

Variabilidad genética de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* en la Región de Murcia mediante microsatélites cloroplásticos

Juan Francisco Jiménez¹, Pedro Sánchez-Gómez², Juan Faustino Martínez³, Aranzazu Molins¹ & Josep A. Rosselló¹
1 Jardí Botanic, Universitat de Valencia, C/ Quart 80, 46008, Valencia.

2 Departamento. de Biología Vegetal (Botánica), Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Murcia.

3 Dirección General del Medio Natural, Consejería de Industria y Medio Ambiente, C/ Catedrático Eugenio Ubeda 3, 30071, Murcia.

Correspondencia

P. Sánchez Gómez

E-mail: psgomez@um.es

Tel.: 968364999

Fax: 968363917

Recibido: 10 Septiembre 2005

Aceptado: 8 Noviembre 2005

Resumen

En el presente trabajo se han utilizado cinco microsatélites cloroplásticos (cpSSR) para describir la diversidad genética intrapoblacional y la diferenciación genética de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* de Murcia. El modelo de alelos infinitos (IAM) ha sido el utilizado para el análisis de la estructura genética y la distribución geográfica de la variación de las poblaciones, tanto naturales como reforestadas. En términos generales, las poblaciones muestreadas presentan una gran variación genética intra e interpoblacional. Estos resultados pueden ser debidos a un descenso dramático de las áreas de distribución, y a la fragmentación de las poblaciones del Sureste ibérico desde el Holoceno. Además, los datos obtenidos indican un claro patrón geográfico de la distribución de la variación genética. Se sugiere que la población del Rincón de los Huertos podría haberse originado a partir de poblaciones de distribución Bética, mientras que las poblaciones de Sierra Espuña (repobladas) y El Carche podrían haberse originado a partir de poblaciones de rango ibérico.

Palabras clave: *Pinus nigra*, SSR, Microsatélites, Diversidad genética.

Abstract

Genetic variability of Pinus nigra subsp. salzmannii in Murcia Region using chloroplast microsatellite markers.

In this work five chloroplast simple sequence repeat markers (cpSSR) were used to describe the genetic variation of *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* populations from SE Spain (Murcia province). The infinite allele model (IAM) was used to analyze the genetic structure of both natural and reforested populations, and to assess the geographical distribution of haplotypic variation. Overall, large levels of genetic variation within and between populations was detected. Genetic variation follow a clear geographic pattern. These results could be explained by a dramatic decline of its distribution and by the fragmentation of populations since Holocene times in Southeast Spain. It is suggested that the population from Rincon de los Huertos could have been originated from propagules from the Baetic range. In addition, populations from Sierra Espuña (reforested) and El Carche could have their origin from samples located on the Iberian range.

Keywords: *Pinus nigra*, SSR, Microsatellite, Genetic diversity.

Introducción

Pinus nigra Arnold es una especie de supuesto origen terciario que se distribuye por las montañas submediterráneas, desde la mitad oriental de la península Ibérica, hasta Anatolia y algunos enclaves del Norte de África (Quezel 1980). En la actualidad, sus poblaciones se encuentran muy fragmentadas, considerándose básicamente tres grandes núcleos poblacionales: el grupo oriental, que suele adscribirse a la subsp. *paullasiana* (Lamb.) Holmboe, el grupo central (*grex nigra*) que contiene varias subespecies (subsp. *nigra*, subsp. *laricio* (Poiret) Maire y subsp. *dalmatica* (Vis) Franco, y el grupo occidental (*grex salzmannii*). Este grupo consta, dependiendo de los autores, varias subespecies o razas locales, como la subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco que correspondería a las poblaciones pirenaicas y su entorno, la subsp. *mauritanica* que incluiría las poblaciones del norte de África y la subsp. *clusiana* (Clemente) Rivas Mart. que correspondería a las poblaciones béticas e iberolevantineas. No obstante, dados los problemas nomenclaturales asociados a la subsp. *clusiana* y que las diferencias morfológicas no parecen ser concluyentes, nos referiremos a las poblaciones autóctonas del sureste Ibérico como pertenecientes a la subsp. *salzmannii*.

