



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

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



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

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

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Diversidad genética y resiliencia de *Pinus radiata* en el norte de España

HURTADO GONZÁLEZ, M.¹, HERRERO PEDRERO, J¹., URRETA GÓMEZ, I.¹, MARINO BILBAO, D.², ALÍA MIRANDA, R.³ Y GOICOECHEA, P.G.¹

¹ Departamento de Ciencias Forestales. NEIKER-BRTA, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Campus Agroalimentario de Arkaute, Crtra N-104 km 355, 01192 Arkaute, Alava, España.

² Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV-EHU). Barrio Sarriena s/n 48940 Leioa, Bizkaia.

³ Centro de Investigación Forestal (CIFOR). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Carretera de la Coruña, km 7,5 28040 Madrid, España.

Resumen

La diversidad genética ha adquirido gran importancia para la mejora genética forestal como el mejor indicador de la resiliencia *sensu lato*, dada la correlación entre ambas variables. En este estudio hemos analizado 62 árboles plus del Huerto Semillero de pino radiata de Neiker y 44 parcelas del Inventario Forestal Nacional 2017. La diversidad genética se ha medido con 18 marcadores neutrales bien distribuidos en el genoma. Los resultados indican que todos los árboles analizados tienen un mismo origen genético, probablemente la procedencia de Año Nuevo. El coeficiente de parentesco muestra variaciones importantes entre los árboles plus del Huerto Semillero, permitiendo diseñar cruzamientos dirigidos para evitar problemas como la depresión endogámica. En lo que respecta a las parcelas de inventario, tanto los valores de heterocigosidad como los de riqueza alélica son bajos. Sin embargo, hemos detectado un gradiente de riqueza alélica, con valores más altos en el Oeste de la Cornisa Cantábrica. Dadas las expectativas de cambio climático, es posible que la diversidad genética necesaria para la adaptación de esta especie (resiliencia) deba basarse en genes que podrían encontrarse en el resto de procedencias originales de pino radiata, sin que pueda descartarse la necesidad de utilizar híbridos inter-específicos y/o herramientas biotecnológicas.

Palabras clave

Resiliencia, diversidad genética, SSRs, índice de parentesco, mejora genética forestal.

1. Introducción

La superficie forestal en España es la segunda mayor de toda Europa solo por detrás de Suecia con aproximadamente 27,5 Mha (Sociedad Española De Ciencias Forestales 2010), lo cual supone alrededor de un 55% de la superficie total y la tercera mayor en 2009 (18,3 Mha) en cuanto a superficie arbolada por detrás de Suecia y Finlandia. Además, es el país en Europa con mayor tasa de crecimiento anual de superficie arbolada (2,19 %) (Sociedad Española De Ciencias Forestales 2010). Estos datos permiten comprender la gran importancia del sector forestal en la economía española que en 2016 pudo estimarse una facturación de 20.000 millones de euros y más de 200.000 empleos directos e indirectos (www.chainwood.eu). La industria maderera tiene gran influencia en ello ya que solo en el País Vasco según el inventario forestal de Euskadi de 2011 ascienden a 62,6 millones de m³ y un crecimiento anual estimado de 3,4 millones de m³/año (Murua 2016). Una de las especies más importante en España y en particular en la industria de la madera es *Pinus radiata*, que ocupa 400000 ha, principalmente en el País Vasco (67%), Galicia (12%) y Asturias (11%) (www.especiesforestales.com).

Para la supervivencia y desarrollo de este sector tan importante es necesaria una gestión forestal sostenible que aborde cambios tales como la producción de madera de mayor valor añadido y la adaptación al cambio climático. Entre las previsiones se pueden destacar temperaturas más extremas, el aumento de las sequías, la desertización, olas de calor o inviernos más duros (National

Geographic 2017) que afectan directamente a la sostenibilidad de las explotaciones forestales de *P. radiata* en España. A modo de ejemplo, informes nacionales del 2020 muestran como la temperatura media de España se ha ido incrementando con el paso de los años, hasta marcar máximos los años 2017 y 2020 (desde que se contabiliza en 1961), 1 °C más que el promedio anual entre el periodo de referencia comprendido entre 1981 y 2010 (AEMET).

En el contexto de cambio climático, las posibilidades de adaptación tanto de las poblaciones naturales como de los bosques plantados dependerán de su resiliencia, que desde una perspectiva ecológica se define como la capacidad de adaptación de un ser vivo o de una población frente a un agente perturbador o un estado o situación adversos. La diversidad genética entre individuos dentro de una población aporta las bases mecánicas necesarias para la plasticidad y la adaptabilidad, de manera que un mayor número de genotipos (diversidad genética) se asocia con un abanico mayor de respuestas funcionales (versatilidad fisiológica), y por lo tanto una mayor probabilidad de que una población resista o se recupere de una perturbación (Hughes et al. 2004, Reusch et al. 2005, He et al. 2021), producida por ejemplo por el cambio climático. Esta afirmación, que hasta hace poco tiempo era un simple fundamento teórico se ha podido confirmar recientemente al demostrar como la diversidad genética estaba correlacionada con la respuesta de los bosques de algas a las olas de calor marinas (Weinberg et al. 2018).

La procedencia natural del pino radiata es una pequeña área de California (procedencias de Año Nuevo, Monterey, Cambria e Isla de Cedros) y la pequeña isla de Guadalupe perteneciente a Mexico (Ledig et al. 1998), aunque su extensión actual es mucho mayor debido a las plantaciones en Europa, Nueva Zelanda, Australia, Sudáfrica y Sudamérica. A pesar del desconocimiento de su origen en España existen datos que sugieren que todas las plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco pertenecen a la procedencia de Año Nuevo (Espinel et al. 1995), A pesar de que estas poblaciones han respondido favorablemente ante la selección para caracteres de crecimiento, su capacidad para adaptarse al cambio climático puede verse gravemente afectada si la diversidad genética es baja. Ante esta situación y con vistas a anticiparse a unas futuras condiciones inciertas es necesario un estudio de caracterización genética para poder valorar la adaptabilidad de la especie en el norte de España al cambio climático.

