver apartado de *Resultados*) podrían explicar estos resultados.

La densidad de las poblaciones es un factor que se espera tenga una gran influencia sobre los patrones de reproducción de las especies (Farris y Mitton 1984; Van Treuren *et al.* 1994; Franceschinelli y Bawa 2000). Sin embargo, no existe una clara tendencia en las relaciones entre la densidad y las tasas de polinización cruzada, al menos en especies de coníferas. Se han encontrado correlaciones positivas entre  $t_m$  y  $t_s$  y la densidad para *P. ponderosa* (Farris y Mitton 1984), *Larix laricina* (Knowles *et al.* 1987) y *Picea enelmannii*, (Shea 1987), pero no para *P. jeffreyi* (Furnier y Adams 1986) y *Abies lasiocarpa*, (Shea 1987). Los datos experimentales y las simulaciones realizadas en diversos trabajos sugieren que el incremento de la endogamia podría observarse únicamente en masas con densidades poblacionales muy bajas (por debajo de 20 pies/ha en *P. sylvestris*, Robledo-Arnuncio *et al.* 2004a) y que la variación en las tasas de polinización cruzada entre poblaciones de coníferas es limitada (O'Connell *et al.* 2006).

Un importante resultado de este estudio es que la mayor parte de la variación en los parámetros del sistema reproductor en el pino negral se explica a nivel de árbol individual (99-100% de la varianza), lo cual es consistente con los resultados de otros trabajos (e.j. El-Kassaby y Jaquish 1996). Aunque una gran proporción de la variación obtenida es debida, de manera inevitable, a los altos errores de estimación que típicamente se dan a este nivel de análisis en los parámetros del sistema reproductor, las tasas de polinización cruzada uni-locus y multi-locus se correlacionaron con el tamaño del árbol (*DBH* y *HT*) y las variables de copa (*HCB* y superficie del elipsoide), y las tasas de paternidad correlacionada con diferentes variables de altura (como resume el *PC2*). Las relaciones positivas entre el tamaño total del árbol y de su copa y las tasas de polinización cruzada sugieren que la recepción de polen alógamo debería verse favorecida en aquellos árboles de mayor tamaño y que presentan copas más amplias, decreciendo, por tanto, las tasas de endogamia. Sin embargo, O'Connell *et al.* (2004) observaron en cuatro poblaciones de *Thuja plicata* que las tasas de polinización cruzada disminuyen con el incremento de la altura de los árboles. Esta variedad de resultados enfatiza la idea de que las tasas de polinización cruzada no sólo se ven afectadas por el tamaño del árbol (con el incremento de la exposición de las flores a la nube de polen), sino que otros factores como el esfuerzo reproductor o la posición social del árbol dentro de la masa, influyen sobre los patrones de reproducción (Burczyk *et al.* 1996; González-Martínez *et al.* 2006).



Existe una creciente evidencia de que la posición relativa de la copa de los árboles respecto a las plantas leñosas vecinas (de la misma o diferente especie) podría tener mayor influencia en los patrones de reproducción que el propio tamaño de los individuos. Por ejemplo, el trabajo de Oddou-Muratorio *et al.* (2004) en *Sorbus torminales*, presenta valores de las tasas de fecundidad masculina del doble de magnitud en la masa dominante y en los árboles borde que en los pies suprimidos. A su vez, García *et al.* (2005) encontraron que las tasas de polinización tienden a disminuir en las agrupaciones densas de *Prunus mahaleb* donde los árboles madre son dominados por otras especies leñosas. La correlación negativa significativa de otros rasgos del sistema reproductor (como la paternidad correlacionada) con las variables de altura, podría explicarse con argumentos similares a los descritos.

A través del ajuste de los kernels de dispersión polínica (usando *TwoGener* y *KinDist*) se obtuvieron unas estimaciones medias de las distancias efectivas de dispersión en *P. pinaster* relativamente elevadas (78,4 en Talayuelas, 174,4 m en Landete y 111,9 m en un análisis global de las tres masas) y siguiendo distribuciones leptocúrticas (parámetro de forma,  $\beta=0,2445$  en Talayuelas,  $\beta=0,2520$  en Landete y  $\beta=0,2229$  en el análisis global). En otras especies cuya polinización se realiza mediante el viento se han obtenido distancias de dispersión similares (135 m para *Pinus sylvestris*, Robledo-Arnuncio y Gil 2005; 140 m para *P. flexilis*, Schuster y Mitton 2000; 119-147 m para *Fraxinus angustifolia* y *F. Excelsior*, Gérard *et al.* 2006). En *Sorbus torminalis*, especie cuya polinización la realizan animales, Oddou-Muratorio *et al.* (2005) estimaron distancias de dispersión de polen superiores a los 500 m, pero estos altos valores probablemente estén influenciados por una densidad excesivamente baja (~0,4 pies/ha, comparada con los ~900-1.000 pies/ha del pino negral) y por la distribución discontinua que presenta la especie. Los resultados obtenidos en *P. pinaster* también son consistentes con las estimaciones de inmigración efectiva de polen en poblaciones naturales de especies de polinización por viento, especialmente cuando se estudian en parcelas de muestreo localizadas en masas extensas y continuas (Burczyk *et al.* 2004).

Mediante las simulaciones numéricas realizadas no se han podido explicar los niveles de paternidad correlacionada observados en las poblaciones objeto de estudio. La dispersión restringida de polen, la asincronía de la fertilidad femenina o la combinación de ambas, no son los únicos factores que parecen actuar sobre este parámetro en *P. pinaster*. Estos resultados contrastan con la expectativa de que esas variables expliquen gran parte de la variación encontrada en los parámetros del sistema reproductor de los árboles de bosques templados. En masas densas de pinos, los sucesos dependientes de la densidad y

de la distancia poseen un gran impacto en el número efectivo de padres, pero éste no parece ser el único factor que motiva el incremento de la paternidad correlacionada. Es más probable que los efectos de la distancia actúen de forma simultánea con variaciones en el éxito reproductor y fenología masculinas. Sin embargo, y en base a los resultados obtenidos en las simulaciones realizadas, las diferencias en el esfuerzo reproductor (CV en los sucesos reproductores de ~129%) o los niveles observados en la asincronía fenológica (CV de ~65-99%) unido a una dispersión restringida de polen, no son suficientes para explicar los niveles observados de paternidad correlacionada en nuestras masas de pino negral. Por tanto, otros factores no incluidos en las simulaciones, tales como la posición social dentro de la masa (dominantes vs. suprimidos), podrían jugar un papel más relevante.

La relación inversa entre la densidad y la distancia de dispersión polínica está bien documentada en especies de polinización mediante animales (Burczyk *et al.* 2002; White *et al.* 2002) y para diferentes coníferas cuya dispersión de polen se realiza mediante el viento (El-Kassaby y Jaquish 1996; Dyer 2002; Robledo-Arnuncio *et al.* 2004b). Una explicación común para esta correlación es que una reducción en la densidad de la cubierta arbórea puede favorecer los movimientos de aire dentro de la masa (Okubo y Levin 1989) lo que permite que el transporte del polen se realice a distancias más largas (Di-Giovanni y Kevan 1991; Lindgren *et al.* 1995). Sin embargo, las distancias de dispersión de polen obtenidas en este estudio para Talayuelas ( $\delta=174,4$  m y 1.068 pies/ha) y Landete ( $\delta=78,4$  m y 810 pies/ha) no son consistentes con esta hipótesis. Talayuelas posee una altura media de los individuos mayor que Landete por lo que una posible explicación podría ser que los árboles más altos dispersen el polen sobre distancias más largas como sugieren Di-Giovanni y Kevan (1991). De manera alternativa, las diferencias en las distancias medias de dispersión de polen obtenidas en estas masas podrían simplemente responder a un (desconocido) error de estimación de los parámetros asociado con el método indirecto utilizado, como se discute a continuación.

