

ASPECTOS GENÉTICOS Y DEMOGRÁFICOS DE *TAXUS BACCATA* EN LA RED DE PARQUES NACIONALES

CONCETTA BURGARELLA¹, ELISA BERGANZO², MARIO ZABAL AGUIRRE¹,
ARANTXA PRADA³, SALUSTIANO IGLESIAS⁴, MIQUEL RIBA², MARÍA MAYOL²,
GIOVANNI G. VENDRAMIN⁵ Y SANTIAGO C. GONZÁLEZ MARTÍNEZ¹

RESUMEN

Debido a que se encuentra en franca regresión a lo largo de toda su distribución y especialmente en las regiones mediterráneas, el tejo (*Taxus baccata* L.) es una especie prioritaria para la conservación en muchos países europeos, incluyendo España. En este estudio se ha hecho una caracterización demográfica de las poblaciones de tejo incluidas en los Parques Nacionales y se ha estimado el nivel y la distribución de la diversidad genética con microsatélites nucleares. Además, se ha analizado la variabilidad en genes candidatos (biosíntesis del taxol), como primera aproximación al estudio de la variación adaptativa en la especie. En general, se han observado tamaños poblacionales bajos y valores significativos de endogamia. Algunas poblaciones presentan niveles de diversidad (heterozigosidad y riqueza alélica) especialmente bajos y/o una distribución irregular de edades. Se discuten estos resultados en relación al impacto potencial de actividades antrópicas recientes y de otros factores biológicos que influyen sobre la viabilidad de las poblaciones y se comparan con poblaciones de referencia fuera de la red de Parques Nacionales.

Palabras clave: Diversidad genética, demografía, cuello de botella, endogamia, genes candidatos.

SUMMARY

In regression across the whole range of its distribution and specifically in Mediterranean regions, the yew (*Taxus baccata* L.) is a priority species for conservation in most European countries as well as in Spain. In this study, we performed a demographic characterization of populations within the Spanish National Parks and estimated levels and distribution of genetic diversity with nuclear microsatellites. Moreover, we analysed the variability of candidate genes (taxol biosynthesis), as a first approximation to the study of adaptive variation in the species. In general, we observed small population sizes and significant values of inbreeding. Some populations showed low diversity values (heterozygosity and al-

¹ Departamento de Ecología y Genética Forestal, Centro de Investigación Forestal (CIFOR), INIA. Cra. de A Coruña km 7.5 – 28040 Madrid, Spain. burgarella.concetta@inia.es santiago@inia.es mario.zabal@inia.es

² Centro de Investigación Ecológica y Aplicaciones Forestales, CREAF. Universidad Autónoma de Barcelona – 08193 Bellaterra, Spain. e.berganzo@creaf.uab.es Miquel.Riba@uab.cat María.Mayol@uab.cat

³ Centro de Investigación y Experiencias Forestales de la Generalitat Valenciana (CIEF). Avda Comarques del país Valencià, 114 – 46930 Quart de Poblet, Spain. gis_banco@gva.es

⁴ Dirección General de Medio Natural y Política Forestal. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. C/Ríos Rosas, 24 – 28003 Madrid, Spain. SIglesias@mma.es

⁵ Plant Genetics Institute, National Research Council, Via Madonna del Piano 10 – 50019 Sesto Fiorentino (Florence), Italy. giovanni.vendramin@igv.cnr.it

lelic richness) or an irregular age distribution. These results were discussed in relation to the potential impact of recent anthropic activities and of other biological factors affecting population viability, and were compared with results from populations external to the Spanish National Park network.

Key words: Genetic diversity, demography, bottleneck, inbreeding, candidate genes.

INTRODUCCIÓN

El tejo (*Taxus baccata* L.) es una gimnosperma dioica, único representante europeo de una familia (Taxaceae) cuyo origen se remonta a finales del Terciario. Según los registros polínicos, el tejo ha estado presente en amplias zonas de la Península Ibérica desde hace 15-20 millones de años. Actualmente se considera una especie en proceso de declive, relacionado principalmente con la excesiva presión antrópica (sobreexplotación, pastoreo, desaparición de formaciones forestales maduras) y con condiciones climáticas progresivamente más secas durante el Cuaternario. Dichas presiones ven acentuados sus efectos por las características propias de la especie, entre otras el lento recambio generacional y la baja competitividad con otras especies arbóreas (THOMAS & POLWART 2003). En la Península Ibérica *T. baccata* se encuentra en la mayoría de los bosques templados y mediterráneos, de forma aislada o formando pequeños rodales, pero frecuentemente con escaso número de efectivos poblacionales. En particular, las poblaciones mediterráneas sufren un alto grado de fragmentación y tienen a menudo carácter relicto (SERRA 2006).

Por su escasez y fragilidad, los hábitats mediterráneos con *T. baccata* se han reconocido como prioritarios para la conservación por la Directiva de Habitats (92/43/EEC) y la especie se ha convertido en modelo de conífera amenazada de distribución dispersa por la Red Europea de Conservación de Recursos Genéticos Forestales (EUFORGEN). En España, el tejo es objeto de un programa nacional de conservación de los recursos genéticos, como se recoge en la Estrategia Española para la Conservación y el Uso Sostenible de los Recursos Genéticos Forestales (MIMAM 2006). En este sentido la Red de Parques Nacionales y de espacios protegidos desempeña un papel esencial para evitar la desaparición de las

poblaciones existentes y asegurar su persistencia in-situ. Para la toma de decisiones sobre las medidas de conservación y manejo más adecuadas en cada caso, es importante conocer de la forma más detallada posible el estado actual de los recursos genéticos (niveles y distribución espacial), y de los factores y procesos ecológicos y genéticos (patrones demográficos y reproductivos, presiones selectivas) que actúan sobre ellos.

