

GENÉTICA DEL CRECIMIENTO PRIMARIO EN *PINUS SYLVESTRIS* L.

Notivol Eduardo Paíno¹ y Ricardo Alía Miranda²

¹Unidad de Recursos Forestales. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria–CITA. Apdo. 727. 50080-ZARAGOZA (España). Correo electrónico: enotivol@aragon.es

²Dpto Sistemas y Recursos Forestales. CIFOR-INIA. Ctra. La Coruña km 7,5. 28040-MADRID (España). Correo electrónico: alia@inia.es

Resumen

Pinus sylvestris L. es la especie forestal arbórea con la mayor distribución geográfica y sus poblaciones están adaptadas a condiciones ambientales muy distintas. Las características referidas al crecimiento primario y a su ritmo temporal son óptimas para comprender la adaptación de las poblaciones a las condiciones locales. Mediante el ajuste no lineal y análisis de las curvas de crecimiento individuales y de los parámetros derivados en diferentes poblaciones se obtuvieron parámetros genéticos referidos a la diferenciación poblacional y a la varianza genética aditiva. Se han considerado diferentes poblaciones del rango natural de la especie y los resultados en diferenciación genética fueron muy variables ($Q_{ST} = 0,09-0,71$) según caracteres y material vegetal. Las varianzas genéticas aditivas alcanzan en algunos casos hasta 14% de la varianza total. Se presentan resultados de los valores de la heredabilidad individual por población y de forma conjunta así como de la diferenciación genética para caracteres cuantitativos. Al agrupar las poblaciones mediante análisis multivariante se observan tendencias clinales pero cuando se incluyen poblaciones en las que los factores de variación geográfica no son simples (no sólo latitud o altitud) los clines geográficos no resultan fáciles de determinar y los parámetros genéticos se deberían relacionar con clines climáticos.

Palabras clave: Poblaciones, Diferenciación genética, Heredabilidad, Curvas de crecimiento

INTRODUCCIÓN

La respuesta a la selección en las medias y en la varianza genética aditiva de los caracteres se puede estudiar en el comportamiento de poblaciones naturales distantes entre sí dentro de su área de distribución al incluirlas en un ensayo de procedencias en idénticas condiciones.

Dentro de cada población hay una presión de selección para un óptimo local (BARTON, 1999), pero el óptimo difiere entre poblaciones a lo largo del gradiente de condiciones naturales. Si bien hay poca información disponible sobre la genéti-

ca cuantitativa de los clines, las predicciones teóricas muestran que las medias seguirán el óptimo local, siendo más difícil hacer predicciones sobre los patrones de la varianza genética, ya que éstos pueden depender en gran parte de la genética de cada característica, y en menor medida de la selección y la migración (BARTON, 1999).

El pino silvestre es una buena especie modelo para poder abordar estas cuestiones ya que se caracteriza por poblaciones con un número elevado de efectivos, abundante flujo polínico y un sistema de cruzamiento abierto (MUONA & HARJU, 1989) lo que teóricamente reduciría la diferencia-

ción neutral. Los resultados empíricos sobre diferencia entre poblaciones a nivel neutro para pino silvestre están de acuerdo con esa predicción (ROBLEDO-ARNUNCIÓ et al., 2005). Por otra parte, la fuerte variación clinal del momento de formación de la yema y la tolerancia a las heladas ha sido descrita en las poblaciones del norte (HURME et al., 1997). El mismo cline para la formación de la yema se encontró en latitudes más al sur (GARCÍA-GIL et al., 2003). Los resultados discrepantes entre los marcadores neutrales y fenotípicos sugieren que los clines fenotípicos observados pueden ser el resultado de la selección divergente y no debido a la estructura histórica de la población (MCKAY & LATTA, 2002). La idea de una fuerte adaptación local de las poblaciones de pino silvestre es también apoyada mediante experimentos de movilidad de semillas. Los árboles del sur sobreviven peor cuando son trasladados al norte, mientras que los árboles del norte sobreviven mejor cuando son plantados en el sur, pero crecen más lentamente que las poblaciones locales del sur (ERIKSSON et al., 1980). Además, las poblaciones españolas, las más al sur del rango de distribución, están más fragmentadas que las del norte, variando ambas en los niveles de diversidad y características de crecimiento (ALÍA et al., 2001a; PRUS-GLOWACKI et al., 2003).

