



2025 | **16-20**
GIJÓN | **JUNIO**

9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

9CFE-1600

Actas del Noveno Congreso Forestal Español
Edita: **Sociedad Española de Ciencias Forestales. 2025.**
ISBN: **978-84-941695-7-1**

Organiza





Estudio genético de la población de mejora gallega de *Pinus pinaster*

VILLAR CAAMAÑO L. (1), FERNÁNDEZ CRUZ (2), J., ALÍA MIRANDA R. (3), GRIVET D. (3) Y DÍAZ VÁZQUEZ R. (2)

(1) Fundación ARUME.

(2) Centro de Investigación Forestal de Lourizán.

(3) Instituto de Ciencias Forestales (iCIFOR) INIA-CSIC

Resumen

Es fundamental estudiar la diversidad genética en poblaciones para lograr entender su estructura y dinámica. Herramientas como los microsatélites y los SNPs son claves en estos estudios, ya que permiten identificar clones y corregir errores de identificación. El principal objetivo de este estudio es obtener información detallada sobre la estructura genética de la principal población de mejora de *Pinus pinaster* de Galicia. Para ello, se analizaron individuos correspondientes a los 116 clones iniciales utilizando los dos tipos de marcadores genéticos: 12 microsatélites y 62 SNPs. El uso de estos marcadores no solo proporcionó información para la gestión y conservación de la población de mejora gallega, sino que también permitió corregir errores de identificación y determinar la estructura genética de la población.

Palabras clave

Marcadores moleculares, nSSR, SNP, diversidad genética, estructura poblacional.

1. Introducción

El estudio molecular en poblaciones de mejora nos permite identificar y diferenciar de forma inequívoca los árboles superiores y su descendencia lo que, a su vez, nos permitirá gestionar las poblaciones de mejora y su aplicación en sus diferentes etapas (NEALE Y KREMER, 2011). En los programas de mejora es necesario estimar la diversidad genética de las poblaciones por varias razones: cuando la diversidad genética es baja, hay una mayor probabilidad de que individuos genéticamente similares se apareen, aumentando así las posibilidades de endogamia; la diversidad genética contribuye a la resiliencia de una población a las enfermedades y al estrés ambiental, asegurando la supervivencia a largo plazo; por otro lado, la identificación inequívoca del material de un programa de mejora es esencial ya que garantiza su trazabilidad.

Los marcadores moleculares son pequeños fragmentos de ADN (codificante o no) que presentan un polimorfismo en función del individuo, lo que permite caracterizar un genotipo. Los marcadores más recientes y utilizados actualmente son los microsatélites (también llamados nSSR: simple sequence repeat) y los SNPs (single nucleotide polymorphism). Los nSSR se han utilizado durante mucho tiempo para reconstruir pedigrís porque son multialélicos, codominantes y fácilmente observables (JONES et al., 2010). Por otro lado, el SNP, es la variación de un solo par de bases del genoma y son más abundantes dentro de este, más confiables, más simples y más baratos de genotipar (TELFER, 2015).

El pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) es una especie con gran diversidad ecológica que se adapta muy bien a diversos tipos de climas y suelos. Es nativo de Europa occidental y el norte de África y las mayores superficies de esta especie se encuentran en Portugal, Francia, Italia y España. En la Península Ibérica, es especialmente notable su presencia en el noroeste del país, en Galicia, donde en 2022 cubría aproximadamente 200.000 hectáreas según los datos del Inventario Forestal Continuo de Galicia (IFCG, 2022). Se encuentra también en la meseta castellana, en las montañas de la zona Soria-Burgos, en las Sierras de Cuenca y de Segura-Alcaraz, y en pequeños puntos del interior y de la costa mediterránea



española.

