2025 | 16·20
GIJÓN | JUNIO
9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

9CFE-1793

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

Organiza

Valoración del estado de conservación de poblaciones y rodales relictos de *Pinus nigra* y *Pinus sylvestris* mediante marcadores moleculares neutrales.

VALBUENA CARABAÑA, M. (1, 2), GIL L, EZQUERRA BOTICARIO FJ (3)
(1) Departamento de Sistemas y Recursos Naturales, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid
(2) Centro para la Conservación de la Biodiversidad y el Desarrollo Sostenible (CBDS), E.T.S.I. Montes, Forestal y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid.
(3) Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio, Junta de Castilla y León, Valladolid.

Resumen

Estudios paleobotánicos muestran cómo las oscilaciones climáticas del Cuaternario y la presión antrópica del Holoceno modelaron la distribución de los pinares ibéricos de montaña. En la Cordillera Cantábrica (CC) y el Sistema Central (SC), las migraciones altitudinales posibilitaron la permanencia de poblaciones continuas y estables hasta el Holoceno. En los últimos milenios, la deforestación antrópica parece la principal causa del retroceso y desaparición de hábitats forestales en los pisos subalpino y montano, dejando evidencias en la diversidad y la conectividad genéticas entre poblaciones hoy marginales o relictas. Los análisis con marcadores neutrales en 456 árboles en más de 15 poblaciones y rodales dispersos en el SC y la CC muestran diferentes grados de aislamiento genético, manteniendo niveles de diversidad muy altos. En el SC, *P. nigra* habría sufrido fragmentaciones poblacionales más recientes que *P. sylvestris*, reducciones acusadas de individuos e incremento de endogamia. En la CC, la mayor diferenciación genética de *P. sylvestris* indicaría procesos de fragmentación mayores y más antiguos que en el SC. Los resultados indican un alto valor de conservación de las poblaciones estudiadas en ambas especies y muestran la utilidad de las herramientas genéticas para el establecimiento de bases de gestión adecuadas en los ecosistemas forestales.

Palabras clave

diversidad genética, endogamia, fragmentación, pinares montanos, recursos genéticos forestales

Introducción

Pinus nigra y *Pinus sylvestris* son las dos especies de pinos montanos más extendidas en la península Ibérica. El pino laricio o salgareño (*Pinus nigra* Arnold) se extiende a lo largo de más de 3,5 millones de hectáreas, desde las montañas del noroeste de África hasta Asia Menor y el sur de Europa. En la península Ibérica, la subespecie *salzmannii* (Dunal) Franco, es un taxon longevo muy bien adaptado a terrenos rocosos, sustratos calcáreo-dolomíticos con clima continental de sequía estival acentuada y frío invernal intenso. Forma bosques fundamentalmente en el Pirineo oriental, Sistema Ibérico y montañas bético-orientales (REGATO *et al.* 1991).

Estudios antracológicos confirman la existencia de *P. nigra* en la región costera mediterránea occidental durante los periodos fríos del Tardiglaciar y del Würm, superando su límite septentrional actual en periodos favorables del interglaciar Riss-Würm (BLANCO CASTRO *et al.* 1997). En la mitad oriental de la península Ibérica debió de desempeñar un papel importante donde las condiciones de clima frío y xérico reinaron en las zonas costeras en los periodos glaciares. A lo largo del

Cuaternario, sus poblaciones se desplazarían cíclicamente de la costa a la media y alta montaña. En el oeste peninsular debió de ocupar extensiones mayores a las actuales (DESPRAT *et al.* 2015). Los datos paleobotánicos señalan su existencia pretérita en zonas de la cordillera Cantábrica (CC) y en amplias áreas de la meseta norte (MORLA *et al.* 2010), donde hoy las formaciones relictas del río Cega y de las Sierras de Guadarrama y Gredos en el Sistema Central (SC)constituyen su límite de distribución occidental.

La distribución actual del pino albar (*Pinus sylvestris* L.) en Europa es la más amplia del género. Es una especie microterma, que soporta bien las heladas, las bajas precipitaciones -aunque requiere cierta cantidad de agua- y los suelos pobres , pionera y colonizadora de áreas con baja presión herbívora (GIL *et al.* 1991; FARJON, 2018). En la península Ibérica, se localiza mayoritariamente en Pirineos, Sistema Ibérico, SC, CC, Maestrazgo, Sierra Nevada y Sierra de Baza.

Las variaciones climáticas durante las fases frías y cálidas del Cuaternario también jugaron un papel crucial en la expansión y contracción de esta especie. Durante los estadios glaciares, especialmente en la última glaciación (Würm), su distribución se vio severamente restringida a refugios glaciares en el sur de Europa (TÓTH *et al.* 2017). Estudios paleobotánicos atestiguan su presencia en zonas montañosas del norte peninsular ibérico y en áreas cercanas a las costas del norte donde hoy no se encuentra (EZQUERRA, 2015). Las poblaciones disjuntas portuguesas de la Serra do Gerês junto con las de la CC y los Montes de León, representan hoy el límite occidental de su área de distribución.

Las poblaciones naturales ibéricas de ambas especies son relictos terciarios que han sobrevivido a lo largo de varios ciclos glaciares del Cuaternario (AFZAL-RAFII & DODD 2007; NAYDENOV *et al.* 2016; BENNETT *et al.* 1991; SINCLAIR *et al.* 1999; SORANZO *et al.* 2000; ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* 2005).

La marcada orografía de la península ha condicionado procesos de fragmentación y fusión reiterados, permitiendo la posible existencia de variables genéticas adaptadas a condiciones microambientales específicas o raras. Cabe destacar el potencial valor de conservación de las poblaciones relictas de *P. nigra* del SC ligadas a suelos graníticos (GÉNOVA *et al.* 2009): un grupo particular de pinares caracterizados por un ecotipo particular de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii*, que presenta semejanzas morfológicas con la subespecie *laricio*, con la que comparte también un tipo de estación ecológica semejante (REGATO y DEL RÍO, 2009). En esta zona (parte occidental de la Sierra de Guadarrama y vertiente meridional de Gredos), tan sólo quedan pequeños bosquetes y árboles dispersos de pino salgareño, vestigio de lo que debió ser un piso supra- y oro-mediterráneo de pinares de *P. nigra* y *P. sylvestris* en el SC (GÉNOVA *et al.* 1988; REGATO *et al.* 1992; DESPRAT *et al.* 2015). También, las poblaciones marginales de *P. sylvestris* en el SC y la CC poseen un alto valor de conservación debido a diferenciaciones genéticas por aislamiento o deriva respecto de las masas continuas de la especie (ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* 2005). En la CC, donde *P. sylvestris* representa actualmente el límite altitudinal del bosque, algunos individuos de *Pinus x rhaetica* Brügger albergarían restos de un antiguo acervo genético de *Pinus uncinata* Ramond, hoy desaparecido (VENTURAS *et al.* 2013). En la CC, además de las poblaciones conocidas de *P. sylvestris* de Puebla de Lillo y Velilla del Río Carrión existen otras masas reducidas e individuos aislados de origen natural que hasta la fecha no han sido analizados genéticamente y que representan asimismo importantes valores de conservación (EZQUERRA y GARCÍA 2017).