En el presente estudio se ha analizado la estructura genética del ritmo de crecimiento de

familias en poblaciones de pino silvestre procedentes de los extremos de su cline latitudinal. Estas características de crecimiento han demostrado tener gran interés para el análisis de la variación adaptativa y comportamiento de las especies arbóreas (REHFELDT, 1992; RWEYONGEZA et al., 2004). Nuestro principal objetivo fue estudiar la diferenciación poblacional y la evaluación del control genético de las características del ritmo de crecimiento.

MATERIAL Y METODOS

Material vegetal y diseño experimental

Se comparan los resultados de dos ensayos de procedencias-progenies de diferente edad. En uno de ellos se utilizaron 69 familias de cuatro poblaciones procedentes de los extremos latitudinales del rango de distribución natural en Europa de pino silvestre con distinta representación familiar (21 familias para Valsaín-España, 10 para Puebla de Lillo-España, 19 para Kolari-Finlandia y 19 para Lapinjärvi-Finlandia) y las plantas analizadas fueron de una savia. En el segundo se utilizaron 9 poblaciones intentando cubrir el rango de distribución de la especie con 5 familias por población y una edad de tres años (Figura 1).

El diseño experimental del primer ensayo (1400 brinzales) fue un alfa látice latinizado con

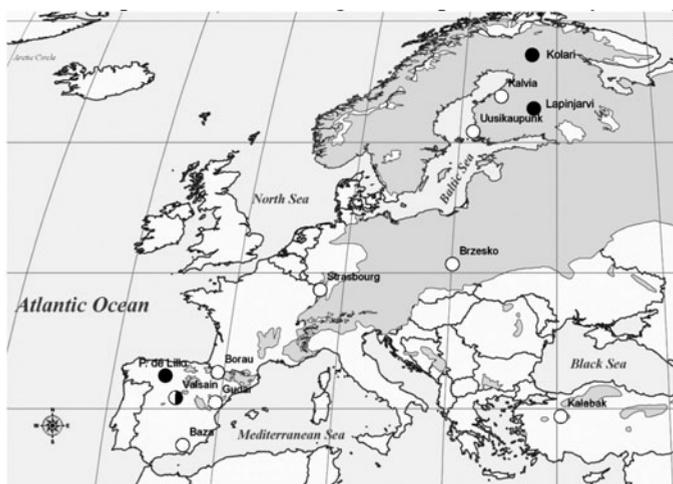


Figura 1. Distribución de la especie (área sombreada) y localización de las poblaciones de ambos experimentos: en negro el experimento 1 y en blanco el experimento 2

4 repeticiones. Las 69 familias fueron divididas en 14 bloques incompletos de 5 familias por bloque y 5 plantas por familia. La latinización se dispuso en 5 columnas perpendiculares a la dirección de los bloques. El segundo experimento (576 brinzales) y fue un diseño en filas y columnas con 12 filas y 4 columnas. La unidad experimental en este caso estuvo compuesta por 4 plantas y constaba de 3 repeticiones.

Las plantas se cultivaron en contenedor con sistemas de autorepicado y antiespiralización de 200 y 300 c.c. respectivamente, bajo condiciones ambientales uniformes sin restricciones hídricas (invernadero y umbráculo respectivamente para evitar altas temperaturas e insolación) en las instalaciones del CITA en Zaragoza y su altura fue medida dos veces por semana desde el inicio hasta el final del periodo de crecimiento primario (del 10 de Julio -34 días después de su siembra-hasta el 23 de Octubre en el primer caso y del 24 de febrero al 17 de junio en el segundo).

Ajuste de curvas de crecimiento

Se eligió la función de Gompertz (DRAPER & SMITH, 1981) para modelizar el crecimiento de cada plántula. Este modelo cumple con las principales características de las curvas de crecimiento: asíntota, punto de inflexión y significado lógico y biológico de los parámetros (KIVISTE *et al.*, 2002). La expresión matemática es: $H = ce^{-e^{-b(t-m)}}$ en el dónde H es la altura de la planta (en mm.) en el momento t (en días después de la siembra o inicio del crecimiento), el parámetro c es el predicho para la altura total de la planta al final del periodo de crecimiento (la asíntota de la curva); b está muy relacionado (proporcionalmente) con la relación del máximo crecimiento respecto de la altura total ($b = \text{crecimiento_max}/c$); y m es el valor de t correspondiente al punto de inflexión de la curva (momento en el que se alcanza el crecimiento máximo).