Situación actual de *Pinus nigra* en Murcia

Este taxon está presente en las altas montañas del Noroeste murciano, sierras de Espuña y Cambrón y Sierra del Carche, en enclaves superiores a los 1300-1400 m de altitud, y 500 mm de precipitación anual. No obstante, se hallan pequeños núcleos poblacionales o incluso pies aislados en ubicaciones más bajas (a partir de 1000 m de altitud) y secas (400 mm de precipitación).

Conforma bosques abiertos en lugares fríos y venteados junto a especies como *Juniperus communis* subsp. *hemisphaerica*, *J. phoenicea* y *J. thurifera*. En ambientes menos continentales, aparece en bosques mixtos en proporciones variables con *Quercus rotundifolia*, *Pinus pinaster* y *P. halepensis*. En todos los hábitats suele aparecer un matorral pulvular dominado por *Erinacea anthyllis*.

En la actualidad, la mayor parte de las poblaciones murcianas pueden considerarse relictuales, habiéndose constatado una clara recesión, tal como ha ocurrido en el Noroeste en los últimos 300 años, con un retroceso altitudinal de 500 m y de unos 2 Km en los márgenes de su área de ocupación (Sánchez-Gómez et al. 2003).

En el núcleo montañoso de Espuña-Cambrón, las masas naturales han desaparecido prácticamente; no

obstante, se han localizado algunos pequeños núcleos autóctonos de varias decenas de ejemplares en Cambrón. Por el contrario, en Sierra Espuña la mayoría de las formaciones actuales corresponden a repoblaciones efectuadas por Codorniu hace aproximadamente 100 años, de las que no se tiene constancia cierta sobre la procedencia de las semillas, aunque morfológicamente tiene afinidades con un patrón ibérico.

La población de la Sierra del Carche se presenta en una situación de amenaza extrema ya que se encuentra muy alejada de su óptimo ecológico. Actualmente se han contabilizado unos 300 individuos, en su mayoría centenarios y se ha constatado un retroceso importante en los últimos 40 años, con la desaparición de varios núcleos poblacionales y más de 400 individuos.

En su conjunto, el deterioro de las poblaciones de *Pinus nigra* se debe, además de la caída de las precipitaciones y probable aumento de la temperatura en los últimos siglos, a la competencia con otras especies actualmente más competitivas, sobre todo *Pinus halepensis* e incluso *Quercus rotundifolia*, y a la mayor incidencia de plagas y enfermedades, provocadas por el debilitamiento generalizado, principalmente la procesionaria, que incide muy negativamente en la vitalidad de los individuos.

Otro problema añadido en las últimas décadas proviene de la inadecuada regulación del aprovechamiento maderero, que no ha ido (fuera de los espacios protegidos) más allá de las especificaciones generales establecidas para la especie a nivel nacional a través de la Ley de Montes, sin tener en cuenta la peculiaridad de las poblaciones murcianas, además de una política de repoblaciones inadecuadas con la introducción de procedencias y subespecies medioeuropeas (*grex nigra*) que, además de encontrarse fuera de su óptimo ecológico, son un reservorio de enfermedades y una fuente de contaminación genética irreversible hacia las poblaciones naturales.

En los últimos años, la aprobación de la Directiva de Aves y la consiguiente figura de ZEPA ha permitido un mayor control sobre la especie, por considerarse algunos de estos pinares como zonas de anidamiento de diversas aves rapaces. La Directiva Hábitat ha permitido cartografiar los hábitats de interés, entre ellos, con carácter prioritario aquellos en los que se presenta *Pinus nigra*. Ello ha permitido el establecimiento de LICs que permitirán a través de los planes de gestión, conservar estas valiosas formaciones.

Por último, *Pinus nigra* ha sido incluido en el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de la Región de Murcia (Decreto 50/2003) en la categoría "Interés especial", que conlleva la elaboración de un

plan de manejo tendente a conservar y mejorar la especie y las comunidades que conforma.