En primer lugar, existen dos fuentes potenciales de error en las estimaciones indirectas realizadas a partir del ajuste de los kernels de dispersión en las poblaciones de estudio. Por un lado, ambas masas, Talayuelas y Landete, poseen elevadas densidades (por encima de los 800 pies/ ha) y por otro lado, el tamaño de muestreo en Landete fue más pequeño (sólo 11 madres, sin una correlación significativa entre la paternidad correlacionada y la distancia), factores ambos que pueden dar lugar a una gran variación de estimación (Robledo-Arnuncio *et al.* 2006). En segundo lugar, las clases de distancia entre madres aparecen representadas de forma diferente dentro de cada población, principalmente, en las

distancias más cortas (Figura 4.1 de *Resultados*), lo que podría dar lugar a diferentes ajustes del kernel si los patrones de dispersión fueran los mismos para ambas poblaciones.

Aunque la distribución de las distancias entre parejas de madres no es, en teoría, lo que afecta en mayor medida a las estimaciones de dispersión de polen (Austerlitz y Smouse 2001; Robledo-Arnuncio *et al.* 2006), la comprobación de la importancia real de este efecto podría requerir de un muestreo de las madres próximas mucho más intenso y homogéneo en las dos poblaciones. Sin embargo, las estimaciones individuales de  $r_p$  en los árboles madre en relación a las tasas de  $r_p$  entre madres (en las que están basadas las estimaciones de dispersión), no se espera que dependan de la distancia entre individuos, ya que están determinadas, entre otros parámetros, por la densidad poblacional y no por la distribución espacial relativa del muestreo.

## **5.2. VARIACIÓN GENÉTICA, DEMOGRAFÍA POBLACIONAL Y ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL A ESCALA LOCAL O “FINA” (SGS)**

Los niveles medios de diversidad genética observados en las poblaciones de pino negral analizadas son típicos de una especie forestal y predominantemente alógama ( $H_e \sim 0,76$ , Hamrick *et al.* 1992) y concuerdan con los valores medios obtenidos en numerosas poblaciones de esta especie analizadas a lo largo de su rango de distribución y con el mismo tipo de marcador molecular ( $H_e = 0,77$ ,  $A = 10,09$ , Derory *et al.* 2002).

En la ruta de colonización postglaciar considerada para *Pinus pinaster* en la Península Ibérica, y en contra de las predicciones del modelo de colonización ‘leading edge’, las poblaciones situadas en el frente de colonización y las ubicadas en el refugio glacial han mostrado resultados similares en términos de heterocigosidad, y sólo se ha observado una leve tendencia de disminución en los valores de riqueza alélica ( $A$  y  $A^S$ ) en dirección este-oeste. La distribución de alelos específicos ha sido el único parámetro estimado que pone en evidencia una demografía poblacional más antigua y estable en las poblaciones cercanas al refugio, en especial, en la población de Quatretonda ( $A^U = 2,3$ ). Los modelos teóricos y los ensayos empíricos permiten concluir que la riqueza alélica en genes nucleares es generalmente más sensible a cambios demográficos y evolutivos que la heterocigosidad (Nei 1975; Dlugosh y Parker 2008; Eckert *et al.* 2008), debido a que los alelos raros, que son los que primero se pierden al producirse efectos fundadores, ‘cuellos de botella’ y otras fluctuaciones esporádicas de los tamaños poblacionales, poseen una influencia mayor en las estimaciones de riqueza alélica que en las de la heterocigosidad (Cornuet y Luikart 1996).

El mayor número de alelos únicos que presentan las poblaciones orientales es coherente con los resultados obtenidos en el estudio de Bucci *et al.* (2007). Estos autores, analizando poblaciones distribuidas a lo largo del rango completo de *P. pinaster* mediante marcadores de cloroplasto, encontraron que la mayor cantidad de haplotipos específicos para la especie se distribuye por el Este de la Península Ibérica.

Otro resultado, también contrario a lo que predice el modelo 'leading edge', es que la diferenciación genética media entre las poblaciones ubicadas en el refugio glacial ha sido mayor que entre las del frente de colonización, hecho que se ve reflejado, tanto en los valores de  $F_{ST}$  obtenidos ( $F_{ST}=0,060$  y  $0,028$ , respectivamente), como al utilizar métodos de agrupamiento (diferentes acervos genéticos identificados en el Este peninsular pero no en la Meseta Castellana).

A pequeña escala, el avance poblacional a través de dispersiones a larga distancia (*LLD*) durante los procesos de colonización promueve un efecto fundador local que favorece una agrupación espacial de genotipos, lo que puede llegar incluso a evitar la expansión de otros genotipos ('efecto embolia', Bialozyt *et al.* 2006). Estas estructuras espaciales pueden crearse tras el paso de sólo unas pocas generaciones y podrían mantenerse a largo plazo. La *SGS* a escala local detectada dentro de las poblaciones continuas no concuerda con esta predicción, ya que la población de Cuéllar (localizada en el frente de colonización) no muestra signos significativos de estructura genética espacial ( $S_p=0,0065$ ), mientras que la población de Olba (en el refugio glacial del Este) sí los mostró ( $S_p=0,0104$ ).

El hecho de que las poblaciones del frente de colonización mantengan niveles de diversidad genética nuclear elevados, reducida diferenciación regional y baja estructura genética espacial a escala fina a pesar de los cuellos de botella detectados, podría ser debido a una colonización rápida de la zona de Meseta Castellana a partir del Este peninsular, teniendo en cuenta las características particulares de las especies arbóreas (Hamrick 2004; Williams *et al.* 2007). La longevidad de las especies forestales, su amplia fase juvenil y su capacidad de dispersar semillas a larga distancia, podrían permitirles realizar numerosas colonizaciones de largo alcance antes de adquirir el estado de madurez (Austerlitz *et al.* 2000). Estos episodios podrían reducir la deriva genética en comparación al proceso puro de difusión que realizan otras especies de plantas de menor tamaño, lo que permitiría a los árboles pasar a lo largo de cuellos de botella sucesivos y de sucesos fundadores sin sufrir cambios substanciales en el nivel y estructura de su diversidad genética (Austerlitz *et al.* 2000; Bialozyt *et al.* 2006). Además, la dispersión de polen puede

incrementar su eficiencia debido a las bajas densidades poblacionales que tienen lugar durante la colonización (Comps *et al.* 2001, Heuertz *et al.* 2004), lo que conllevaría diferenciaciones genéticas menos acusadas en las poblaciones generadas (Austerlitz *et al.* 2000). Por estas razones, y en contra de las predicciones del modelo 'leading edge', los datos empíricos de numerosas especies forestales han mostrado niveles de diferenciación relativamente bajos para genes nucleares entre las poblaciones del frente de expansión (Petit *et al.* 2004).