2. Objetivos

Nuestro objetivo principal es intentar que los árboles seleccionados del programa de mejora genética de pino radiata de Neiker (progenitores) contengan suficiente diversidad para asegurar la adaptación de las progenies a las condiciones ambientales previstas por el cambio climático. Dentro de este marco general, en el presente estudio hemos caracterizado la diversidad genética de las poblaciones de pino radiata de la Cornisa Cantábrica. Nuestra hipótesis es que, si la diversidad genética y la diferenciación son altas, podemos contar con el material genético necesario para incrementar la resiliencia en los programas de mejora genética de pino radiata (NEIKER y CIF Lourizan). Por el contrario, si la diversidad genética y la diferenciación son bajas, este incremento de resiliencia debería proceder bien de otras procedencias originales de pino radiata, bien de alguno de sus posibles híbridos interspecíficos o bien de cambios producidos con herramientas biotecnológicas (e.j., CRISPR-CAS9).

3. Metodología

3.1 Material vegetal

El material vegetal (acículas) se recogió por el personal de IFN 2017, en las parcelas de inventario de pino radiata en la Cornisa Cantábrica. En total, se analizaron 44 parcelas correspondientes a Asturias (9), Cantabria (9), Bizkaia (10), Gipuzkoa (10) y Araba (6). En cada

parcela se muestrearon acículas de 24 árboles que se guardaron en bolsas de plástico con cierre zip-lock en las que se había introducido un puñado de silice gel. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su recepción en NEIKER, donde se liofilizaron y se conservaron a -20°C hasta su utilización para la extracción de ADN. Nótese que las muestras no corresponden estrictamente a los árboles de las parcelas del IFN (en muchos casos la parcela contenía menos árboles y en otros las acículas estaban demasiado altas), sino que proceden de árboles de la misma plantación que tenían acículas fácilmente accesibles.

Por otra parte, NEIKER recogió acículas de 62 árboles plus del Huerto Semillero (HS) del programa de mejora genética de pino radiata, conservándolas en las mismas condiciones que el resto de muestras.

3.2 Genotipado

Se extrajo el ADN de las acículas proporcionadas mediante el kit de extracción innuPREP Plant DNA Kit y se siguió el protocolo 1 de las instrucciones del fabricante, triturando 50 mg de biomasa con la ayuda de un moledor mecánico. La ausencia de contaminantes en el ADN se comprobó mediante los ratios de absorbancias 260/280 y 260/230 en un Nanodrop. Cuando dichos ratios se encontraban entre los valores adecuados (1,8-2 y >1 respectivamente) se obtuvieron las lecturas de concentración del ADN. Los ADNs concentrados se guardaron a -20°C hasta su uso en diluciones a 5ng/µL y conservación a 4°C

Para el genotipado, se llevó a cabo una primera selección de 24 SSRs de secuencias genómicas de *P. radiata* y *P. taeda* a partir del mapa genético de *P. taeda* (Echt et al. 2011) que incluían marcadores tanto del propio estudio como de anteriores (Auckland et al. 2002 y Chagne et al. 2004). La selección se basó en la inclusión de dos marcadores por cada uno de los 12 grupos de ligamiento (GL), lo más alejado posible entre ellos, con el objetivo de obtener una representación del genoma lo más completa posible. Los SSRs seleccionados se probaron en una muestra de 16 árboles, variándose las condiciones de PCR hasta obtener perfiles claros que permitieran asignar inequívocamente los alelos a los diferentes loci. Se realizó una segunda selección de 12 marcadores pertenecientes a los GL cuyos SSRs no pudieron amplificarse y resolverse de manera satisfactoria o no mostraron polimorfismo. Al final, el estudio se llevó a cabo con 18 SSRs (Tabla 1), de los cuales 11 provenían de secuencias genómicas de *P. taeda* y 7 de *P. radiata*). Las PCRs se llevaron a cabo con 0,5 U de Taq polimerasa (KAPA Taq), 1X tampón de amplificación 0,8 µM de dNTPs de Invitrogen, cebadores y MgCl₂ en las cantidades indicadas en la tabla 1. Los ciclos empleados fueron los siguientes: (1) fase inicial de “touch down” (-0,7 °C/ciclo durante 5 ciclos) hasta alcanzar la temperatura de anillamiento (Tabla 1); (2) 40 ciclos de desnaturación durante 30 segundos a 94 °C; (3) anillamiento durante 30 segundos a la temperatura indicada; (4) una fase de extensión a 72 °C durante 1 minuto; (5) una fase final y única de extensión adicional de 10 minutos a 72 °C. Las PCRs se conservaron a 4 °C hasta su utilización (generalmente 1 o 2 días después).

Tabla 1. Información de los marcadores SSR empleados.

SSRs	LG	TA	[MgCl ₂]	[Cebadores (F/R)]	Referencia
NZPR0943	1	60,5 °C	2,5 µM	0,1 µM	Echt et al. 2011
PtRIP_0211	1	57,0 °C	2,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
PtTX2094	2	55,0 °C	1,5 µM	0,2 µM	Auckland et al. (2002)
PtSIFG_1207	2	55,0 °C	2,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
NZPR0473	3	50,5 °C	1,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011

PtRIP_0179	3	60,5 °C	2,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
NZPR0413	4	55,0 °C	1,5 µM	0,2 µM	Chagne et al. (2004)
NZPR0206	5	56,5 °C	2,5 µM	0,1 µM	Echt et al. 2011
PtRIP_0960	6	55,0 °C	1,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
PtSIFG_1005	7	55,0 °C	1,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
PtRIP_0689	8	55,0 °C	1,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
PtRIP_0658	8	58,0 °C	1,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
NZPR1004	9	57,0 °C	1,5 µM	0,1 µM	Echt et al. 2011
PtSIFG_0408	9	55,0 °C	1,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
PtRIP_0255	10	55,0 °C	1,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
NZPR0599	11	60,5 °C	2,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
NZPR0274	12	55,0 °C	2,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011
PtRIP_9138	12	53,5 °C	2,5 µM	0,2 µM	Echt et al. 2011

La separación de los fragmentos de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis capilar en un secuenciador Applied Biosystems 3500. Los tamaños crudos de los alelos se obtuvieron con el software GeneMapper® version 5 (Applied Biosystems™) y el binado se realizó con el paquete de R MsatAllele (Alberto 2009).