Además de los cambios climáticos, la acción humana ha desempeñado un papel crucial en la desaparición de los pinares ibéricos en general (VALBUENA-CARABAÑA *et al.* 2010), y particularmente en la CC (EZQUERRA 2005; MORALES-MOLINO *et al.* 2022) y en SC (ROIRON *et al.* 2013; ROBLES-LÓPEZ *et al.* 2017). Desde el Neolítico, el manejo antrópico del fuego abrió los bosques generando áreas abiertas de pastizal y matorral para alimento del ganado y una agricultura de subsistencia (EZQUERRA 2005; 2015; LÓPEZ-SÁEZ *et al.* 2018). Esta deforestación afectó a *Pinus* spp. en mayor medida que a las restantes especies arbóreas debido a las dificultades para resistir perturbaciones frecuentes y recurrentes como el fuego dirigido y el pastoreo.

La conservación de los recursos naturales es de especial importancia debido al gran impacto que sufren los ecosistemas y a la creciente amenaza sobre su estabilidad y viabilidad a causa no sólo de cambios naturales, sino, principalmente, de las transformaciones antrópicas. La variación genética posibilita, al tiempo que refleja, la adaptación de las especies a un rango de condiciones ambientales a lo largo del tiempo y del espacio, y su mantenimiento es objeto importante de cualquier esfuerzo de conservación (BOSHIER 2000).

Objetivos

El objetivo de este trabajo es profundizar en el conocimiento de los recursos genéticos de poblaciones relictas del límite occidental de la distribución de *Pinus nigra* y *Pinus sylvestris* en la Meseta Norte Ibérica y montañas circundantes, algunas situadas en ecotonos singulares.

Se pretende caracterizar la diversidad genética neutral, tanto a nivel organular como nuclear, de poblaciones en el límite occidental actual de las distribuciones de ambas especies, compararla con otras conocidas y contribuir al establecimiento de sus valores de conservación.

Metodología

Poblaciones de estudio

Pinus nigra: Se analizaron 151 árboles adultos procedentes de 5 masas naturales en las estribaciones orientales del SC (San Leonardo de Yagüe, Soria (LEO); Cañón del río Cega, Segovia (CEG)) y en enclaves de la Sierra de Gredos (Ávila): uno formado por árboles dispersos en orientación Sur (desde el Tiétar hasta Las Navas del Marqués y Peguerinos (TIE)), y otros dos procedentes de los pinares de Navalacruz (NAC) y el Valle de Iruelas (IRU).

Pinus sylvestris:

En el SC: Se analizaron 150 árboles adultos en 5 poblaciones, una en las estribaciones orientales del Sistema Central en Soria (Pinar de Losana (LOS)), dos cercanas a la población de Cuéllar, Segovia (Común Grande de las Pegueras y Cañón del río Cega (PRA) y Los Valsaínes (VAL) y dos en la Sierra de Gredos en Ávila (Navarredonda (NAR) y Hoyocasero (HOY)).

En la CC: Se analizaron 150 árboles adultos en 5 enclaves, cuatro de ellos constituyen poblaciones más o menos continuas y reducidas en extensión y en número de individuos. Dos en Velilla del Río Carrión (Palencia), una masa natural (VRCN) y una repoblación (VRCR) efectuada con semilla de un vivero local. Las otras dos poblaciones en la Loma del Pinar de Lillo (Puebla de Lillo, León (LPL)) y en el Pinar de Collacerrosa (Redipollos, León (RDP)). Finalmente, un conjunto de individuos (OTROS) más o menos aislados y muy dispersos a lo largo de distintas

localidades leonesas y algunas asturianas, que no constituye una población en sí misma.

Marcadores moleculares de ADN

Se utilizaron marcadores neutrales de ADN de tipo microsatélite del núcleo (nSSR), de herencia biparental, y del cloroplasto (cpSSR), de herencia paterna mediante el polen. En concreto, 6 cpSSR (Pt71936, Pt26081, Pt30204, Pt87268, Pt36480, Pt15169 (VENDRAMIN *et al.* 1996)) y 6 nSSR (PtTx3107, PtTx4001 (AUCKLAND *et al.* 2002), SPAC11.8, SPAG7.14, SPAC12.5, SPAC 11.4 (SORANZO *et al.* 1998)). Este último no amplificó en *P. nigra*, por lo que los resultados de *P. sylvestris* se muestran también para los 5 nSSR comunes a *P. nigra*.

Se extrajo el ADN mediante kits comerciales (INVITEK) a partir de acículas deshidratas y se amplificó mediante PCR siguiendo las condiciones publicadas ligeramente modificadas. La detección y determinación de los tamaños alélicos se realizó mediante electroforesis y utilizando el software SAGA GT Genotyping por comparación con muestras de referencia.

Parámetros de diversidad genética y diferenciación poblacional

Con las variantes alélicas se calcularon parámetros de diversidad mediante el *software* SpaGeDi v.1.5 (HARDY & VEKEMANS 2002) por población, especie y región: número de alelos (NA), número efectivo (NA_e) y riqueza alélica (AR) (número esperado de alelos en un determinado número de copias génicas (K)). Para los nSSR se estimaron Heterocigosidad esperada (He); Heterocigosidad observada (Ho) y coeficiente de endogamia (F).

Además, las variantes alélicas de los cpSSR se combinaron para obtener los haplotipos de cada árbol. Mediante el *software* Haplotype Analysis v. 1.05 (ELIADES & ELIADES, 2009) se han calculado parámetros de diversidad haplotípica poblacional: número de haplotipos (A); privados (P); efectivos (N_e) y riqueza (Rh); heterozigosidad esperada (H_e) y distancia genética media entre individuos de la misma población D_sh^2.

Para conocer la estructuración de la diversidad del cloroplasto en sus distintos componentes, se estimó la diversidad haplotípica debida a la variación intrapoblacional (H_s), que junto con la diferenciación genética (D_{st}) constituyen la diversidad haplotípica total (H_t).

Con ambos tipos de marcadores, se calcularon los índices de fijación F_{st} y R_{st} y la varianza molecular (AMOVA), considerando, para *P. sylvestris*, el nivel de región.

Además, para los nSSR se efectuó un análisis ciego de identificación de grupos genéticos homogéneos sin información poblacional previa, mediante técnicas de inferencia Bayesiana basadas en la distribución diferencial de las frecuencias alélicas de genes no ligados dentro de grupos panmícticos implementadas en el *software* STRUCTURE (PRITCHARD *et al.* 2000; FALUSH *et al.* 2003). Esto permite estimar el número de grupos genéticos (k) más probable en una muestra, y asignar con cierta probabilidad los individuos a los distintos grupos, estimando la proporción del genoma (Q) que proviene de cada uno. Se asumieron frecuencias alélicas correlacionadas y contribuciones mixtas de los diversos grupos genéticos al genoma de cada individuo. Para cada valor de k (entre 1 y 9), se realizaron 3 repeticiones de 10^6 ciclos de *burn-in period* y 10^6 simulaciones de MCMC estimándose los valores medios.

Resultados

Diversidad Genética de cloroplasto

Los seis marcadores analizados proporcionaron entre 3 y 10 alelos, obteniéndose un total de 43. A nivel específico *P. sylvestris* es ligeramente más diverso que *P. nigra* en términos de NA, NA_e y AR (Tabla 1). Sin embargo, considerando las poblaciones del SC, *P. nigra* alcanza niveles de diversidad ligeramente superiores a *P. sylvestris*. Para *P. nigra*, la población más diversa es TIE. Para *P. sylvestris*, la CC, y en especial el grupo OTROS, presentan niveles de diversidad mayores que el SC, donde destaca HOY.