El programa de mejora genética más avanzado de esta especie comenzó en 1960 en Aquitania, al suroeste de Francia. Este programa se inició con el fin de aumentar el rendimiento y la productividad de las masas de *P. pinaster*, si bien actualmente pretende también encontrar genotipos resistentes a las enfermedades, a la sequía, y a otros estreses ambientales, utilizando para ello una combinación de métodos de mejora tradicionales con técnicas basadas en marcadores moleculares, como nSSR y SNPs. El uso de microsátélites en el programa de mejora genética de *Pinus pinaster* en Francia es una herramienta esencial para estudiar la diversidad genética y la estructura poblacional, mientras que los Arrays de SNP son claves para la selección asistida por marcadores (MAS), la evaluación de la diversidad genética y la mejora de caracteres de esta especie forestal (RAFFIN et al., 2016).

El programa de mejora portugués es otro de los programas de mejora de *P. pinaster* más antiguos. El pino marítimo es una especie muy importante en Portugal, ya que se utiliza ampliamente para la producción de madera, la reforestación y la industria papelera (ICNF, 2023). El programa de mejora genética en Portugal se inició en 1960 a partir de una selección de 80 árboles en Leiría en colaboración con Australia, a partir de los cuales se establecieron dos huertos semilleros cualificados utilizando 60 clones injertados y de este mismo huerto, en el año 2000, un huerto semillero testado que contenía los 16 mejores clones en rectitud y volumen (AGUIAR et al., 2003). Recientemente se ha realizado una nueva selección de más de 100 árboles, pero esta vez, en todo Portugal. En la última década han incorporado cada vez más marcadores moleculares (nSSR y SNPs) para mejorar la precisión y eficiencia de sus esfuerzos de mejora genética.

En España, en los años 80, se inició un programa de mejora genética de *P. pinaster* en Galicia mediante la selección fenotípica de árboles superiores de rodales ubicados a lo largo de la costa atlántica gallega con el objetivo de aumentar la producción de madera para apoyar y promover el sector forestal gallego. Se decidió realizar la selección en esta procedencia en base a resultados obtenidos a partir del ensayo de procedencias instalado en los años 50 por D. Fernando Molina (MOLINA, 1965). El criterio de selección se basó en la rectitud, el crecimiento en volumen y el menor espesor de corteza. Se seleccionaron un total de 116 árboles y se replicaron mediante injerto en un huerto semillero clonal de primera generación (Sergude, A Coruña), constituyendo la principal población de mejora del programa gallego. Este huerto fue incluido en 2001 en el Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB) para la obtención de material forestal de reproducción, de categoría calificado. En 1998 se instaló un nuevo huerto semillero en Monfero (A Coruña) con el mismo material y diseño también incluido como material de base calificado en el CNMB en 2007. Desde entonces, se establecieron varios ensayos de campo e invernadero y, tras analizar los resultados de esos ensayos, se estableció un huerto semillero de generación 1,5 en A Braxe (A Coruña) con los clones injertados de los 79 mejores genotipos. Entre 2016 y 2020 se dieron de alta en el CNMB otros tres huertos semilleros, en este caso de brinzales, así como seis progenitores de familia resistentes al nematodo de la madera del pino. Desde el año 2020 se han introducido al programa de mejora los estudios moleculares, utilizando tanto nSSR como SNPs para poder determinar los diferentes parámetros de diversidad, así como conocer la identidad y el origen de los árboles.

2. Objetivos

Los principales objetivos de este estudio fueron: 1) Genotipar la población principal de mejora, con un total de 452 individuos que pertenecen a 116 árboles

superiores utilizando 12 microsátélites; 2) Genotipar mediante 62 SNP los distintos genotipos determinados por nSSR para confirmar nuevamente la identidad de este material y comparar los resultados obtenidos con los de los nSSR; 3) Corregir errores de identificación, determinar la estructura genética de la población y estudiar su diversidad.

3. Metodología

Material vegetal

El material vegetal empleado fueron acículas de 452 ramets procedentes de 116 árboles superiores seleccionados en Galicia en los años 80 a partir material local, el cual se había demostrado presentaba mejores características que otras poblaciones del área de distribución natural de la especie (MOLINA, 1965). Estos se injertaron en 1998 en un huerto semillero de primera generación ubicado en Monfero, Galicia (43° 17' 54.82" N y 7° 56' 14.84" W).

Estos árboles superiores se seleccionaron a lo largo de la costa atlántica de Galicia (Figura 1) en base a sus características fenotípicas superiores, lo que asegura que estos árboles continúen proporcionando semillas de alta calidad dentro del programa de mejora genética de Galicia.