3.3 Análisis

3.3.1 Diferencias entre marcadores

Las diferencias entre los marcadores empleados en este estudio se analizaron mediante 3 parámetros: (1) datos perdidos, (2), heterocigosidad (Nei, 1987) y (3) Riqueza Alélica (RA), estimada mediante el número de alelos esperados (Mousadik & Petit 1996). El análisis de datos perdidos se llevó a cabo obteniendo el porcentaje de la totalidad de las muestras (44 parcelas IFN + Huerto Semillero). La heterocigosidad de los marcadores fue medida con el programa Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010) mientras que la RA fue estimada del paquete de R PopGenReport (Adamack & Gruber 2014). Tanto la heterocigosidad como la RA se analizaron con las 44 poblaciones del IFN que se emplearían posteriormente en el análisis de poblaciones. Dado que para los análisis de heterocigosidad se fijó un máximo de 10 % de datos perdidos por locus y en la RA no es posible llevar a cabo el cálculo cuando existen poblaciones sin datos para algún locus el número útil de marcadores (loci usables) se redujo. En concreto se emplearon 13 marcadores SSR para el análisis de heterocigosidad (ya que 5 marcadores superaban el 10 % de datos perdidos) y 17 para la RA (1 SSR no contenía datos para varias poblaciones del IFN).

3.3.2 Estructura Genética de las Poblaciones

Las relaciones genéticas entre poblaciones del IFN se analizaron con el método de clusterización Bayesiano de Structure v2.3.4 (Pritchard et al. 2010, Falush et al. 2003) y con la librería de R rmaverick (Verity & Nichols 2016) aplicando los datos del genotipado de los 18 SSRs. Los modelos testados con Structure fueron “admixture” (en el que pueden existir individuos híbridos *sensu lato*) con frecuencias alélicas correlacionadas tanto cuando F_{ST} se asume igual entre poblaciones como diferente. Para cada valor de K=1-5 (número de poblaciones) se obtuvieron 5

ríplicas a partir de una fase de “burn-in” de 1×10^5 iteraciones seguidas de $2,5 \times 10^5$ iteraciones finales. Los resultados de las simulaciones se analizaron con el programa Structure Harvester (Earl and vonHoldt 2012).

rmaverick está basado en los mismos modelos que Structure, pero la elección del número de poblaciones se lleva a cabo mediante un método bayesiano muy apropiado para el modelo matemático subyacente (integración termodinámica). Gracias a ello, rmaverick permite distinguir entre los casos de K=1 y K=2. El análisis se corrió no solo con el modelo “admixture” sino también con el modelo “no admixture” (en el que las poblaciones se mantienen completamente aisladas) con 2×10^6 iteraciones “burn-in” para el modelo “admixture” y 1×10^6 iteraciones para el modelo “no-admixture”, seguido en ambos modelos de 2×10^5 iteraciones “sampling”. Este análisis fue llevado a cabo sobre las 44 parcelas del IFN.

3.3.3 Diversidad y Diferenciación Genéticas de las poblaciones del IFN

Los SSRs permiten además medir la diversidad genética mediante los dos parámetros antes mencionados (heterocigosidad y RA). Esta tarea se llevó a cabo con PopGenReport, empleando las 44 poblaciones del IFN y los 13 marcadores utilizables para la heterocigosidad y 17 para la RA. La diferenciación genética que fue analizada en las 44 poblaciones del IFN, así como en el Huerto Semillero fue estimada a partir del método de número diferente de alelos de Arlequin (Excoffier and Lischer 2010) conveniente cuando las poblaciones a analizar no son naturales. En este caso el número usable de loci fueron 13 por el mismo motivo que la heterocigosidad. Los mapas de diversidad y diferenciación genética se realizaron con el paquete de R ggplot2 (Wickham 2016). Para la mejor visualización de los datos de riqueza alélica se realizó una interpolación geoestadística de puntos intermedios. Esta interpolación, conocida como “Krigging”, se calculó con el paquete de R auto-map (Hiemstra et al. 2009).

3.3.4 Parentesco entre los árboles ‘plus’

Las relaciones de parentesco entre los árboles “plus” del programa de mejora genética de pino radiata de Neiker se estimaron con el programa SPAGeDi v1.5d (Hardy & Vekemans 2002), utilizando el coeficiente de parentesco de J. Nason, al que se hace referencia en Losielle et al., 1995. Para ello se emplearon 16 de los 18 marcadores SSR ya que 2 de ellos no contenían datos para ningún árbol del Huerto Semillero. El coeficiente de parentesco (F) se define como la probabilidad de identidad por descendencia de alelos homólogos (Ritland 1996). Sin embargo, los estimadores basados en marcadores genéticos realmente estiman un “parentesco relativo” que se puede definir como los cocientes de diferencias de probabilidades de identidad (Rousset 2002, Vekemans & Hardy 2004). Por lo tanto, generalmente no es correcto equiparar este tipo de coeficientes con la probabilidad de identidad por descendencia. En el caso de dos individuos i y j el coeficiente de parentesco se puede definir como $F_{ij} = (Q_{ij} - Q_m) / (1 - Q_m)$, donde Q_{ij} es la probabilidad de identidad de copias de genes aleatorios de i y j, y Q_m es la media de probabilidades de identidad para las copias de genes que provienen de individuos aleatorios de la muestra (o la población de referencia).

4. Resultados

4.1 Caracterización de los marcadores SSR

La figura 1 muestra la caracterización de los marcadores SSR empleados en el estudio. En los datos perdidos (Figura 1a), contabilizados en los 18 marcadores, se observa un grupo de 10 SSRs que contienen una cantidad baja (menor del 4%), otro grupo con una cantidad moderada (entre el 6 y el 10%) y un grupo final de 5 marcadores con una gran cantidad de datos perdidos (mayor del 10%). Son estos 5 marcadores precisamente los que se descartan a la hora de llevar a cabo los análisis de

heterocigosidad por superar esa cantidad. Los 13 marcadores restantes para el análisis (Figura 1c) muestran un alto grado de variabilidad (0,22-0,86). En cuanto a la RA uno de los marcadores carece de datos para ciertas poblaciones del IFN, por lo que no es aplicable en este análisis. La RA analizada en los 17 loci válidos restantes (Figura 1d), también muestran cierto grado de variabilidad (1,93-12,46). Tanto heterocigosidad como riqueza alélica, distribuyen su variabilidad entre loci de manera gradual, por lo que no se distinguen grupos marcados de SSR para estos parámetros (Figuras 1b y c). Finalmente, se puede apreciar una correlación positiva significativa entre heterocigosidad y RA para los 13 marcadores comunes aplicables (Figura 1b).