Tabla 1. ***Diversidad alélica de cloroplasto.***

Población	N	NA	NA_e	AR	K
CEG	30	3,50	2,79	3,50	30
LEO	30	3,33	2,71	3,33	30
TIE	31	4,50	2,96	4,38	30
NAC	30	4,00	2,45	4,00	30
IRU	30	4,17	2,63	4,17	30
P. nigra	**151**	**5,50**	**2,91**	**5,50**	**150**
PRA	30	3,50	2,57	3,49	29
VAL	30	3,83	2,63	3,81	29
LOS	30	3,83	2,54	3,82	29
NAR	30	3,50	2,74	3,49	29
HOY	30	4,00	2,82	3,98	29
P. sylvestris SC	***150***	***4,67***	***2,72***	***4,67***	***150***
VRCN	30	2,67	1,91	2,66	29
LPL	31	4,33	3,35	4,30	29
RDP	30	4,33	3,23	4,32	29
OTROS	29	4,67	3,67	4,67	29
VRCR	30	3,67	2,22	3,64	29
***P. sylvestris* CC**	**150**	**5,50**	**3,10**	**5,50**	**150**
P. sylvestris	**300**	**6,00**	**3,02**	**5,69**	**300**

Tabla 1. Valores multilocus para 6 cpSSRs. Tamaño muestral (N); número de alelos (NA); número de alelos efectivo (NAe) en relación al tamaño muestral; riqueza alélica (AR), número esperado de alelos en K copias génicas. Los análisis poblacionales se han realizado para cada especie por separado (K=30 en el caso de *P. nigra* y k=29 en el caso de *P. sylvestris*)..

En término de haplotipos, la diversidad es muy elevada (A=117 en *P. nigra* y A=210 en *P. sylvestris*). La mayoría de ellos aparecen representados una vez (93/117=79% en *P. nigra*; 157/210=75% en *P. sylvestris*), o como mucho en dos árboles (17 haplotipos en *P. nigra* y 37 en *P. sylvestris*), nunca de distinta especie. Ambas especies muestran niveles de diversidad similares, excepto en la distancia genética media entre individuos de la misma población (D_sh^2), que es muy superior en algunas poblaciones de *P. sylvestris* (Tabla 2).

Tabla 2. ***Diversidad haplotípica de cloroplasto***

Población	N	N_e	Rh	H_e	D_sh^2
CEG	30	16,071	21,367	0,970	4,248
LEO	30	25,000	25,200	0,993	3,629
TIE	31	30,857	26,067	0,995	6,304
NAC	30	21,429	23,300	0,986	4,266
IRU	30	26,471	26,133	0,995	4,287
P. nigra	**30,2**	**23,966**	**25,186**	**0,988**	**4,547**
PAR	30	25,000	25,200	0,993	3,318
VAL	30	22,500	23,333	0,989	5,602
LOS	30	30,000	28,000	1,000	4,546
NAR	30	23,684	24,267	0,991	4,236
HOY	30	25,000	25,200	0,993	22,310
P. sylvestris SC	**150**	**87,891**	**107**	**0,995**	**8,209**
VRCN	30	9,574	12,767	0,926	2,105
LPL	31	29,121	27,127	0,998	8,649
RDP	30	26,471	26,133	0,995	8,124
OTROS	29	29,000	28,000	1,000	9,534
VRCR	30	17,308	20,433	0,975	3,756
P. sylvestris CC	**150**	**77,586**	**114**	**0,994**	**8,428**
P. sylvestris	**30**	**23,766**	**24,046**	**0,986**	**7,218**

Tabla 2. Diversidad haplotípica mediante 6 cpSSRs. (N) tamaño muestral; (Ne) número efectivo de haplotipos; (Rh) riqueza haplotípica; (He) diversidad genética intrapoblacional; (D_sh^2) distancia genética intrapoblacional.

En el análisis por poblaciones, para *P. nigra*, la mayor diversidad de haplotiposse encuentra en TIE (30 haplotipos en 31 muestras, 29 privados), especialmente en términos de D_sh^2 (Tabla 2). En *P. sylvestris*, la población más diversa del SC es LOS, que presenta 30 haplotipos diferentes, aunque solo algo más de la mitad son privados. Destacan las mayores distancias genéticas de HOY (D_sh^2=22,310). En la CC, los individuos localizados en los enclaves más occidentales y aislados (OTROS) son los más diversos. La población natural de Velilla del río Carrión (VRCN) destaca por presentar un número reducido de haplotipos (14 en 30 muestras, sólo 5 privados) con escasas diferencias entre individuos (D_sh^2=2,105).

Los parámetros de diversidad genética poblacional basados en las frecuencias haplotípicas se muestran en la Tabla 3. En términos generales, *P. nigra* presenta niveles significativamente superiores, debido tanto a la variación dentro de cada población (H_s), como a la diferencia en las frecuencias haplotípicas de cada población comparada con el resto (D_{st}), lo que condiciona las fuertes diferencias encontradas en la diversidad total (H_t).

Considerando las frecuencias haplotípicas, *P. nigra* presenta mayor diversidad tanto dentro (H_s) como entre poblaciones (D_{st}), lo que condiciona las marcadas diferencias en la diversidad total (H_t) entre especies (Tabla 3), escasas entre poblacionales. Para *P. nigra,* TIE es la más diversa, fundamentalmente por los mayores valores de H_s y CEG muestra los mayores niveles de diferenciación haplotípica (D_{st}). En *P. sylvestris*, destacan VRCN y VRCR, con niveles de H_s menores que el resto y valores de D_{st} mayores.

Tabla 3. ***Partición de la diversidad haplotípica a nivel poblacional***

Población	H_s	D_{st}	H_t
CEG	0,1876	0,0070	0,1945
LEO	0,1920	0,0057	0,1977
TIE	0,1935	0,0059	0,1994
NAC	0,1907	0,0066	0,1973
IRU	0,1924	0,0063	0,1988
P. nigra **(SE)**	**0,1912 (0,0023)**	**0,0063 (0,0005)**	**0,1975 (0,0019)**
PAR	0,0960	0,0037	0,0997
VAL	0,0956	0,0037	0,0993
LOS	0,0967	0,0033	0,1000
NAR	0,0958	0,0037	0,0995
HOY	0,0960	0,0036	0,0996
VRCN	0,0896	0,0058	0,0953
LPL	0,0966	0,0035	0,1000
RDP	0,0962	0,0038	0,1000
OTROS	0,0966	0,0037	0,1002
VRCR	0,0942	0,0045	0,0987
P. sylvestris **(SE)**	**0,0953 (0,0021)**	**0,0039 (0,0007)**	**0,0992 (0,0014)**

Tabla 3. Partición de la diversidad haplotípica poblacional. Se muestran los valores medios por población y especie y la desviación estándar (SE). (H_s) diversidad haplotípica debida a la variación intrapoblacional; (D_{st}) diversidad debida a la diferenciación genética de cada población con el resto; (H_t) diversidad haplotípica global para cada población.

Diferenciación genética del cloroplasto

P. nigra muestra valores medios de diferenciación poblacional superiores a *P. sylvestris* (Fst=0,1058 vs Fst=0,0680)(Tabla 4), (como ocurría en términos de D_{st} (Tabla 3)). Para *P. sylvestris,* las poblaciones de la CC se diferencian más que las del SC, y la diferenciación media entre ambas regiones es menor (F_{st}=0,0588) que la media para la especie.