La curva de crecimiento se ajustó para cada plántula usando un procedimiento no lineal. Los estimadores de los parámetros (c, b, m) se buscaron tal que optimizaran la función de la suma de los cuadrados de los residuos, minimizándola mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt (WOLFRAM, 1999). Dado que el método de optimización es iterativo se necesitan valores inicializadores de los parámetros, y para

ello se desarrolló e implementó un programa en Mathematica® para, mediante un procedimiento de búsqueda, generar estos valores inicializados. Este método usa intervalos numéricos en lugar de valores puntuales para obtener los valores iniciales en un ajuste no lineal.

A partir de las curvas se obtuvieron dos variables para cada curva ajustada, inicio del crecimiento (t10) y finalización del crecimiento (t90), consideradas como el tiempo necesario para alcanzar el 10% ($H = 0,1c$) y el 90% ($H = 0,9c$) del total de la altura, respectivamente:

$$t10 = m - \frac{\ln[-\ln(0,1)]}{b} \quad t90 = m - \frac{\ln[-\ln(0,9)]}{b}$$

La duración del crecimiento (dur) se obtuvo como diferencia entre t90 y t10.

En ambos experimentos se registro la fecha de formación de la yema terminal.

Análisis de varianza

Siguiendo el diseño experimental y asumiendo que los residuos son independientes y se distribuyen normalmente ($0, V_e$), se establecieron los correspondientes modelos para las variables y se analizaron como un modelo mixto con efectos fijos (población, repetición y columna) y aleatorios (familia, bloque y error), obteniendo los componentes de la varianza por máxima verosimilitud restringida (REML). Se obtuvieron los mejores estimadores lineales insesgados y predichos (BLUE y BLUP) para los factores fijos y aleatorios respectivamente y el test de Tukey-Kramer se utilizó para agrupar las medias ajustadas de las poblaciones (SAS, 1999). El test de Shapiro-Wilks fue usado para evaluar la normalidad (SOKAL & ROHLF, 1995) y aunque se evidenció alguna heterogeneidad de las varianzas, no se consideró una transformación estabilizadora al comprobar que los ratios entre varianzas eran inferiores a 10 (WILLIAMS *et al.*, 2002).

Análisis multivariantes

Se realizaron un análisis multivariante de la varianza y un análisis discriminantes canónicos (SAS, 1999) en los dos casos para ver si existen diferencias globales entre poblaciones y para su agrupación con base en la máxima variabilidad recogida por el conjunto de las variables obtenidas del modelo.

Parámetros genéticos

La heredabilidad (h^2) obtenida fue la individual en sentido estricto, calculada como el ratio entre varianza genética aditiva respecto a la fenotípica y la diferenciación genética para caracteres cuantitativos (Q_{st}) según la expresión.

$$Q_{st} = \frac{\sigma_{pob}^2}{\sigma_{pob}^2 + 2(3\sigma_{fam}^2)}$$

RESULTADOS

Las curvas de crecimiento estimadas se ajustaron a los datos con bastante exactitud. La diferencia media entre valores predichos y observados fue del 3% y el coeficiente de determinación (R^2) fue $0,999 \pm 0,0002$ (con valores individuales máximos y mínimos de 0,999 y 0,859 respectivamente).

En los dos experimentos el factor población de los análisis de varianza resultó altamente significativo para todas las variables. Los errores fueron bajos y los efectos ambientales del diseño no fueron significativos. Los análisis multivariantes

de la varianza mostraron asimismo efectos muy significativos en el efecto población cuando se consideraban todas las variables juntas. Las heredabilidades individuales en sentido estricto por población y calculadas de forma conjunta se presentan en la tabla 1. Se encontró un elevado nivel de diferenciación entre poblaciones para la mayoría de las características, variando la diferenciación genética para caracteres cuantitativos (Q_{st}), de 0,08 para la altura total hasta 0,77 para la fecha de formación de la yema en el primer experimento y de 0,09 para el inicio del crecimiento hasta 0,25 para la duración del mismo en el segundo.

Los análisis discriminantes canónicos (Figura 2) fueron satisfactorios absorbiendo las dos primeras variables canónicas el 88% y el 89% en el primer y segundo experimento respectivamente y agruparon las poblaciones coherentemente por áreas geográficas y climáticas.