Otra posible explicación para el mantenimiento de la elevada diversidad y de la pequeña diferenciación genética encontradas en las poblaciones de la Meseta Castellana podría ser la mezcla de diferentes acervos genéticos, al igual que ha ocurrido en otras especies forestales (Walter y Epperson 2001; Heuertz *et al.* 2004). En *Fraxinus excelsior*, Heuertz *et al.* (2004) plantean que el efecto de un 'cuello de botella' detectado mediante estadísticos basados en desequilibrios de Hardy-Weinberg puede ser difícil de distinguir de una mezcla de varias poblaciones, ya que, si dos o más poblaciones con idéntica composición alélica pero con diferentes frecuencias se mezclan, el número de alelos permanece constante, pero si la nueva distribución de frecuencias alélicas resulta más homogénea que en un principio, daría lugar a un incremento relativo de la diversidad genética. Por otra parte, Bucci *et al.* (2007) consideran el Sureste y el centro de España como 'puntos calientes' ('hotspots') de biodiversidad intraespecífica para *P. pinaster*, e interpretan que la elevada diversidad haplotípica encontrada en las poblaciones de la Meseta Castellana puede ser debida a la mezcla de los acervos genéticos originados en la zona atlántica y en la costa mediterránea de la P.I., junto a una posible contribución genética de diversas poblaciones de pino negral ubicadas en ámbitos montañosos cercanos. Esta hipótesis se está comprobando en la actualidad mediante microsatélites nucleares (de-Lucas *et al.* enviado), para lo que a las poblaciones de este trabajo se han añadido otras 10 poblaciones distribuidas a lo largo del rango de interés. Sin embargo, los resultados preliminares apuntan a que no existen claros signos de una mezcla poblacional en la Meseta Castellana.

Las características demográficas, genéticas y geográficas hacen de la población de Quatretonda un interesante reservorio de biodiversidad. Su dinámica poblacional ha conseguido compensar los procesos locales de extinción a pesar de su reducido tamaño poblacional y de su aislamiento, manteniendo, incluso, altos valores de diversidad genética en contra de lo que generalmente sucede en poblaciones relicticas (Petit *et al.* 2005). La adaptación local que parece haber desarrollado esta población, unido a un presumible

reducido flujo genético debido a su aislamiento geográfico podrían haber dado lugar a un ecotipo valioso (Hampe y Petit 2005) que merecería un esfuerzo de conservación.

Otro resultado interesante de este estudio son las intensas contracciones poblacionales históricas que se han detectado tanto en las poblaciones localizadas en el área de colonización reciente como en aquellas próximas al refugio glacial. En general, y asumiendo un período de generación para pinos de ~25 años (Brown *et al.* 2004; Willyard *et al.* 2006), los cuellos de botella detectados pueden datarse hace unos 22.500 años, momento cercano al último período glacial. Durante esta etapa, el espectro de polen de pino negral desaparece en los diagramas polínicos de Navarrés (Valencia), lugar donde se han encontrado los restos palinológicos más antiguos para la especie en la Península Ibérica (Carrión *et al.* 2000), volviendo a reaparecer al mejorar las condiciones climáticas. Estos resultados contrastan con los de otras coníferas Eurosiberianas que han mostrado cuellos de botella mucho más antiguos (hace 150.000-300.000 años en *Picea abies*, Heuertz *et al.* 2006; ó hace ~2 millones de años en *Pinus sylvestris*, Pyhäjärvi *et al.* 2007), lo que revela dinámicas glaciares diferentes en las coníferas Mediterráneas debido, probablemente, a una respuesta adaptativa distinta a los cambios ambientales (Barbéro *et al.* 1998).

Independientemente de su pasado demográfico, las poblaciones continuas de pino negral analizadas en este estudio no muestran signos de SGS (en el caso de Cuéllar) o, si lo hacen, éstos son débiles (Olba). La ausencia de estructura genética espacial en individuos adultos de la especie en una población extensa y continua de 'Meseta Castellana' concuerda con los resultados obtenidos en otra, ubicada en Coca (Segovia), a unos 40 km de Cuéllar, donde se encontraron estructuras genéticas débiles en los individuos juveniles pero no en los pies adultos (González-Martínez *et al.* 2002). Por el contrario, las poblaciones fragmentadas de Quatretonda y Fuentelapeña han mostrado una intensidad mayor de estructura genética espacial. Generalmente, en especies alogamas, anemócoras y anemófilas, la dispersión de polen es el factor que contribuye en mayor medida al flujo genético global debido a su carácter extensivo, por lo que una dispersión restringida de semilla suele ser el agente que determina la formación de SGS dentro de una población. La forma cóncava de la regresión polinomial de los residuos del coeficiente de parentesco que presenta la población de Quatretonda indica una dispersión de semilla restringida, lo que podría explicar la estructura genética encontrada. En el caso de la población de Fuentelapeña, la fuerte SGS detectada viene, a su vez, acompañada por una fuerte consanguinidad ( $F=0,181$ ). La sobreestimación de los niveles de endogamia es un hecho bastante habitual en los estudios de genética de poblaciones debido principalmente a la

presencia de alelos nulos en los marcadores moleculares utilizados y/o a la existencia de una subdivisión poblacional en la muestra analizada (efecto 'Wahlund'). Sin embargo, ambas causas pueden ser descartadas en este trabajo, ya que el marcador *Frpp91* que presentaba una deficiencia significativa de heterocigotos fue omitido en las estimaciones de los parámetros y el programa STRUCTURE no ha detectado signos de sub-estructuración en ninguna de las poblaciones consideradas. Por tanto, los altos niveles de endogamia encontrados en Fuentelapeña pueden estar relacionados, probablemente, con una fragmentación reciente de la población unida a una fuerte estructura familiar. Dadas la elevadas tasas de polinización cruzada que presentan en general las especies de pinos (Burczyk *et al.* 1996; Boshier 2000; Wasielewska *et al.* 2005) y en concreto las obtenidas en *P. pinaster* ( $t_m$  y  $t_s \sim 96\%$ , de-Lucas *et al.* 2008), el apareamiento entre individuos genéticamente próximos es el motivo más común de la creación de endogamia. Sin embargo, en la población de Fuentelapeña, la proximidad genética entre árboles vecinos ( $F_{(r)}=0,037$ ) es menor que entre la totalidad de individuos muestreados en la parcela ( $F=0,181$ ), lo que sugiere que la endogamia resultante es más bien debida a procesos de autopolinización, o a una endogamia biparental no estructurada espacialmente y provocada por una reproducción preferencial entre individuos emparentados.