Tabla 4. ***Diferenciación poblacional del cloroplasto***

R_{st} / F_{st}	CEG	LEO	TIE	NAC	IRU
CEG		-0,0059	0,1379	-0,0035	0,1432
LEO	-0,0179		0,1916	0,0526	**0,1588**
TIE	**0,1387**	**0,1314**		0,0737	**0,2266**
NAC	**0,0829**	**0,0804**	**0,1131**		0,1270
IRU	**0,0875**	**0,0755**	**0,1401**	**0,1573**	

9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL
2025 | 16-20 GIJÓN | JUNIO

R_{st} / F_{st}	PRA	VAL	LOS	NAR	VRCN	LPL	RDP	OTROS	VRCR
PRA		0,0670	0,0752	**0,0738**	-0,0012	0,2492	**0,467**	0,1483	0,3376
VAL	0,0196		0,0653	0,1586	0,0211	0,2172	0,3934	0,2236	0,2741
LOS	**0,0520**	0,0312		0,0161	-0,0064 / 0,1014	0,0911	0,3034	0,0756	0,2106
NAR	0,0065	0,0218	0,0049		0,1611	0,1354	0,3620	0,0347	0,3034
HOY	0,0092	0,0207	**0,0428**	0,0097	0,0167	0,0348	0,1262	0,0184	-0,0168
VRCN	**0,0618**	**0,0945**	**0,0986**	**0,0888**		**0,2725**	**0,4842**	0,2121	0,3751
LPL	**0,1147**	**0,1243**	**0,1070**	**0,0907**	**0,1162**		0,0574	0,0601	**0,2438**
RDP	**0,1293**	**0,1358**	**0,1032**	**0,0972**	**0,1408**	0,0162		**0,2251**	**0,4451**
OTROS	**0,0459**	**0,0898**	**0,0635**	0,0299	**0,1136**	**0,0350**	**0,0497**		0,1910
VRCR	**0,2294**	**0,2405**	**0,2045**	**0,1943**	**0,2368**	**0,1577**	**0,1763**	**0,1113**	

Tabla 4. Valores de diferenciación entre pares de poblaciones (R_{st} por encima y F_{st} por debajo de la diagonal) mediante marcadores de cloroplasto para *Pinus nigra* (arriba) y *Pinus sylvestris* (abajo). (en negrita, valores significativos basados en 100.000 permutaciones (p<0,05)).

En algunos casos, los valores R_{st} son significativamente superiores a los F_{st} (en el SC, IRU-LEO e IRU-TIE para *P. nigra* y PRA-NAR para *P. sylvestris*; en la CC, para muchas comparaciones) (Tabla 4), por lo que el modelo mutacional paso a paso influye en la diferenciación del cloroplasto, mayoritariamente en *P. sylvestris*. Sin embargo, no se observa esta influencia en la estructuración filogeográfica del cloroplasto en ambas regiones (SC-CC: F_{st}=0,0588; R_{st}=0,0465).

Para *P. sylvestris*, los AMOVAs muestran el mismo patrón contrastado entre regiones: en la CC la variación entre poblaciones alcanza el 26% (p= 0.001) y entre individuos de cada población supone el 74% (p=0.001). En el SC la variación interpoblacional es tan solo del 2% (p=0.001) mientras que la intrapoblacional supone el 98% (p=0.001). A nivel global, el mayor porcentaje de variación se encuentra entre individuos de la misma población (86%; *p=0.001*), seguido por la variación entre poblaciones (11%; *p=0.001*), siendo el porcentaje de variación entre regiones únicamente del 3% (*p=0.001*).

Diversidad genética nuclear

Los patrones específicos de diversidad alélica nuclear son también muy elevados y similares, sólo ligeramente superiores en *P. sylvestris* (Tabla 5). Las mayores diferencias residen en los índices de endogamia, muy superiores en *P. nigra*. Para esta especie, IRU es la población más diversa. Para *P. sylvestris*, las poblaciones del SC son de media ligeramente más diversas en términos de riqueza alélica (NA y AR), número efectivo de alelos (NAe) y heterocigosidad observada (Ho), aunque varían en mayor grado. La población de LOS es la más diversa, aunque NAR es la única que no presenta niveles significativos de endogamia. En la CC la diversidad es, en general, menor, excepto en términos de He. Sólo VRCR no presenta niveles de endogamia significativos.

Tabla 5. ***Diversidad genética nuclear***

Población	N	NA	NA_e	AR	k	He	Ho	F
CEG	30	11,60	8,53	11,07	44	0,7783	0,454	0,422
LEO	30	12,60	9,93	11,90	44	0,7932	0,432	0,460
TIE	36	14,60	9,14	12,72	44	0,7994	0,412	0,488
NAC	30	12,40	7,70	11,62	44	0,7686	0,453	0,416
IRU	30	15,00	17,54	13,89	44	0,8192	0,478	0,421
P. nigra	**156**	**28,00**	**13,60**	**27,08**	**238**	**0,8101**	**0,445**	**0,451**
PRA	30	14,00	8,55	12,90	48	0,8403	0,721	0,144
VAL	30	12,50	6,58	11,61	48	0,7586	0,704	0,073
LOS	30	18,17	13,81	16,73	48	0,8858	0,799	0,099
NAR	30	17,33	14,67	15,95	48	0,8589	0,847	0,015 ^{ns}
HOY	30	18,33	13,88	17,10	48	0,8557	0,779	0,091
P. sylvestris SC	***150***	***32,83***	***13,68***	***32,11***	***266***	***0,8685***	***0,773***	***0,111***

VRCN	30	12,83	9,06	12,29	48	0,8602	0,700	0,189
LPL	31	15,50	10,93	14,18	48	0,8830	0,737	0,168
RDP	30	12,67	7,79	11,87	48	0,8376	0,706	0,159
OTROS	29	15,33	10,81	14,48	48	0,8843	0,735	0,172
VRCR	30	14,00	9,49	13,08	48	0,8705	0,830	0,047 ^{ns}
***P. sylvestris* CC**	***150***	***25,00***	***11,78***	***24,27***	***266***	***0,8940***	***0,741***	***0,172***
P. sylvestris	**300**	**37,17**	**13,54**	**30,26**	**266**	**0,8946**	**0,756**	**0,155**
***P. sylvestris* (5nSSR)**	**300**	**38,00**	**13,94**	**29,70**	**238**	**0,8909**	**0,741**	**0,168**

Tabla 5. Valores multilocus para 5 y 6 nSSRs a nivel poblacional, por especie y región. N (tamaño muestral), NA (número de alelos en la muestra); NAe (número efectivo de alelos); AR (riqueza alélica, número esperado de alelos en K copias génicas); He (diversidad genética); Ho (heterocigosidad observada); F (coeficiente de endogamia); ns (valores no significativos (p>0,05)).

Diferenciación genética nuclear

En general, la diferenciación entre poblaciones es muy reducida, alrededor de un 2% (F_{st}=0,0191) en *P. nigra* y en torno a un 5% (F_{st}=0,0498) en *P. sylvestris* ($F_{st\ SC}$=0,040; $F_{st\ CC}$=0,035), ambas especies siguen un patrón opuesto al del cloroplasto. En *P. nigra*, IRU es la única que muestra diferenciación significativa excepto con CEG (Tabla 6), población con la que presentaba los mayores valores de diferenciación del cloroplasto (Tabla 4).

