

INTROGRESIÓN GENÉTICA EN LAS POBLACIONES RELICTAS DE *PINUS SYLVESTRIS* L. VAR *NEVADENSIS* DEL PARQUE NACIONAL DE SIERRA NEVADA

JUAN JOSÉ ROBLEDO ARNUNCIO¹, MIGUEL NAVASCUÉS MELERO²,
SANTIAGO C. GONZÁLEZ MARTÍNEZ¹ Y LUIS GIL SÁNCHEZ³

RESUMEN

La población relictas de pino silvestre (*Pinus sylvestris* L. var *nevadensis* Christ) existente en el Parque Nacional de Sierra Nevada representa el límite meridional de la distribución mundial de la especie. Dada su marginalidad geográfica, demográfica y ecológica, junto con su marcada diferenciación genética tanto en caracteres neutros como cuantitativos, es conveniente prestar atención al riesgo de introgresión genética que suponen las extensas repoblaciones alóctonas que rodean a estas poblaciones relictas. Realizamos aquí un estudio basado en marcadores de ADN para determinar el nivel de introgresión genética en esta población. Los resultados muestran tasas de introgresión de gametos masculinos procedente de las repoblaciones alóctonas con valores medios del 12,1-14,3% en el regenerado de las masas naturales. La tasa de introgresión estimada en la cosecha de semillas (antes de la dispersión) es del 38,7%. Se observa además una tendencia (no significativa) al aumento de la introgresión genética desde las repoblaciones en las cohortes de menor edad del regenerado natural. A la luz de estos resultados, podrían contemplarse como posibles medidas de conservación genética un tratamiento de regeneración asistida y el mantenimiento de colecciones *ex-situ* de germoplasma de la masa relictas.

Palabras clave: conservación recursos genéticos, introgresión, flujo genético, dispersión polen y semilla, alóctono, autóctono.

SUMMARY

The relict Scots pine (*Pinus sylvestris* L. var *nevadensis* Christ) population in Sierra Nevada National Park represents the southernmost limit of the species global distribution. Its geographic, demographic and ecological marginality, along with its marked genetic differentiation in neutral and quantitative traits, make advisable assessing genetic introgression risk from the surrounding widespread allochthonous plantations. We perform here a DNA-marker-based study to determine introgression rate levels in this population. Results show average male gametic introgression rates from allochthonous plantations of 12.1-14.3 % among naturally regenerated recruits. The estimated introgression rate at the seed-crop level (before dispersal) was 38.7%. We have also observed a non-significant trend of increasing introgression rates from plantations among younger naturally regenerated seedlings. Based on

¹Departamento de Sistemas y Recursos Forestales, CIFOR-INIA, Carretera de La Coruña km 7.5, 28040 Madrid.

²Équipe Éco-évolution Mathématique, CNRS UMR 7625 Écologie & Évolution, Université Pierre et Marie Curie, École Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris, Francia.

³Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética Forestales, ETSI de Montes, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.

these results, genetic conservation management plans might include assisted regeneration and the maintenance of *ex-situ* germplasm collections.

Key words: genetic resources conservation, introgression, gene flow, pollen and seed dispersal, allochthonous, autochthonous.

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones autóctonas de pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.) de Sierra Nevada representan el límite meridional de la distribución global de la especie, junto con las existentes en la cercana Sierra de Baza (GIL *et al.* 1991). Se trata de poblaciones marginales desde un punto de vista geográfico, demográfico y ecológico. Además de marcar el límite meridional de la distribución mundial, se encuentran aisladas por más de 300 km de las masas naturales más próximas de la especie, en los Montes Universales. La presión antrópica durante los últimos siglos ha reducido su extensión a unos pequeños fragmentos que en su conjunto no suman más de 120 ha, localizados en el término municipal de Monachil, en la provincia de Granada, dentro del área del Parque Nacional de Sierra Nevada (JIMÉNEZ 1991; SÁNCHEZ 2002; HÓDAR *et al.* 2003). Estos fragmentos poblacionales se distribuyen entre los 1600 y los 1850 m de altitud, en unas condiciones de termicidad y xericidad que corresponden al hábitat marginal de la especie en la Península (GANDULLO & SÁNCHEZ 1994).