Los trabajos realizados hasta el momento en el ámbito de la península Ibérica con marcadores moleculares neutrales (microsatélites nucleares) indican que las poblaciones más extensas y mejor conectadas (e.g. Cordillera Cantábrica) son más diversas genéticamente pero menos diferenciadas entre sí a escala regional que las poblaciones más perturbadas y/o aisladas del Mediterráneo peninsular e insular. Se ha observado una marcada estructura espacial a escala local que, sin embargo, no se observa a escala regional. Estos patrones se han interpretado como el efecto de cuellos de botella recurrentes y aislamiento prolongado en núcleos pequeños procedentes de la fragmentación de una distribución más continua en el pasado (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.* 2010). La consecuencia evolutiva de un tamaño efectivo poblacional muy reducido es la pérdida de viabilidad a medio y largo plazo, por deriva genética y/o endogamia. En efecto, un estudio realizado en Suiza ha documentado la existencia de una mayor deriva genética en las poblaciones pequeñas de la especie (HILFIKER *et al.* 2004). En España, se han encontrado niveles relativamente elevados de endogamia en los núcleos de tejo del Montseny, severamente fragmentados y sujetos a repetidas acciones antrópicas (DUBREUIL *et al.* 2010).

A lo largo de toda su distribución, y sobre todo en la península Ibérica, el tejo es capaz de vivir en ambientes muy diferentes en términos de altitud, régimen de precipitaciones y temperatura. A

estas condiciones ambientales tan contrastadas podrían corresponder adaptaciones locales, como se ha descrito en otras especies arbóreas de amplia distribución mediante ensayos de procedencia y análisis de caracteres cuantitativos (para una revisión véase SAVOLAINEN, PYHÄJÄRVI, & KNÜRR 2007). Este tipo de aproximaciones no se han usado todavía en *T. baccata*, pero se ha observado en campo notable variabilidad en la especie en ciertos caracteres morfológicos (e.g. tamaños de semilla y de arilos) y funcionales (e.g. densidad de estomas) potencialmente asociados a las modalidades de dispersión, germinación y establecimiento, y por tanto relevantes para su capacidad adaptativa (aunque se desconoce su base genética).

En consecuencia, la extinción de núcleos relictos de tejo podría suponer la desaparición de genotipos con adaptaciones únicas. El riesgo de pérdida de diversidad adaptativa es tanto más preocupante en el caso de poblaciones mediterráneas, con condiciones ambientales más cálidas y secas, cuyos genotipos podrían ser los que tienen mayor potencial adaptativo frente a los posibles cambios climáticos futuros. Estos cambios predicen una tendencia al incremento de la temperatura y reducción de las precipitaciones, al igual que un aumento de su irregularidad.

En este estudio se ha evaluado el estado de conservación del acervo genético de *Taxus baccata* L. dentro de la Red de Parques Nacionales, en comparación con poblaciones de referencia fuera de la red (véase GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.* 2010). Para ello se ha hecho una caracterización demográfica de las poblaciones estudiadas y se han estimado el nivel y la distribución de la diversidad genética con microsatélites nucleares. Además, se ha analizado la variabilidad en genes potencialmente implicados en la respuesta de defensa contra herbívoros y patógenos (biosíntesis del taxol), como primera aproximación al estudio de la variación adaptativa en la especie. Finalmente, se ha recogido material vegetal para incrementar la colección de genotipos de *Taxus baccata* de los bancos clonales de Valsaín y Puerta de Hierro (dependientes del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino), valioso re-

curso para el estudio de la variabilidad fenotípica de diferentes genotipos bajo las mismas condiciones ambientales y para actividades de restauración y repoblación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Poblaciones estudiadas

Taxus baccata se encuentra en cuatro de los parques nacionales: Picos de Europa, Ordesa y Monte Perdido, Sierra Nevada y Cabañeros. Dentro de dichos espacios naturales, se han analizado 10 poblaciones, con un total de 366 adultos y 168 juveniles (Tabla 1). En particular, en el PN de Cabañeros se han inventariado y muestreado todos los individuos de los cuatro núcleos conocidos de tejo dentro del Parque. En Sierra Nevada se han escogido dos núcleos que representan los dos tipos de sustratos posibles, silíceo (Cabezera del río Maitena) y mixto silíceo/calcáreo (Barranco de Huenes-Trevenquillo). Sucesivamente se ha considerado oportuno incluir las otras tres poblaciones mayores del Parque (Dehesa del Camarate, Río Genil, Río Monachil), para las cuales se presentan solo los resultados demográficos, estando los análisis genéticos todavía en curso. Además, se ha considerado de gran interés incluir la población de Bujaruelo, que se encuentra a las puertas del PN de Ordesa y Monte Perdido y que, con cerca de 6.000 ejemplares, es la de mayor tamaño de los Pirineos (y una de las más grandes de la península Ibérica). Se han recogido acículas para el genotipado con microsatélites nucleares, semillas para el análisis con los genes candidato y púas para la colección clonal de conservación de *Taxus* situada en los Centros de Mejora y Conservación de Puerta de Hierro y Valsaín (Tabla 1). Cada uno de los individuos muestreados se ha georeferenciado y se ha tomado nota de caracteres demográficos y autecológicos, como la presencia de órganos reproductores, el sexo, el número de pies, el diámetro del tronco a la altura del pecho (DBH), la altura y el tamaño de copa.

Extracción del ADN de hojas y semillas

Para la extracción del ADN de las acículas y de los megagametofitos (la porción haploide de la