Tabla 6. ***Diferenciación poblacional nuclear***

R_{st} / F_{st}	CEG	LEO	TIE	NAC	IRU
CEG		0,0686	0,0568	0,1530	-0,0149
LEO	**0,0147**		-0,0199	-0,0096	-0,0147
TIE	**0,0333**	**0,0223**		0,0123	-0,0089
NAC	**0,0489**	**0,0147**	**0,0179**		0,0162
IRU	**0,0216**	0,0103	-0,0013	0,0111	

9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL
2025 | 16-20 GIJÓN | JUNIO

R_{st} / F_{st}	PRA	VAL	LOS	NAR	HOY	VRCN	LPL	RDP	OTROS	VRCR
PRA		0,0162	-0,0073	0,0079	0,0185	0,0840	0,0472	0,0558	0,0506	0,0936
VAL	**0,0186**		0,0347	0,0368	0,0051	0,1719	**0,1279**	0,1118	**0,1097**	0,1619
LOS	**0,0107**	**0,0429**		-0,0022	0,0082	0,0669	0,0202	0,0173	0,0139	0,0565
NAR	**0,0453**	**0,0868**	**0,0153**		-0,0058	0,0706	0,0277	0,0092	0,0179	0,0470
HOY	**0,0556**	**0,0939**	**0,0252**	0,0070		0,1024	0,0562	0,0271	0,0245	0,0577
VRCN	**0,0452**	**0,0959**	**0,0361**	**0,0533**	**0,0689**		0,0062	0,0559	0,0445	0,0207
LPL	**0,0313**	**0,0632**	**0,0222**	**0,0506**	**0,0603**	**0,0255**		0,0046	0,0009	0,0140
RDP	**0,0900**	**0,1367**	**0,0757**	**0,0947**	**0,0974**	**0,0815**	**0,0332**		-0,0047	0,0210
OTROS	**0,0305**	**0,0635**	**0,0159**	**0,0386**	**0,0464**	**0,0255**	0,0053	**0,0520**		0,0003
VRCR	**0,0409**	**0,0811**	**0,0291**	**0,0514**	**0,0575**	**0,0228**	**0,0237**	**0,0652**	**0,0125**	

Tabla 6. Valores de diferenciación entre pares de poblaciones (R_{st} por encima y F_{st} por debajo de la diagonal) mediante marcadores nucleares para *Pinus nigra* (arriba) y *Pinus sylvestris* (abajo). En negrita valores significativos basados en 100.000 permutaciones ($p<0,05$).

Al igual que para el cloroplasto, para *P. sylvestris* la diferenciación entre regiones es inferior (F_{st}=0,0299) a la media poblacional para la especie (F_{st}=0,0498) y semejante al R_{st} medio. En la CC, las poblaciones de Velilla del Río Carrión de origen natural (VRCN) y de repoblación (VRCR) muestran la menor diferenciación (F_{st}: 0,0228), y RDP los mayores valores con el resto de poblaciones (F_{st} =0,081; $F_{st\ CC}$=0,034). Los grupos LPL, OTROS, NAR y HOY en Gredos no se diferencian significativamente.

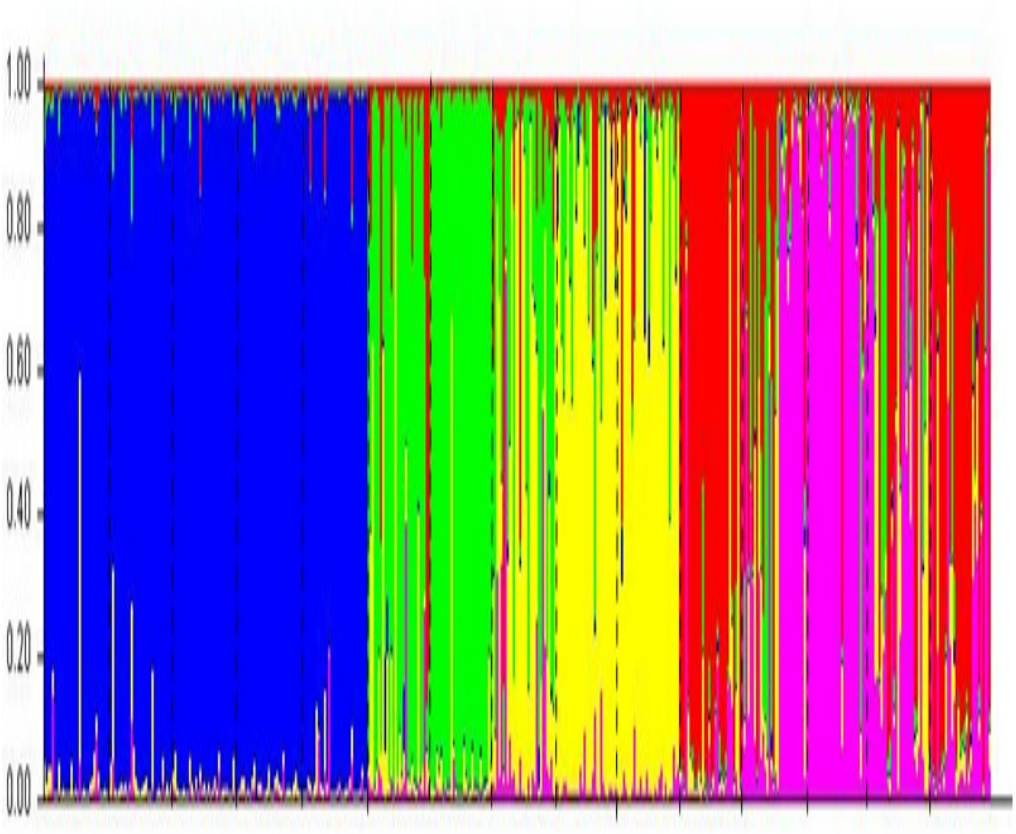
Identificación de grupos genéticos homogéneos a nivel nuclear

Los análisis muestran que, a medida que aumenta k (de 1 hasta 9), la probabilidad posterior de que el número de grupos genéticos homogéneos sea k también aumenta. Más allá de k=9, las probabilidades se incrementan sólo ligeramente. Sin embargo, la asignación de individuos a cada grupo genético deja de tener coherencia poblacional o geográfica para k>5.

Para todos los valores de k, ambas especies quedan claramente diferenciadas en dos acervos genéticos distintos. A medida que aumenta k, las muestras de *P. sylvestris* se agrupan con bastante coherencia geográfica, si bien algunos individuos no son consistentes con sus poblaciones. El grupo de árboles de *P. nigra* se mantiene homogéneo como especie, formando un único acervo genético.

Para k=3, *P. sylvestris* se divide en dos grupos , mayoritariamente el SC se divide en dos grupos: las poblaciones de PRA y VAL junto con algunos pinos de LOS; el resto junto a NAR y HOY en Gredos forman otro grupo. Para k=5, la CC se subdivide en un grupo que comprende fundamentalmente los individuos de RDP y algunos de LPL, y otro grupo homogéneo formado por los pinos de Velilla del río Carrión naturales (VRCN) y de repoblación (VRCR). El resto de pinos de LPL y los denominados OTROS se adscriben a los distintos grupos genéticos de la especie (Figura 1).

Figura 1. Diagrama de barras que muestra la proporción del genoma individual (Q) de los N=451 individuos para k=5. . Las líneas verticales discontinuas delimitan las poblaciones de este estudio : *Pinus nigra* (CEG, LEO, TIE, NAC, IRU en color azul) y *Pinus sylvestris* (PRA y VAL en color verde; LOS en colores verde, amarillo y rosa; NAR y HOY en amarillo; VRCN en rojo; LPL en rojo, verde y rosa; RDP en rosa; OTROS en rosa, amarillo, verde y rojo; VRCR en rojo).



Teniendo en cuenta la homogeneidad constante de *P. nigra,* los análisis conjuntos separan coherentemente las dos especies sin mostrar diferenciación poblacional en *P. nigra*.