Las simulaciones numéricas han demostrado que la SGS es capaz de establecerse tras el paso de muy pocas generaciones y que la reducción del tamaño efectivo poblacional juega un papel destacado en su formación. Al igual que los resultados obtenidos en este estudio, Gapare y Aitken (2005) detectaron signos de estructura genética espacial en poblaciones fragmentadas y periféricas de *Picea sitchensis*, pero no en las poblaciones continuas y centrales de la especie. La interacción entre la fragmentación y una SGS puede tener efectos importantes sobre la dinámica de una población y puede influir sobre los niveles de biodiversidad y la distribución de la diversidad genética en las poblaciones naturales de plantas (Young *et al.* 1996; Thompson 1999). Sin embargo, en especies forestales, la correlación entre la fragmentación del hábitat (de origen antrópico o natural) y la formación de SGS no siempre sigue un patrón intuitivo. Por ejemplo, Born *et al.* (2008) encontraron niveles más bajos de SGS en una población fragmentada de la especie tropical *Aucoumea klaineana* que en las poblaciones continuas, y sugieren que el efecto provocado por la fragmentación puede compensarse con un incremento de la dispersión, que se ve favorecida por la disminución de la densidad de la cubierta arbórea.

En base a estas simulaciones, los niveles de SGS que se han detectado en la mayoría de las poblaciones de pino negral analizadas, no parecen deberse únicamente a un

tamaño poblacional reducido, al aislamiento genético o al tipo de muestreo realizado. Esta discrepancia de resultados se podría deber a que la modelización de los parámetros de dispersión utilizada no refleja los verdaderos procesos de dispersión acontecidos en las poblaciones reales, unido al efecto de factores demográficos y ecológicos que no se han considerado en las simulaciones. El hecho de que la dispersión sea un proceso altamente estocástico, sujeto a considerables variaciones interanuales e intrapoblaciones (Nathan *et al.* 2000; Juez 2007) hace que en el ajuste de kernels de dispersión (especialmente en aquellas funciones con colas más abultadas que las de una exponencial), los parámetros que les caracterizan puedan sufrir variaciones (Robledo-Arnuncio *et al.* 2006; Jones y Muller-Landau 2008). De hecho, y para alcanzar un valor del estadístico  $S_p$  cercano a 0,02 como se observa en las poblaciones fragmentadas, se requieren distancias de dispersión más cortas, como por ejemplo, 8 m para las semillas y 23 m para el polen, si se utiliza una función de dispersión normal bivalente como en Heuertz *et al.* (2003), frente a los ~12 m para las semillas y ~112 m para el polen, utilizados en nuestras simulaciones.

Por otro lado, y por su propia definición, el valor del estadístico  $S_p$  aumenta al disminuir la densidad efectiva poblacional ( $S_p = 1/4\pi D_e \sigma_g^2$ ). En una población muy fragmentada de *Pinus sylvestris*, se descubrió que sólo el 8% de los individuos potencialmente reproductores actuaban como tales (Robledo-Arnuncio *et al.* 2004a), lo que disminuía enormemente el tamaño efectivo poblacional. Las poblaciones estudiadas presentan tamaños efectivos poblacionales más pequeños que los escenarios simulados ( $N_b$  observado entre 38 y 96 vs.  $N_b=150$  obtenido en la población simulada de 225 individuos y sin inmigración de polen y semilla), por lo que un número de reproductores bajo podría ser una causa más de la estructura detectada en Fuentelapeña y Quatretonda. La selección en estado de plántula debido a un efecto materno (Jones y Hubbell 2006; Bladé y Vallejo 2008), la heterogeneidad ambiental (Troupin *et al.* 2006; Calvo *et al.* 2008) o una reproducción preferencial entre determinados individuos debida, por ejemplo, al tamaño de los árboles o a una sincronización fenológica (González-Martínez *et al.* 2006; Gérard *et al.* 2006), pueden ser algunas de las causas que provocarían una reducción en el tamaño efectivo poblacional, que a su vez, ocasionaría la fuerte SGS encontrada en alguna de las poblaciones de *Pinus pinaster* consideradas.



## 6 CONCLUSIONES





## 6. CONCLUSIONES

- I. El sistema reproductor de *Pinus pinaster* en masas densas de 'Serranía de Cuenca' se caracteriza por un elevado flujo polínico y unas tasas relativamente bajas de paternidad correlacionada y de endogamia biparental. A pesar del gran flujo polínico existente, la variación encontrada en los parámetros analizados depende exclusivamente de variables biométricas que determinan el tamaño de los individuos, principalmente aquellas relacionadas con la altura, los diámetros y la copa. El hecho de que el sistema de reproducción no muestre diferencias entre poblaciones y masas pertenecientes a una región de procedencia amplia, valida las prácticas actuales basadas en programas de manejo que abarcan grandes extensiones.
- II. Factores tales como la acusada diferencia en el éxito reproductor de los árboles padre, asincronías fenológicas o la posición social de los individuos dentro de la masa, podrían actuar de forma simultánea dando lugar a un incremento de la variabilidad de los patrones de reproducción a nivel de árbol individual.
- III. El pino negral muestra una distribución de distancias de dispersión polínica claramente leptocúrtica, alcanzando una distancia de dispersión media próxima a los 175 m, lo que proporciona un dato de partida a la hora de definir la distancia mínima a respetar (probablemente de miles de metros) entre las repoblaciones de la especie y aquellas masas a conservar o de las que se recolectan materiales base de reproducción.
- IV. La variación y distribución genética de la especie no se comporta como predicen los modelos teóricos sencillos de colonización y fragmentación, sugiriendo que son muchos los factores que actúan de forma conjunta y particular en cada población. La capacidad de la especie para mantener unos niveles de diversidad relativamente altos y una endogamia relativamente baja a pesar de los fuertes 'cuellos de botella' que ha sufrido, no hace pensar que sus poblaciones estén en peligro, por lo que los esfuerzos de conservación en pino negral, deberían centrarse en poblaciones relicticas, estables y singulares, como la población de Quatretonda, especialmente por haber mantenido altos niveles de diversidad y singularidad genética.

- V. Independientemente de la proximidad o no al refugio glaciar de la especie, las poblaciones de pino negral han mostrado contracciones poblacionales intensas datadas hace aproximadamente 22.500 años, época muy posterior a los cuellos de botella detectados en *Picea abies* o *Pinus sylvestris*. Esto sugiere que la especie no ha recuperado todavía una estabilidad demográfica y que ha desarrollado respuestas adaptativas diferentes a los cambios ambientales con respecto a otras coníferas de ámbito menos mediterráneo.
- VI. La intensidad de la estructura genética espacial encontrada depende más del efecto de la fragmentación que de los procesos históricos de colonización. Las distancias donde ésta resulta significativa proporcionan pautas a la hora de recolectar semillas, siendo aconsejable respetar al menos 10 m en poblaciones continuas y 20 m en poblaciones fragmentadas de la especie.
- VII. La estructura genética espacial se crea tras un número de generaciones reducido pero ni un tamaño poblacional pequeño ni un desequilibrio en el éxito reproductor de los individuos son capaces de incrementar su intensidad, salvo que las restricciones en las distancias de dispersión de semilla y polen sean elevadas, o que existan factores ecológicos que reduzcan de forma notable el número efectivo poblacional. Este último aspecto es de gran importancia en la conservación genética de las poblaciones de la especie ya que es el número efectivo poblacional, y no el número de censo, el parámetro que mejor se relaciona con la supervivencia de la población a largo plazo.