Para la gestión eficaz integrada de esta especie es necesario conocer el estado de conservación, la autoc-tonía y las características edafoclimáticas de las distintas poblaciones murcianas. Como complemento, cada vez resulta una herramienta más necesaria la caracterización genética de las distintas poblaciones. Ésta aporta información básica para conocer el origen y paleo-geografía de la especie y resulta primordial para el establecimiento de cualquier actuación relacionada con la reintroducción y reforzamiento de las poblaciones más amenazadas. En el género *Pinus*, los marcadores más ampliamente utilizados son los SSR (Simple Sequence Repeat) cloroplásticos (p.e. Provan et al. 1998, Marshall et al. 2002), ya que se ha visto que presentan una alta tasa de polimorfismo (Stoehr et al. 1998) y son buenos indicadores de la distribución geográfica de la variación genética (Wilson & Balding 1998), así como de las posibles rutas migratorias seguidas por diversas especies vegetales como consecuencia de las sucesivas glaciaciones (Newton et al. 1999). Además se conocen numerosos cebadores universales (Vendramin et al. 1996), utilizados con éxito para otras especies del género *Pinus* como *P. halepensis* (Bucci et al. 1998), *P. ceciliae* (García et al. 2003) o *P. canariensis* (Gómez et al. 2003).

Los objetivos principales de este trabajo han sido (I) evaluar los niveles de diversidad genética de las poblaciones de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* de Murcia, (II) establecer las pautas de su distribución geográfica y (III) proponer las medidas de gestión más adecuadas para esta especie en dicho territorio en base a los datos genéticos.

Material y Métodos

Material recolectado

Se ha recolectado material vegetal (acículas de ramas jóvenes) de todos los núcleos poblaciones conocidos de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* de la región de Murcia, así como de una población natural de las Sierras béticas (Collados de la Sagra, Granada) y otra de la Serranía de Cuenca (Priego, Cuenca), a fin de comparar los patrones de variación genética de las poblaciones murcianas con los de estas poblaciones naturales de mayor tamaño. También se ha recolectado material de Sierra Espuña, tanto de la subespecie *salzmannii* como del grex *nigra*, proveniente de repoblaciones, a fin de determinar el posible origen de este material. Las localidades de recolección y el número de individuos por localidad vienen reflejados en la tabla 1 y figura 1.

El ADN ha sido extraído con el Kit de extracción Dneasy Plant Mini Kit Qiagen a partir de las hojas de los individuos muestreados, previamente desecadas en gel de sílice de acuerdo con Systma et al. (1993).

Marcadores moleculares utilizados

Se han utilizado 5 cebadores universales de microsatélites cloroplásticos para *Pinaceae* (Pt11048, Pt15169, Pt41093, Pt71936, Pt87268) diseñados por Vendramin et al. (1996). Las reacciones de amplificación PCR han sido realizadas en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient siguiendo el siguiente protocolo: incubación de las muestras a 94°C

Tabla 1. Localidades de recolección de *Pinus nigra*. *Localidad de la repoblación de *Pinus nigra* grex *nigra*
Table 1. Sampled populations of *Pinus nigra*. * Reforested population of *Pinus nigra* grex *nigra*.

Población	Código	Nº individuos
Sierra Espuña-1	SE	25
Sierra Espuña-2*	PN	25
El Carche	EC	25
Rincón de los Huertos	RH	25
Collados de la Sagra	CS	25
Serranía de Cuenca	CU	25