Aunque, metodológicamente, estos análisis de estructuración son distintos a los estadísticos F_{st}, ambos resultados son coherentes: las poblaciones de *P. nigra* presentan niveles de diferenciación menores que las de *P. sylvestris*.

Para *P. sylvestris,* los cuatro grupos genéticos que corresponden principalmente a las zonas orientales y occidentales de las dos regiones de estudio presentan un porcentaje de individuos asignados similar entre sí, acorde con la homogeneidad del muestreo, y con gran coherencia espacial (la mayoría se asigna principalmente a un único grupo genético). El 74% de los presentan valores de Q>0,7 (más del 70% de su composición genética corresponde con el grupo al que se le asigna). Del 26% restante, sólo una tercera parte (9% del total) presenta valores de Q<0,5. Estas asignaciones tienen coherencia poblacional. En muchos casos, más del 90% de los árboles de una población se asigna a un mismo grupo genético. En otros (PRA y VRC) este porcentaje se encuentra alrededor del 70%. La población de LOS es la que mayor porcentaje de árboles asignados a otros grupos presenta dentro del SC, si bien el 50% de ellos se asigna al grupo de Gredos. Los árboles analizados como OTROS constituyen el grupo con mayor mezcla genética, adscribiéndose fundamentalmente a los grupos occidentales, tanto de la CC como del SC, destaca la singularidad genética

Discusión

Las poblaciones relictas y marginales, generalmente reducidas y aisladas de otras masas de la especie, suelen localizarse en los márgenes de la distribución geográfica, o en los umbrales de las condiciones ambientales de la especie (HAMPE & JUMP, 2011). Si bien se espera que su variación genética sea baja, debido al limitado flujo genético y a la elevada presión selectiva, su distribución marginal fomenta la existencia de estructuras genéticas particulares con interés de conservación para el conjunto de la especie, especialmente en los límites meridionales (PETIT et al. 2005). En este sentido, los análisis genéticos pueden proporcionar información valiosa para el establecimiento de actuaciones específicas al identificar poblaciones por su singularidad y riqueza.

En este trabajo, la diversidad de cloroplasto es muy elevada y similar entre ambas especies, aunque ligeramente superior en *P. sylvestris*, sobre todo en la CC cuyas poblaciones muestran elevadas distancias genéticas intrapoblacionales ($D_s h^2$). Sin embargo, considerando la variación en las frecuencias haplotípicas, *P. nigra* presenta mayor diversidad, tanto dentro (H_s) como entre poblaciones (D_{st}), donde destaca TIE.

Estos resultados podrían indicar que las poblaciones de *P. sylvestris* habrían sido más numerosas en comparación, sufriendo mayores reducciones poblacionales que habrían conducido a disminuir la heterocigosidad intrapoblacional manteniendo elevadas distancias genéticas entre individuos, como se evidencia entre el conjunto OTROS.

En general, los altos niveles de diversidad haplotípica encontrados son propios de otras poblaciones ibéricas de pinos montanos localizadas en regiones más continuas y estudiadas con el mismo tipo de marcadores cpSSR. El único trabajo que compara ambas especies también muestra valores de diversidad muy similares, aunque ligeramente superiores en *P. nigra*, ambas más diversas que las especies mediterráneas (SOTO *et al.* 2010). .

Los niveles de diversidad son también muy elevados y similares para ambas especies, ligeramente superiores en *P. sylvestris,* o con alguna población destacable como HOY. Sin embargo, los índices de endogamia son también elevados y significativos, muy superiores en *P. nigra*.

En general, niveles de diversidad genética elevados son propios de especies anemófilas y longevas, pero resulta destacable que, aun tratándose de poblaciones relictas y marginales, la diversidad neutral es tan elevada o más que la de otras poblaciones ibéricas localizadas en zonas más continuas de sus distribuciones actuales y analizadas con los mismos marcadores, si bien, los datos nucleares no son tan abundantes (ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.* 2005; SOTO *et al.* 2010; PAVIA *et al.* 2014).

Además, en comparación con poblaciones europeas fragmentadas y relictas, *P. sylvestris* muestra mucha mayor diversidad en este estudio, tanto a nivel nuclear (He_{CC}=0,894; He_{SC}=0,869) como de cloroplasto (He_{CC}=0,994; He_{SC}=0,995) que en el límite occidental de la distribución portuguesa, en la Serra do Gerês (He_{nSSR}=0,76; He_{cpSSR}=0,75; PAVIA *et al.* (2014)), o en el límite meridional italiano, en los Apeninos septentrionales (He_{nSSR}=0,81; He_{cpSSR}=0,92; SCALFI *et al.* 2009), o en el sur y este de los Cárpatos (He_{nSSR}=0,627; ȘOFLETEA *et al.* 2020), o también en comparación con poblaciones no relictas situadas en Turquía (He_{nSSR}=0,77; He_{cpSSR}=0,98; BILGEN *et al.* 2017) y en Rusia (He_{nSSR}=0,53; SHELLER *et al.* 2023), o a lo largo de la

distribución completa en 60 poblaciones (He_{nSSR}=0,532) (ŻUKOWSKA et al. 2023); 26 de las cuales presentan valores de endogamia significativos, aunque muy inferiores (F=0,021) a los aquí detectados (F=0,137).

Tales resultados indican que las poblaciones estudiadas han mantenido efectivos poblacionales muy elevados a lo largo del tiempo, por lo que probablemente en el pasado constituyeron poblaciones más numerosas y continuas. Los niveles de diversidad encontrados en ambos pinos montanos refuerzan el carácter de relictos terciarios que tendrían estos enclaves, lo que incrementa su alto valor de conservación.

Sin embargo, la endogamia constituye una amenaza deconsecuencias negativas para la variabilidad genética futura, sobre todo en *P. nigra*, que podría disminuir su adaptabilidad a cambios ambientales o aumentar su vulnerabilidad frente a enfermedades. En el caso de los pinares cantábricos, la única población que no presenta niveles de endogamia significativos es el pinar de repoblación de Velilla del Río Carrión (VRCR) y en contraste con la masa natural, lo que indica que la recolección de semillas con la que se efectuó procedía de un número suficientemente elevado de individuos reproductores.

Diferenciación poblacional

Niveles de diferenciación genética reducidos entre poblaciones son propios de especies en las que el flujo genético a larga distancia se da de forma efectiva, lo que contrarresta los efectos de la fragmentación y el aislamiento físico de las poblaciones.

En este trabajo, a nivel de cloroplasto, *P. nigra* muestra mayor diferenciación poblacional que *P. sylvestris* (F_{st} 11% vs 7%; D_{st} 0,0063 vs 0,0039). Ambas regiones se diferencian menos que las medias poblacionales. Estos valores, nada desdeñables para especies anemófilas, indican un aislamiento genético por polen considerable, probablemente ligado al aislamiento geográfico de los árboles de estudio. En el SC, los valores superiores de *P. nigra* indican procesos de aislamiento poblacional más intensos donde el flujo polínico habría sido menor, bien por el mayor aislamiento geográfico, bien por una demografía más reducida que contribuyera a una menor densidad de las nubes de polen. Estos niveles son ligeramente inferiores a los caracterizados por SOTO *et al.* (2010) en rangos de distribución y distancias de separación más amplios, donde *P. nigra* también muestra mayor diferenciación en comparación con *P. sylvestris*. En el caso de *P. nigra*, estos autores muestran una estructura filogeográfica significativa (valores de R_{st} significativamente superiores a los valores de F_{st}), algo que no ocurre sistemáticamente en este estudio.

