

Análisis de los recursos genéticos de *Pinus pinea* L. en España mediante microsatélites del cloroplasto

A. Gómez *, E. Aguiriano, R. Alía, M.A. Bueno

CIFOR-INIA
Ctra. de La Coruña, km 7; E-28040 Madrid, España
argomez@inia.es

RESUMEN

El análisis de los recursos genéticos de *Pinus pinea* L. se ha realizado mediante marcadores microsatélites del cloroplasto. Los patrones de diversidad genética y la riqueza alélica de 10 poblaciones españolas pertenecientes a diversas regiones de procedencia de la especie se han determinado con 9 cpSSRs. Seis de los *loci* analizados han resultado polimórficos y de su combinación para cada muestra se han definido 9 haplotipos diferentes.

La mayor parte de los haplotipos son comunes a varias poblaciones. Uno de ellos es común a todas, incluyendo a la población con una base genética menor, en la que todas las muestras analizadas son iguales.

El número de regiones polimórficas, el número de haplotipos y los valores de diversidad genética que se deducen de sus frecuencias muestran valores inferiores de variabilidad genética en el pino piñonero que en otros pinos mediterráneos. La diferenciación que existe entre las poblaciones estudiadas es baja ($R_{ST} = 3,81$) y la mayor parte de la variabilidad genética presente es intrapoblacional.

Los resultados obtenidos amplían el conocimiento de los recursos genéticos del pino piñonero en España, orientando los programas de conservación y mejora genética de la especie.

Palabras clave: diversidad genética, haplotipo, región polimórfica, cpSSR, *Pinus pinea*.

INTRODUCCIÓN

Pinus pinea L. es un pino mediterráneo cuyas mayores extensiones se localizan en la Península Ibérica. El pino piñonero se caracteriza por su aplicación como especie ornamental, así como del aprovechamiento que se realiza tanto de su madera como de sus frutos. Es precisamente el valor de la especie para el ser humano el responsable de su expan-

* Autor para correspondencia

Recibido: 6-4-01

Aceptado para su publicación: 28-8-01

sión geográfica y, consecuentemente, una de las cuestiones básicas al analizar los recursos genéticos del pino piñonero es la determinación de su origen espontáneo o antrópico.

Los registros antracológicos confirman la naturaleza espontánea del pino piñonero en el área occidental del Mediterráneo. Así algunos autores han localizado precisamente en esta zona el centro de origen de *Pinus pinea* (Agrimi y Ciancio, 1994); sin embargo, también existen teorías que explican este origen en la zona más oriental de la cuenca mediterránea (Quezel, 1980).

Los programas de mejora genética del pino piñonero se han basado en la evidente variabilidad que existe entre individuos en cuanto a la producción de piñas y piñones. Las diferencias en las condiciones ecológicas en las que se desarrolla la especie en España han servido de base para la delimitación de las Regiones de Procedencia de *Pinus pinea* L. (Prada *et al.*, 1997) y suponen una primera y evidente aproximación a la variabilidad del pino piñonero en España.

Escasos son todavía los estudios que se han realizado empleando marcadores moleculares, así dos poblaciones españolas han sido analizadas mediante isoenzimas (Fallour *et al.*, 1997). Los resultados del único *locus* estudiado mostraron que las diferencias entre las poblaciones eran superiores a la variabilidad intrapoblacional, lo que se explicaría como resultado de una divergencia temprana de las poblaciones o mediante el origen antrópico de las mismas.

Para incrementar la información sobre los recursos genéticos de la especie *P. pinea* en España se han seleccionado 10 poblaciones pertenecientes a diferentes regiones de procedencia y se ha procedido a la caracterización genética de 25 individuos de cada una de ellas mediante marcadores microsátélites de cloroplasto.

Los microsátélites (SSRs) constituyen un tipo de marcadores moleculares de ADN muy polimórficos (Tautz y Renz, 1984). Formados por repeticiones de secuencias pequeñas (6 o menos pares de bases) de ADN, los alelos de cada *locus* se diferencian en el número de repeticiones. La amplificación de estas secuencias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite detectar las diferencias en el tamaño de los fragmentos amplificados (Weber y May, 1989; Saghai-Marroof *et al.*, 1994).

En el genoma del cloroplasto del género *Pinus* se han detectado también secuencias constituidas por repeticiones de mononucleótidos (cpSSR) que han demostrado ser muy polimórficas (Powell *et al.*, 1995). Estas secuencias se han amplificado utilizando como cebadores parejas de secuencias homólogas a las que enmarcan el cpSSR (Vendramin *et al.*, 1996).