Parque Nacional	Población	Acículas		Semi-llas	Esta-quillas	He (SD)	F _{IS} (SD)	A (SD)	R (SD)
		Adultos	Juveniles						
Cabañeros	Arroyo de la Mierera	21	–	2	4	0,48 (0,04)	0,27*	6,00 (2,71)	4,85 (1,99)
	Cabecera del Estena ²	30	3	10	5	0,62 (0,03)	0,16*	8,14 (4,56)	5,76 (2,45)
	Boquerón del Estena	18	26	1	2	0,41 (0,04)	0,32*	4,43 (2,37)	3,85 (1,82)
	El Chorro	11	1	–	–	0,51 (0,06)	0,23*	5,29 (1,89)	5,07 (1,74)
Sierra Nevada	Río Maitena	51	14	–	22	0,63 (0,08)	0,06	7,71 (2,75)	5,00 (1,38)
	Trevenquillo ²	32	24	18	–	0,52 (0,08)	0,08	5,29 (1,80)	3,59 (1,19)
Picos de Europa	Hayedo Redemuña ²	57	60	21	17	0,60 (0,03)	0,21*	13 (5,57)	6,79 (1,99)
Ordesa y Monte Perdido	Valle de Añisclo	48	–	–	–	0,53 (0,03)	0,22*	9,57 (4,35)	6,36 (2,92)
	Valle de Pineta ²	39	40	10	–	0,52 (0,03)	0,28*	6,86 (1,95)	4,92 (1,11)
	Bujaruelo	59	–	–	–	0,75 (0,06)	0,21*	11,86 (5,15)	6,59 (2,10)
Todas		366	168	70	50	0,53 (0,07)	0,20 (0,08)	7,89 (2,94)	5,28 (1,09)
Península Ibérica ¹		659	–	–	–	0,46 (0,07)	0,29 (0,12)	6,44 (1,70)	4,62 (0,90)

Tabla 1. Número de individuos, tipo de tejido muestreado e índices de diversidad genética por población, calculados sobre los individuos adultos. SD, desviación estándar. * P-valor $\leq 0,05$.

¹ Los valores presentados para la Península Ibérica son valores medios calculados sobre 29 poblaciones naturales analizadas en González-Martínez *et al.* (2010) y con tamaño de muestra ≥ 11 (media 23).

² Poblaciones en las que se han secuenciado los genes candidatos (cfr. Material y Métodos).

Table 1. Number of individuals, tissue sampled and genetic diversity by population computed on adult trees. SD, standard deviation. * P-value ≤ 0.05 .

¹ Values for the Iberian Peninsula are average values for 29 natural populations analysed in González-Martínez *et al.* (2010). Only populations with sample size ≥ 11 (average of 23) were used.

² Populations selected for sequencing of candidate genes (cfr. Materials and Methods).

semilla) se ha empleado el kit de extracción de Invitex (Invisorb[®] DNA Plant HTS 96 Kit/C). El resultado es un ADN de calidad, adecuado para el genotipado con microsatélites y para la secuenciación de genes nucleares.

Genotipado y análisis con microsatélites nucleares

El ADN obtenido de las acículas se ha amplificado con los cebadores para siete loci microsatélites nucleares diseñados específicamente para *Taxus baccata* (DUBREUIL *et al.* 2008). Posteriormente los productos de la amplificación se han separado mediante electroforesis en capilares usando un secuenciador MegaBace 1000 (GE He-

althcare). La interpretación de los cromatogramas para la obtención del perfil genético de cada uno de los individuos se ha llevado a cabo con el programa MegaBACE Fragment Profiler 1.2.

Para caracterizar genéticamente las poblaciones y compararlas entre sí y con poblaciones del resto de la Península (aquellas presentadas en GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.* 2010), se han calculado: la heterocigosidad observada (H_e), el coeficiente de endogamia (F_{IS}), número de alelos (A) y riqueza alélica (R) por población y la diferenciación entre parejas de poblaciones (F_{ST}) con el programa Fstat 2.9.3.2 (GOUDET 2001). Los P-valores asociados a las estimaciones de F_{ST} se han obtenido mediante 4.500 permutaciones.

Como caso de estudio, se ha seleccionado el Parque Nacional de Cabañeros (para el que la accesibilidad de las poblaciones ha permitido ser muestreado con mayor intensidad), habiéndose realizado análisis adicionales encaminados a proporcionar un ejemplo de aplicación de la información genética para la gestión de las poblaciones. Por un lado, se ha empleado un método de detección de estructura genética espacial explícito, el análisis Bayesiano de agrupación (Bayesian clustering analysis) implementado por el programa Structure 2.1. (PRITCHARD & WEN 2004), para identificar la estructura genética espacial a escala del Parque. Por otro, con el programa Metapop (PÉREZ-FIGUEROA *et al.* 2008) se ha evaluado la contribución relativa de cada población/núcleo a la diversidad genética global del Parque. Esta contribución puede separarse en dos componentes: la diversidad dentro de la población y la diferenciación entre poblaciones (i.e. la singularidad de cada población). Finalmente, se ha estimado cuál debería ser la representación relativa de cada población (mediante realización de cruces controlados) en una población *ex-situ* (e.g. un huerto semillero o una plantación de conservación) en la cual se busque representar la diversidad máxima posible dentro del Parque minimizando el efecto de la endogamia especí-

fica de cada población. Estas informaciones pueden ser de interés a la hora de establecer núcleos prioritarios para la conservación *in-situ* y *ex-situ*, y para actuaciones de refuerzo de poblaciones naturales.

Secuenciación y análisis de genes adaptativos

Se estima que la ruta biosintética del taxol esté constituida por 19 reacciones principales, promovidas por sus enzimas correspondientes (CROTEAU *et al.* 2006). Entre los genes conocidos por su participación en la codificación de estas enzimas, se seleccionaron los cuatro siguientes (Figura 1): la taxadieno sintetasa (TXS), implicada en la ciclización del geranil geranil difostato a taxadieno, el primer paso de la ruta que produce la estructura específica de los taxanos; la taxadienol acetil transferasa (TAT), relacionada con la acetilación del taxadienol; la 2- α -hidroxitaxano 2-O-benzoiltransferasa (TBT), que produce la benzoilación del taxadienol en posición C2; y la 10-deacetil baccatin III-10-o-acetiltransferasa (DBAT), responsable de la acetilación de la 10-deacetil baccatina III a baccatina III, molécula precursora del taxol.

Estructura del gen: ■■ exon; — intron.

1. TXS, taxadieno sintetasa (3.780 pb)



2. TAT, taxadienol acetil transferasa (1.480 pb)



3. TBT, 2- α -hidroxitaxano 2-O-benzoiltransferasa (1.900 pb)



Figura 1. Estructura de los genes que intervienen en la ruta biosintética del taxol y secuenciados en este estudio. Los números indican el orden de participación en la ruta.