DISCUSION

Las variables empleadas en este estudio caracterizan el ritmo de crecimiento de las plân-

h^2 (1° exp)	c	b	m	t10	t90	dur.	yema
Kolari	1,58	0,23	0,42	0,55	0,28	0,19	0,75
Lapinjärvi	0,68	0,66	0,84	0,28	1,04	0,91	0,59
P. Lillo	0,24	0,29	0,42	0,00	0,49	0,43	0,47
Valsain	0,85	0,75	0,21	0,96	0,64	0,84	0,57
Conjunta	1,09	0,54	0,43	0,64	0,71	0,84	0,66
Q_{st}	0,08	0,71	0,52	0,19	0,56	0,54	0,77
h^2 (2° exp)	h	c	b	m	t10	t90	yema
Baza	1,44	1,48	0,11	0,17	0,00	0,31	0,15
Turquia	1,48	1,01	0,08	0,67	0,58	0,34	0,00
Gudar	0,03	0,00	0,00	0,30	0,26	0,00	0,00
Valsain	0,82	0,98	0,14	0,32	0,00	0,33	0,25
Borau	0,00	0,50	0,47	0,39	0,21	0,90	1,22
Strasbourg	0,39	0,00	0,06	0,08	0,00	0,22	0,07
Brzesco	1,40	0,75	0,45	0,34	0,48	0,14	0,14
Uusikaupunki	1,46	0,81	1,22	0,00	0,00	0,00	0,28
Kalvia	0,35	0,00	0,96	0,51	0,13	0,68	0,61
Conjunta	1,35	0,67	0,68	0,39	0,36	0,34	0,20
Q_{st}	0,18	0,21	0,13	0,11	0,09	0,17	0,25

Tabla 1. Heredabilidades individuales (sentido estricto, h^2) y coeficientes de diferenciación genética para caracteres cuantitativos (Q_{st}) de las variables derivadas del ajuste de curvas y de la fecha de formación de la yema en ambos experimentos

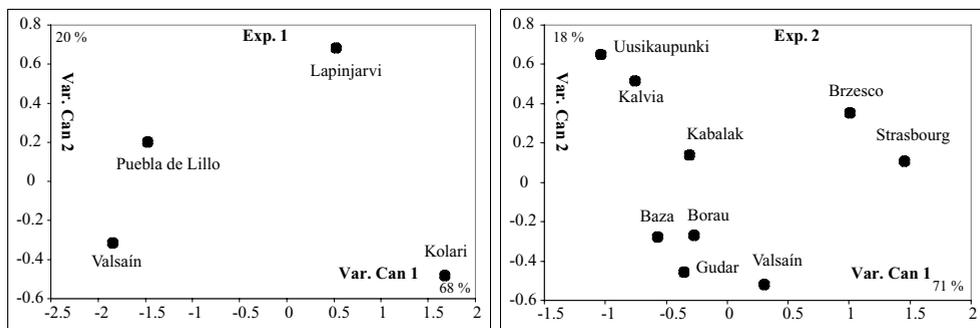


Figura 2. Representación de los valores medios por población de las dos primeras variables canónicas obtenidas mediante un análisis discriminante canónico basado en el conjunto de las variables para ambos experimentos

tulas de pino silvestre durante los primeros estadios del crecimiento, y son importantes para entender el proceso de selección durante la primera fase de las plantas bajo diferentes condiciones ambientales. Se eligieron las curvas de Gompertz por su simplicidad, por su precisa descripción del proceso y por el significado biológico de los parámetros obtenidos. Comparado con otros modelos, el de Gompertz no incorpora la restricción de simetría como el modelo logístico (la curva es simétrica alrededor del punto de ratio máximo crecimiento y tiene los mismos períodos de crecimiento lento y rápido). Por otra parte presenta la limitación matemática de que el punto de inflexión está siempre a una proporción fija del valor de la asíntota, pero esta característica también es común en otros modelos habituales de la descripción del crecimiento (Weibull o Richards–Chapman), y está suficientemente compensada por la simplicidad del modelo (sólo tres parámetros) y su gran flexibilidad.