GAUSSEN *et al.* (1964) consideraron las poblaciones granadinas de pino silvestre como una variedad diferenciada (*var. nevadensis*) de la especie *Pinus sylvestris* L., basándose principalmente en caracteres morfológicos florales. NICOLÁS & GANDULLO (1969), utilizando variables ecológicas de la estación de la especie, definen cuatro ecotipos de pino silvestre en España: catalán, pirenaico, ibérico y nevadense, refiriéndose este último a las poblaciones relictas granadinas. Estudios genéticos posteriores, centrados en distintos caracteres cuantitativos y marcadores moleculares, han prestado atención al pino silvestre nevadense y han confirmado la marcada diferenciación genética de estas poblaciones, no sólo en el ámbito ibérico, sino respecto al conjunto de su distribución europea (isoenzimas, PRUS-

GLOWACKI *et al.* 1994, 2003; ADN mitocondrial, SINCLAIR *et al.* 1999; SORANZO *et al.* 2000; caracteres cuantitativos, ALÍA *et al.* 2001). Cabe destacar la existencia de un haplotipo de ADN mitocondrial único en estas poblaciones, no encontrado en ninguna otra de las analizadas en España y Europa (SINCLAIR *et al.* 1999). La coincidencia de todos los trabajos anteriores en señalar la diferenciación genética del pino silvestre de Granada ha hecho que sus poblaciones se consideren objeto prioritario de las estrategias de conservación de la diversidad genética de la especie. Especialmente, ha de considerarse su potencial valor como variedad relativamente más adaptada a condiciones secas y cálidas, frente a un escenario de calentamiento climático en Europa y, en particular, en la península Ibérica.

Dada la singularidad genética de las poblaciones de *Pinus sylvestris* *var. nevadensis*, se ha llamado la atención sobre el riesgo que para su conservación puede suponer la introgresión genética desde las extensas repoblaciones de origen no local (alóctonas) que existen en su proximidad (GIL *et al.* 1991; MARTÍN & GONZÁLEZ-MARTÍNEZ 2000; véase Figura 1), introducidas a mediados del siglo XX. Se entiende comúnmente por introgresión genética la incorporación de genes procedentes de un conjunto diferenciado de poblaciones en otro (RIESEBERG & WENDEL 1993). Los procesos de introgresión genética pueden afectar la dinámica evolutiva de las especies vegetales. Concretamente, a nivel intraespecífico, el intercambio genético entre poblaciones con distintas adaptaciones locales puede resultar en cambios en los niveles de diversidad genética, en la introducción de nuevos caracteres bien o mal adaptados al entorno, en la disrupción de complejos de genes con un valor coadaptativo y en la aparición de nuevos ecotipos (NAGY 1997). La introgresión genética desde las repoblaciones alóctonas podría por tanto suponer un riesgo de pérdida de los recursos genéticos de esta variedad local, riesgo que con-

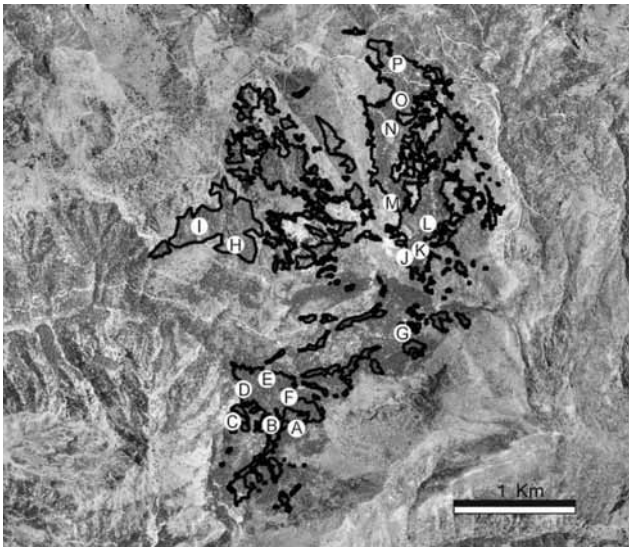


Figura 1. Distribución de la masa natural relictada (delimitada por línea continua) de *Pinus sylvestris* var. *nevadensis* en Sierra Nevada. El resto de la vegetación arbórea que se observa corresponde a repoblaciones de pino silvestre de origen no local. Los círculos indican la localización de las parcelas de regeneración natural estudiadas. (Modificado de ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, en prensa).