## 7 BIBLIOGRAFÍA





## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams WT, Burczyk J (2000) *Magnitude and implications of gene flow in gene conservation reserves.*, (eds. TBD Boshier; A Young). CSIRO Publishing, Collingwood. Australia.
- Alcalde C, García-Amorena I, Gómez F, *et al.* (2004) Nuevos datos de carbones y maderas fósiles de *Pinus pinaster* Aiton en el Holoceno de la Península Ibérica. *Invest Agrar: Sist Recur For Fuera de serie*, 152-163.
- Alcalde C, Gómez F, Postigo JM, Sanz E, Menéndez-Pidal I (2003) *Pinus sylvestris* L. en el Pleistoceno superior del Duero (Vega Cintora, Soria, España). *Rev C & G* **17**, 21-28.
- Aldrich PR, Hamrick JL, Chavarriaga P, Kochert G (1998) Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Mol Ecol* **7**, 933-944.
- Alía R (1989) *Mejora genética de Pinus pinaster Ait. Estudio de procedencias*. Tesis doctoral. Departamento de Silvopascicultura, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Madrid
- Alía R, Gil L, Pardos JA (1995) Performance of 43 *Pinus pinaster* provenances on 5 locations in Central Spain. *Silvae Genet* **44**, 75-81.
- Alía R, Martín S, De Miguel J, *et al.* (1996) *Las regiones de procedencia de Pinus pinaster Ait.* O A Parques Nacionales, Madrid.
- Ally DS, El-Kassaby YA, Ritland K (2000) Genetic diversity, differentiation and mating system in mountain hemlock (*Tsuga mertensiana*) across British Columbia. *Forest Genet* **72**, 97-108.
- Austerlitz F, Garnier-Géré PH (2003) Modelling the impact of colonisation on genetic diversity and differentiation of forest trees: interaction of life cycle, pollen flow and seed long-distance dispersal. *Heredity* **90**, 282-290.
- Austerlitz F, Mariette S, Machon N, Gouyon P-H, Godelle B (2000) Effects of colonization processes on genetic diversity: differences between annual plants and tree species. *Genetics* **154**, 1309-1321.
- Austerlitz F, Smouse PE (2001) Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between  $F_{IT}$ , pollen dispersal and interfemale distance. *Genetics* **157**, 851-857.

- Austerlitz F, Smouse PE (2002) Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. IV. Estimating the dispersal parameter. *Genetics* **161**, 355-363.
- Barbéro M, Loisel R, Quézel P, Richardson DM, Romane F (1998) Pines of the Mediterranean Basin. In: *Ecology and biogeography of Pinus* (ed. DM Richardson), pp. 153-170. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Beaumont MA (1999) Detecting population expansion and decline using microsatellites. *Genetics* **153**, 2013-2029. <http://heidi.chnebu.ch/doku.php?id=msvar>.
- Beaumont MA (2004) Recent developments in genetic data analysis: what can they tell us about human demographic history? *Heredity* **92**, 365-379.
- Bennet KD, Tzedakis PC, Willis KJ (1991) Quaternary refugia of north European trees. *J Biogeogr* **18**, 103-115.
- Bialozyt R, Ziegenhagen B, Petit RJ (2006) Contrasting effects of long distance seed dispersal on genetic diversity during range expansion. *J Evolution Biol* **19**, 12-20.
- Bladé C, Vallejo VR (2008) Seed mass effects on performance of *Pinus halepensis* Mill. seedlings sown after fire. *Forest Ecol Manag* **255**, 2362-2372.
- Born C, Hardy OJ, Chevallier M-H, *et al.* (2008) Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. *Mol Ecol* **17**, 2041-2050.
- Boshier DH (2000) Mating systems. In: *Forest conservation genetics: principles and practice*. (eds. TBD Boshier; A Young), pp. 63-79. CSIRO Publishing, Collingwood. Australia.
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* **5**, 453-455.
- Brown GR, Geoffrey PG, Kuntz RJ, Langley CH, Neale DB (2004) Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15255-15260.
- Bucci G, González-Martínez SC, Le Provost G, *et al.* (2007) Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Mol Ecol* **16**, 2137-2153.
- Burczyk J, Adams WT, Moran GF, Griffins AR (2002) Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. *Mol Ecol* **11**, 2379-2391.
- Burczyk J, Adams WT, Shimizu JY (1996) Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon.) stand. *Heredity* **77**, 251-260.



- Burczyk J, DiFazio SP, Adams WT (2004) Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? *Forest Genet* **11**, 1-14.
- Burczyk J, y Prat D (1997). Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: the effects of spatial structure and flowering characteristics. *Heredity* **79**, 638-647.
- Calvo L, Santalla S, Valbuena L (2008) Post-fire natural regenerations of a *Pinus pinaster* forest in NW Spain. *Plant Ecol* **197**, 81-90.
- Carrión JS (2002) Patterns and processes of Late Quaternary environmental change in a montane region of southwestern Europe. *Quaternary Sci Rev* **21**, 2047-2066.
- Carrión JS, Navarro C, Navarro J, Munuera M (2000) The distribution of cluster pine (*Pinus pinaster*) in Spain as derived from palaeoecological data: relationships with phytosociological classification. *The Holocene* **10**, 243-252.
- Carrión JS, Van Geel B (1999) Fine-resolution Upper Weichselian and Holocene palynological record from Navarre's (Valencia, Spain) and a discussion about factors of Mediterranean forest succession. *Rev Palaeobot Palyno* **106**, 209-236.
- Cloutier D, Rioux D, Beaulieu J, Schoen DJ (2003) Somatic stability of microsatellite loci in Eastern white pine, *Pinus strobus* L. *Heredity* **90**, 247-252.
- Comes HP, Kadereit JW (1998) The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Plant Sci* **3**, 432-438.
- Comps B, Gömöry D, Letouzey J, Thiébaud, Petit RJ (2001) Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European Beech. *Genetics* **157**, 389-397.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Chagné D, Chaumeil P, Ramboer A, *et al.* (2004) Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theor Appl Genet* **109**, 1204-1214.
- Chambel R (2006) *Variabilidad adaptativa y plasticidad fenotípica en procedencias de 8 pinos ibéricos*. Tesis doctoral. Departamento de Silvopascicultura, Universidad Politécnica de Madrid. Madrid
- Chung MY, Nason J, Chung MG, *et al.* (2002) Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). *Am J Bot* **89**, 1229-1236.

- Davies S, White A, Lowe A (2004) An investigation into effects of long-distance seed dispersal on organelle population genetic structure and colonization rate: a model analysis. *Heredity* **93**, 566-576.
- Davis MB (1983) Quaternary history of deciduous forests of eastern North America and Europe. *Ann Mo Bot Gard* **70**, 550-563.
- de-Lucas AI, Robledo-Arnuncio JJ, Hidalgo E, González-Martínez SC (2008) Mating system and pollen gene flow in Mediterranean maritime pine. *Heredity* **100**, 390-399.
- de-Lucas AI, González-Martínez SC, Hidalgo E, Bravo F, Heuertz M. Admixture of Atlantic and Mediterranean gene pools or rapid colonization of the Castilian Plateau by maritime pine? An answer from nuclear microsatellite markers. Enviado a *Invest Agrar: Sist Recur For*.
- Degen B, Bandou E, Caron H (2004) Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symbhonia globulifera* in French Guiana. *Heredity* **93**, 585-591.
- Demesure B, Comps B, Petit J (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* **50**, 2515-2520.
- Derory J, Mariette S, González-Martínez SC, et al. (2002) What can nuclear microsatellites tell us about maritime pine genetic resources conservation and provenance certification strategies? *Ann For Sci* **59**, 699-708.
- Destremau DX, Alazard P, Chaperon H (1982) Monographie génétique de *Pinus pinaster*. *Ann Forestières* **9**, 125-150.
- DeWoody J, Nason JD, Hipkins VD (2006) Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Mol Ecol Notes* **6**, 951-957.
- Di-Giovanni F, Kevan PG (1991) Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination: a review. *Can J For Res* **21**, 1155-1170.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol ecol* **17**, 431-449.
- Dow BD, Ashley MV (1998) Factors influencing male mating success in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *New Forest* **15**, 161-180.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- Dutech C, Sork VL, Irwin AJ, Smouse P, Davis FW (2005) Gene flow and fine-scale genetic structure in a wind-pollinated tree species, *Quercus lobata* (Fagaceae). *Am J Bot* **92**, 252-261.