Se recogieron muestras de acículas de un total de 452 individuos presentes en el huerto semillero clonal (una media de 3,9 ramets/clon). Las muestras se colocaron en bolsas de papel junto con gel de sílice, un material desecante que ayuda a mantenerlas secas, y, posteriormente, se almacenaron de manera segura hasta que extrajo el ADN.

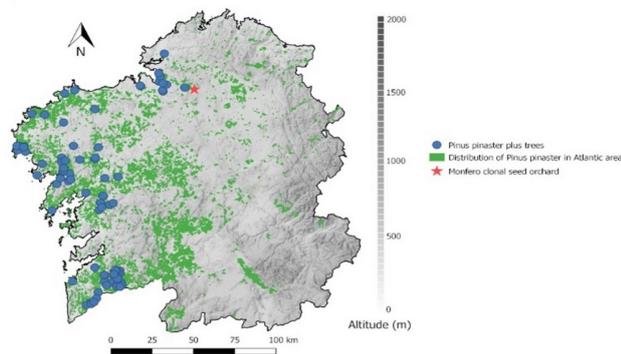


Figura 1. Distribución de árboles superiores de Pinus pinaster en la zona atlántica y situación de los huertos semilleros clonales de Monfero

Genotipado

En primer lugar, se liofilizaron todas las muestras de acículas y, posteriormente, se molieron 40 mg de este material con Tissue Lyser (Qiagen, Venlo, Países Bajos) utilizando nitrógeno líquido. Para el estudio con nSSR, se extrajo el ADN con el kit comercial NucleoSpin™ 96 Plant II (Macherey – Nagel™, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante, al que se añadieron algunas modificaciones, y se cuantificó por fluorimetría con Qubit 4 (Thermo Fisher, EE. UU.). Además, se comprobó la integridad y la calidad del ADN mediante un gel de agarosa. Se almacenó a 4 °C hasta la reacción de PCR.

Para el genotipado de las muestras se utilizaron 12 nSSR que ya se habían seleccionado y utilizado previamente para otros estudios con esta misma especie:



ctg275, NZPR544, RPtest11, ctg4363, NZPR418, NZPR1078 (CHAGNÉ et al., 2004), A6F03 (GUEVARA et al., 2005), FRPP94 (MARIETTE et al., 2001), epi3, epi5 (SEBASTIANI et al., 2012), gPp14 (PINZAUTI et al., 2012), pEST2669 (STEINITZ et al., 2011).

Para la amplificación mediante PCR, se utilizó el kit PCR Multiplex de Qiagen (Qiagen, Venlo, Países Bajos). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 μ l que contenían 3 μ l de agua estéril, 5 μ l de 2x Type-it Master Mix, 1 μ l de 2 μ M primer mix, y 1 μ l de ADN a 10ng/ μ l. El procedimiento consistió en un primer paso de desnaturalización del ADN durante 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, anillamiento a 57°C durante 90 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos. Por último, se realizó una extensión final de 30 minutos a 60°C y se realizó un gel de agarosa al 1% para verificar la amplificación. Los productos de PCR amplificados se analizaron en un secuenciador ABI3500 utilizando LIZ500 como estándar de tamaño y los tamaños de los fragmentos se determinaron utilizando Geneious Prime 2021.1.1 (Dotmatics).

Para el genotipado mediante SNPs se hicieron 112 de las 116 muestras originales de árboles superiores, ya que las otras 4 no tenían calidad suficiente para estudiarse con estos marcadores, y se enviaron al INRAE (Burdeos, Francia). La extracción de ADN se realizó con el kit DNeasy® Plant Mini (Qiagen, Venlo, Países Bajos) y se cuantificó con técnicas espectrofotométricas y fluorométricas utilizando Nanodrop y Picogreen, respectivamente. Se utilizaron un total de 61 SNPs con la tecnología Sequenom en PGTB (La Plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux) ya que uno de ellos no funcionó. Estos SNPs ya se habían probado anteriormente genotipar la población de mejora de pino marítimo francés. El genotipado mediante estos marcadores se llevó a cabo utilizando la tecnología iPLEX Gold en el MassARRAY (Agena Bioscience).