Figure 1. Spatial distribution of the natural relict population of *Pinus sylvestris* var. *nevadensis* in Sierra Nevada (delimited by continuous line). All the observed surrounding tree stands are Scots pine plantations of non-local origin. Circles indicate the spatial location of natural regeneration study plots. (Modified from ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* in press).

cierte directamente a los objetivos de conservación del Parque Nacional en que se encuentran. Así queda recogido en la Estrategia Española para la Conservación y el Uso Sostenible de la Diversidad Biológica, en la que se señala el riesgo de "pérdida de diversidad genética" que en el medio forestal puede suponer la "introducción de especies y genomas exóticos" (MIMAM 1999, pág. 75). Análogamente, la Estrategia Española para la Conservación y el Uso Sostenible de los Recursos Genéticos Forestales subraya que determinadas repoblaciones realizadas con material de reproducción alóctono son la causa de que "algunas poblaciones estén seriamente amenazadas por contaminación genética", especialmente en el género *Pinus* (MIMAM 2006, pág. 34).

A la hora de determinar un riesgo ambiental, como pueda llegar a ser la introgresión genética, es conveniente distinguir dos componentes multiplicativas: la probabilidad de ocurrencia y el efecto

(JOHNSON *et al.* 2006). La introgresión, una vez producida, puede tener efectos importantes en términos evolutivos. La valoración del impacto positivo, negativo o neutro de estos efectos dependerá del carácter concreto que se considere, y podrá estar condicionada por factores subjetivos. En el caso de poblaciones de especies arbóreas longevas, como es el pino silvestre, una valoración detallada del efecto de la introgresión requiere largos plazos de tiempo o el desarrollo de ensayos precoces alternativos, en condiciones controladas y sobre caracteres concretos. Es indudable el interés científico y de conservación de estos posibles experimentos, pero desde el punto de vista de la gestión del Parque, es muy aconsejable iniciar la evaluación del riesgo con estimaciones de la probabilidad de ocurrencia. Una estimación rápida de esta probabilidad permitirá, por una parte, determinar la conveniencia de continuar con la evaluación de los efectos y, en caso de realizarse esta última, será parte fundamental del futuro cálculo global del riesgo. Por otra parte, permitirá obtener propuestas concretas para posibles actuaciones encaminadas a la minimización de la probabilidad de introgresión. En este sentido, el objetivo del presente trabajo, que resume principalmente los resultados presentados en ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* (en prensa), es estimar el nivel de introgresión genética en las poblaciones relictas de pino silvestre de Sierra Nevada desde las repoblaciones alóctonas próximas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Estimar la tasa de introgresión genética en la cosecha de semillas y el regenerado natural de la masa relictada requiere caracterizar genéticamente, en primer lugar, los individuos reproductores de la masa relictada y de las repoblaciones y, en segundo lugar, una muestra de semillas y regenerado natural de la masa relictada. Con este fin, se recogieron en mayo de 2004 acículas de un total de 112 individuos adultos de la masa natural y 109 de las repoblaciones, distribuidos uniformemente en toda la zona ocupada por la masa relictada y las repoblaciones circundantes (montes "La Corti-

juela" y "La Dehesilla"; Término Municipal de Monachil). En la misma fecha, se tomaron acículas de 333 individuos (0-30 años) distribuidos en 16 parcelas de regenerado natural bajo la masa relictas (Figura 1). Las acículas se etiquetaron y almacenaron en nevera para su traslado al laboratorio. En diciembre de 2004, se recogieron 10 piñas de cada uno de 22 árboles madre, situados en esta ocasión únicamente en la zona sur de la masa natural (monte "La Cortijuela"). Tras abrir las piñas en estufa, se realizó un conteo de la proporción de óvulos sin fertilizar (una estimación indirecta de limitación polínica) y semillas abortadas (debidas a la muerte del embrión por consanguinidad o estrés ambiental), y se tomaron al azar 20 semillas viables por árbol para su análisis genético (total 440 semillas). Véase ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* (en prensa) para más detalles sobre el muestreo de material vegetal.