Figure 1. Structure of genes implied in the biosynthesis of taxol and sequenced in this study. Numbers refer to their order in the metabolic pathway.

Usando como referencia las secuencias de estos genes presentes en la base de datos pública del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se han diseñado cebadores específicos para cada uno de ellos. Para *TXS* y *DBAT* el diseño de cebadores se ha hecho sobre secuencias de *Taxus baccata*. Sin embargo, para *TAT* y *TBT* no hay secuencias de *T. baccata* disponibles en la base de datos. Por tanto, los cebadores para estos genes se han diseñado sobre las secuencias de consenso obtenidas del alineamiento de las secuencias de otras especies del género, generalmente limitadas a la parte codificante de cada gen (los exones). Las secuencias obtenidas durante el proceso de testado de los cebadores han hecho posible aclarar la composición interna de los genes en exones e intrones (Figura 1).

Todos los genes se secuenciaron de forma completa en 32 megagametofitos procedentes de los cuatro parques nacionales (ocho por parque, véase Tabla 1). Para cada gen y población se estimaron: S , el número de sitios polimórficos; π , la media de las diferencias nucleotídicas por pares de individuos o diversidad nucleotídica; H_d , la diversidad haplotípica; y diferentes tests de neutralidad (Tajima's D y Fay & Wu's H_n) por población y para el conjunto de poblaciones con el programa DNAsp 5.0 (LIBRADO & ROZAS 2009). D y H_n son estadísticos que describen diferentes aspectos del espectro de frecuencias nucleotídicas. Valores de estos estadísticos significativamente diferentes de cero indican una desviación de la distribución neutral esperada para una población de tamaño constante, que puede deberse a selección o a procesos demográficos históricos (i.e. cambios del tamaño efectivo poblacional). La diferenciación entre poblaciones (F_{ST}) se ha estimado con Arlequin 3.1 (EXCOFFIER & LISCHER 2010).

RESULTADOS

Demografía

Cuando se comparan las poblaciones de tejo de los parques nacionales con otras repartidas por toda la península Ibérica (Berganzo, Riba y Mayol, datos no publicados) es llamativo el

hecho de que todas (menos Bujaruelo) tienen efectivos poblacionales muy bajos (menos de 150 individuos adultos por núcleo en Picos de Europa y Ordesa y Monte Perdido, y menos de 50 en Sierra Nevada y Cabañeros). A partir de las medidas de DBH, se ha podido estimar la estructura demográfica de cada población. Para ello se ha considerado un crecimiento medio anual en diámetro de 2,86 mm/año, estimado a partir de observaciones sobre toda la Península. Como se observa en la Figura 2, en Cabañeros y Picos de Europa se encuentra una estructura relativamente regular, con todas las clases de edades homogéneamente distribuidas. Al contrario, en Ordesa y Monte Perdido y Sierra Nevada prevalecen las clases de edades más pequeñas. En general, estos dos tipos de estructura se pueden observar en otras poblaciones de tejo peninsulares. En las poblaciones con estructura más regular el bajo porcentaje de juveniles es debido, probablemente, al sobrepastoreo. Esto es lo que se observa en general en la Cordillera Cantábrica. En Picos de Europa de hecho, todos los juveniles muestreados se han encontrado en vallados de exclusión o completamente rodeados por otras especies arbustivas que ejercían una evidente función protectora. En contraste, una estructura dominada por juveniles, donde los adultos escasean, es el patrón más común en los Pirineos y áreas mediterráneas de la especie (excepto Cabañeros). La ausencia de individuos adultos refleja cuellos de botella recientes (en parte probablemente asociados a prácticas de explotación y manejo activas hasta hace pocos decenios). Donde el reclutamiento no está limitado, la recuperación posterior se evidencia por la presencia de muchos individuos juveniles. Llama la atención en Cabañeros encontrar muy poco reclutamiento efectivo. Esto podría deberse a que, entre las poblaciones mediterráneas, este enclave es uno de los que presenta condiciones más extremas para el tejo, siendo el único aporte hídrico los cursos de agua estacionales (mientras otras poblaciones mediterráneas pueden aprovechar el aporte de nieblas y precipitaciones costeras, e.g. en Penya-golosa y en el Montseny).

Otro aspecto demográfico que se ha tenido en cuenta para la caracterización de las poblaciones

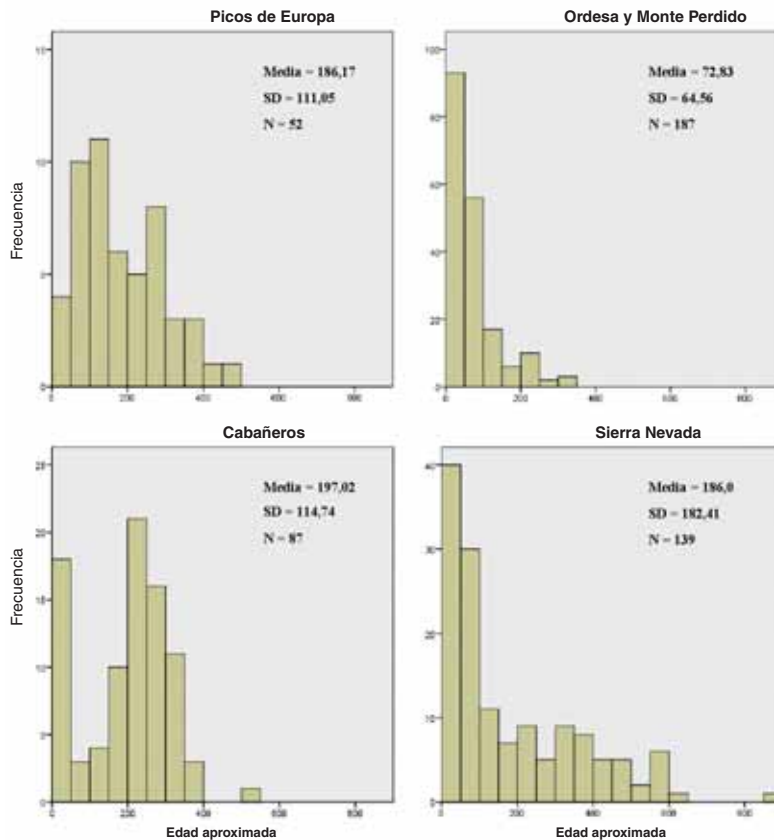


Figura 2. Estructura de edades en cada Parque Nacional, estimada a partir de las medidas de DBH y del crecimiento medio anual en diámetro estimado para la Península Ibérica (2,86 mm/año).