Análisis de datos

Para la identificación de clones mediante nSSR, primero se comprobó si había alelos nulos con el software Cervus v.3.0.7 y se eliminaron aquellos marcadores con $F(\text{null}) > 0,1$ para el análisis posterior. Para los datos de SNPs calculamos los datos faltantes, la frecuencia de alelos menores (MAF) y el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). El genotipo más frecuente de todos los árboles genotipados para un clon se identificó como el genotipo de referencia del clon para estudios posteriores.

En el caso de los SNPs, se calculó el Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) (BOTSTEIN et al., 1980) y los parámetros calculados para los dos conjuntos de marcadores fueron: número de árboles superiores, número de genotipos únicos, número de individuos con genotipo diferente de los genotipos iniciales, árboles superiores que comparten el mismo genotipo, número de loci, probabilidad combinada de no exclusión (primer progenitor), probabilidad combinada de no exclusión (segundo progenitor), probabilidad combinada de no exclusión (par progenitor), probabilidad combinada de no exclusión (identidad), probabilidad combinada de no exclusión (identidad de hermanos).

El cálculo de parámetros de diversidad genética para ambos tipos de marcadores se realizó con el software Genodive 3.0 y se calculó: número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e ; NEI, 1987) e índice de consanguinidad (F_{is}). Este mismo software también se utilizó para detectar muestras duplicadas y para confirmar la identidad de cada individuo y un análisis de identidad para SNPs con el programa Cervus v.3.0.7 (KALINOWSKI et al., 2007).

Se utilizó un método de agrupamiento bayesiano implementado en el software

STRUCTURE v.2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000) para definir la estructura de la población. Se probaron diez ejecuciones independientes para $K = 1-20$. Se utilizó un modelo de mezcla con un período de prueba de 10 000 interacciones seguido de 100 000 interacciones de Monte Carlo con cadena de Markov. Este análisis se realizó con frecuencias correlacionadas.

4. Resultados

Identificación de clones, diversidad genética de la población y estructura

Se realizó un primer análisis genético de los marcadores utilizando el programa Cervus 3.0.7. Este análisis ha permitido identificar y excluir marcadores con alelos nulos (Tabla 1). El criterio aplicado para identificar alelos nulos fue que la frecuencia del alelo nulo $F(\text{null})$ debía ser mayor que 0,1. Mediante este criterio, se identificaron tres marcadores que presentaron alelos nulos (NZPR544, NZPR418 y gPp14) y se excluyeron de los análisis posteriores, que se realizaron solamente con 9 nSSR (Tabla 2). Estos nSSR seleccionados fueron muy informativos ya que tenían suficiente poder para diferenciar individuos.

Tabla 1. Alelos nulos obtenidos con el programa Cervus 3.0.7

Locus	F(Null)
ctg275	0,0032
NZPR544	0,2799
A6F03	0,0086
RPtest11	0,0427
FRPP94	0,0561
ctg4363	-0,0312
epi3	0,006
epi5	-0,0363
NZPR418	0,1441
gPp14	0,1034
pEST2669	0,0754
NZPR1078	0,02

Tabla 2. Información de los 9 nSSR

Locus name	Primer sequence (5'-3')	Allele size (bp)
ctg275 - F	ACGGAGATATATTGCTGGCG	116 - 138
ctg275 - R	AAAGAATAACGTGAAACAAACCC	
A6F03 - F	CCTGAAAATCGACGGATCG	240 - 252