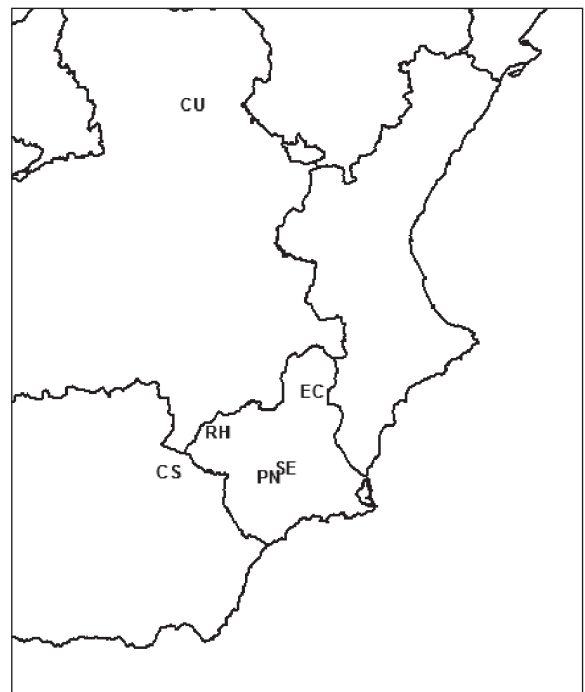


Figura 1 Localización geográfica de las poblaciones muestreadas. Los códigos de cada población son los reflejados en la tabla 1.
Figure 1. Geographical localization of sampled populations. Populations labels are reported in table 1.

durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C 1 minuto, 50°C 45 segundos, 72°C 1 minuto, y un paso final a 72°C durante 8 minutos para la terminación de los productos de amplificación. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25 µl, que contenían 2.5 µl de tampón de Taq polimerasa, (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.2 µM de cada primer (el primer directo había sido previamente marcado con fluorocromos), aproximadamente 50-100 ng de ADN y 1 unidad de NETZYME® DNA polimerasa. Los productos de amplificación fueron combinados con tampón de carga que contenía un marcador de tamaño molecular marcado con fluorescencia, y posteriormente diluidos y corridos en un gel desnaturante de poliacrilamida utilizando un secuenciador automático ABI 310. El tamaño de los fragmentos de amplificación fue calculado utilizando los programas GeneScan (v. 3.1) y Genotyper (v 2.0).

Análisis de los datos

Aunque se ha puesto de manifiesto que los microsátélites tienen un tipo de evolución particular, que generalmente se incluye dentro del modelo stepwise mutation (SMM, Ohta & Kimura, 1973), en este caso los datos no parecen ajustarse completamente a este modelo, ya que en muchas poblaciones aparecen solo dos alelos en frecuencias similares, la distribución de las frecuencias es bimodal, e incluso aparecen alelos cuyo tamaño excede el patrón de mutación puntual. Además, en los estudios infraespecíficos como el aquí desarrollado, suelen ser más adecuados estadísticos basados en el modelo de alelos infinitos (IAM, Kimura & Crow, 1964; Goldstein et al. 1995; Bucci et al. 1998). Por tanto, la diversidad genética poblacional ha sido estudiada, siguiendo el modelo IAM, de manera que se han calculado los parámetros de diversidad intra e interpoblacional Hs, Ht y Gst, de acuerdo con Nei (1987). A partir de los valores de

Tabla 2. Distribución y frecuencias alélicas de 5 loci de microsátélites estudiados para *Pinus nigra*. Los códigos de los cebadores son los utilizados por Vendramin et al. (1996).

Table 2. Allele distribution and their frequencies in five microsatellite loci analysed in *Pinus nigra*. The labels of the primers are those used in Vendramin et al. (1996).

Cebadores	Alelos obs.	LOCALIDADES ESTUDIADAS					
		SE	PN	EC	RH	CS	CU
PT41093	75	0.12	0.56	0.12	0.64	0.36	0.12
	76	0.88	0.40	0.88	0.36	0.64	0.84
	79	---	0.04	---	---	---	---
	82	---	---	---	---	---	0.04
PT71936	144	---	---	0.08	0.04	---	---
	145	0.12	0.08	0.08	---	---	0.04
	146	0.48	0.48	0.72	0.76	0.32	0.52
	147	0.40	0.36	0.12	0.2	0.56	0.28
	148	---	0.04	---	---	0.12	0.08
	149	---	---	---	---	---	0.08
PT87268	159	0.04	---	---	---	---	0.12
	160	0.08	0.12	---	0.32	0.56	0.40
	161	0.48	0.64	0.24	0.08	0.24	0.24
	162	0.40	0.16	0.76	0.48	0.20	0.12
	163	---	0.08	---	0.12	---	0.12
PT11048	70	---	---	0.04	---	---	---
	72	---	---	0.08	---	---	---
	75	---	0.04	---	---	---	---
	76	---	0.08	0.04	---	---	---
	77	---	---	0.28	---	---	---
	83	0.04	0.28	0.08	0.16	0.32	---
	84	0.16	---	0.12	0.72	0.44	0.28
	85	0.76	0.48	0.32	0.12	0.20	0.56
	86	---	0.12	---	---	0.04	0.16
92	0.04	---	0.04	---	---	---	
PT15169	113	---	---	0.08	---	---	---
	114	0.04	0.04	0.08	---	---	---
	115	---	---	0.04	0.04	0.04	---
	116	0.80	0.84	0.64	0.84	0.64	1.00
	117	0.16	0.12	0.16	0.12	0.28	---
	118	---	---	---	---	0.04	---