Análisis genético

Según se describe en ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* (en prensa), se testaron en el laboratorio diversos marcadores moleculares para identificar aquellos que mejor discriminan (por la presencia de alelos específicos o por la diferencia en las frecuencias alélicas) los individuos adultos de la población relictas de aquellos de las plantaciones. De entre los marcadores ensayados, se eligieron siete microsatélites del cloroplasto (Pt71936, Pt30204, Pt1254, Pt87268, Pt36480, Pt26081 y Pt15169; VENDRAMIN *et al.* 1996) para caracterizar los niveles de diversidad genética de los individuos adultos, y cuatro de éstos (Pt87268, Pt36480, Pt26081 y Pt15169) para estimar las tasas de introgresión en las semillas y regenerado de la masa natural. Los microsatélites del cloroplasto, de herencia paterna en coníferas, revelan la presencia de introgresión de gametos masculinos, la cual puede estar originada por la dispersión de semilla o bien desde madres autóctonas fertilizadas por polen alóctono, o bien desde madres alóctonas fertilizadas por polen alóctono (si bien, en el caso de las semillas recogidas directamente de las madres autóctonas, el único vector de introgresión posible sería la fertilización de éstas por polen alóctono). En ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* (en prensa) puede encontrarse una descripción de los protocolos utilizados para la extrac-

ción del ADN y el genotipado de las muestras en los microsatélites seleccionados.

Análisis de datos

A partir de las frecuencias haplotípicas observadas en los individuos adultos de la masa relictas y las repoblaciones, se estimó en primer lugar el nivel de diversidad genética de los individuos adultos de la masa relictas, comparándose con la diversidad de las repoblaciones alóctonas. Para ello, se calcularon el número total de haplotipos (n_h) observados, la heterozigosidad haplotípica insesgada (H_e) y el número efectivo de haplotipos (n_{eh}), definido como el inverso de H_e . En segundo lugar, se utilizó un modelo de máxima verosimilitud para estimar la tasa de introgresión gamética (m), definida como la proporción de gametos masculinos procedentes de las repoblaciones en el regenerado y la cosecha de semillas de la masa natural. Este método, basado en una asignación fraccional implícita, proporciona estimaciones de m precisas e insesgadas, permitiendo además la obtención de intervalos de confianza con una cobertura real esperada muy próxima a la nominal, como se describe en detalle en ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* (en prensa). Utilizando este método, se obtuvieron estimaciones de m en el regenerado de La Cortijuela y de la Dehesilla y en la cosecha de semillas de La Cortijuela.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad genética de la masa relictas y las repoblaciones

Los resultados muestran diferencias notables de diversidad genética entre la masa relictas y las plantaciones, y unos niveles de diversidad similares en las dos masas naturales estudiadas (La Cortijuela y La Dehesilla) (Tabla 1). En concreto, las plantaciones alóctonas presentan valores de n_h , H_e y n_{eh} muy superiores a los de la población natural, resultado esperable por una parte de los niveles mínimos de diversidad genética descritos para la variedad *nevadensis* de pino silvestre respecto a otras poblaciones europeas de la especie (PRO-

Población	N	n_h	n_{eh}	H_e
Relicta-“La Cortijuela”	63	36	7,6	0,868
Relicta-“La Dehesilla”	49	32	9,3	0,893
Plantaciones	98	71	76,9	0,987
Meseta Norte (media de 13 poblac.)	322	169	45,5	0,978

Tabla 1. Diversidad genética haplotípica en las plantaciones y la masa relictas de pino silvestre de Sierra Nevada utilizando siete microsatélites del cloroplasto (*Pt71936*, *Pt30204*, *Pt1254*, *Pt87268*, *Pt36480*, *Pt26081* y *Pt15169*). Con fines comparativos, se incluyen además los valores publicados para la especie en poblaciones naturales de la Meseta Norte (ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* 2005). Véase el texto para una explicación de los parámetros.

Table 1. Genetic haplotypic diversity in Scots pine plantations and relict population in Sierra Nevada, using six chloroplast microsatellites (*Pt71936*, *Pt30204*, *Pt1254*, *Pt87268*, *Pt36480*, *Pt26081* and *Pt15169*). Published results for natural populations of the species in the Meseta Norte (ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* 2005) are shown for comparison. See text for details about estimated parameters.

VAN *et al.* 1998) y, por otra parte, del origen no local de las repoblaciones, las cuales podrían incluso haberse establecido a partir de material forestal de reproducción de distintos orígenes. Es además sobresaliente la muy reducida diversidad de las masas relictas respecto a otras poblaciones naturales (no marginales) del centro y norte de la península Ibérica (Tabla 1), como probable consecuencia de procesos de deriva genética en aquellas asociados a su aislamiento geográfico histórico y reducido tamaño poblacional.