Figure 2. Age structure in each National Park, estimated using DBH values and a mean annual growth for the Iberian Peninsula of 2.86 mm/year above sea level.

es la proporción de sexos, que en poblaciones en equilibrio se espera sea del 50%. También en este aspecto se aprecia cierto desequilibrio en las poblaciones estudiadas dentro de la Red de Parques Nacionales. De hecho, el número de hembras es mayor que el de machos (media = 61%, desviación estandar = 18%). El desequilibrio es más evidente en Sierra Nevada y Cabañeros (67% y 19%), con el caso extremo de la población de El Chorro (Cabañeros) donde los únicos individuos adultos encontrados son hembras (aunque no se puede excluir la presencia de machos en las paredes rocosas no alcanzables del valle). Análisis preliminares parecen indicar una relación significativa entre la proporción relativas de sexos y

la temperatura (Berganzo, Riba y Mayol, datos no publicados).

Diversidad genética neutral

La diversidad genética expresada en términos de heterocigosidad observada (Tabla 1) varía entre $He = 0,41$ para la población de El Boquerón de Estena (Cabañeros) y $He = 0,75$ para Bujaruelo (Pirineos). Estos valores, relativamente bajos para una especie alógama como el tejo, junto con los valores positivos de F_{IS} (estimación del grado de endogamia de una población, significativamente diferente de cero para la mayoría de las pobla-

ciones), podrían reflejar el efecto de apareamiento entre individuos consanguíneos. Es interesante notar que las únicas poblaciones con valores no significativos de endogamia están en Sierra Nevada. El análisis de otras 3 poblaciones mayores en este Parque (en progreso) revelará si comparten el mismo patrón y contribuirá a esclarecer la dinámica poblacional del tejo en este enclave tan peculiar. En cuanto a número de alelos y riqueza alélica, se han encontrado valores más heterogéneos entre poblaciones. En Cabañeros y en Sierra Nevada se encuentran las poblaciones más pobres según estos índices. Entre las poblaciones de Picos de Europa y Ordesa y Monte Perdido, en general más diversas, destaca Pineta con valores de A y R netamente más bajos (Tabla 1). La diferenciación genética calculada con F_{ST} entre parejas de poblaciones (F_{ST}) indica que, en general, los núcleos analizados constituyen grupos de individuos genéticamente reconocibles, puesto que en todas las comparaciones menos una los valores de F_{ST} por pares son significativos (P -valor $\leq 0,001$).

Caso de estudio: el tejo en el Parque Nacional de Cabañeros: Los valores de F_{ST} indican que el núcleo del Estena es más parecido genéticamente a cada

uno de los otros tres núcleos dentro del Parque Nacional de Cabañeros que estos últimos entre sí (Tabla 2). El análisis Bayesiano de estructura espacial a escala más fina confirma los resultados de F_{ST} e indica que existe una estructuración geográfica clara (Figura 3). Los núcleos del Mierera, Boquerón y El Chorro son bien distinguibles entre sí y más homogéneos que el núcleo del Estena, dentro del cual se puede identificar cierta subestructura (Figura 3b). El análisis con Metapop en el Parque Nacional de Cabañeros (Tabla 3) deja evidente que la componente intrapoblacional es la que más contribuye a la diversidad genética total. La población de Estena es la que más contribuye (principalmente con su componente intrapoblacional), puesto que su exclusión conlleva la pérdida de diversidad global más alta (-4,3%). Las poblaciones de Mierera, El Chorro y El Boquerón contribuyen principalmente con la componente de diversidad interpoblacional a la diversidad total, siendo El Boquerón la que menos contribuye (i.e. si se excluye la diversidad genética total es mayor de un 1,5 %). Teniendo en consideración los valores relativamente altos de endogamia en todos los núcleos de tejo de Cabañeros (Tabla 2), para una colección ex-situ (semillas, plántulas o clones

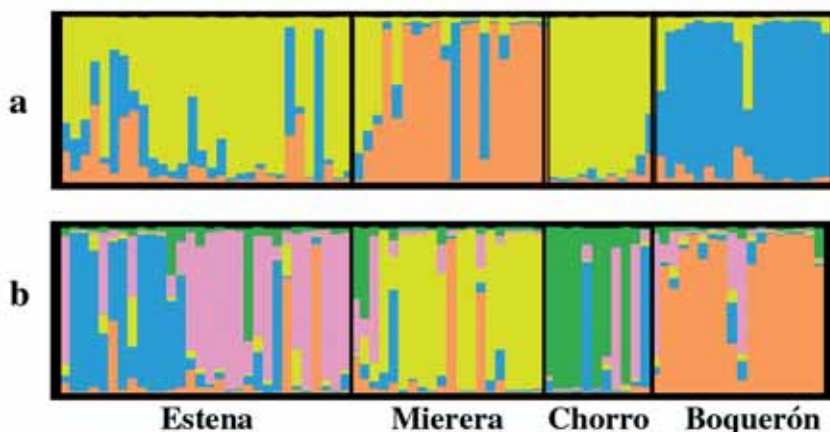


Figura 3. Distribución de los genotipos de loci microsatélites de las cuatro poblaciones de *Taxus baccata* presentes en el Parque Nacional de Cabañeros en 3 (a) y 5 (b) grupos de individuos genéticamente homogéneos según el programa Structure (véase Material y Métodos). Cada individuo está representado por una barra vertical y cada grupo genético por un color.