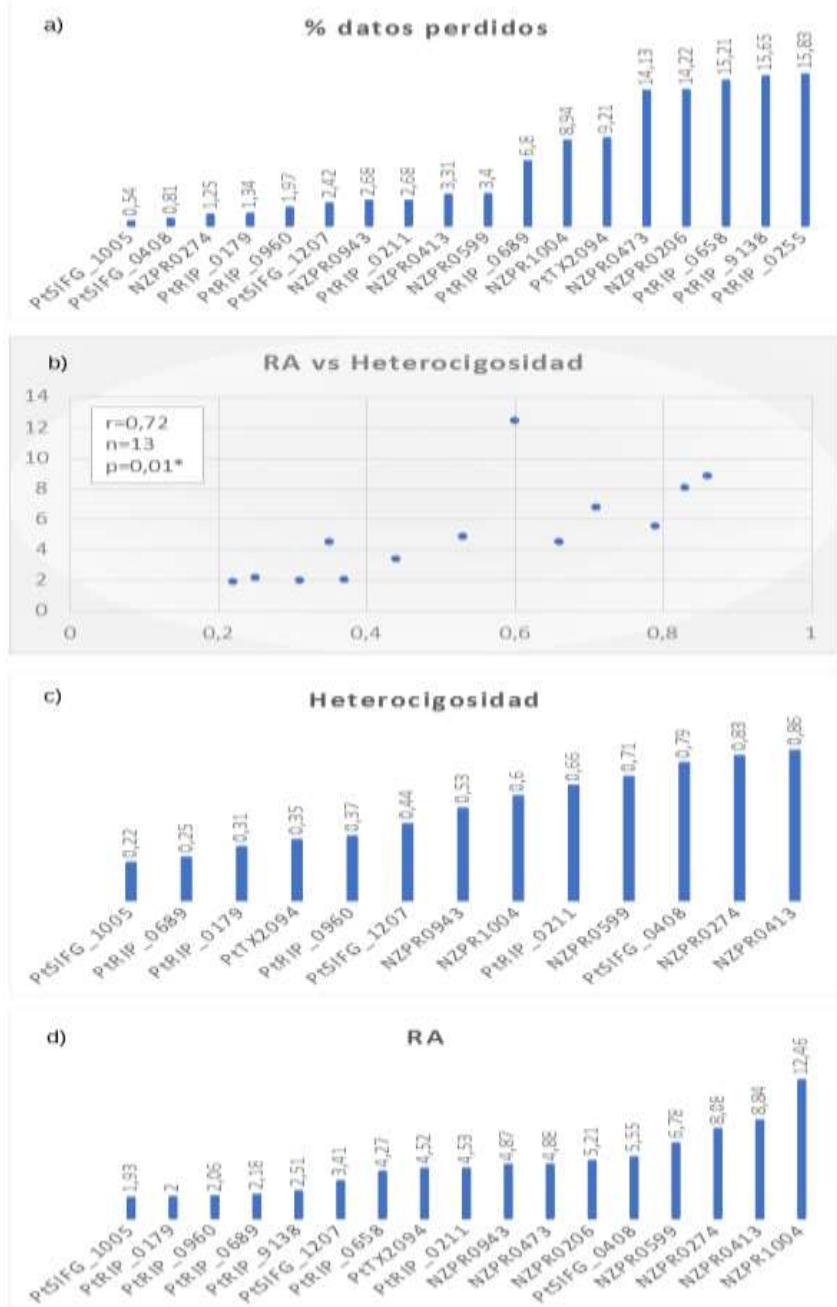


Figura 1. Caracterización de los SSRs empleados. Porcentaje de datos perdidos (a), correlación heterocigosidad y RA (b), heterocigosidad (c) y RA (d).

4.2 Estructura genética

El análisis de los resultados de Structure con Structure Harvester indica que Delta K alcanza su valor máximo para $K=3$ (Figura 2a) en el modelo de admixture con frecuencias alélicas correlacionada (tanto cuando Fst se asume igual entre poblaciones como diferente). Sin embargo, los gráficos de composición genética de cada individuo indican que tanto para $K=3$ como para $K=2$ todos los individuos muestran niveles intermedios de admixture (Figura 2b), sin que existan individuos “puros” de ningún grupo. Esto hace sospechar que la estructura genética real es $K=1$, es decir, todas las muestras pertenecen al mismo pool genético, la misma población.

Los resultados obtenidos con rmaverick confirman esta hipótesis, indicando una probabilidad posterior cercana a 1 para el caso $K=1$ y probabilidades posteriores prácticamente nulas para el resto de casos, tanto para el modelo con admixture como para el modelo sin admixture (Figura 2c,d,e,f.).

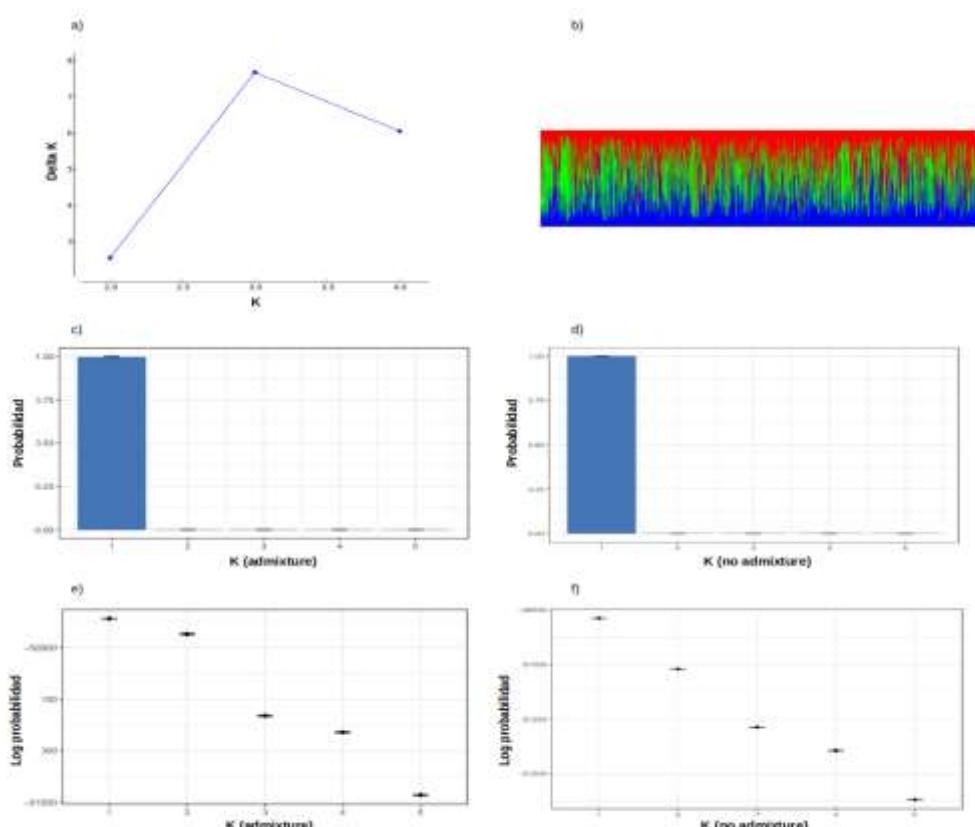


Figura 2. Probabilidad de número de poblaciones a las que pertenece el Pino radiata en el norte de España según Structure (a), gráfico de composición genética para 3 poblaciones de Structure, probabilidad del número de poblaciones según rmaverick para los modelos “admixture” (c) y “no admixture” (d) y logaritmo de la probabilidad para “admixture” (e) y “no admixture” (f).