Evaluación de la limitación polínica y la mortalidad embrionaria

El porcentaje de óvulos sin fertilizar por piña en árboles madre de la masa relictas fue de $44,58 \pm 14,19\%$ (Media \pm Desviación Estándar) y el porcentaje de semillas abortadas (tanto de primer como de segundo año) fue de $40,73 \pm 17,49\%$. Como los resultados de las desviaciones estándar ponen en evidencia, se han encontrado diferencias notables entre árboles en estos parámetros, lo que podría estar relacionado con la diferente disponibilidad (y la diferente “calidad”) del polen que fertiliza cada árbol madre o, alternativamente, diferentes condiciones microambientales. Los valores observados, tanto de la tasa de óvulos sin polinizar como de la tasa de semillas abortadas, no son significativamente distintos de los estimados en las extensas masas de la especie situadas en Valsaín y Navafría (Sierra de Guadarrama), que toman valores medios de $40,67 \pm 23,90\%$ y $33,77 \pm 17,55\%$, respectivamente (ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* 2005). Esto indicaría que las masas de pino silvestre de Sierra Nevada no están limitadas polínicamente, ni su-

fren una depresión endogámica acusada a nivel de semilla, respecto a poblaciones del área central de la especie.

Introgresión genética en la masa relictas desde las repoblaciones

La estimación de la tasa de introgresión gamética masculina (m) fue del 14,3% y 12,1% en el regenerado de La Cortijuela y La Dehesilla, respectivamente, valores significativamente distintos de cero pero no significativamente distintos entre sí (ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* en prensa). La tasa de introgresión estimada en la cosecha de semillas (antes de la dispersión) de La Cortijuela fue del 38,7%, significativamente distinto tanto de cero como del valor observado en la regeneración del mismo monte de La Cortijuela ($p = 0.001$; a partir de 10,000 permutaciones aleatorias de individuos entre muestras). Ordenando las muestras de semillas y regenerado por clases de edad, se observa una tendencia (no significativa) al aumento de la introgresión genética desde las repoblaciones en las cohortes de menor edad del regenerado natural (Figura 2). A nivel de parcela de regenerado, las tasas de introgresión estimadas variaron entre 0 y 45% (sólo los valores superiores fueron significativamente distintos de cero), sin mostrar un patrón espacial claro: las parcelas con las mayores tasas estimadas están dispersas por toda el área de muestreo (ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* en prensa). La introgresión polínica estimada a nivel de árbol madre osciló entre el 7 y el 70%, siendo la mayor parte de los valores significativamente distintos de cero, y estando los árboles con las progenies más introgredidas situados en zonas de la población natural más alargadas o bien en peque-

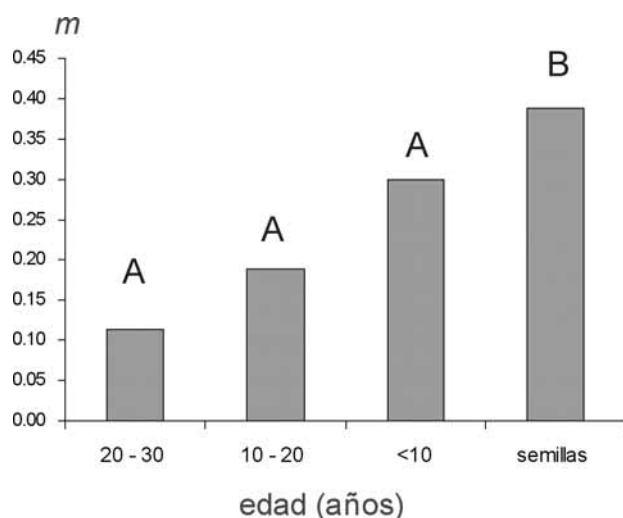


Figura 2. Tasas de introgresión estimadas a nivel de regeneración (edades 0-30 años) y de semillas en árboles madre. Letras mayúsculas iguales indican valores no significativamente diferentes ($p < 0,05$). (Modificado de ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, en prensa).

Figure 2. Estimated introgression rates at the natural regeneration (0-30 year-old) and standing seed-crop levels. Values with a common capital letter are not significantly different ($p < 0.05$). (Modified from ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, in press).

ños fragmentos inmersos en las repoblaciones (Figura 3).

Los valores de introgresión estimados pueden considerarse elevados a nivel de regeneración (12-15%) y muy elevados a nivel de semilla antes de la dispersión (~40%). Resulta notable que el monte de La Dehesilla, más alejado de las repoblaciones y en una vertiente distinta a aquella en las que éstas se encuentran, presenta una tasa estimada de introgresión en el regenerado similar a la de La Cortijuela, mucho más próxima a las repoblaciones. También resulta de interés el hecho de que la introgresión estimada a nivel de semilla sea muy superior a la estimada en el regenerado.

