

# ESTRUCTURA POBLACIONAL Y FLUJO GENÉTICO EN UN REGENERADO NATURAL DE *PINUS PINASTER* AIT. (COCA, SEGOVIA)

S.C. González Martínez<sup>1,2</sup>, I. Miguel<sup>2</sup>, M. Allué-Andrade<sup>3</sup>, R. Alía Miranda<sup>1</sup> y L. Gil Sánchez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Depto. de Mejora Genética y Biotecnología. CIFOR-INIA. Carretera de la Coruña km. 7. 28040-MADRID (España). Correo electrónico: santiago@inia.es

<sup>2</sup> Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética. E.T.S. de Ingenieros de Montes. Ciudad Universitaria, s/n. 28040-MADRID (España)

<sup>3</sup> Servicio Territorial de Segovia. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León. Plaza de la Reina D<sup>a</sup> Juana 5. 40001-SEGOVIA (España)

## Resumen

El análisis mediante marcadores moleculares de la estructura poblacional y genética de los repoblados constituye una valiosa herramienta para el estudio de los procesos de regeneración natural, para la optimización de las prácticas selvícolas y para el diseño de las estrategias de conservación y mejora de las especies forestales. En este trabajo se analiza información genética procedente del regenerado natural existente en una parcela de *Pinus pinaster* ubicada en Coca (Segovia), presentándose datos poblacionales (distribución de edades y alturas, estructura espacial de la regeneración) y genéticos (flujo genético, estructura genética y composición de los golpes de regenerado). Estos últimos son el resultado de un análisis de parentesco basado en tres marcadores de ADN nuclear altamente polimórficos. El regenerado presenta una distribución contagiosa. Su distribución de edades es continua y abarca desde plántulas del año hasta ejemplares de 25 años, así como individuos dispersos de edad superior a 30 años. El flujo genético procedente del arbolado que circunda la parcela es muy alto, estimándose que el porcentaje de plántulas con alguno de sus progenitores fuera de la misma (50 m de radio) supera el 86%. Los grupos de regenerado se componen de individuos que no están, por lo general, emparentados entre sí. En consecuencia, su formación parece encontrarse relacionada con la existencia de condiciones microestacionales propicias. A pesar de ello, se ha encontrado una clara estructura genética en los primeros 15 metros a partir de los árboles madre, lo que parece indicar una dispersión restringida de la cosecha de semilla.

Palabras clave: *Marcadores moleculares, Dispersión de semilla, Regeneración natural, Meseta castellana, Pino nigral*

## INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la estructura poblacional de las masas forestales resulta determinante para la conservación de sus recursos genéticos y permite optimizar su gestión. La estructuración familiar de los regenerados naturales condiciona la estrategia de selección de los árboles padre en las cortas y el espaciamiento mínimo aceptable

entre ellos, así como la validez de los ensayos de progenie basados en familias de polinización abierta y la selección de árboles plus (SORENSEN & WHITE, 1988; ADAMS, 1992). Por otra parte, la existencia de un flujo genético elevado limita en gran medida la contribución de los árboles padre a la siguiente generación (YAZDANI et al., 1989; YAZDANI & LINDGREEN, 1992). Así pues, las conclusiones derivadas del estudio de los nive-

les de flujo en regenerados naturales pueden ser de gran ayuda a la hora de determinar la forma en que deben conducirse las cortas de regeneración. Los análisis basados en marcadores moleculares que se describen en este trabajo constituyen una primera aportación al estudio de la estructura genética de las masas mediterráneas de pino negro (*Pinus pinaster* Ait.).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Características de la zona y del regenerado en estudio

La parcela de estudio está situada en el tronzón 1 del cuartel A de la sección 2ª del monte nº 105 del C.U.P. de Segovia, propiedad de la Comunidad de Villa y Tierra de Coca. En el trabajo de ALLUÉ Y ALLUÉ (1994) puede encontrarse una referencia detallada acerca de las características ecológicas de este típico pinar resinero sobre sustratos arenosos, así como de los avatares de la marcha ordenada del monte desde 1901. El tronzón en que se ubica la parcela pertenece al tramo I y, en consecuencia, fue de los primeros regenerados a principios del siglo XX. La resinación de los pinos del tronzón se inició hacia 1970. El método de cortas comúnmente utilizado en la masa es una variante del aclareo sucesivo uniforme. Los pies prematuramente agotados y los árboles secos se extraen con frecuencia en una o más intervenciones muy ligeras que preceden a las cortas de regeneración en sentido estricto, provocando a menudo la aparición de regenerado adelantado. Las cortas de regeneración en los tramos I del monte se iniciaron en 1996. No se ha producido hasta la fecha ninguna intervención de este tipo en el tronzón 2ªA1, aunque sí se ha procedido al apeo de pies secos en diversas ocasiones.