Tabla 3. Análisis de la diversidad genética para *Pinus nigra*. H, diversidad genética intrapoblacional. Ht, diversidad genética total. Gst, diferenciación genética de las poblaciones (Nei 1987).

Table 3. Genetic diversity parameters of *Pinus nigra* accessions. H, within-population genetic diversity. Ht, total genetic diversity. Gst, overall genetic divergence among populations (Nei 1987).

Localidad	N Haplot.	% Indiv. haplot. excl.	H	Ht	Gst
SE	18	20	0.425		
PN	22	68	0.529		
EC	23	72	0.474		
RH	17	28	0.442		
CS	20	32	0.558		
CU	21	40	0.447		
Total				0.565	0.1525

Tabla 4 Diferenciación genética entre poblaciones a partir de los valores de Fst (Wright 1965)

Table 4. Genetic divergence among populations from Fst values (Wright 1965)

SE						
PN	0.125					
EC	0.132	0.215				
RH	0.315	0.212	0.235			
CS	0.192	0.133	0.223	0.137		
CU	0.069	0.145	0.187	0.226	0.123	
	SE	PN	EC	RH	CS	CU

distancia entre poblaciones se ha representado un dendrograma con el método UPGMA (Nei 1972) para ver como se agrupan las poblaciones. Los resultados han sido obtenidos con el programa POPGENE 1.32 (Yeh et al. 1999). Los índices de diferenciación interpopulacionales Fst (Wright, 1965) y Gst (Nei, 1987) se han calculado con el programa MICROSAT.

Resultados

Los cinco loci de microsatélites cloroplásticos empleados para el estudio de los 150 individuos de *Pinus nigra* han resultado ser polimórficos, apareciendo al menos dos alelos en todas las poblaciones, a excepción del loci PT15169, que es monomórfico en la población de la Serranía de Cuenca. El número medio de alelos por loci es de 6.4, variando entre los 4 del loci PT411093 y los 10 del loci PT11048. En la tabla 2 se puede observar la longitud de cada uno de los alelos así como sus frecuencias. Algunos de los alelos son exclusivos de la población en la que han sido detectados, aunque suelen aparecer en frecuencias muy bajas (tabla 2). Así, por ejemplo, en la población de El Carche se han localizado cuatro alelos exclusivos, en la población repoblada de *Pinus nigra*

grex nigra tres, dos en la población de Cuenca y uno en la población de los Collados de la Sagra.

Como consecuencia de esta diversidad alélica se han identificado 87 haplotipos, de los que 65 eran exclusivos de población, cuyo número variaba desde los cinco exclusivos de Sierra Espuña hasta diecisiete para *Pinus nigra* subsp. *nigra*, o los dieciocho de la población de El Carche. De hecho, no se ha encontrado ningún haplotipo que aparezca en todas las poblaciones, aunque sí algunos que aparecen en hasta cuatro poblaciones, pero siempre en muy baja frecuencia.