Una tasa de introgresión del 12-15% en individuos híbridos de primera generación podría conducir a elevados niveles de introgresión genética en generaciones sucesivas y eventualmente a la fijación de variantes genéticas de origen no local, en el caso de que los genes no locales presentasen alguna ventaja selectiva frente a los genes locales (HAYGOOD *et al.* 2004). Esto podría ser así incluso si el flujo genético desde las repoblaciones se interrumpiese en el futuro. Caso de que los

genes no locales tengan un mismo valor selectivo que los locales, la probabilidad de fijación de los genes no locales en la masa relictas podría considerarse, como primera aproximación, igual a la tasa de introgresión observada (es decir, 12-15%) (EWENS 2004). Por el contrario, en caso de que los genes no locales supongan una mínima desventaja selectiva frente a los genes locales, la probabilidad de fijación de los genes no locales sería muy baja, dado el tamaño relativamente grande de la masa relictas (varios miles de individuos) y la eficacia de la selección natural en poblaciones de este tamaño. En este último caso, no obstante, el nivel de introgresión se mantendría en la medida que continúe el flujo polínico desde las repoblaciones, tendiendo a cero en el momento en que el mismo se interrumpiera.

Consideraciones para la conservación genética de la masa relictas

El mayor nivel de introgresión estimado a nivel de semilla (antes de la dispersión) que a nivel de regenerado (0-10 años de edad), así como la tendencia (no significativa) a la disminución de la tasa de introgresión con la edad del regenerado (Figura 2), permitiría formular una primera hipótesis, de que los genotipos introgredidos presentan una desventaja selectiva frente a los genotipos locales (dada la disminución de la tasa de introgresión tras la dispersión y el establecimiento). No obstante, existe una segunda hipótesis que podría explicar por sí sola la citada variación en las tasas de inmigración: que la concentración relativa del polen procedente de las repoblaciones ha venido aumentando durante los últimos años, a medida que los individuos de las mismas han ido alcanzando la madurez sexual y una mayor fecundidad asociada a la edad (su edad actual es de unos 30-50 años, mientras que los individuos adultos de la masa natural tienen en general más de 100 años).

Las implicaciones para la gestión de cada una de estas hipótesis son muy diferentes (ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* en prensa). Si fuese cierta la primera, cabría esperar que los individuos "híbridos" fuesen eliminados por la selección natural, al menos bajo las condiciones ambientales del estudio y siempre suponiendo que la diferencia de va-