4.3 Diversidad y diferenciación genética de las poblaciones

Los valores de heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada fueron bastante bajos y de magnitudes similares en todas las poblaciones analizadas (Figura 3a). El análisis de la distribución espacial de la heterocigosidad no permite obtener conclusiones al respecto. Aunque se pueda apreciar tímidamente un grado mayor de heterocigosidad hacia el oeste no existe correlación significativa entre dicha variable y longitud (Figura 4a).

Los valores de riqueza alélica se comportaron de manera similar a los de la heterocigosidad, pero en este caso la tendencia a una mayor riqueza alélica en las poblaciones del Oeste de la Cornisa Cantábrica es más robusta. Esta relación espacial es más clara tras la interpolación geoestadística de los puntos restantes de la zona norte de España (Figura 3b), que se ha comprobado que es estadísticamente significativa como se puede apreciar en la correlación entre longitud y RA (Figura 4b).

En cuanto a la diferenciación genética, se llevó a cabo mediante el método de número diferente de alelos de Arlequin. Los resultados indican que la gran mayoría de las poblaciones no son significativamente diferentes. Sin embargo, existen 5 poblaciones diferenciadas significativamente al menos con el 90% del resto de las parcelas del IFN, todas ellas en el País Vasco (Figura 3c). El Huerto Semillero también mostró diferenciación con la totalidad de las poblaciones del norte de España analizadas.

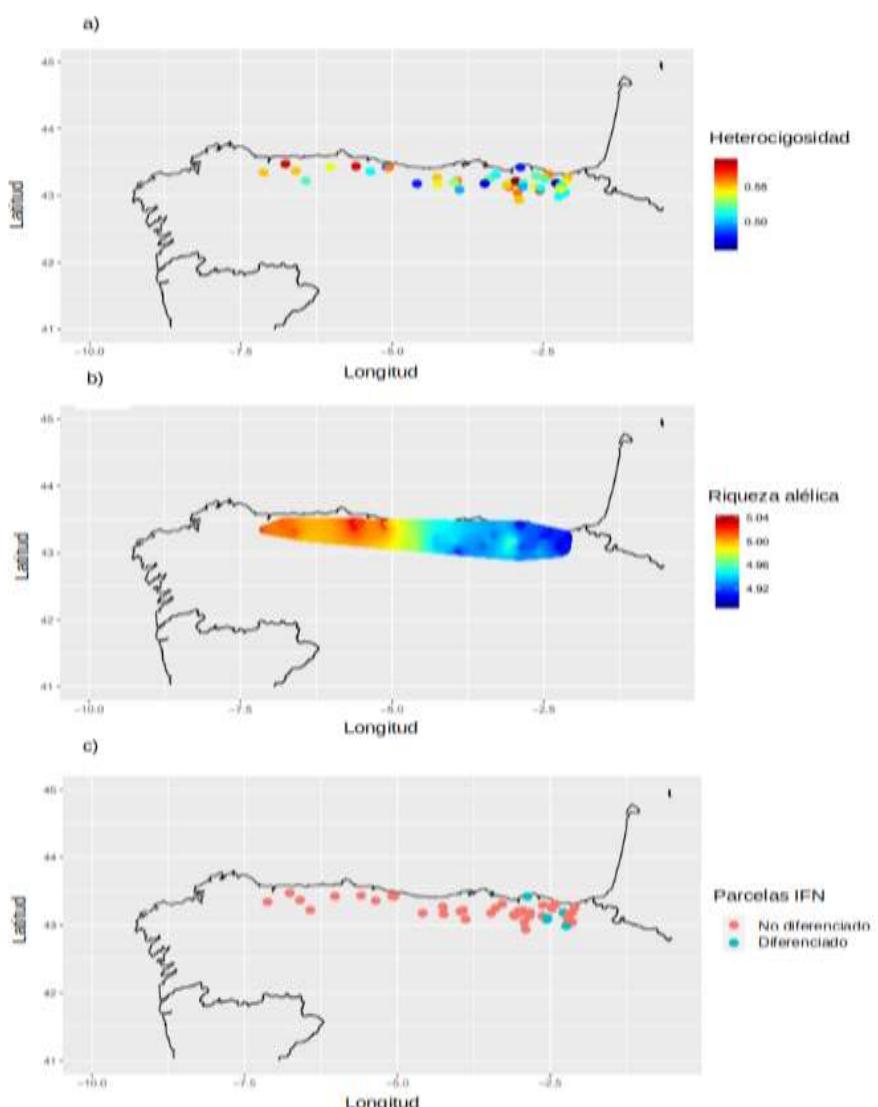


Figura 3. Mapas de heterocigosidad (a), krigging de riqueza alélica (b) y parcelas IFN diferenciadas (c) en el norte de España.