- Dyer RJ (2002) *Contemporary pollen movement in shortleaf pine, Pinus echinata Mill.* PhD Thesis. Department of Biology, University of Missouri. St. Louis
- Eckert CG, Samis KE, Loughheed SC (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Mol ecol* **17**, 1170-1188.
- El-Kassaby YA, Jaquish B (1996) Population density and mating pattern in western larch. *J Hered* **87**, 438-443.
- El-Kassaby YA, Dunsworth BG, Krakowski J (2003) Genetic evaluation of alternative silvicultural systems in coastal montane forests: western hemlock and amabilis fir. *Theor Appl Genet* **107**, 598-610.
- Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* **72**, 250-259.
- Epperson B (1990) Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. *Genetics* **124**, 757-771.
- Epperson B, Chung MG (2001) Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms within populations of *Pinus strobus* (Pinaceae). *Am J Bot* **88**, 1006-1010.
- Epperson BK (1992) Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. *New Forest* **6**, 257-278.
- Epperson BK (1995) Spatial distributions of genotypes under isolation by distance. *Genetics* **140**, 1431-1440.
- Epperson BK (2003) Covariances among join-count spatial autocorrelation measures. *Theor Pop Biol* **64**, 81-87.
- Escudero A, Iriondo JM, Torres ME (2003) Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biol Conserv* **113**, 351-365.
- Estoup A, Clegg SM (2003) Bayesian inferences on the recent island colonization history by the bird *Zosterops lateralis lateralis*. *Mol Ecol* **12**, 657-674.
- 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.
- Excoffier L, Heckel G (2006) Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Genetics* **7**, 745-758.
- Farris MA, Mitton JB (1984) Population density, outcrossing rate, and heterozygote superiority in ponderosa pine. *Evolution* **38**, 1151-1154.
- Figueiral I (1995) Charcoal analysis and the history of *Pinus pinaster* (cluster pine) in Portugal. *Rev Palaeobot Palyno* **89**, 441-454.

- Franceschinelli EV, Bawa KS (2000) The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity* **84**, 116-123.
- Franco-Múgica F, García-Antón M, Maldonado-Ruiz J, Morla-Juaristi C, Sainz-Ollero H (2005) Ancient pine forest on inland dunes in the Spanish northern meseta. *Quaternary Res* **63**, 1-14.
- Franco-Múgica F, García Antón M, Maldonado Ruiz J, Morla C, Sainz-Ollero H (2001) The Holocene history of *Pinus* forests in Spanish Northern Meseta. *The Holocene* **11**, 343-358.
- Frankel OH, Soulé ME (1981) *Conservation and Evolution*, Cambridge University Press. New York.
- Furnier GR, Adams WT (1986) Mating system in natural populations of Jeffrey pine. *Am J Bot* **73**, 1008-1022.
- Gapare WJ, Aitken SN (2005) Strong spatial genetic structure in peripheral but not core populations of Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.]. *Mol Ecol* **14**, 2659-2667.
- García C, Arroyo M, Godoy A, Jordano P (2005) Mating patterns, pollen dispersal, and the ecological maternal neighbourhood in a *Prunus mahaleb* L. population. *Mol Ecol* **14**, 1821-1830.
- Gaspar MJ, de-Lucas AI, González-Martínez SC, *et al.* Use of molecular markers for estimating breeding parameters: a case study in a maritime pine progeny trial. *Enviado a Tree Genet Genomes*.
- Gérard PR, Klein EK, Austerlitz F, Fernández-Manjarrés JF, Frascaria-Lacoste N (2006) Assortative mating and differential male mating success in an ash hybrid zone population. *BMC Evol Biol* **6**, 96.
- Glémin S, Bazin E, Charlesworth D (2006) Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. *P Natl Acad Sci USA* **273**, 3011-3019.
- Gómez A, Lunt DH (2007) Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: *Phylogeography of Southern European Refugia - Evolutionary Perspective on the Origins and Conservation of European Biodiversity* (eds. S Weiss, N Ferrand), pp. 155-188. Springer.
- Gómez A, Vendramin GG, González-Martínez SC, Alía R (2005) Genetic diversity and differentiation of two Mediterranean pines (*Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Ait.) along a latitudinal cline using chloroplast microsatellite markers. *Divers Distrib* **11**, 257-263.

- González-Martínez SC, Alía R, Gil L (2002) Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity* **89**, 199-206.
- González-Martínez SC, Burczyk J, Nathan R, *et al.* (2006) Effective gene dispersal and female reproductive success in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). *Mol Ecol* **15**, 4577-4588.
- González-Martínez SC, Gerber S, Cervera MT, *et al.* (2003) Selfing and sibship structure in a two-cohort stand of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) using nuclear SSR markers. *Ann For Sci* **60**, 115-121.
- González-Martínez SC, Gil L, Alía R (2005) Genetic diversity estimates of *Pinus pinaster* in the Iberian Peninsula: a comparison of allozymes and quantitative traits. *Invest Agrar: Sist Recur For* **14**, 1-10.
- Gonzalez-Martinez SC, Salvador L, Agundez D, Alia R, Gil L (2001) Geographical variation of gene diversity of *Pinus pinaster* Ait. in the Iberian Peninsula. In: *Genetic Response of Forest Systems to Changing Environmental Conditions* (eds. G Müller-Starck, R Schubert), pp. 161-171. Kluwer Academic Publishers. Freising - Weihenstephan, Germany
- Goossens B, Chikhi L, Ancrenaz M, *et al.* (2006) Genetic signature of anthropogenic population collapse in Orang-utans. *Plos Biol* **4**, 285-291.
- Griffin CAM, Eckert CG (2003) Experimental analysis of biparental inbreeding in a self-fertilizing plant. *Evolution* **57**, 1513-1519.
- Hampe A, Petit J (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol Lett* **8**, 461-467.
- Hamrick JL (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecol Manag* **197**, 323-335.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* **6**, 95-124.
- Hamrick JL, Murawski DA (1990) The breeding structure of tropical tree populations. *Plant Spec Biol* **5**, 157-166.
- Hamrick JL, Murawski DA, Nason JD (1993) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio* **107/108**, 281-297.
- Hamrick JL, Nason JD (1996) Consequences of dispersal in plants. In: *Forest conservation genetics: principles and practice* (eds. A Young, D Boshier, T Boyle), pp. 81-90. CSIRO, Melbourne, Australia; CABI, Wallingford, UK.