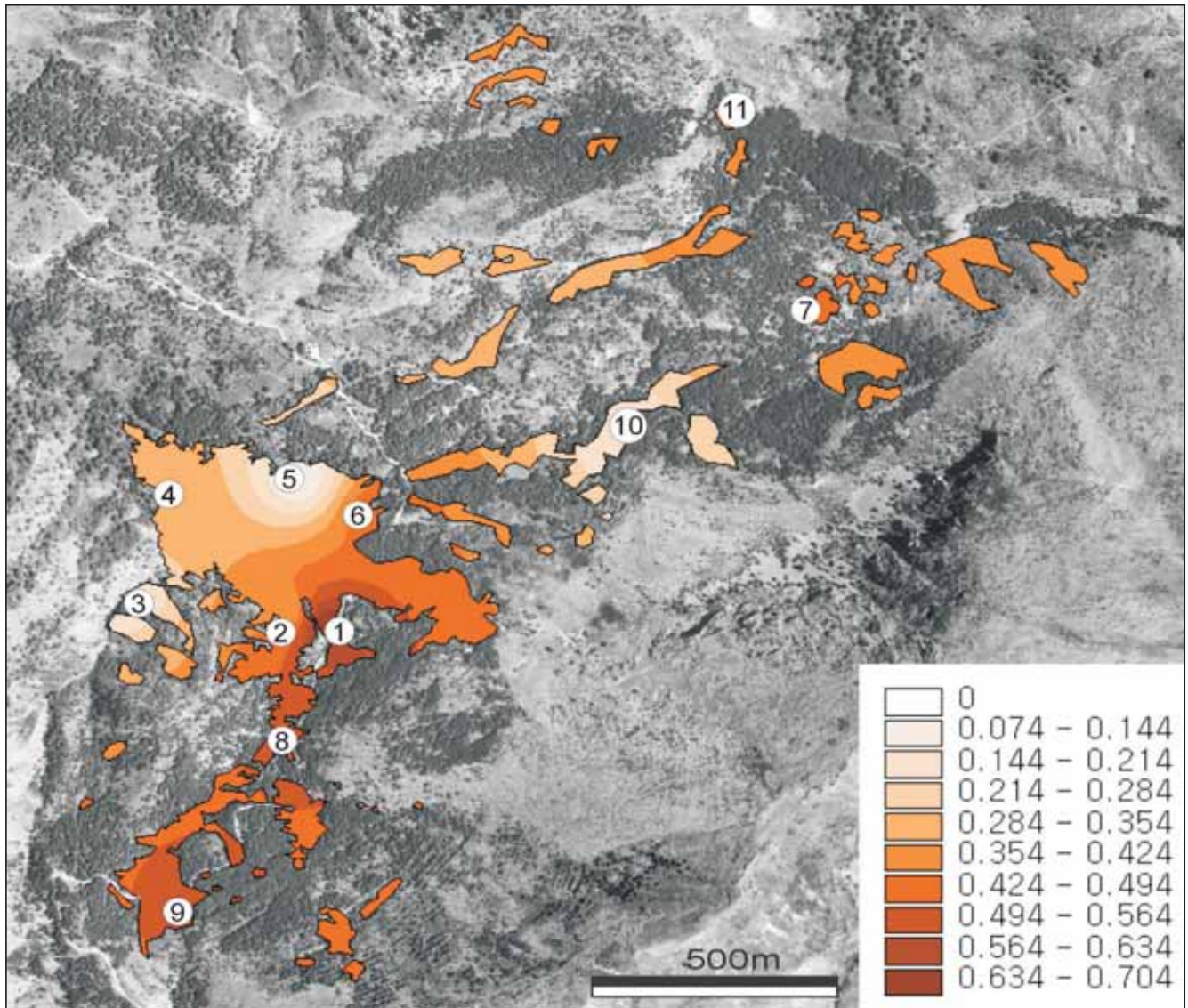


Figura 3. Representación visual de la variación espacial en la tasa de introgresión polínica desde las repoblaciones alóctonas en las semillas de la población relicta de *Pinus sylvestris* L. var. *nevadensis* en La Cortijuela (Trevenque, Granada). Los círculos indican la posición de los árboles muestreados. La escala de color indica las diferencias en las tasas de inmigración estimadas obtenida mediante interpolación ponderada por el inverso de la distancia utilizando ArcView GIS 3.2. (Modificado de ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, en prensa).

Figure 3. Visual representation of spatial variation in pollen introgression rates from non-local plantations into the standing seed crop of *Pinus sylvestris* L. var. *nevadensis* natural relict in La Cortijuela (Trevenque, Granada). Circles indicate the position of sampled seed-trees. The colour scale indicates differences in estimated introgression rates, obtained by means of inverse-distance-weighted interpolation using ArcView GIS 3.2. (Modified from ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, in press).

lores selectivos no se invierta a edades más avanzadas. Si fuese cierta la segunda hipótesis, cabría entonces esperar incrementos adicionales de las tasas de introgresión durante los próximos años, aumentando la exposición de la masa relicta a los genes no locales. Con objeto de contrastar ambas hipótesis, y poder realizar predicciones más concluyentes sobre el destino a largo plazo de los individuos "híbridos", sería necesario realizar

ensayos en condiciones controladas para determinar el diferencial de selección de los individuos introgredidos frente a los individuos locales.

Dadas las elevadas tasas de introgresión observadas en la regeneración natural de la masa relicta y la gran extensión del área ocupada por la población natural y las repoblaciones, no parece viable ninguna medida directa para mitigar la

llegada de polen o semillas alóctonas. La única medida efectiva imaginable para la interrupción de la llegada de propágulos procedentes de las repoblaciones sería la eliminación de éstas, medida muy discutible por sus consecuencias ecológicas. Caso de considerarse conveniente favorecer la regeneración natural libre de introgresión genética en la masa relictas, cabría plan-