Las heredabilidades calculadas indican un alto control genético de los caracteres relacionados con el ritmo de crecimiento primario como ya se ha constatado anteriormente (GWAZE et al., 2002; SAVOLAINEN et al., 2004). Además los altos valores en general de Q_{st} manifiestan una diferenciación de las poblaciones para este grupo de variables relacionadas con la dinámica del crecimiento en altura. Si bien los efectos maternos son relevantes en la germinación y en el crecimiento del primer año (KAYA Y ISIK, 1997; HURME et al., 1997), los valores de las diferencias poblacionales en el ritmo de crecimiento son, en todos los casos, mayores que los observa-

dos con marcadores neutrales, indicando una fuerte estructura genética de la diversidad en las características cuantitativas (adaptativas) para las poblaciones de pino silvestre. Otros estudios han mostrado diferentes resultados dependiendo de la especie, del protocolo del experimento y de los caracteres analizados. Así, no se encontraron diferencias en la tasa de crecimiento en plantas de un año de *P. sylvestris* (REICH et al., 1994) y de cuatro años de *Pinus halepensis* (ALÍA et al., 2001b). También se hayó poca diferenciación para el inicio del crecimiento en *Pinus contorta* (REHFELDT & WYKOFF, 1981) y en *Pinus merkusii* (KOSKELA, 2000), pero sí para la tasa de crecimiento en *Pinus banksiana* (BLAKE & YEATMAN, 1989), para la elongación total y los parámetros de crecimiento en plantas de un año en *P. contorta* (CHUINE et al., 2001), y también para la altura total en plantas de cuatro años en *P. halepensis* (ALÍA et al., 2001b) y *P. sylvestris* (NOTIVOL et al., 1996).

La relación entre los valores medios de las variables y la latitud en el primer experimento muestran un claro efecto clinal para la tasa máxima de crecimiento, el punto de inflexión y el cese del crecimiento (altos valores de Q_{st}), esta relación se puede observar en el primer eje del gráfico del análisis discriminante canónico (Figura 2). Hay que destacar que estas características tienen un significado adaptativo importante. Para una mayor discusión sobre el tema ver NOTIVOL et al. (2007).

Por otra parte cuando se incluyen más poblaciones en el estudio del ritmo de crecimiento primario e intentando eliminar los efectos

maternales con material algo más adulto no es posible distinguir una tendencia clinal para los caracteres estudiados. Resultados preliminares no mostrados en este trabajo (NOTIVOL et al., 2006) parecen indicar que podrían existir tendencias de variación clinal o patrones de distribución de la varianza genética aditiva en función del clima obtenido a partir de un modelo global (HIJMANS et al., 2005).

BIBLIOGRAFIA

- ALÍA, R.; MORO, J. & NOTIVOL, E.; 2001a. Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) provenances in Spain: Growth traits and survival. *Silva Fennica* 35: 27-38.
- ALIA, R.; GÓMEZ, A.; AGUNDEZ, M.D.; BUENO, M.A. & NOTIVOL, E.; 2001b. Levels of genetic differentiation in *Pinus halepensis* Mill. in Spain using quantitative traits, isozymes, RAPDs and cp-microsatellites. In: G. Muller Starck & R. Schubert R (eds.), *Genetic Response of Forest Systems to Changing Environmental Conditions*. Forestry Sciences 70: 151-160. Kluwer. Dordrecht.
- BARTON, N.H.; 1999. Clines in polygenic traits. *Genet. Res.* 74: 223-236.
- BLAKE, T.J. & YEATMAN, C.W.; 1989. Water relations, gas-exchange, and early growth-rates outcrossed and selfed *Pinus banksiana* families. *Can. J. For. Res.* 67: 1618-1623.
- CHUINE, I.; AITKEN, S.N. & YING, C.C.; 2001. Temperature thresholds of shoot elongation in provenances of *Pinus contorta*. *Can. J. For. Res.* 31: 1444-1455.
- DRAPER, N.R. & SMITH, H.; 1981. *Applied regression analysis*. 2nd edition. John Wiley and Sons Inc. New York.
- ERIKSSON, G.; ANDERSSON, S.; EICHE, V.; IFVER, J. & PERSSON, A.; 1980. Severity index and transfer effects on survival and volume production of *Pinus sylvestris* in Northern Sweden. *Studia Forestalia Suecica* 156: 1053-1061.
- GARCÍA-GIL, M.R.; MIKKONEN, M. & SAVOLAINEN, O.; 2003. Nucleotide diversity at two phytochrome loci along a latitudinal cline in *Pinus sylvestris*. *Mol. Ecol.* 12: 1195-1206.
- GWAZE, D.P.; BRIDGWATER, F.E. & WILLIAMS, C.G.; 2002. Genetic analysis of growth curves for a woody perennial species, *Pinus taeda* L. *Theor. Appl. Genet.* 105: 526-531.
- HIJMANS ET AL. 2005. Worldclim: High resolution interpolated surfaces for global land areas. *Intl. J. Clim.* 25: 1965-1978.
- HURME, P.; REPO, T.; SAVOLAINEN, O. & PAAKKONEN, T.; 1997. Climatic adaptation of bud set and frost hardiness in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Can. J. For. Res.* 27: 716-723.
- KAYA, Z. & ISIK, F.; 1997. The pattern of genetic variation in shoot growth of *Pinus brutia* Ten. populations sampled from the Toros Mountains in Turkey. *Silvae Genet.* 46: 73-81.
- KIVISTE, A.; ÁLVAREZ GONZÁLEZ, J.G.; ROJO ALBORECA, A. & RUIZ GONZÁLEZ, A.D.; 2002. *Funciones de crecimiento en el ambiente forestal*. Monografías INIA: Forestal 4. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (INIA). Madrid.
- KOSKELA, J.; 2000. Early shoot and diameter growth in four *Pinus merkusii* populations from Thailand. *J. Trop. For. Sci.* 12: 707-716.
- MCKAY, J.K. & LATTA, R.G.; 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends Ecol. Evol.* 17: 285-291.
- MUONA, O. & HARJU, A.; 1989. Effective population sizes, genetic variability, and mating system in natural stands and seed orchards of *Pinus sylvestris*. *Silvae Genet.* 38: 221-228.
- NOTIVOL, E.; ALÍA, R. & GIL, L.; 1996. Variation and adaptation of *Pinus sylvestris* L. provenances in Spain. In: *Diversity and Adaptation in forest ecosystems in a changing world*. Abstracts: 48. Vancouver, Canadá.
- NOTIVOL, E.; CORCUERA L. & ALÍA, R.; 2006. Adaptive genetic variation of in a latitudinal cline in Scots pine: Growth rhythm traits and curves analysis. In: *IUFRO conference Population genetics and genomics of forest trees: from gene function to evolutionary dynamics and conservation*. Alcalá de Henares.
- NOTIVOL, E.; GARCÍA-GIL, M.R.; ALÍA, R. & SAVOLAINEN, O.; 2007. Genetic variation of growth rhythm in the limits of a latitudinal