Figure 3. Distribution of microsatellite genotypes for the four *Taxus baccata* populations from Cabañeros' National Park in three (a) and five (b) groups genetically homogeneous, according to Structure software (see Materials and Methods). Each individual is represented by a vertical bar and each genetic pool by a colour.

Redemuña	Pineta	Añisclo	Bujaruelo	Maitena	Trevenque	Estena	Mierera	Chorro	Boquerón	Redemuña
Redemuña		0,091	0,047	0,037	0,085	0,137	0,066	0,084	0,079	0,081
Pineta	***		0,091	0,089	0,135	0,245	0,106	0,164	0,130	0,163
Añisclo	***	***		0,031	0,054	0,160	0,076	0,104	0,069	0,104
Bujaruelo	***	***	***		0,063	0,154	0,074	0,122	0,075	0,110
Maitena	***	***	***	***		0,148	0,134	0,197	0,142	0,131
Trevenque	***	***	***	***	***		0,184	0,253	0,213	0,172
Estena	***	***	***	***	***	***		0,069	0,065	0,065
Mierera	***	***	***	***	***	***	***		0,121	0,108
Chorro	***	***	**	***	***	***	**	***		0,137
Boquerón	***	***	***	***	***	***	***	***	***	

Tabla 2. Diferenciación genética entre parejas de poblaciones (F_{ST} , en el triángulo superior derecho) y nivel de significación correspondiente (triángulo inferior izquierdo). ** P-valor $\leq 0,01$; *** P-valor $\leq 0,001$.

Table 2. Pairwise genetic differentiation between populations (F_{ST} , upper diagonal) and its corresponding significance level (lower diagonal). ** P-value ≤ 0.01 . *** P-value ≤ 0.001 .

para repoblación) que represente todas las poblaciones del parque podría interesar maximizar la diversidad genética total tratando de minimizar el nivel de endogamia de cada núcleo. En este supuesto, en la Tabla 3 se muestra la contribución ideal de cada población a la colección. Se puede notar que no sería necesario incluir material del núcleo de El Boquerón para conseguir la población ex-situ con las características descritas.

Diversidad en los genes del taxol

Los resultados ponen en evidencia niveles de diversidad nucleotídica y haplotípica relativamente altos en los cuatro genes (Tabla 4). Aunque, como era de esperar, la mayoría de los polimorfismos son «silenciosos» (i.e. aquellos para los cuales el cambio de la base no tiene efectos sobre la proteína codificada, bien porque se

	Diversidad genética actual ^a			Diversidad tras quitar una población ^b			Población artificial ^c	
	En cada población	Entre poblaciones	Total	Total	En cada población	Entre poblaciones	Contribución (%)	
Estena	0,2724	0,0204	0,2928	0,6823	-4,2	1,7	-4,3	68,1
Mierera	0,1609	0,0183	0,1792	0,7052	0,9	-1,6	-0,9	18,7
Chorro	0,0855	0,0113	0,0969	0,7054	0,2	-1,7	-0,9	13,2
Boquerón	0,1319	0,0167	0,1486	0,7224	2,2	-1,4	1,5	0
Total	0,6507	0,0612	0,7116					

Tabla 3. Análisis de diversidad genética para las poblaciones del Parque Nacional de Cabañeros realizado con Metapop. ^a Distribución de la diversidad genética de cada población y del conjunto de poblaciones en sus componentes intrapoblacionales e interpopulacionales. ^b Efecto de la exclusión de cada población sobre la diversidad genética global. ^c Contribución relativa de cada población a una población artificial con la máxima diversidad genética (DG) posible, $DG_{tot} = 0,7263$.

Table 3. Genetic diversity analysis (Metapop) for the yew populations found in Cabañeros National Park. ^a Distribution of genetic diversity per population and for all populations, considering within and among population components. ^b Effect of removing one population at a time on the overall genetic diversity. ^c Relative contribution of each population to an artificial population of maximum genetic diversity (DG), with $DG_{tot} = 0.7263$.

	n	S	π	H_d	Tajima's D	Fay & Wu's H_n
Redemuña	8	31,5	0,007	0,738	0,551	0,17
Estena	7,8	29,5	0,007	0,705	0,436	-0,636
Trevenquillo	7,3	25,5	0,005	0,655	-0,650	-1,432**
Pineta	8	19,8	0,005	0,585	0,155	-2,015***
Media	7,8	26,6	0,006	0,671	0,123	-0,976

Tabla 4. Tamaño de muestra, diversidad nucleotídica (S , número de sitios polimórficos; π , media de las diferencias nucleotídicas por pares de individuos) y haplotípica (H_d) y tests de neutralidad (Tajima's D , Fay & Wu's H_n) por población y media para el conjunto de poblaciones. Valores medios para cuatro genes secuenciados (TXS , TAT , TBT y $DBAT$).

Table 4. Sample size, nucleotide diversity (S , number of polymorphic sites; π , average pairwise differences), haplotypic diversity (H_d) and neutrality tests (Tajima's D , Fay & Wu's H_n) by population and the overall average. Average values for four candidate genes (TXS , TAT , TBT and $DBAT$).

trata de bases situadas en los intrones, que son las zonas no codificantes de los genes, bien porque el cambio de base no supone un cambio de aminoácido dada la redundancia del código genético), hay un alto porcentaje (14% del total) de bases polimórficas no sinónimas (cuyo cambio tiene un efecto sobre la composición aminoacídica de la proteína y potencialmente sobre su estructura tridimensional).