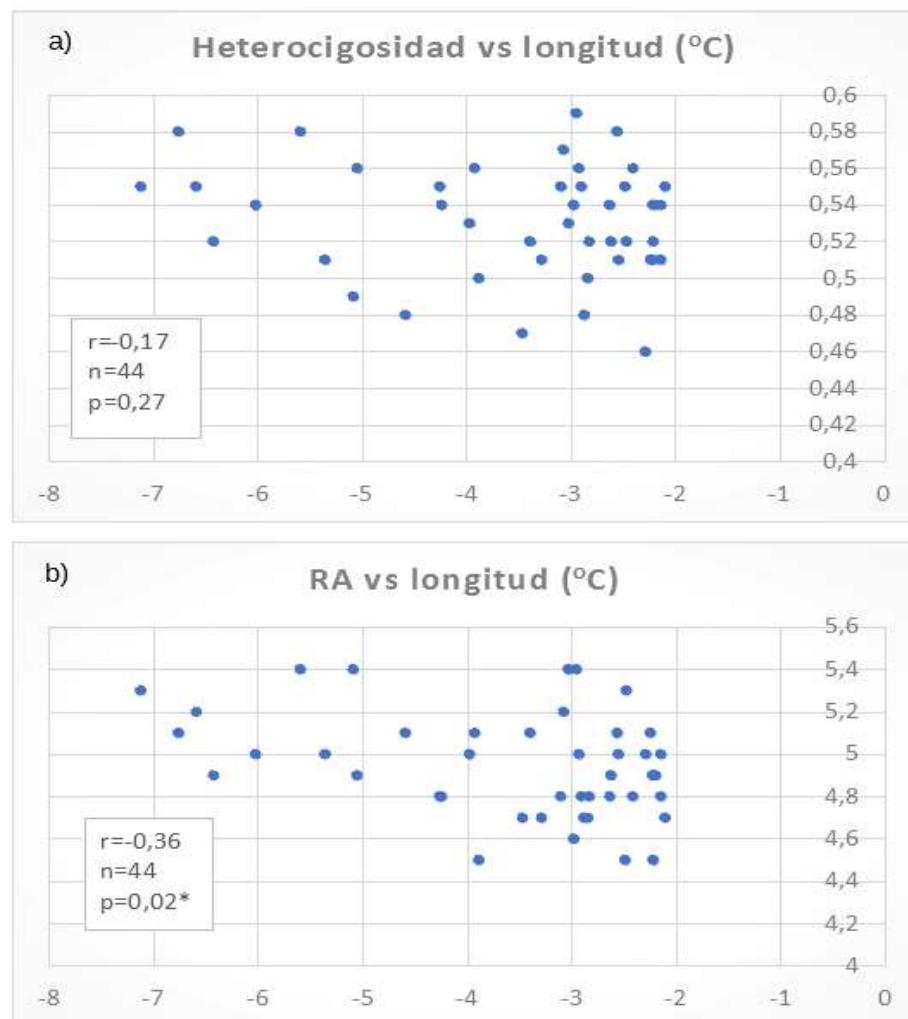


Figura 4. Correlación de heterocigosidad (a) y riqueza alélica (b) a lo largo de la cornisa cantábrica.

4.4 Análisis de parentesco

El análisis de parentesco entre individuos se realizó únicamente entre los árboles que forman parte del Huerto Semillero de Llodio (árboles plus del programa de mejora genética de Pino radiata de Neiker) y se ha representado gráficamente en la Figura 5. Los datos indican que más de la mitad de los árboles muestran un alto grado de parentesco. Sin embargo, también es posible observar la existencia de dos grupos de individuos que parecen tener poca relación genética con el resto (Figura 5, cuadrados oscuros en la parte superior e inferior de la figura). Nótese que tal y como se ha indicado en la sección de métodos, esta es una medida relativa, que puede cambiar con la composición de los árboles analizados.

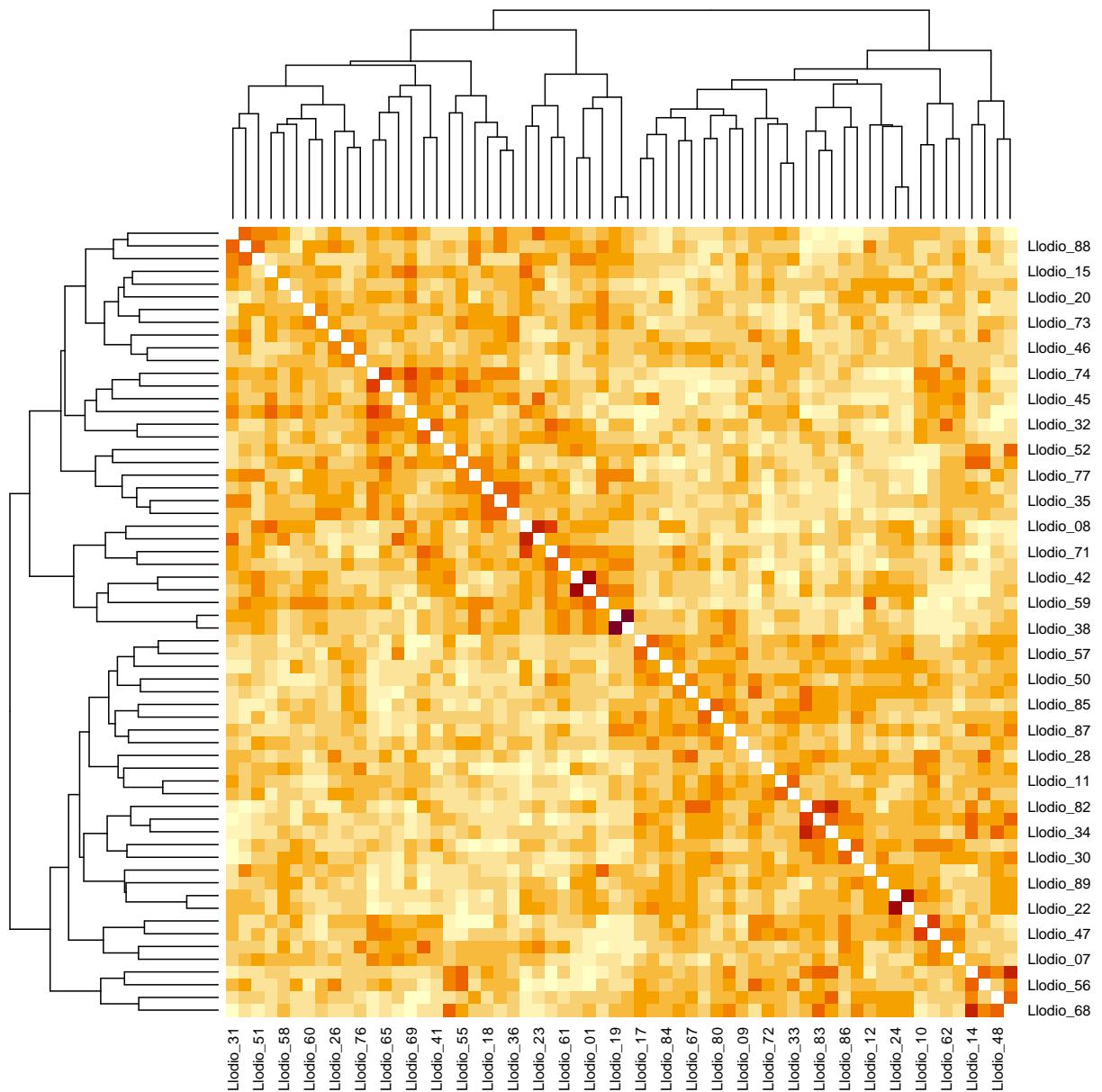


Figura 5. Heatmap de los coeficientes de parentesco de los árboles plus del Huerto Semillero. Nótese que el gráfico es simétrico y que los tonos blanquecinos indican mayor relación que los tonos oscuros.