- cline in Scots pine. *Can. J. For. Res.* 37: 540-551.
- PRUS-GLOWACKI, W.; STEPHAN, B.R.; BUJAS, E.; ALIA, R.; & MARCINIAK, A.; 2003. Genetic differentiation of autochthonous populations of *Pinus sylvestris* (Pinaceae) from the Iberian peninsula. *Plant System. Evol.* 239(1-2): 55-66.
- REHFELDT, G. & WYKOFF, W.; 1981. Periodicity in shoot elongation among populations of *Pinus contorta* from the northern Rocky Mountains. *Ann. Bot.* 48: 371-377.
- REHFELDT, G.; 1992. Early selection in *Pinus ponderosa*: compromises between growth potential and growth rhythm in developing breeding strategies. *For. Sci.* 38(3): 661-677.
- REICH, P.; OLEKSYN, J. & TJOELKER, M.; 1994. Seed mass effects on germination and growth of diverse European Scots pine populations. *Can. J. For. Res.* 24: 306-320.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J.; COLLADA, C.; ALIA, R. & GIL, L.; 2005. Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *J. Biogeog.* 32(4): 595-605.
- RWEYONGEZA, D.M.; YEH, F.C. & DHIR, N.K.; 2004. Genetic parameters for seasonal height and height growth curves of white spruce seedlings and their implications to early selection. *Forest Ecol. Manage.* 187(2-3): 159-172
- SAS; 1999. *SAS OnlineDoc version eight*. SAS, Institute Inc. Cary, NC, USA.
- SAVOLAINEN, O.; BOKMA, F.; GARCÍA-GIL, M.R.; KOMULAINEN, P. & REPO, T.; 2004. Genetic variation in timing of growth and adaptation of *Pinus sylvestris* to climatic changes. *Forest Ecol. Manage.* 197: 79-89.
- SOKAL, R. & ROHLF, F.; 1995. *Biometry*. W H Freeman and Co. New York.
- WILLIAMS, E.R.; MATHESON, A.C. & HARWOOD, C.E.; 2002. *Experimental design and analysis for tree improvement*. 2nd. ed. CSIRO Publishing. Collingwood.
- WOLFRAM, S.; 1999. *The Mathematica book*. Cambridge University Press. Cambridge.