Los valores de diversidad genética intrapoblacional son bastante similares en todas las poblaciones (tabla 3). La población de Sierra Espuña es la que presenta el valor más bajo (0.425), mientras que la que presenta el valor más alto es la de los Collados de la Sagra (0.558). El valor de heterozigosidad esperada (Ht) es de 0.5654. Este valor es intermedio con respecto a los obtenidos en otras especies del género (Delgado et al. 2002). El valor de Gst (0.1525) indica un cierto grado de aislamiento interpopulacional. Los valores de diferenciación genética interpopulacionales obtenidos con el cálculo de Fst (tabla 4) indican que todas las poblaciones tienen un elevado

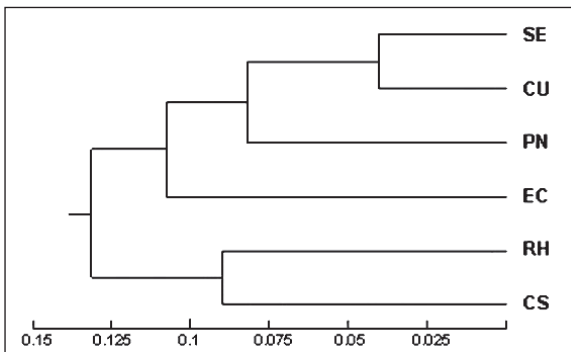


Figura 2 Representación gráfica de las distancias genéticas entre poblaciones a partir del método UPGMA. Los códigos de cada población son los reflejados en la tabla 1.

Figure 2. UPGMA dendrogram obtained from genetic distances between populations. Populations labels are reported in table 1.

grado de diferenciación genética a excepción de las poblaciones de la Serranía de Cuenca y Sierra Espuña, que presentan los menores valores de diferenciación interpoblacional tanto para el estadístico F_{st} (0.069), como el estadístico G_{st} (0.046).

El dendrograma obtenido con los valores de distancia de Nei (1972) (figura 2), permite observar una topología muy clara en cuanto al grado de similitud de las poblaciones. Como se puede observar, aparecen dos grupos claramente diferenciados, uno en el que se engloban las poblaciones del Rincón de los Huertos y Collados de la Sagra, y otro en el que se agrupan el resto, y en el que aparece un pequeño subgrupo en el que se agrupa la población de Sierra Espuña y la de la Serranía de Cuenca. Relacionadas con éstas, pero algo más separadas están la población de *Pinus nigra* *grex nigra* repoblada en Sierra Espuña y la población de El Carche.

Discusión

Los microsatélites cloroplásticos han demostrado ser muy eficaces para el cálculo de la variabilidad genética en las poblaciones murcianas de *Pinus nigra* como se desprende del elevado número de haplotipos detectado en los 5 loci estudiados. Puesto que el número de haplotipos exclusivos de población es elevado (65 de 87), se sugiere que estos microsatélites cloroplásticos podrían ser una herramienta muy útil para la certificación de semillas y la identificación de procedencias (Bucci et al. 1998), una vez que se haya estudiado todo el rango poblacional de *Pinus nigra* *s.l.* Comparando los resultados de diversidad genética intrapoblacional con otras especies de *Pinus* encontramos que la variación se sitúa en una zona intermedia, ya que es menor por ejemplo que la encontrada en *P. sylvestris* (Provan et al. 1998), *P. pinaster* (Riberio et al. 2001) o *P. resinosa* (Echt et

al. 1998), y mayor que la encontrada en *P. halepensis* y *P. brutia* (Bucci et al. 1998). Estos valores de diversidad contrastan con los obtenidos en *P. nigra* subsp. *pallasiana* para isoenzimas (Çengel et al. 2000, Tolun et al. 2000), cuyos valores eran menores ($H_t=0.288$, $H_t=0.227$) y no existía apenas diferenciación genética entre las poblaciones ($G_{st}=0.060$, $G_{st}=0.070$). No obstante, los microsatélites cloroplásticos suelen presentar unos valores más altos de diversidad genética (Provan et al. 1998, Delgado et al. 2002). Desafortunadamente, no existen datos de microsatélites cloroplásticos aplicados a *P. nigra* con los que comparar los valores de diversidad genética y diferenciación interpoblacional obtenidos. Lo que sí se desprende de los valores de F_{st} , así como de la presencia de numerosos haplotipos exclusivos en cada población, es que las poblaciones murcianas de *P. nigra* subsp. *salzmannii* están diferenciadas genéticamente. Existen datos paleopalínológicos e históricos que sugieren que las poblaciones de *P. nigra* han sufrido un retroceso muy importante en el sureste ibérico, muy posiblemente debido a los cambios climáticos ocurridos durante el Holoceno (Rodríguez-Ariza 1992, Badal et al. 1994). Este proceso se ha agravado en los últimos 300 años, lo que ha acentuado la severa fragmentación de las poblaciones murcianas. No obstante, no parece haber producido una elevada pérdida de diversidad genética, ya que los valores de diversidad poblacional son similares a los encontrados en las grandes poblaciones de la Serranía de Cuenca y de las Sierras béticas (Collados de la Sagra).