La parcela elegida tiene un radio de 50 m y una superficie de 0,78 ha. En ella se han determinado las edades, alturas y circunferencias normales de todos los árboles adultos (76). Se recogieron también las alturas y las edades -por conteo de verticilos- del regenerado de altura superior a 20 cm presente en una subparcela concéntrica de la anterior de 25 m de radio (132 individuos), con 0,20 ha. Se tomaron además las referencias de la posición de cada individuo con respecto al centro

de ambas parcelas. El marcado individual de las plántulas en el terreno permitió el seguimiento de su mortalidad durante el verano de 1999.

### Marcadores moleculares

Para la realización del análisis de parentesco se recogieron acículas de todos y cada uno de los árboles o plántulas considerados, conservándolas en frío hasta su análisis en laboratorio. Para la extracción de ADN se ha seguido un protocolo modificado de DELLAPORTA *et al.* (1983), utilizando tres microsatélites nucleares (SSRs) desarrollados en el *Laboratoire de génétique et amélioration des arbres forestiers* del INRA en Burdeos: *Itp4516* (13 alelos;  $He=0,89$ ), *Frpp91* (22 alelos;  $He=0,91$ ) y *Frpp94* (8 alelos;  $He=0,73$ ). Frente a otros marcadores, los SSRs nucleares presentan la ventaja de ser codominantes y altamente polimórficos. La exclusión de parentesco (probabilidad de detectar el árbol progenitor, conocido el genotipo de la plántula) obtenida al utilizar estos marcadores supera el 90%. Los detalles sobre la amplificación y lectura de los marcadores utilizados se describen en el trabajo de MARIETTE *et al.* (2001).

### Análisis de datos

Se analizó en primer lugar la distribución de edades y alturas del regenerado en la parcela así como su distribución espacial, para lo que se utilizó el estadístico  $K$  de Ripley, que permite comparar el número de plántulas existente en una parcela de un determinado radio con el esperado en una distribución espacial aleatoria. La simulación de 1.000 distribuciones aleatorias de plántulas permitió calcular valores del índice  $K$  para radios de 1 a 50 metros, determinando intervalos de confianza al 95%. Posteriormente se procedió a un análisis de parentesco basado en los genotipos de cada árbol. Con el objeto de determinar los parentales más probables (tanto padres individuales como parejas) se calcularon los siguientes cocientes de verosimilitud o *LOD-scores* (MEAGHER & THOMPSON, 1986):

Padres individuales:

$$LOD - score (C \text{ padre de } B) = \log_e \frac{T(g_B/g_C) P(g_C)}{P(g_B) P(g_C)} = \frac{T(g_B/g_C)}{P(g_B)}$$

Parejas:

$$LOD - score (C, D \text{ padres de } B) = \log_e \frac{T(g_B/g_C, g_D)}{P(g_B)}$$

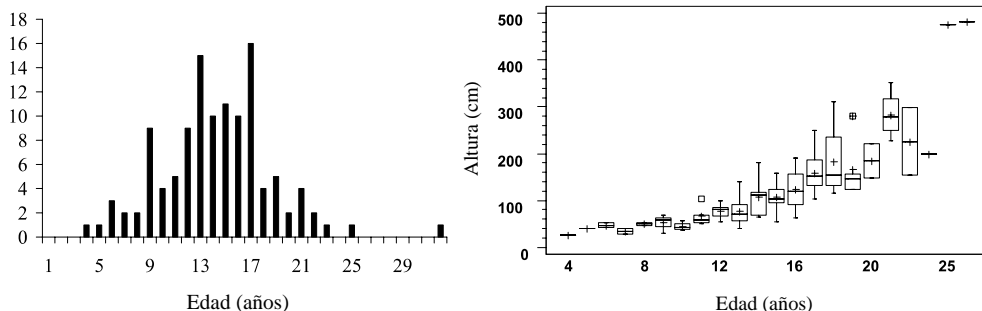
Donde  $C$  y  $D$  son dos parentales potenciales;  $B$  es una plántula dada;  $g_C$ ,  $g_D$  y  $g_B$  son los genotipos de  $C$ ,  $D$  y  $B$ , respectivamente;  $P$  es la frecuencia poblacional de un genotipo dado; y  $T$  es la probabilidad de transición de  $B$  para cada caso ensayado, es decir, la probabilidad de obtener el genotipo de la plántula  $B$  a partir del genotipo del parental  $C$  o parentales  $C$  y  $D$  potenciales.