Por el contrario, a nivel nuclear, *P. sylvestris* presenta mayores diferenciaciones genéticas (en torno a un 5%) que *P. nigra* (alrededor de un 2%). Este patrón diferencial tiene su máximo exponente en IRU. Como ocurría con los genes de cloroplasto, para *P. sylvestris*, la diferenciación entre regiones es inferior a la diferenciación media poblacional, lo que indicaría cierta conectividad genética Norte-Sur en la Meseta. Las poblaciones *de P. nigra* comparten un mismo acervo genético, debido al origen común o a la conectividad genética mediada por semilla, lo que podría indicar una fragmentación demográfica más reciente que para *P. sylvestris*.

De forma general, *P. sylvestris* podría haber mantenido un flujo polínico más amplio, con poblaciones más continuas y extensas que *P. nigra*, pero un flujo de

semilla menor; quizá sus poblaciones habrían sido históricamente más densas que las de *P. nigra*. Por su parte, *P. nigra* habría mantenido un flujo polínico más restringido que *P. sylvestris* en el SC. Un mayor aislamiento poblacional en esta región, quizá debido a condicionantes orográficos podría haber causado diferencias en la fenología de la floración restringiendo el flujo polínico. Sin embargo, la escasa diferenciación del genoma nuclear apuntaría a un flujo de semilla más continuo, que podría indicar la existencia de masas más extensas y abiertas que han sufrido pérdidas de conectividad recientemente y de efectivos poblacionales, incrementando su endogamia.

Conclusiones

Los elevados niveles de diversidad genética encontrados en estas poblaciones marginales muestran su condición natural e indican una permanencia estable, con poblaciones más numerosas y continuas en el pasado para ambas especies, lo que es coherente con la información aportada por los registros paleobotánico y fitogeográfico, sobre todo en el caso de *P. nigra*, y de *P. sylvestris* en la CC, las cuales habrían sufrido pérdidas de efectivos poblacionales de forma reciente. Los resultados evidencian el alto valor de conservación de estos enclaves, tanto por el valor diferencial que puedan comportar sus adaptaciones específicas en el contexto del cambio climático, como por su papel clave en las dinámicas forestales en procesos de restauración de la naturaleza.

Los elevados niveles de diversidad, tanto organular como nuclear, comunes en especies anemófilas y longevas, son superiores a los de otras poblaciones relictas de ambas especies, lo que manifiesta su alto valor de conservación, especialmente de las poblaciones de TIE, HOY, RDP y OTROS.

En la mayoría de las poblaciones se han detectado niveles de endogamia elevados cuyas potenciales consecuencias negativas para su adaptabilidad futura deberían evitarse, promoviendo la reproducción cruzada y efectiva entre el mayor número posible de individuos, especialmente en las poblaciones de *P. nigra* y en las masas naturales de *P. sylvestris* en la CC.

Los patrones de diferenciación poblacional son opuestos para ambas especies, mayores para *P. nigra* a nivel organular y para *P. sylvestris* a nivel nuclear. Estos resultados indicarían un flujo genético por polen más restringido entre las poblaciones de *P. nigra*, compatible con una distribución más fragmentada, escasa o aislada. Por el contrario, el flujo genético mediado por semilla sería mayor en *P. nigra* homogeneizando la estructura genética nuclear de sus poblaciones, las cuales podrían tener un origen común más reciente que en el caso de *P. sylvestris*.

Los resultados obtenidos permiten avanzar recomendaciones de gestión que garanticen una conservación más efectiva de estas formaciones y su patrimonio genético. Para ello, conviene articular regímenes de protección efectivos que establezcan o mantengan la tutela sobre su gestión por parte de las administraciones competentes en patrimonio natural o en gestión forestal. Además, al menos en los casos de menor representación poblacional y mayor singularidad genética, convendría desarrollar programas de conservación ex-situ y actuaciones de extensión, replicación y refuerzo poblacional con contingentes genéticos locales.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido promovido por la Junta de Castilla y León a través de la Fundación Patrimonio Natural, entidad financiadora del proyecto de colaboración

(nº 6201126) establecido con la Fundación Conde del Valle de Salazar de la ETSI de Montes, Forestal y Medio Natural de la UPM. El estudio ha sido posible gracias al apoyo técnico de Elena Zafra en el laboratorio de la U.D. de Anatomía, Fisiología y Genética, y al de numerosos técnicos y agentes medioambientales de los Servicios Territoriales de Medio Ambiente de Ávila, Segovia, León, Palencia y Soria que organizaron la recogida y el envío de muestras a la UPM. Queremos agradecer singularmente por su especial interés a Teresa Borregón (D.E.P.), Florencio Martín, Nicolás González, José Antonio Lucas, Mariano Torre, Víctor González, Manuel Ordóñez, Miguel Ángel Acevedo, José Carlos García y Luis Carlón.

Bibliografía

AFZAL-RAFII Z, DODD RS. 2007. Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. *Mol. Ecol.* 16, 723-736.

AUCKLAND L, BUI T, ZHOU Y, SHEPHERD M, WILLIAMS CG. 2002. Conifer Microsatellite Handbook. Texas A&M University, College Station.

BENNETT KD, TZEDAKIS PC, WILLIS KJ. 1991. Quaternary refugia of north European trees. *J. Biogeogr.* 18, 103-115.

BILGEN B, & KAYA N. 2017. Genetic diversity among *Pinus Sylvestris* L. Populations and its implications for genetic conservation: comparison of nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Fresenius environmental bulletin*, *26*, 6873-6881.

BLANCO CASTRO E, CASADO GONZÁLEZ MA, COSTA TENORIO M, ESCRIBANO BOMBÍN R, GARCÍA ANTÓN M, GÉNOVA FUSTER M, GÓMEZ MANZANEQUE, F., MORENO SÁIZ JC, MORLA JUARISTI C, REGATO PAJARES P, SÁINZ OLLERO H. 1997. Los bosques ibéricos. Planeta, Barcelona.

BOSHIER DH. 2000. Mating systems (pp 63-79) En: Forest conservation genetics: principles and practice. (Young A, Boshier DH, Boyle TJ eds.) CSIRO, Melbourne, Australia; CABI, Wallingford, UK. 350 pp.

DESPRAT S, DÍAZ-FERNÁNDEZ PM, COULON T, EZZAT L, PESSAROSSI-LANGLOIS J, GIL L, MORALES-MOLINO C, SÁNCHEZ-GOÑI MF. 2015. *Pinus nigra* (European black pine) as the dominant species of the last glacial pinewoods in south-western to central Iberia: a morphological study of modern and fossil pollen. *J. Biogeogr.* 42, 1998-2009.

ELIADES N-G, ELIADES DG. 2009. HAPLOTYPE ANALYSIS: Software for analysis of haplotype data. Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-August University Goettingen, Germany.

EZQUERRA FJ. 2005. Influencias antrópicas en la evolución de la vegetación en la Montana Cantábrica: del Postglaciar al Neolítico. Actas del 4º Congreso Forestal Español.

EZQUERRA FJ. 2015. Los pinares en la evolución de los paisajes forestales de las montañas leonesas a lo largo del Holoceno. Tesis Doctoral. Universidad de León.

EZQUERRA BOTICARIO FJ. GARCÍA LÓPEZ JC. 2017. Más allá de Lillo: evolución histórica y caracterización de las poblaciones nativas de *Pinus sylvestris* L. en el Alto Porma (León). Actas del 7º Congreso Forestal Español.

FALUSH D, STEPHENS M, PRITCHARD JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.

FARJON A. 2018. The Kew Review: Conifers of the World. *Kew Bulletin*, *73*(1), 8.