Distribución geográfica de la variación

El análisis fenético de los datos obtenidos sugiere que las poblaciones murcianas podrían haberse originado a partir de dos vías principales. Por un lado se encuentra la población del Rincón de los Huertos, que se agrupa con la de los Collados de la Sagra, de hecho, incluso comparten 7 haplotipos, de los que 4 sólo aparecen en estas dos poblaciones. Estas dos localidades se incluyen dentro de la misma unidad biogeográfica, y apenas existen discontinuidades poblacionales, por lo que la localidad murciana podría tratarse de un extremo de la gran población existente en las Sierras béticas de Andalucía, Albacete y Murcia. La población de Sierra Espuña de *P. nigra* subsp. *salzmannii* de origen desconocido se asemeja claramente a la población muestreada de la Serranía de Cuenca; de hecho, comparten 7 haplotipos (2 exclusivos), y exhiben los valores más bajos de diferenciación ($F_{st}=0.069$; $G_{st}=0.046$). Estos datos contrastan con la gran dis-

continuidad y distancia geográfica existente entre ambos núcleos. Para entender porqué ocurre esto, habría que tener en cuenta que Sierra Espuña es un macizo en el que la mayoría de sus pinares proceden de repoblaciones, sobre todo la efectuada a principios del siglo XX por Ricardo Codorniu, y, aunque existen datos de la procedencia de las especies repobladas, en muchos casos existen confusiones y errores. De este modo, sugerimos que las poblaciones repobladas de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* pudiesen proceder del Sistema Ibérico. En cuanto a la desconcertante similitud de los ejemplares procedentes de la repoblación de *Pinus nigra* grex *nigra* efectuada en la década de los 70 con estas dos localidades, se desconoce el origen de los pies repoblados, pero estos resultados indican que podría haber incluso contaminación genética proveniente de vivero con pies del Sistema Ibérico, ya que los individuos repoblados aún no producen regeneración natural. En cuanto a la población de El Carche, se engloba con las anteriormente citadas, pero algo más alejada. De hecho, es la que presenta mayor número de alelos exclusivos y por tanto, de haplotipos privados (18). El hecho de que no se agrupe con las poblaciones de influencia bética como cabría esperar en principio, y sí con las de ámbito ibérico, sugiere que su origen está relacionado con la vía de entrada desde las sierras del Sistema Ibérico hacia la cuenca del Júcar, quizás por las montañas valencianas hasta las sierras del Noreste murciano. Esta hipótesis adquiere coherencia por encontrarse en esta sierra y otras alledañas numerosos elementos florísticos iberolevantineos como *Thymus piperella*, *Saxifraga fragilis* subsp. *paniculata*, *Erodium saxatile*, *Globularia repens*, *Silene otites*, *Sideritis chamaedryfolia*, *Sideritis tragoriganum*, etc.

La confirmación de todas estas hipótesis requeriría un estudio más amplio de todas las poblaciones naturales de *Pinus nigra* de la península Ibérica e incluso a nivel europeo, que indicaría cuáles han sido las posibles vías migratorias en períodos históricos relacionados con las fluctuaciones climáticas causadas por las glaciaciones.

Agradecimientos

A Juan Bautista Vera y a Laura Monteagudo por la recolección de las muestras procedentes de El Carche y la Serranía de Cuenca respectivamente. Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General del Medio Natural de la Región de Murcia mediante una Asistencia técnica denominada "Estudio de regiones de procedencia de diversas especies de interés forestal en la Región de Murcia".