Una vez calculados los *LOD-scores* de todos los parentales potenciales con cada plántula se seleccionaron aquéllos con mayor cociente de verosimilitud, utilizando poblaciones simuladas para el cálculo de la probabilidad de cada asignación (GERBER et al., 2000). Se utilizaron las asignaciones parental potencial-plántula más fiables ( $p < 0,15$ ) para estudiar la estructura genética de la población, comparando la distribución de distancias entre los parentales y su progenie con la distribución de distancias obtenida por permutación de las coordenadas de los individuos, que representa distancias entre árboles adultos y plántulas elegidos al azar. Para la comparación entre ambas distribuciones se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov ( $ks$ ). Con el objeto de construir una distribución de distancias medias generadas al azar para compararla con la distancia media entre los parentales y su progenie, este procedimiento se repitió 10.000 veces. Para la realización de todos los análisis se utilizaron programas en C++ de libre disposición, desarrollados por E. Thompson (*University of Washington*).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El regenerado presenta una estructura espacial contagiosa, formando grupos de pequeñas dimensiones ( $K$  de Ripley máxima entre 3 y 7 m de radio). Las edades del repoblado cubren un amplio rango, pudiendo encontrarse desde plántulas del año hasta individuos de 25 años, así como ejemplares dispersos de edad superior a 30 años (ver figura 1). La estructura de la distribución de alturas para cada edad parece sugerir la estabilidad de la posición social de las plántulas a partir de los 12 años. Esta circunstancia contrasta con lo observado en once parcelas de regeneración natural de *Pinus sylvestris*, ubicadas en el alto valle del Ebro (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ Y BRAVO, 2001). En ellas, la diferenciación social de las plántulas se producía en los primeros años, quedando determinada por lo tanto la posición social de los árboles a lo largo de las primeras estaciones de crecimiento. Sobre esta circunstancia conviene no obstante tener presente que la población estudiada en Coca constituye un regenerado adelantado, cuyo desarrollo obedece a circunstancias posiblemente muy diferentes de las que gobiernan el establecimiento y primer crecimiento de los repoblados de la misma especie a que dan lugar las cortas de regeneración, de mayor intensidad.

Tan sólo se han detectado 18 plántulas con los dos parentales en el interior de la parcela, aunque para 80 de ellas la existencia de al menos un parental en la parcela era probable (ver figura 2 para asignaciones con  $p < 0,15$ ). Todo ello implica un flujo genético, definido

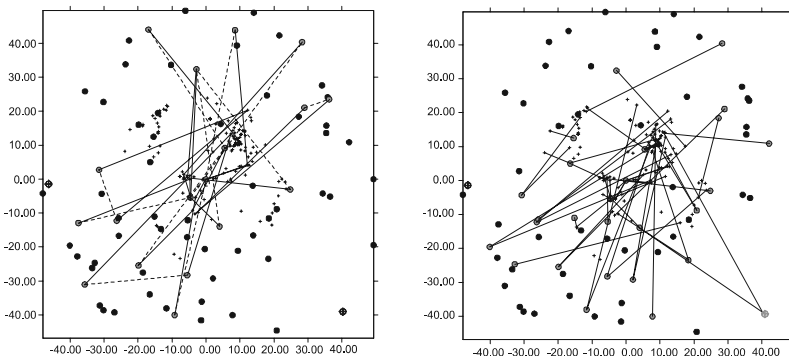


**Figura 1.** Estructura de la regeneración natural. Estructura de edades (izquierda) y diagrama de caja de las alturas (en cm) para cada edad (derecha).