A6F03 - R	ATGGTATTTTGC GG GTTGC	
RPtest11 - F	AGGATGCCTATGATATGCGC	206 - 215
RPtest11 - R	AACCATAACAAAAGCGGTGC	
FRPP94 - F	GGCAAACCTCTTTAGAGTGC	133 - 157
FRPP94 - R	TTTGTGCGATTTTCTTGAAATCTAA	
ctg4363 - F	TAATAATTCAAGCCACCCCG	93 - 99
ctg4363 - R	AGCAGGCTAATAACAACACGC	
epi3 - F	AGCAACATTTCCCTGGACAC	223 - 241
epi3 - R	GGAATAATTGCAGTTGCAGTAGC	
epi5 - F	GGCGCGAACTACTTCATCTG	183 - 201
epi5 - R	CAATGCTGACAAACCCAGAA	
pEST2669 - F	ATTGCTTCTGAAAGGGCATC	144 - 160
pEST2669 - R	TCCCTTGGCACCATGTTAAT	
NZPR1078 - F	TGGTGATCAAGCCTTTTTTC	328 - 338
NZPR1078 - R	GTTGATGAGTGATGGCATGG	

Los análisis realizados con GenAlex 6.5 han permitido identificar errores de identificación, obteniéndose un total de 98 MLG (Multilocus Genotype) que se corresponden con árboles superiores seleccionados en Galicia en los años 80, en lugar de los 116 supuestamente seleccionados. Se obtuvieron los mismos resultados para los 61 SNP en cuanto a identificación de clones. Por otra parte, se encontró un error de genotipado del 6,6%.

Por otro lado, los resultados del análisis con el programa STRUCTURE, mostraron que no existe una estructura genética definida dentro de la población reproductora de *P. pinaster*, lo que implica que todos los individuos pueden considerarse parte del mismo grupo genético.

Comparación entre nSSR y SNP

Los 9 nSSRs utilizados para evaluar la variabilidad genética resultaron ser polimórficos, ya que presentaron entre 4 y 9 alelos. El número promedio de alelos (N_a) fue de 5,33, lo que indica una diversidad alélica considerable en la población.

Los valores de heterocigosidad observada y esperada son bastante similares ($H_0=0,56$; $H_E=0,57$), lo que sugiere un nivel alto de diversidad genética dentro de la población de mejora gallega de *P. pinaster* (Tabla 3). Además, los valores del índice de fijación (F) fueron cercanos a cero, lo cual indica que la reproducción dentro de la población es aleatoria. Esto es un signo positivo de variabilidad genética, ya que no hay indicios de endogamia significativa.

Tabla 3. Número de alelos observado (N_a) y efectivo (N_e), heterocigosidad observada (H_0) y esperada (H_e) e índice de consanguinidad (F_{is}) estimados para la principal población reproductora gallega con 9 microsatélites.

Locus	Na	Ne	Ho	Hs	Fis
ctg275	9	3.523	0.714	0.72	0.008 ns
A6F03	6	2.748	0.622	0.639	0.026 ns
RPtest11	4	2.04	0.469	0.513	0.084 ns
FRPP94	8	5.065	0.714	0.807	0.115*
ctg4363	4	2.349	0.612	0.577	-0.061 ns
epi3	5	3.221	0.684	0.693	0.014 ns
epi5	4	1.816	0.48	0.451	-0.062 ns
pEST2669	4	1.345	0.224	0.258	0.129
NZPR1078	4	2.123	0.51	0.532	0.041 ns
General	5.33	2.69	0.56	0.577	0.031 ns

Los valores de Ho y He son mayores en el caso de los nSSR (Tabla 4), debido a su mayor grado de polimorfismo, lo que muestra que estos marcadores son más discriminantes, suponiendo una mejor herramienta de identificación.

Tabla 4. Comparación de los valores obtenidos para los diferentes parámetros con nSSR y con SNPs

Parámetro	nSSR	SNPs
Número de individuos	98	112
Número de loci	9	61
Número medio de alelos por locus	5.33	2
Heterocigosidad media esperada	0.58	0.37
Contenido medio de información polimórfica (PIC)	0.52	0.29
Probabilidad combinada de no exclusión (primer padre)	0.12	0.01
Probabilidad combinada de no exclusión (segundo padre)	0.02	6.61E-5
Probabilidad combinada de no exclusión (par de padres)	1.2E-3	1.3E-7
Probabilidad combinada de no exclusión (par de padres)	1.19E-6	3.11E-20
Probabilidad combinada de no exclusión (identidad de hermanos)	2.62E-3	9.48E-11