- Hardy OJ, González-Martínez SC, Colas B, *et al.* (2004) Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). II. Correlated paternity within and among sibships. *Genetics* **168**, 1601-1614.
- 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. <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/spagedi.html>.
- Heuertz M, De Paoli E, Källman T, *et al.* (2006) Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst). *Genetics* **174**, 2095-2105.
- Heuertz M, Hausman JF, Hardy OJ, *et al.* (2004) Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution* **58**, 976-988.
- Heuertz M, Vekemans X, Hausman F, Paladas M, Hard J (2003) Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Mol Ecol* **12**, 2483-2495.
- Hewitt GM (1989) The subdivision of species by hybrid zones. In: *Speciation and its consequences* (eds. D Otte, J Endler), pp. 85-110. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol J Linn Soc* **58**, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J Linn Soc* **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Holsinger KE (2000) Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 7037-7042.
- Huntley B, Birks HJB (1983) An Atlas of past and present pollen maps for Europe:0-13,000 years ago. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ibrahim DM, Nichols RA, Hewitt GM (1996) Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* **77**, 282-291.
- Ishihama F, Ueno S, Tsumura Y, Washitani I (2005) Gene flow and inbreeding depression inferred from fine-scale genetic structure in an endangered heterostylous perennial, *Primula sieboldii*. *Mol Ecol* **14**, 983-990.
- Jones FA, Hamrick JL, Peterson CJ, Squiers ER (2006) Inferring colonization history from analyses of spatial genetic structure within populations of *Pinus strobus* and *Quercus rubra*. *Mol Ecol* **15**, 851-861.

- Jones FA, Hubbell SP (2006) Demographic spatial genetic structure of the Neotropical tree, *Jacaranda copaia*. *Mol Ecol* **15**, 3205–3217.
- Jones FA, Muller-Landau HC (2008) Measuring long-distance seed dispersal in complex natural environments: a evaluation an integration of classical and genetic methods. *J Ecol* **96**, 642-652.
- Juez L (2007) *Estrategia reproductora, dispersión de semilla y análisis de la regeneración natural del pino negral (*Pinus pinaster* Aiton) en la Meseta Castellana (Coca, Segovia)* TFC. Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, Universidad de Valladolid. Palencia
- Kalinowski ST (2005) HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol Ecol Notes* **5**, 187-189.  
<http://www.montana.edu/kalinowski>.
- Kimmel M, Chakraborty R, King JP, *et al.* (1998) Signatures of population expansion in microsatellite repeat data. *Genetics* **148**, 1921-1930.
- King JP, Kimmel M, Chakraborty R (2000) A power analysis of microsatellite-based statistics for inferring past population growth. *Mol Biol Evol* **17**, 1859-1868.
- King RA, Ferris C (1998) Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Mol Ecol* **7**, 1151-1161.
- Kingman JFC (1982) The coalescent. *Stoch Proc Appl* **13**, 235-248.
- Klein EK, Lavigne C, Gouyon P-H (2006) Mixing of propagules from discrete sources at long distance: comparing a dispersal tail to an exponential. *BMC Ecology* **6**, 1-12.
- Knowles P, Furnier GR, Aleksiuk MA, Perry DJ (1987) Significant levels of self-fertilization in natural populations of tamarack. *Can J Bot* **65**, 1087-1091.
- Konnert M, Bergmann F (1995) The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Syst Evol* **196**, 19-30.
- Le Corre V, Machon N, Petit RJ, Kremer A (1997) Colonization with long-distance seed dispersal and genetic structure of maternally inherited genes in forest trees: a simulation study. *Genet Res* **69**, 117-125.
- Ledig FT (1998) Genetic variation in *Pinus*. In: *Ecology and Biogeography of Pinus* (ed. DM Richardson), pp. 251-280. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ledig FT (2000) Founder effects and the genetic structure of Coulter Pine. *The Journal of Heredity* **91**, 307-315.

- Lindgren D, Paule L, Shen XH, *et al.* (1995) Can viable pollen carry Scots pine genes over long distances? *Grana* **34**, 64–69.
- Loader CR (2007) Locfit: Local regression, likelihood and density estimation. R package, 1.5-4. Loader, C.R. <http://locfit.herine.net/>
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am J Bot* **82**, 1420-1425.
- Loveless MD (1992) Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New Forest* **6**, 67-94.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *The Journal of Heredity* **89**, 238-247.
- Luikart G, Cournet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv Biol* **12**, 228-237.
- Miguel-Pérez I, González-Martínez SC, Alía R, Gil L (2002) Growth phenology and mating system of maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton) in central Spain. *Invest Agrar: Sist Recur For* **11**, 195-204.
- Murawski DA, Gunatilleke IAUN, Bawa KS (1994) The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. *Conserv Biol* **8**, 1002.
- Nanos N, González-Martínez SC, Bravo F (2004) Studying within-stand structure and dynamics with geostatistical and molecular marker tools. *Forest Ecol Manag* **189**, 223-240.
- Nathan R, Safriel UN, Noy-Meir I, Schiller G (2000) Spatiotemporal variation in seed dispersal and recruitment near and far from *Pinus halepensis* trees. *Ecology* **81**, 2156–2169.
- Nei M (1975) *Molecular population genetics and evolution*, (eds. A Neuberger, EL Tatum). North-Holland publishing company, Amsterdam - Oxford.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- O'Connell LM, Mosseler A, Rajora OP (2006) Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* **97**, 418-426.



- O'Connell LM, Russell J, Ritland K (2004) Fine-scale estimation of outcrossing in western redcedar with microsatellite assay of bulked DNA. *Heredity* **93**, 443-449.
- Oddou-Muratorio S, Demesure-Mush B, Pélissier R, Gouyon PH (2004) Impacts of gene flow and logging history on the local genetic structure of a scattered tree species, *Sorbus torminalis* L. Crantz. *Mol Ecol* **13**, 3689-3702.
- Oddou-Muratorio S, Klein EK, Austerlitz F (2005) Real-time patterns of pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. II. Spatial patterns of pollen flow and variance in male reproductive success inferred from parent-offspring. *Mol Ecol* **14**, 4441-4452.
- Okubo A, Levin SA (1989) A theoretical framework for data analysis of wind dispersal of seed and pollen. *Ecology* **70**, 329-338.
- Olalde M, Herrán A, Espinel S, Goicoechea PG (2002) White oaks phylogeography in the Iberian Peninsula. *Forest Ecol Manag* **156**, 89-102.
- Parker KC, Hamrick JL, Parker AJ, Nason JD (2001) Fine-scale genetic structure in *Pinus clausa* (Pinaceae) populations: effects of disturbance history. *Heredity* **87**, 99-113.
- Petit JR, Bialozyt R, Garnier-Géré PH, Hampe A (2004) Ecology and genetics of tree invasions: from recent introductions to Quaternary migrations. *Forest Ecol Manag* **197**, 117-137.
- Petit RJ, Brewer S, Bordács S, *et al.* (2002) Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecol Manag* **156**, 49-74.
- Petit RJ, Hampe A, Cheddadi R (2005) Climate changes and tree phylogeography in the Mediterranean. *TAXON* **54**, 877-885.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* **90**, 502-503. <http://www1.montpellier.inra.fr/URLB/bottleneck/bottleneck.html>.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* **6**, 847-856.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Pritchard JK, Wen W (2004) Documentation for STRUCTURE software version 2. <http://pritch.bsd.uchicago.edu>.