La diversidad haplotípica (H_d , Tabla 3) y la distribución geográfica de los haplotipos de cada gen (no se muestra) indica que la población de Picos de Europa es la más diversa para los tres genes, mientras que la menos diversa es Pineta en el PN de Ordesa y Monte Perdido. Para el gen TXS se puede notar que todas las poblaciones poseen haplotipos exclusivos (no compartidos con otras poblaciones). La diferenciación entre poblaciones (F_{ST}) para todos los genes está en el rango del 12-15%. Tanto el patrón de distribución de los haplotipos como los valores relativamente altos de diferenciación interpoblacional sugieren que existe cierta estructuración espacial de la diversidad nucleotídica dentro de cada gen. La media entre genes de los estadísticos D y H_n no es significativamente diferente de cero para Redemuña y Estena. Sin embargo, H_n es significativamente negativo para Trevenquillo y Pineta, lo cual sugiere que la diversidad observada en los genes no pueda ser explicada por un simple escenario de tamaño poblacional constante y ausencia de selección. Entre las hipótesis alternativas que podrían explicar esos valores de H_n , los más probables serían

una reducción histórica de tamaño poblacional o un proceso de selección positiva todavía en curso. Análisis más detallados están en curso para inferir la historia demográfica de las poblaciones y testar las hipótesis mencionadas.

DISCUSIÓN

En este trabajo se han analizado las poblaciones de tejo incluidas en la Red de Parques Nacionales y se han comparado con otras poblaciones de la península Ibérica, para evaluar la contribución relativa de las poblaciones de tejo incluidas en los parques nacionales a la diversidad y a la conservación de la especie en España. Para ello, se han abordados tres aspectos principales: la estructura demográfica de las poblaciones, su diversidad genética neutral y la variabilidad en genes candidato, potencialmente adaptativos. La diferenciación genética tanto en los loci microsatélite como en los genes secuenciados indica que cada Parque tiene una composición genética que lo hace diferente de los demás y que merece ser conservado porque constituye una parte única del acervo genético de la especie no representada en otras áreas dentro (o fuera, ver GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.* 2010) de la Red. Además, las estimaciones demográficas y de variabilidad genética coinciden en poner de manifiesto que todas las poblaciones estudiadas tienen un fuerte riesgo de deriva genética (altos niveles de endogamia, baja diversidad genética). Ésta parece estar asociada principalmente a unos tamaños poblacionales muy re-

ducidos (menos de 150 ejemplares adultos por población) que podrían ser la consecuencia de cuellos de botella provocados por prácticas de manejo y explotación sostenidas y recurrentes en el pasado. La asimetría observada en la estructura de edades (ausencia de adultos o de juveniles) y en la proporción de sexos puede incrementar la estocasticidad demográfica y reducir el tamaño efectivo de la población aumentando, en consecuencia, el impacto de la deriva genética. Aunque, en general, en las especies arbóreas la longevidad y el potencial de migración podrían mitigar los efectos de la deriva genética consideramos que éste no es el caso para *Taxus baccata*, visto que los estudios disponibles sobre la variabilidad genética neutra en el Mediterráneo occidental indican un flujo génico muy restringido (elevado aislamiento) entre y dentro de poblaciones y una fuerte deriva genética poblacional (DUBREUIL *et al.* 2010; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.* 2010).

Sin embargo, generalizar es muy difícil porque cada parque nacional presenta una situación diferente. En particular, la diversidad genética es menor en las poblaciones de Sierra Nevada y Cabañeros, y se corresponde a tamaños poblacionales más pequeños. Estos resultados no sorprenden, ya que en las poblaciones del sur y este peninsular se han documentado los niveles de diversidad genética más bajos de la península Ibérica, probable consecuencia de un mayor impacto de los cuellos de botella y la deriva genética en las regiones sujetas a clima mediterráneo (DUBREUIL *et al.* 2010; y GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.* 2010). En Ordesa y Monte Perdido y Picos de Europa se encuentran las poblaciones con mayor diversidad genética y tamaño poblacional dentro de los parques nacionales, aunque la viabilidad de estas poblaciones se puede suponer a priori mucho menor que la de otras en las mismas áreas geográficas (e.g. Bujaruelo y Suevo, con miles de individuos adultos estimados). Es llamativo que en Pineta la diversidad genética sea comparativamente más baja que en el resto de poblaciones del norte peninsular. Sin embargo, la estructura de edades (casi todos los individuos tienen menos de 100 años) sugiere que el número de adultos que participan en la reproducción es muy bajo y, por consiguiente, también lo es el tamaño efectivo de la población, en comparación

con Añiselo (y Redemuña). Es interesante notar que en Pineta se observa también menor diversidad haplotípica en los genes del taxol en comparación con las otras poblaciones, aunque en este caso no sólo el tamaño efectivo poblacional reducido sino también un proceso de selección positiva reciente podría ser la causa.

Los resultados de este estudio sugieren algunas consideraciones de cara a la conservación y al manejo de las masas naturales de tejo en los parques nacionales. Teniendo en cuenta la diferenciación genética significativa entre poblaciones, parece conveniente manejarlas de forma separada dentro de cada parque nacional, evitando introducir material procedente de otros núcleos. Nuestras observaciones a lo largo de la península Ibérica sugieren que en muchos casos no parece haber problemas de reclutamiento (Pineta es un ejemplo claro de recuperación poblacional con gran número de juveniles), y cuando éstos se producen se deben principalmente a exceso de herbivoría (e.g. Redemuña en Picos de Europa), falta de dispersores y/o de plantas facilitadoras. Atenuar estos factores negativos podría ser el primer paso a seguir, por ejemplo instalando vallas de exclusión de herbívoros, favoreciendo otras especies con frutos carnosos que constituyen la dieta de las especies dispersoras, o en caso de reforzar las poblaciones, incorporar también plantas facilitadoras (GARCÍA *et al.* 2000; GARCÍA & OBESO 2003). A pesar de ser una especie con una tolerancia extraordinaria a la falta de luz, una cobertura excesivamente densa puede tener un efecto negativo sobre el crecimiento y reproducción del tejo. Estas condiciones son típicas de los bosques mediterráneos dominados por especies de hoja latifolia y perenne. En bosques caducifolios, el tejo puede tomar ventaja durante el invierno, cuando la humedad y la falta de hojas en el dosel arbóreo le favorecen. Su capacidad de fotosintetizar en niveles bajos de temperatura y luz le permiten ampliar el periodo fotosintéticamente activo (HAGENEDER 2007).