5. Discusión

En tres de los 12 marcadores SSR empleados en el estudio de la población principal de mejora mediante microsatélites (nSSR) se identificó la presencia de alelos nulos. Por ello, se optó por utilizar únicamente 9 de los marcadores nSSR originales. En cuanto a la estructura poblacional, el programa STRUCTURE



determinó que estos árboles comparten un mismo origen genético, es decir, la población principal de mejora constituye una única población homogénea. Además, todos los parámetros de diversidad analizados (número de alelos observados (N_a) y efectivos (N_e), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) e índice de fijación (F)) mostraron valores dentro de un rango aceptable (H_o y $H_e > 5$), por lo que se puede afirmar que la población es lo suficientemente diversa. Por lo tanto, en principio, no es necesaria la introducción de nuevos genotipos.

El alto nivel de polimorfismo de los nSSR que indican los niveles de heterocigosidad de la población de mejora confirmó resultados de estudios previos realizados en diferentes poblaciones de *P. pinaster* utilizando el mismo conjunto de marcadores (JARAMILLO-CORREA et al., 2015).

Los errores de identificación son comunes cuando no se hace la identificación molecular y, además, suelen ser valores altos. Por ejemplo, en el programa de mejora francés, el error obtenido fue de un 17% cuando estudiaron 524 árboles (5 ramets/árbol) con 80 nSSR (BOUFFIER, 2022). En el presente estudio, el error de identificación en el huerto semillero de Monfero fue muy aceptable (5,8%), ya que sólo se identificaron incorrectamente 26 individuos. Como resultado, el número de genotipos que constituyen la población de mejora resultó ser 98 en lugar de los 116 clones seleccionados originalmente. La razón más probable es que hubo errores en el etiquetado o manejo de los árboles durante el establecimiento del huerto.

Además, se han encontrado algunos genotipos nuevos de fuentes desconocidas que de momento no se van a añadir a la población de mejora ya que, sin sus datos genéticos, su introducción podría resultar en la transmisión de caracteres indeseables que, a su vez, podrían afectar características importantes como el crecimiento, la resistencia a enfermedades, la calidad de la madera o la adaptabilidad a las condiciones climáticas (FALCONER et al. 1996).

La elección entre usar nSSR o SNPs dependerá del acceso a cada uno de ellos o de la preferencia hacia uno u otro ya que, los resultados obtenidos con las 112 submuestras estudiadas son los mismos con ambos marcadores, es decir, también indican que hay menos genotipos de los considerados inicialmente y el porcentaje de error es el mismo.

6. Conclusiones

Tanto los 9 nSSR empleados en este estudio como los 61 SNPs del array de baja densidad desarrollado en Francia han demostrado ser efectivos para diferenciar e identificar genotipos dentro de la población principal de mejora gallega de *P. pinaster*.

Se ha comprobado que la población principal de mejora gallega constituye una única unidad genética, dado que no se ha encontrado una estructura genética definida. Además, los parámetros de diversidad estudiados muestran que esta población es suficientemente diversa por lo que, en principio, no es necesario introducir en ella nuevos genotipos. Hay que destacar que, de los 116 árboles superiores que se seleccionaron inicialmente en el programa de mejora gallego, 98 genotipos han sido correctamente identificados y caracterizados molecularmente, mientras que el resto (18) no han identificado aún con certeza.

7. Agradecimientos

Agradecemos a Laurent Bouffier y Annie Raffin, de INRAE, por su ofrecimiento y ayuda en el estudio de SNPs. A Marta Callejas y Sanna Olsson, del iCIFOR, por su ayuda en las lecturas y los análisis de datos, así como al Centro de Investigación Forestal de Lourizán, sin el que no sería posible la realización de este estudio.