GÉNOVA M, GÓMEZ MANZANEQUE F, REGATO P. 1988. Sobre los pinares relictos de la sierra de Gredos (Ávila). Actas del Simposio Internacional de Botánica Pius Font i Quer II: 439-442.

GÉNOVA FUSTER M, GÓMEZ MANZANEQUE F, MORLA JUARISTI C EDS. 2009. Los bosques de Gredos a través del tiempo. Monografíasde la Red de Espacios Naturales de Castilla y León. Serietécnica: Junta de Castilla y León. Valladolid. p. 320.

Gil L. 1991. Consideraciones históricas sobre *Pinus pinaster* Aiton en el paisaje vegetal de la península ibérica. *Estudios Geográficos*, 52(202), 5-27.

HAMPE, A. & JUMP, A.S. 2011. Climate Relicts: Past, Present, Future. *Annu. Rev. Ecol., Evol. Syst.* 42, 313-333.

HARDY OJ, VEKEMANS X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* 2, 618-120.

LÓPEZ-SÁEZ JA, ABEL-SCHAAD D, LUELMO-LAUTENSCHLAEGER R, ROBLES-LÓPEZ S, PÉREZ-DÍAZ S, ALBA-SÁNCHEZ F, SÁNCHEZ-MATA D, GAVILÁN RG. 2018. Resilience, vulnerability and conservation strategies in high-mountain pine forests in the Gredos Range, central Spain. *Plant Ecol. Div.* 11, 1, 97-110.

MORALES-MOLINO C, LEUNDA M, MORELLÓN M, GARDOKI J, EZQUERRA FJ, MUÑOZ SOBRINO C, RUBIALES JM, TINNER W. 2022. Millennial land use explains modern high-elevation vegetation on the submediterranean mountains of Southern Europe. *J. Biogeogr.* 49 (10): 1779-1792.

MORLA JUARISTI C, ALCALDE OLIVARES C, HERNÁNDEZ MATEO L, GARCÍA ANTÓN M, GARCÍA LÓPEZ JM, GARCÍA GÜEMES C.; GUERRERO GARCÍA S, MORALES DEL MOLINO C, MORENO AMAT E, POSTIGO MIJARRA JM, NIDO MARTIN J. 2010. Investigaciones paleobotánicas en la cuenca central del Duero. Actas del 5º Congreso Forestal Español.

NAYDENOV KD, NAYDENOV MK, ALEXANDROV A, VASILEVSKI K, GYULEVA V, MATEVSKI V, NIKOLIC B, GOUDIABY V, BOGUNIC F, PAITARIDOU D, CHRISTOU A, GOIA I, CARCAILLET C, ESCUDERO ALCANTARA A, TURE C, GULCU S, PERUZZI L, KAMARY S, BOJOVIC S, HINKOV G, TSAREV A. 2016. Ancient split of major genetic lineages of European black pine: evidence from chloroplast DNA. *Tree Genet. Genomes* 12(68), 1-18.

PAVIA I, MENGL M, GASPAR MJ, CARVALHO A, HEINZE B, LIMA-BRITO J. 2014. Preliminary evidence of two potentialy native populations of *Pinus sylvestris* L. in Portugal based on nuclear and chloroplast SSR markers. *Austrian J. For. Scie.* 131, 1-22.

PETIT RJ, HAMPE A, CHEDDADI R. 2005. Climate changes and tree phylogeography in the Mediterranean. *Taxon* 54:877-85.

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

REGATO P, ELENA R, SANCHEZ PALOMARES O. 1991: Estudio autoecológico comparativo de *Pinus nigra* Am. subsp. *salzmannii* de la Península Ibérica y otras subespecies de la región circunmediterránea. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales* (0): 49-59.

REGATO P, GÉNOVA M, GÓMEZ F. 1992. Las representaciones relictas de *Pinus nigra* Arnold en el Sistema Central español. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* (Sec. Biol.) 88 (1-4): 63-71.

REGATO P, DEL RÍO M. 2009. 9053_Pinares (sud-) mediterráneos de *Pinus nigra* endémicos. En: Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino.

ROBLEDO-ARNUNCIO JJ, COLLADA C, ALÍA R, GIL L. 2005. Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *J. Biogeogr.* 32, 595-605.

ROBLES-LÓPEZ S, LUELMO-LAUTENSCHLAEGER R, PÉREZ-DÍAZ S, ABEL-SCHAAD D, ALBA-SÁNCHEZ F, RUIZ-ALONSO M, LÓPEZ-SÁEZ JA. 2017. Vulnerabilidad y resiliencia de los pinares de alta montaña de la Sierra de Gredos (Ávila, Sistema Central): dos mil años de dinámica socioecológica. *Cuaternario y Geomorfología* 31 (3-4), 51-72.

ROIRON P, CHABAL L, FIGUEIRAL I, TERRAL JF, ALI AA. 2013. Palaeobiogeography of *Pinus nigra* Arn. subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco in the northwestern Mediterranean Basin: A review based on macroremains. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 194 1-11.

SCALFI M, PIOTTI A, ROSSI M, PIOVANI P. 2009. Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: The rear edge of the range. *Eur. J. For. Res. 128*(4), 377-386.

SHELLER M, TÓTH EG, CIOCÎRLAN E, MIKHAYLOV P, KULAKOV S, KULAKOVA N, MELNICHENKO N, IBE A, SUKHIKH T, CURTU AL. 2023. Genetic Diversity and Population Structure of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) in Middle Siberia. *Forests* 14, 119.

SINCLAIR WT, MORMAN JD, ENNOS RA. 1999. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Mol. Ecol.* 8, 83-88.

ȘOFLETEA N, MIHAI G, CIOCÎRLAN E, CURTU AL. 2020. Genetic Diversity and Spatial Genetic Structure in Isolated Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Populations Native to Eastern and Southern Carpathians. *Forests 11*(10), 1047.

SORANZO N, PROVAN J, POWELL W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Mol. Ecol.* 7, 1260-1261.

SORANZO N, ALÍA R, PROVAN J, POWELL W. 2000. Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the post-glacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Mol. Ecol.* 9, 1205-1211.

SOTO A, ROBLEDO-ARNUNCIO JJ, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ SC, SMOUSE P, ALÍA R. 2010. Climatic niche and neutral genetic diversity of the six Iberian pine species: a retrospective and prospective view. *Mol. Ecol.* 19, 1396-1409.

TÓTH EGY, KÖBÖLKUTI ZA, PEDRYC A, HÖHN M. 2017. Evolutionary history and phylogeography of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Europe based on molecular markers. *J. For. Res. 28*(4), 637-651.

VALBUENA-CARABAÑA M, DE HEREDIA UL, FUENTES-UTRILLA P, GONZÁLEZ-DONCEL I, GIL L. 2010. Historical and recent changes in the Spanish forests: a socio-economic process. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 162, 492-506.

VENDRAMIN GG, LELLI L, ROSSI P, MORGANTE M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Mol. Ecol.* 5, 595-598.

VENTURAS M, GARCÍA ÁLVAREZ S, FAJARDO ALCÁNTARA, M, COLLADA C, GIL L. 2013. Species selection for reforestations: what happens with historic local extinctions and habitat protection zones? A case study in the Cantabrian Range. *Eur. J. For. Res.* 132, 107-120.

ŻUKOWSKA WB, WÓJKIEWICZ B, LEWANDOWSKI A, LÁSZLÓ R, WACHOWIAK W. 2023. Genetic variation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Eurasia: impact of postglacial recolonization and human-mediated gene transfer. *Ann. For. Sci.* 80, 42.