Por otro lado, el relativamente bajo nivel de diversidad genética observado en las poblaciones de los parques nacionales podría suponer una base genética insuficiente sobre la que la selec-

ción natural pueda actuar, perjudicando la adaptabilidad de las poblaciones de tejo en estos espacios naturales. En este sentido podría ser conveniente emprender acciones de refuerzo poblacional o de conservación ex-situ específicas. Para ello, nos parece interesante subrayar la utilidad de la información genética y de herramientas informáticas como el programa Metapop. Como caso de estudio, en este trabajo se han usado esas herramientas para evaluar cuál debería ser la contribución relativa de cada uno de los núcleos de tejo del Parque Nacional de Cabañeros a una población artificial (sea banco de germoplasma, sea producción de plántulas para la repoblación) donde se quiera conservar la máxima diversidad genética total y minimizar efectos de endogamia (tenido en cuenta el reducido número de individuos de cada núcleo). También, el método implementado en Metapop permite plantear condiciones diferentes para la población artificial, p.e. maximizar la diferenciación entre núcleos (a expensas del aumento de endogamia), que podrían ser más adecuadas en el contexto específico de otros parques, con poblaciones más extensas.

Por primera vez se está llevando a cabo un estudio poblacional de la diversidad nucleotídica en genes de la ruta del taxol, una molécula potencialmente implicada en la respuesta de la planta contra agentes patógenos y ampliamente utilizada en medicina como principio activo contra el cáncer. La distribución observada de la variabilidad entre genes y entre poblaciones sugiere que cada gen y cada población han tenido una historia evolutiva independiente determinada por procesos demográficos e históricos (e.g. cambios de tamaño poblacional) o selectivos. Determinar el tipo de proceso y su intensidad es el objeto de las investi-

gaciones en curso. Por último, la existencia de abundante variación genética en genes relacionados con el taxol, aspecto con posible aplicación en biomedicina, podría resultar en una mayor valoración del tejo y de sus poblaciones conservadas en la Red de Parques Nacionales.

Los conocimientos y las herramientas moleculares desarrollados en este estudio van a tener una aplicación directa para la conservación y el manejo de *T. baccata* en la Red de Parques Nacionales a corto plazo y, a la vez, sientan las bases para una investigación más extensa sobre la biología y la historia evolutiva de la especie y de sus congéneres. Finalmente, en los casos en los cuales haya problemas de reproducción (por ejemplo, por falta de producción de semillas), el material ya reproducido en los bancos clonales del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino en el marco de este proyecto puede ser de gran utilidad en eventuales acciones de refuerzo poblacional.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer el apoyo institucional proporcionado por los directores y conservadores de los parques nacionales involucrados en el desarrollo del proyecto (Cabañeros, Sierra Nevada, Picos de Europa y Ordesa y Monte Perdido), y en especial a Mario Ruiz y José Miguel Muñoz (P.N. Sierra Nevada), Nuria Díaz (P.N. Cabañeros) y Juan José Alonso (P.N. Picos de Europa) por su ayuda de campo en la localización y el muestreo de las poblaciones. Se agradece también la ayuda de Delphine Grivet y Miguel Navascués en los trabajos de campo y de Carmen García en los análisis moleculares en el laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CROTEAU, R., KETCHUM, R.E.B., LONG, R.M., KASPERA, R. & WILDUNG, M.R. 2006. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews* 5: 75-97.
- DUBREUIL, M., RIBA, M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C., VENDRAMIN, G.G., SEBASTIANI, F. & MAYOL, M. 2010. Genetic effects of chronic habitat fragmentation revisited: Strong genetic structure in a temperate tree, *Taxus baccata* (Taxaceae), with great dispersal capability. *American Journal of Botany* 97: 303-310.

- DUBREUIL, M., SEBASTIANI, F., MAYOL, M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C., RIBA, M. & VENDRAMIN, G.G. 2008. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Taxus baccata* L. *Conservation Genetics* 9: 1665-1668.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- GARCÍA, D. & OBESO, J.R. 2003. Facilitation by herbivore-mediated nurse plants in a treated tree, *Taxus baccata*: local effects and landscape level consistency. *Ecography* 26: 739-750.
- GARCÍA, D., ZAMORA, R., HÓDAR, J.A., GÓMEZ, J.M. & CASTRO, J. 2000. Yew (*Taxus baccata* L.) regeneration is facilitated by fleshy-fruited shrubs in Mediterranean environments. *Biological Conservation* 95: 31-38.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C., DUBREUIL, M., RIBA, M., VENDRAMIN, G.G., SEBASTIANI, F. & MAYOL, M. 2010. Spatial genetic structure of *Taxus baccata* L. in the western Mediterranean Basin: Past and present limits to gene movement over a broad geographic scale. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 805-815.
- GOUDET, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- HAGENEDER, F. 2007. *Yew: A history*. The History Press Ltd., Gloucestershire, UK.
- HILFIKER, K., GUGERLI, F., SCHÜTZ, J.-P., ROTACH, P. & HOLDEREGGER, R. 2004. Low RAPD variation and female-biased sex ratio indicate genetic drift in small populations of the dioecious conifer *Taxus baccata* in Switzerland. *Conservation Genetics* 5: 357-365.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- MIMAM. 2006. *Estrategia de conservación y uso sostenible de los recursos genéticos forestales*. DGB, Madrid, España.
- PÉREZ-FIGUEROA, A., SAURA, M., FERNÁNDEZ, J., TORO, M.A. & CABALLERO, A. 2008. METAPOPOP — A software for the management and analysis of subdivided populations in conservation programs. *Conservation Genetics* 10: 1097-1099.
- PRITCHARD, J. & WEN, W. 2004. *Documentation for Structure Software, version 2*. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.
- SAVOLAINEN, O., PYHÄJÄRVI, T. & KNÜRR, T. 2007. Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 595-619.
- SERRA, L. (editor) 2006. *El tejo en el Mediterráneo occidental. Jornadas Internacionales sobre el tejo y las tejas en el Mediterráneo Occidental*. Generalitat Valenciana, Valencia, España.
- THOMAS, P.A. & POLWART, A. 2003. *Taxus baccata* L. *Journal of Ecology* 91: 489-524.