Bibliografía

AGUIAR, A.; ALMEIDA, M.H.; BORRALHO, N.; 2003. Genetic Control of Growth,



- Wood Density and Stem Characteristics of *Pinus pinaster* in Portugal. *Silv. Lusit.* 11(2). 131- 139.
- BOTSTEIN, D., WHITE, RL., SKOLNICK, M., & DAVIS, RW.; 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32(3). 314–331.
- BOUFFIER, L.; 2022. Utilisation des marqueurs moléculaires - Sélection pour la résistance à la sécheresse. Journées *Pinus pinaster*. Vitoria. Spain. ([hal-04712220](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-04712220))
- CHAGNÉ, D., CHAUMEIL, P., RAMBOER, A., COLLADA, C., GUEVARA, A., CERVERA, M. T., VENDRAMIN, G. G., GARCIA, V., FRIGERIO, J. M., ECHT, C., RICHARDSON, T., & PLOMION, C.; 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA nSSRs in pines. *Theor Appl Genet.* 109(6). 1204-1214. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1683-z>
- GUEVARA, MA.; CHAGNE, D.; ALMEIDA, MH.; BYRNE, M.; COLLADA, C.; FAVRE, JM.; HARVENGT, L.; JEANDROZ, S.; ORAZIO, C.; PLOMION, C.; RAMBOER, A.; ROCHETA, M.; SEBASTIANI, F.; SOTO, A.; VENDRAMIN, GG; CERVERA, MT.; 2005. Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in *Pinus pinaster* Ait. *Mol. Ecol. Notes.* 5:57–59. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00830.x>
- ICNF. 2023. *Algés: Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas.*
- JONES, AG.; SMALL, CM.; PACZOLT, KA.; RATTERMAN, NL.; 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 6–30
- JARAMILLO-CORREA, JP.; RODRÍGUEZ-QUILÓN, I.; GRIVET, D.; LEPOITTEVIN, C.; SEBASTIANI, F.; HEUERTZ, M.; GARNIER-GÉRÉ, PH.; ALÍA, R.; PLOMION, C.; VENDRAMIN, GG.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, SC.; 2015. Molecular proxies for climate maladaptation in a long-lived tree (*Pinus pinaster* Aiton, Pinaceae). *Genetics*, 199(3). 793-807.
- KALINOWSKI, ST.; TAPER, ML.; MARSHALL, TC.; 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16 (5). 1099-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- LIJAVETZKY, D.; CABEZAS, J.; IBÁÑEZ, A.; ET AL.; 2007. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC Genomics* 8:. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-424>
- MARIETTE, S.; CHAGNÉ, D.; DECROOQ, S.; ET AL. 2001. Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait *Ann. For. Sci.*, 58(2). 203-206.
- MOLINA F.; 1965. Comportamiento racial de *Pinus pinaster* en el Noroeste de España. *Anales IFIE.* 2(10). 221-238.
- NEALE, D., KREMER, A.; 2011. Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nat. Rev. Genet.* 12, 111–122. <https://doi.org/10.1038/nrg2931>.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, PE.; 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 6:288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
- PINZAUTI, F., SEBASTIANI, F., BUDDE, KB., FADY, B., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C., & VENDRAMIN, GG.; 2012. Nuclear microsatellites for *Pinus pinea* (Pinaceae), a genetically depauperate tree, and their transferability to *P. halepensis*. *Am. J. Bot.* 99, 9. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200064>
- PRITCHARD, JK.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P.; 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data.
- RAFFIN, A.; VIDAL, M.; BOUFFIER, L.; 2016. L’apport des marqueurs moléculaires, *Cah. Reconst.* 5, 4.
- SEBASTIANI, F.; PINZAUTI, F.; KUJALA, ST.; ET AL.; 2012. Novel polymorphic



nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conserv. Genet. Resour.* 4:231–234. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9513-5>.

STEINITZ, O.; TROUPIN, D.; VENDRAMIN, GG.; NATHAN, R.; 2011. Genetic evidence for a Janzen-Connell recruitment pattern in reproductive offspring of *Pinus halepensis* trees. *Mol. Ecol.* 20. 4152-4164. [10.1111/j.1365-294X.2011.05203.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05203.x).

TELFER, EJ.; STOVOLD, GT.; LI, Y.; SILVA-JUNIOR, OB.; GRATTAPAGLIA, DG.; DUNGEY, HS.; 2015. Parentage Reconstruction in *Eucalyptus nitens* Using SNPs and Microsatellite Markers: A Comparative Analysis of Marker Data Power and Robustness. *PLoS ONE* 10(7): e0130601.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130601>.