tear acciones de regeneración asistida utilizando semillas “puras” procedentes de cruces controlados entre individuos adultos de la masa natural, cuidando por supuesto de mantener el máximo de diversidad genética. Sería además muy recomendable toda medida encaminada a la conservación *ex-situ* de los recursos genéticos de la masa relictas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALÍA, R., NOTIVOL, E. & MORO, J. 2001. Genetic variability of Spanish provenances of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.): Growth traits and survival. *Silva Fennica* 35: 27-38.
- EWENS, W.J. 2004. Mathematical population genetics. I. Theoretical introduction. 2nd edition. Springer, New York.
- GANDULLO, J.M. & SÁNCHEZ, O. 1994. Estaciones ecológicas de los pinares españoles. ICONA. Colección Técnica. Madrid.
- GAUSSEN, H., HEYWOOD, V.H. & CHATER, A.O. 1964. *Pinus* L. *Flora Europea* 1: 32-35, Cambridge University Press.
- GIL, P., GALERA, R.M., MARTÍN, S., AGUNDEZ, D. & ALÍA, R. 1991. Las regiones de procedencia de *Pinus sylvestris* L. y *Pinus nigra* Arn. subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco en España. ICONA, Madrid.
- HAYGOOD, R., IVES, A.R. & ANDOW, D.A. 2004. Population genetics of transgene containment. *Ecology Letters* 7: 213-220.
- HÓDAR, J.A., CASTRO, J. & ZAMORA, R. 2003. Pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* as a new threat for relict Mediterranean Scots pine forests under climatic warming. *Biological Conservation* 110: 123-129.
- JIMÉNEZ, Y. 1991. Los paisajes de Sierra Nevada. Cartografía de los sistemas naturales de una montaña mediterránea. Universidad de Granada. 223 pp.
- JOHNSON, K.L., RAYBOULD, A.F., HUDSON, M.D. & POPPY, G.M. 2006. How does scientific risk assessment of GM crops fit within the wider risk analysis? *Trends in Plant Science* 12:1-5.
- MARTÍN ALBERTOS, S. & GONZÁLEZ MARTÍNEZ S.C. 2000. Conservación de recursos genéticos de coníferas en España. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales Fuera de Serie* 2: 151-184.
- MIMAM. 1999. Estrategia española para la conservación y uso sostenible de la diversidad biológica. DGB. Madrid, 160 pp.
- MIMAM. 2006. Estrategia de conservación y uso sostenible de los recursos genéticos forestales. DGB. Madrid, 81 pp.
- NAGY, E.S. 1997. Selection for native characters in hybrids between two locally adapted plant subspecies. *Evolution* 51: 1469-1480.
- NICOLAS, A., GANDULLO, J.M. 1969. Ecología de los pinares españoles, II. *Pinus sylvestris* L. IFIE, Madrid.
- PROVAN, J., SORANZO, N., WILSON, N.J. et al. (1998). Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proceedings of the Royal Society of London Series Biological Sciences* 265: 1697-1705.
- PRUS-GLOWACKI, W. & STEPHAN, B.R. 1994. Genetic variation of *Pinus sylvestris* from Spain in relation to other European populations. *Silvae Genetica* 43: 7-14.
- PRUS-GLOWACKI, W., STEPHAN, B.R., BUJAS, E., ALÍA, R. & MARCINIÁK, A. 2003. Genetic differentiation of autochthonous populations of *Pinus sylvestris* (Pinaceae) from the Iberian Peninsula. *Plant Systematics and Evolution* 239: 55-66.

- RIESEBERG, L.H. & WENDEL, H.F. 1993. Introgression and its consequences in plants. En: Harrison RG (ed.) Hybrid zones and the evolutionary process. New York, Oxford University Press. Pp. 70-109.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J., COLLADA, C., ALÍA, R. & GIL, L. 2005. Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *Journal of Biogeography* 32: 595-605.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J., NAVASCUÉS, M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C. & GIL, L. (en prensa). Estimating gametic introgression rates in a risk assessment context: a case study with Scots pine relicts. *Heredity*.
- SÁNCHEZ, R.M. 2002. Proyecto de conservación ex situ de los recursos genéticos de *Pinus sylvestris* var. *nevadensis*. Proyecto Fin de Carrera. EUITF, Madrid.
- SINCLAIR, W.T., MORMAN, J.D. & ENNOS, R.A. 1999. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 8: 83-88.
- SORANZO, N., ALÍA, R., PROVAN, J. & POWELL, W. 2000. Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of european *Pinus sylvestris* populations. *Molecular Ecology* 9: 1205-1211.
- VENDRAMIN, G.G., LELLI, L., ROSSI, P. & MORGANTE, M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5: 595-598.