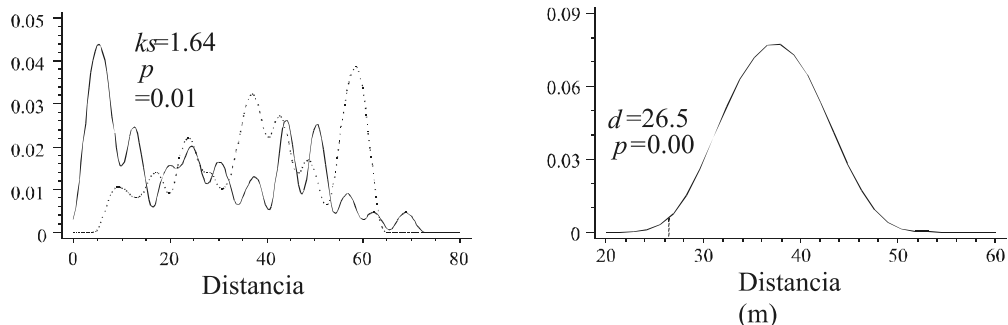
como el porcentaje de regenerado con al menos uno de los parentales fuera de la parcela, muy alto ( $\approx 86\%$ ), así como un notable desequilibrio en la capacidad de dispersión de los parentales femenino y masculino. Esta circunstancia parece frecuente en el género *Pinus*, en cuyas especies a menudo se presentan importantes diferencias entre las tasas de dispersión de polen y de semilla. Así, ENNOS (1994) registra tasas de dispersión de polen que superan en 24-64 veces las correspondientes a la dispersión de semillas para *Pinus contorta*, *P. radiata*, *P. attenuata* y *P. muricata*. Por otra parte, YAZDANI et al. (1989) comprobaron que tras una corta a hecho en un rodal sueco de *Pinus sylvestris* menos de un 10 % de la progenie de los árboles padre se encontraba en un radio de 10 m a partir de los mismos. De acuerdo con ADAMS (1992), el elevado flujo genético existente en las coníferas limita la formación de estructuras genéticas que favorezcan procesos de transmisión de caracteres favorables entre los árboles padre y el regenerado.

El análisis de la estructura genética de la población indica una estructura familiar en los primeros 15 m a partir de los árboles adultos pero no en distancias superiores (ver figura 3). La ausencia de estructura genética o el carácter débil de ésta parece frecuente en el género *Pinus* (EPPERSON & ALLARD, 1989; LEDIG, 1998). Por el contrario, diversas especies del género *Quercus* presentan fuertes estructuraciones. Así, de un estudio realizado por DOW &

ASHLEY (1996) en regenerados de *Quercus macrocarpa* se deduce que un 75% de las plántulas analizadas se situaban en grupos alrededor de uno de los parentales, pudiendo atribuirse tan sólo a cuatro árboles (6,5% del arbolado adulto) el 86% de la regeneración natural. En la parcela de Coca, los grupos de regenerado se componen de individuos que, por lo general, no están emparentados entre sí. En consecuencia, la ubicación de estos grupos podría estar relacionada con la existencia de condiciones microestacionales más favorables que las de su entorno. La zona de estudio se caracteriza por una baja producción de piña, así como por unas condiciones de sequedad estival acusada, aunque no muy prolongada en el tiempo. Existen además diversas referencias acerca de las elevadas temperaturas que pueden alcanzarse en los suelos arenosos sin cubierta vegetal que abundan en estos pinares durante las horas más calurosas de los días estivales (ALLUÉ Y ALLUÉ, 1994), próximas a los 60°. La mortalidad de la regeneración natural parece ser muy alta, incluso a edades relativamente elevadas. Tan sólo un 35% de las plántulas de edad inferior a cuatro años sobrevivieron a las condiciones del verano de 1999. En estas condiciones cabe esperar una marcada tendencia del repoblado a agruparse en los microhábitats más favorables, resultando determinantes a estos efectos tanto la influencia de los árboles padre como la competencia interespecífica con la vegetación leño-



**Figura 2.** Análisis de parentesco. Parejas (izquierda) y parentales individuales (derecha) con  $p < 0,15$ . Las líneas continuas unen los árboles padre (círculos) con su progenie (cruces). Las líneas discontinuas unen las parejas detectadas (izquierda).