5. Discusión

En este estudio hemos analizado alrededor de 1100 árboles de la especie *P. radiata*, procedentes de 44 plantaciones distribuidas en la Cornisa Cantábrica y del programa de mejora genética de Neiker para esta especie. Los análisis se han realizado con 18 SSRs que han mostrado un alto grado de variabilidad entre ellos, en los que se refiere a porcentaje de datos perdidos, heterocigosidad y riqueza alélica. Los 18 marcadores fueron empleados para el análisis de estructura genética, sin embargo, debido a los datos perdidos, 17 fueron aplicables al análisis de RA, 16 para el análisis de parentesco, y 13 para los análisis de heterocigosidad y diferenciación. Debido a la alta variabilidad de los marcadores SSRs es probable que los resultados de heterocigosidad y riqueza alélica pudieran cambiar si se utilizan otros SSRs con menores diferencias entre ellos. La

representatividad del genoma mediante los marcadores SSRs, es de gran importancia para una caracterización más amplia del genoma. Inicialmente se pretendió que cada Grupo de Ligamiento (GL) de *P. radiata* estuviera cubierto por dos marcadores SSR, lo más alejado posible entre ellos. Sin embargo, quedó patenté la dificultad de optimización de este tipo de marcadores al haber sido posible emplear únicamente la mitad de los 36 que fueron testados. En cualquier caso, todos los GL de *P. radiata* fueron representados al menos con un marcador, en algunos casos incluso con doble represntación, lo cual aunque da margen de mejora debería proporcionar unos resultados robustos.

Los resultados de los análisis de estructura genética de las poblaciones sugieren que todas las parcelas muestreadas pertenecen a una única unidad genética. Dado que las procedencias de pino radiata pueden distinguirse fácilmente utilizando marcadores moleculares (datos propios de 256 SNPs analizados en las procedencias de Año Nuevo, Monterrey y Cambria) y dado que las plantaciones del País Vasco pertenecen a la procedencia de Año Nuevo (Espinel et al., 1995), los resultados de nuestro estudio mostrarían que todo el material genético de pino radiata plantado en la Cornisa Cantábrica es de la misma procedencia, en concreto de la procedencia de Año Nuevo.

La relación entre el grado de diversidad genética y la adaptabilidad de las especies y poblaciones está fuera de toda duda, con ejemplos variados tanto de especies con baja diversidad genética y escasa adaptabilidad que incrementa el riesgo de extinción (ej., el guepardo *Acinonyx jubatus*, O'Brien et al. 2017, como de especies con elevada diversidad genética y elevado grado de adaptabilidad (ej., el arroz *Oriza sativa*, He et al. 2021). Nuestros resultados muestran que las poblaciones/plantaciones cantábricas de pino radiata tienen una diversidad genética muy baja y escasa diferenciación entre poblaciones, en comparación con otras especies de pinos (Wang & Hao 2010, Liu et al. 2016). Esto, sumado al único origen de *P. radiata* que podría existir en España supone un riesgo no solo para continuar con la mejora de los caracteres tradicionales (crecimiento, volumen), sino también para la resiliencia de las poblaciones actuales y de las próximas generaciones de pino radiata que deberán adaptarse a las condiciones ambientales generadas por el cambio climático. En concreto en España parece que uno de los mayores cambios se está dando en el aumento de la temperatura media, que está registrando los valores más altos en los últimos años (AEMET), hecho que, además, está afectando uniformemente en todos los territorios.

No es fácil decidir si la diversidad genética observada será suficiente para garantizar la supervivencia de tales poblaciones en las condiciones ambientales futuras, pero el principio de precaución invita a tomar acciones para incrementar la diversidad genética de las poblaciones actuales. Como primer paso, las poblaciones del Oeste de la Cornisa Cantábrica parecen presentar una mayor riqueza alélica que las del Este, además de existir 5 poblaciones diferenciadas en el País Vasco al resto de las de España, por lo que podrían utilizarse para incrementar la diversidad genética de la población de mejora. Sin embargo, no está claro que esta diversidad sea suficiente para incrementar la adaptabilidad y sería recomendable buscar nuevos genotipos entre el resto de procedencias originales de la especie (fundamentalmente entre las procedencias de Guadalupe y Cedros, las más resilientes a condiciones de calor y sequía). Si el incremento de adaptabilidad no fuera suficiente para sobrevivir a las condiciones ambientales esperadas, habría que pensar en incorporar nueva diversidad mediante la utilización de híbridos inter-específicos (ej. *P. radiata* x *P. attenuata*), tal y como ha ocurrido en el rescate de los castaños americanos con genes de castaños asiáticos resistentes al tizón (The American Chestnut Foundation; <https://acf.org/science-strategies/tree-breeding/>), o mediante herramientas biotecnológicas como CRISP/CAS9 (Oliva et al. 2019).

6. Conclusiones

Con este estudio se ha realizado una primera caracterización genética del pino radiata en España. Se ha podido concluir que el pino radiata en la Cordillera Cantábrica muestra una

uniformidad que sería compatible con un único origen en la procedencia de Año Nuevo. La escasa riqueza alélica, los bajos niveles de heterocigosidad y la pequeña diferenciación entre poblaciones hacen temer por su capacidad adaptativa ante el cambio climático. Estos problemas relacionados con la resiliencia podrían abordarse mediante el empleo de cruzamientos dirigidos entre árboles poco relacionados, pero el futuro de la especie en España puede necesitar la incorporación de genes procedentes de otros orígenes (procedencias), la utilización de híbridos interespecíficos y/o soluciones biotecnológicas. Sin duda, este estudio debe continuarse con ensayos de campo/invernadero que reproduzcan las condiciones esperadas bajo el cambio climático. La información obtenida en este estudio será de gran valor para la selección de los materiales a testar.

7. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado parcialmente por el Gobierno Vasco y por el Grupo Operativo Supra-Autonómico GENMAC. Los autores agradecen a los miembros del IFN la recogida de muestras en las 44 parcelas analizadas. Asimismo, M. Hurtado agradece la concesión de una beca de doctorado al organismo de Desarrollo Económico e Infraestructuras del Gobierno Vasco.