- Pyhäjärvi T, García-Gil MR, Knürr T, *et al.* (2007) Demographic history has influenced nucleotide diversity in European *Pinus sylvestris* populations. *Genetics* **177**, 1713-1724.
- Ritland K (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using *n* independent loci. *Heredity* **88**, 221-228.
- Robledo-Arnuncio JJ (2004) *Estructura genética y dispersión polínica de Pinus sylvestris L. en la meseta norte (España)* Tesis doctoral. Departamento de Silvopascicultura, Universidad politécnica de Madrid. Madrid
- Robledo-Arnuncio JJ, Alía R, Gil L (2004a) Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Mol Ecol* **13**, 2567-2577.
- Robledo-Arnuncio JJ, Austerlitz F, Smouse PE (2006) A new indirect method of estimating the pollen dispersal curve, independently of effective density. *Genetics* **173**, 1033-1045.
- Robledo-Arnuncio JJ, Austerlitz F, Smouse PE (2007) POLDISP: a software package for indirect estimation of contemporary pollen dispersal. *Mol Ecol Notes* **7**, 763-766. <http://poldisp.googlepages.com>.
- Robledo-Arnuncio JJ, Gil L (2005) Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* **94**, 13–22.
- Robledo-Arnuncio JJ, Smouse PE, Gil L, Alía R (2004b) Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. *Forest Ecol Manag* **197**, 245-255.
- Roig S, Gómez Manzaneque F, Masedo F, Morla C, Sánchez Hernando LJ (1997) Estudio paleobotánico de estróbilos y maderas subfósiles holocenas en el yacimiento de Cevico Navero (Palencia, España). *Anales Jard Bot Madrid* **55**, 111-123.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* **4**, 137-138. <http://www.cmb.usc.edu/~noahr/distruct.html>.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-Statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Rousset F (2000) Genetic differentiation between individuals. *J Evolution Biol* **13**, 58-62.
- Salvador L, Alía R, Agúndez D, Gil L (2000) Genetic variation and migration pathways of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in the Iberian peninsula. *Theor Appl Genet* **100**, 89-95.
- SAS (2002-2003) version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

- Schnabel A, Nason JD, Hamrick JL (1998) Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L.: seed dispersal and variation in female reproductive success. *Mol Ecol* **7**, 819-832.
- Schoen DJ, Brown AHD (1991) Intraspecific variation in population gene diversity and effective population size correlates with the mating systems in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 4494-4497.
- Schuster WSF, Mitton JB (2000) Paternity and gene dispersal in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Heredity* **84**, 348-361.
- Shea KL (1987) Effects of population structure and cone production on outcrossing rates in Engelmann spruce and subalpine fir. *Evolution* **41**, 124-136.
- Shea KL, Furnier GR (2002) Genetic variation and population structure in central and isolated populations of balsam fir, *Abies balsamea* (Pinaceae). *Am J Bot* **89**, 783-791.
- Sierra-de-Grado R, Moulia B, Fournier M, Alía R, Díez-Barra R (1997) Genetic control of stem form in *Pinus pinaster* Ait. seedlings exposed to lateral light. *Trees* **11**, 455-461.
- Sinclair WT, Morman JD, Ennos RA (1999) The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Mol Ecol* **8**, 83-88.
- Slatkin M (1973) Gene flow and selection in a cline. *Genetics* **75**, 733-756.
- Smouse P, Dyer RJ, Westfall RD, Sork VL (2001) Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* **55**, 260-271.
- Smouse P, Meagher TR, Kobak CJ (1999) Parentage analysis in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae): why do some males have higher reproductive contributions? *J Evolution Biol* **12**, 1069-1077.
- Smouse P, Robledo-Arnuncio JJ (2005) Measuring the genetic structure of the pollen pool as the probability of paternal identity. *Heredity* **94**, 640-649.
- Smouse P, Sork VL (2004) Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecol Manag* **197**, 21-38.
- Sork VL, Smouse PE (2006) Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecol* **21**, 821-836.
- Storz JF, Beaumont MA (2002) Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical bayesian model. *Evolution* **56**, 154-166.

- Storz JF, Beaumont MA, Alberts SC (2002) Genetic evidence for long-term population decline in a Savannah-Dwelling Primate: inferences from a hierarchical bayesian model. *Mol Biol Evol* **19**, 1981-1990.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A-G, Cossons J-F (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol Ecol* **7**, 453-464.
- Tapias R, Climent J, Pardos JA, Gil L (2004) Life histories of Mediterranean pines. *Plant Ecol* **171**, 53-68.
- Team RDC (2007) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2.6.1. R Development Core Team. <http://www.R-project.org>.
- Templeton AR, Shaw K, Routman E, Davis SK (1990) The genetic consequences of habitat fragmentation. *Ann Mo Bot Gard* **77**, 13-27.
- Thompson JD (1999) Population differentiation in Mediterranean plants: insights into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. *Heredity* **82**, 229-236.
- Torres AM, Weeden NF, Martín A (1993) Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theor Appl Genet* **93**, 613-617.
- Troupin D, Nathan R, Vendramin GG (2006) Analysis of spatial genetic structure in an expanding *Pinus halepensis* population reveals development of fine-scale genetic clustering over time. *Mol Ecol* **15**, 3617-3630.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* **4**, 535-538. <http://www.microchecker.hull.ac.uk/>.
- Van Treuren R, Bulsma R, Ouborg NJ, Kwak MM (1994) Relationships between plant density, outcrossing rates and seed set in natural and experimental populations of *Scabiosa columbaria*. *J Evolution Biol* **7**, 287-302.
- Vekemans X, Hardy J (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol Ecol* **13**, 921-935.
- Vendramin GG, Lelli L, Rossi P, Morgante M (1996) A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Mol Ecol* **5**, 595-598.
- Verdú M, González-Martínez SC, Montilla AI, Mateu I, Pannell JR (2006) Ovule discounting in an outcrossing, cryptically dioecious tree. *Evolution* **60**, 2056-2063.

- Walter R, Epperson BK (2001) Geographic pattern of genetic variation in *Pinus resinosa*: area of greatest diversity is not the origin of postglacial populations. *Mol Ecol* **10**, 103-111.
- Ward M, Dick CW, Gribel R, Lowe AJ (2005) To self, or not to self: A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity* **95**, 246-254.
- Wasieliwska M, LKlemm M, Burczyk J (2005) Genetic diversity and mating system of Scots pine plus trees. *Dendrobiology* **53**, 57-62.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- White GM, Boshier DH, Powell W (2002) Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 2038-2042.
- Williams DA, Wang Y, Borchetta M, Gaines MS (2007) Genetic diversity and spatial structure of a keystone species in fragmented pine rockland habitat. *Biol Conserv* **138**, 256-268.
- Willyard A, Syring J, Gernandt DS, Liston A, Cronn RC (2006) Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Mol Biol Evol* **24**, 90-101.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-138.
- Wright S (1946) Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* **31**, 39-59.
- Young AG, Boyle T, Brown AHD (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol* **11**, 413-418.
- Young AG, Merriam HG (1994) Effects of forest fragmentation on the spatial genetic structure of *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. *Heredity* **72**, 201-208.



## 8 ANEJOS