**Figura 3.** Estructura genética del rodal. Comparación de la distribución de distancias entre árboles padre y su progenie (línea continua) con una distribución al azar (línea discontinua);  $ks$ : test de Kolmogorov-Smirnov (izquierda). Distribución de las distancias medias obtenida a partir de 10.000 permutaciones de coordenadas y distancia media ( $d$ ) entre árboles padre y su progenie (derecha).

sa y herbácea del sotobosque (DAVIS *et al.*, 1998). El estudio detallado de estos factores mejoraría notablemente la comprensión de los procesos de regeneración natural en ambientes mediterráneos.

## CONCLUSIONES

El análisis mediante marcadores moleculares practicado en el regenerado natural de *Pinus pinaster* Ait. objeto de estudio pone de manifiesto la existencia de un fuerte flujo genético y de una débil estructura familiar en la parcela. En las condiciones de trabajo, acusadamente mediterráneas, parece probable que el arbolado remanente en la superficie estudiada pueda desempeñar un importante papel en la supervivencia de los grupos de regenerado, ubicados en microhábitats favorables, aun cuando la contribución de los primeros a la nueva generación representada por los segundos haya sido muy limitada. Entre las cuestiones que cabría plantear en investigaciones futuras se encontrarían la magnitud del radio de la parcela teórica capaz de integrar la práctica totalidad de los progenitores del regenerado presente en la parcela estudiada, el grado de direccionalidad de su ubicación y, muy destacadamente, si las pautas detectadas se mantendrían en otras situaciones selvícolas, como, por ejemplo, en el caso de que se practicasen cortas de regeneración.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, W.T.; 1992. Gene dispersal within forest tree populations. *New Forests* 6: 217-240.
- ALLUÉ, C. Y ALLUÉ, M.; 1994. Notes on the managed development of the 'Pinar Viejo' pine forest (Coca, Segovia) from 1901 to 1990. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For., Fuera de Serie* 3: 259-281.
- DAVIS, M.A., WRAGE, K.J. & REICH, P.B.; 1998. Competition between tree seedlings and herbaceous vegetation: support for a theory of resource supply and demand. *J. Ecol.* 86: 652-661.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. & HICKS, J.B.; 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- DOW, B. & ASHLEY, M.; 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* 5: 615-627.
- ENNOS, R.A.; 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250-259.
- EPPERSON, B.K. & ALLARD, R.W.; 1989. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. *Genetics* 121: 369-377.
- GERBER, S., MARIETTE, S., STREIFF, R., BODÉNÈS, C. & KREMER, A.; 2000. Comparison of microsatellites and AFLP markers for parentage analysis. *Molecular Ecology* 9: 1037-1048.

- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C. Y BRAVO, F.; 2001. Density and population structure of the natural regeneration of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the High Ebro Basin (northern Spain). *Ann. For. Sci.* 58: 277-288.
- LEDIG, F.T.; 1998. Genetic variation in *Pinus*. In: D. M. RICHARDSON (ed.); *Ecology and biogeography of Pinus*: 251-280. Cambridge University Press. Cambridge.
- MARIETTE, S., CHAGNE, D., DECROOCQ, S., VENDRAMIN, G.G., LALANNE, C., MADUR, D. & PLOMION, C.; 2001. Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. *Ann. For. Sci.* 58: 203-206.
- MEAGHER, T.R. & THOMPSON, E.; 1986. The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. *Theoretical Population Biology* 29: 87-106.
- SORENSEN, F.C. & WHITE, T.L.; 1988. Effect of natural inbreeding on variance structure in tests of wind-pollination Douglas-fir progenies. *For. Sci.* 34: 102-118.
- YAZDANI, R. & LINDGREN, D.; 1992. Gene dispersion after natural regeneration under a widely-spaced seed-tree stand of *Pinus sylvestris* L. *Silvae Genetica* 41: 1-5.
- YAZDANI, R., LINDGREN, D. & STEWART, S.; 1989. Gene dispersion within a population of *Pinus sylvestris*. *Scand. J. For. Res.* 4: 295-306.