Bibliografía

- Badal E, Bernabeu J & Vernet JL. 1994. Vegetation changes and human action from the Neolithic to the Bronze Age (7000-4000 B.P.) in Alicante, Spain based on charcoal analysis. *Vegetation History and Archaeobotany* 3: 155-166.
- Bucci G, Anzidei M, Madaghiele A & Vendramin GG. 1998. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in halepensis-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. *Molecular Ecology* 7: 1633-1643.
- Çengel B, Velioglu E, Tolun AA & Kaya Z. 2000. Pattern and magnitude of genetic diversity in *Pinus nigra* Arnold subsp. *pallasiana* populations from Kazdagi: Implications for in situ conservation. *Silvae genetica* 49: 249-256.
- Delgado P, Cuenca A, Escalante AE, Molina-Freaner F & Piñero D. 2002. Comparative genetic structure in pines: evolutionary and conservation consequences. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 27-37.
- Echt CS, DeVerno LL, Anzidei M & Vendramin GG. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology* 7: 307-317.
- García-Gil MR, Mus M & Rosselló JA. in press. Chloroplast microsatellite data does not support a relict status for *Pinus ceciliae*, a putative endemic pine from the Balearic islands. *Molecular Ecology*.
- Goldstein DB, Linares AR, Cavalli-Sforza, LL & Feldman MW. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.
- Gómez A, González-Martínez SC, Collada C, Climent J & Gil L. 2003. Complex population genetic structure in the endemic Canary Island pine revealed using chloroplast microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1123-1131.
- Kimura M, Crown JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Marshall HD, Newton C & Ritland K. 2002. Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics* 104: 367-378.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Newton AC, Allnutt TR, Gillies ACM, Lowe AJ, Ennos RA. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology & Evolution* 14:140-145.
- Ohta T, Kimura M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically

- detectable alleles in a finite population. *Genetical Research Cambridge* 22: 201-204.
- Provan J, Soranzo N, Wilson NJ, McNicol JW, Forrest GI, Cottrell J & Powell W. 1998. Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proceedings of Royal Society London B* 265: 1697-1705.
- Quézel P. 1980. Biogéographie et écologie des conifères sur le pourtour méditerranéen. In *Actualités d'Ecologie Forestière* (Pesson P, ed.). Paris: Gauthier-Villars, pp. 205-255.
- Ribeiro MM, Plomion C, Petit R, Vendramin GG & Szmida AE. 2001. Variation in chloroplast single sequence repeats in Portuguese maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics* 102: 97-103.
- Rodríguez-Ariza MO. 1992. Las relaciones hombre-vegetación en el sureste de la Península Ibérica durante las edades del Cobre y Bronce a partir del análisis antracológico de siete yacimientos arqueológicos. Granada: Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Sánchez-Gómez P, Guerra J, Fernández S & Vera JB. 2003. Instrumentos para el aprovechamiento de las especies vegetales de interés económico en la Región de Murcia. Memoria Técnica. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente.
- Stoehr MU, Orvar BL, Vo TM, Gawley JR, Webber JE & Newton CH. 1998. Application of a chloroplast DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research* 28: 187-195.
- Sytsma KJ, Givnish TJ, Smith JF & Hahn WJ. 1993. Collection and storage of land plant samples for macromolecular comparisons. *Methods in Enzymology* 224: 23-37.
- Tolun AA, Velioglu E, Çengel B & Kaya Z. 2000. Genetic structure of Black Pine (*Pinus nigra* Arnold subspecies *pallasiana*) Populations Sampled from the Bolkar Mountains. *Silvae Genetica* 49: 113-119.
- Vendramin GG, 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.
- Wilson IJ & Balding DJ. 1998. Genealogical inference from microsatellite data. *Genetics* 150: 499-510.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Yeh FC, Yang R & Boyle T. 1999. POPGENE 1.31. Quick user guide. University of Alberta and Centre for International Forestry Research.