8. Bibliografía

AEMET; Informe sobre el estado del clima de España 2020

ADAMACK, A.T.; GRUBER, B.; 2014. PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution* 5(4) 384-387

ALBERTO, F.; 2009 MsatAllele_1.0: An R Package to Visualize the Binning of Microsatellite Alleles. *Journal of Heredity* 100(3) 394-397

AUCKLAND, L.D.; BUI, T.; ZHOU, Y.; WILLIAMS, C.G.; 2002. Conifer microsatellite handbook. Raleigh Corporate Press

BEGNA, T.; 2021. Role and economic importance of crop genetic diversity in food security. *J Agric Sc Food Technol* 7(1) 164-169.

CHAGNÉ, D.; CHAUMEIL, P.; RAMBOER, A.; COLLADA, C.; GUEVARA, M.A.; CERVERA, M.T.; VENDRAMIN, G.G.; GARCÍA, V.; FRIGERIO, J.M.; ECHT, C.; RICHARDSON, T.; PLOMION, C.; 2004. Cross species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in Pines. *Theor Appl Gene* 109 1204-1214

EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M.; 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2) 359-361

ECHT, C.; SAHA, S.; KRUTOVSKY, K.; WIMALANATHAN, K.; ERPELDING, J.; LIANG, C.; NELSON, C.; 2011 An annotated genetic map of loblolly pine based on microsatellite and cDNA markers. *BMC Genetics* 12:17

ESPINEL, S.; ARAGONÉS, A.; RITTER, E.; 1995. Performance of different provenances and of the local population of the Monterey pine (*Pinus radiata* D Don) in northern Spain. *Ann Sci For* 52 515-519

EXCOFFIER, L.; LISCHER, L.; 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform

population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10 564-567

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.; 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. Genetics 164 1567–1587

FURLAN, E.; STOKLOSA, J.; GRIFFITHS, J.; GUST, N.; ELLIS, R.; HUGGINS, R.M.; WEEKS1, A.R.; 2012. Small population size and extremely low levels of genetic diversity in island populations of the platypus, *Ornithorhynchus anatinus*. Ecol Evol. 2(4) 844–857

HARDY, O.J.; VEKEMANS, X.; 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Molecular Ecology Notes 2 618-620

HE, P.; WANG, C.; ZHANG, N.; LIU, B.; YANG, Y.; ZHU, Y.; LI, X.; YU, X.; HAN, G.; WANG, Y.; 2021. Multi-genotype varieties reduce rice diseases through enhanced genetic diversity and show stability and adaptability in the field. Phytopathol Res 3(28)

HIEMSTRA, P.H.; PEBESMA, E.J.; TWENHOFEL, C.J.W.; HEUVELINK, G.B.M.; 2009. Real-time automatic interpolation of ambient gamma dose rates from the Dutch Radioactivity Monitoring Network. Computers & Geosciences 35(8) 1711-1721

HUGHES, A. R.; STACHOWICZ, J. J.; 2004. Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance. Proc Natl Acad Sci 101(24) 8998-90024

LEDIG, T.F., VARGAS-HERNÁNDEZ, J.J.; JOHNSEN, K.H.; 1998. The conservation of forest genetic resources. J For 96 32–42

LIU, J.; SNIEZKO, R.; MURRAY, M.; WANG, N.; HAO, C.; ZAMANY, A.; STURROCK, R.N.; SAVIN, D.; KEGLEY, A.; 2016. Genetic Diversity and Population Structure of Whitebark Pine (*Pinus albicaulis* Engelm.) in Western North America. PLoS One 11(12)

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C.; 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). Am J Bot 82 1420–1425

MOUSADIK, A.E.; PETIT, R.J.; 1996; High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. Theor Appl Genet 92 832-839.

MURUA, J.R.; 2016. Libro Blanco del Sector de la Madera. Servicio central de publicaciones del Gobierno Vasco.

NATIONAL GEOGRAPHIC; 2017 (publicado), 2021 (actualizado). El cambio climático en España: impacto y consecuencias. <https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/2017/10/el-cambio-climatico-en-espana-impacto-y-consecuencias>

O'BRIEN, S.J.; JOHNSON, W.E; DRISCOLL, C.A.; DOBRYNIN, P.; MARKER, L.; 2017. Conservation Genetics of the Cheetah: Lessons Learned and New Opportunities. *Journal of Heredity* 108(6) 671-677

OLIVA, R.; JI, C.; ATIENZA-GRANDE, G.; HUGUET-TAPIA, J.C.; PEREZ-QUINTERO, A.; LI, T.; EOM, J.; LI, C.; NGUYEN, H.; LIU, B.; AUGUY, F.; SCIALLANO, C.; LUU, V.T.; DOSSA, G.S.; CUNNAC, S.; SCHMIDT, S.M.; SLAMET-LOEDIN, I.H.; CRUZ, C.V.; SZUREK, B.; FROMMER, W.B.; WHITE, F.F.; YANG, B.; 2019. Achieving broad-spectrum resistance against rice bacterial blight through targeted promoter editing and pathogen population monitoring. *Nat Biotechnol* 37(11) 1344–1350

PRITCHARD, J.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P.; 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155 945–959.

REUSCH, T.B.H.; EHLERS, A.; HÄMMERLI, A.; WORM, B.; 2005. Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proc Natl Acad Sci* 102(8) 2826-31.

RITLAND, K.; 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genet. Res., Camb.* 67 175-185.

ROUSSET, F.; 2002. Inbreeding and relatedness coefficients: what do they measure? *Heredity (Edinb)* 88(5) 371-80.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FORESTALES; 2010. Situación de los Bosques y del Sector Forestal en España, Informe 2010.

VEKEMANS, X.; HARDY, O.J.; 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 13 921– 935.

VERITY, R.; NICHOLS, R.A.; 2016. Estimating the number of subpopulations (K) in structured populations. *Genetics* 203(4) 1827-1839.

WANG, M.; HAO, Z.; 2010. Rangewide genetic diversity in natural populations of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*). *Biochem Genet* 48(7-8) 590-602.

WERNBERG, T.; COLEMAN, M.A.; BENNETT, S.; THOMSEN, M.S.; TUYA, F.; KELAHER, B.P.; 2018. Genetic diversity and kelp forest vulnerability to climatic stress. *Sci Rep* 8(1) 1851.

WICKHAM, H.; 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag. New York.