La combinación de los datos obtenidos de diversas regiones polimórficas en el genoma haploide del cloroplasto carente de recombinación y con herencia uniparental paterna, se convierte en un sistema de estudio que proporciona mucha información para el análisis de la diversidad genética de las poblaciones naturales. Estas regiones del genoma plastidial tan variables permiten los estudios de variabilidad genética a nivel intra e interpoblacional (Powell *et al.*, 1995; Cato y Richardson, 1996; Vendramin y Zieghenhagen, 1998; Bucci *et al.*, 1998; Gómez, 1998).

Los cpSSRs se han utilizado en el análisis de la diversidad genética de numerosas especies del género *Pinus*: *P. brutia* Ten. y *P. halepensis* Mill., *P. sylvestris* L. y *P. pinaster* Ait. (Morgante *et al.*, 1998; Gómez, 1998; Bucci *et al.*, 1998; Provan *et al.*, 1998; Vendramin *et al.*, 1998).

Los resultados que se desprenden de este trabajo pretenden mostrar la utilidad de los marcadores genéticos en la determinación de los recursos genéticos de *Pinus pinea* en

España, facilitando el establecimiento de los programas de mejora y de conservación de los citados recursos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de ADN

Las semillas se recolectaron de 25 árboles por población, en un total de 10 poblaciones naturales de *Pinus pinea* (Tabla 1) y se han conservado a 4 °C. El ADN total ha sido extraído mediante el protocolo de Doyle y Doyle (1990) de 24 embriones pregerminados de cada población.

Tabla 1

Localización geográfica y condiciones ecológicas de 10 poblaciones españolas de *Pinus pinea* analizadas mediante cpSSRs

Población	Latitud	Longitud	Altitud (m)
Tordesillas	41 30'N	4 57'W	680
Cadalso	40 17'N	4 31'W	800
Biar	38 38'N	0 45'W	900
Palafrugell	41 57'N	3 6'E	100
Garrovillas	39 41'N	6 35'W	400
Tarazona	39 17'N	1 55'W	700
Doñana	36 55'N	6 25'W	20
Hoyo de Pinares	40 30'N	4 31'W	800
Bogarra	38 32'N	2 12'W	800
Cartaya	37 15'N	7 7'W	60

Amplificación

Las amplificaciones de ADN mediante PCR se han realizado en un termociclador Perkin-Elmer 9600, según los parámetros y mezcla definidos por Vendramin *et al.* (1996). Con cada muestra de ADN se han amplificado nueve microsatélites del cloroplasto: PT110048 (A), PT15169 (B), PT26081 (C), PT3025 (D), PT36480 (E), PT41093 (F), PT71936 (G), PT87268 (H) y PT9400 (I).

Análisis del tamaño de los microsatélites

La visualización con luz ultravioleta de cada amplificación tras electroforesis en gel de agarosa al 1 %, tampón TAE 1x y tinción con bromuro de etidio se utilizó para comprobar la presencia de los fragmentos. Posteriormente se realizó el análisis de los mismos mediante el secuenciador automático de ADN, ABI-Prism (Perkin Elmer). El tamaño de

los fragmentos de amplificación se determinó mediante el programa GeneScan[®] 2.1 (Perkin-Elmer).

Diseño de los haplotipos y análisis de las poblaciones

El haplotipo de cada individuo ha sido definido como la combinación de los 9 fragmentos amplificados. En cada población se han calculado los haplotipos, el número de microsatélites polimórficos y el número efectivo de haplotipos.

A partir de las frecuencias de los haplotipos se ha calculado la diversidad genética según la ecuación:

$$h = n (1 - \sum p_i^2) / (n - 1)$$

Donde n es el número de muestras analizadas y p_i la frecuencia del haplotipo i .

La diferenciación entre las poblaciones se ha analizado mediante el programa *Arlequin* 1.1 (Excoffier, 1995). La distancia entre los haplotipos se ha calculado a partir de la suma de las diferencias en el número de repeticiones al cuadrado entre dos haplotipos:

$$d_{xy} = (a_{xi} - a_{yi})^2$$

Donde a_{xi} y a_{yi} son el número de repeticiones para el *locus* i th en los haplotipos x e y . De este modo se obtiene el análogo del coeficiente de diferenciación entre poblaciones, R_{ST} , de Slatkin (1995).

El análisis genético se ha realizado según el modelo de mutación por pasos, ya que se ha obtenido el tamaño del fragmento amplificado, número de unidades repetidas, para cada microsatélite y muestra individualmente. La distancia genética media en cada población, D^2 , ha sido la definida por Goldstein *et al.* (1995). Esta distancia está basada en las diferencias entre el número de unidades repetidas en cada microsatélite, considerando el ADN del cloroplasto como un único *locus*.

Las diferencias en la longitud en cada microsatélite entre parejas de individuos se han calculado y utilizado para construir histogramas en cada población.

RESULTADOS

Seis de los 9 cpSSR *loci* analizados son polimórficos y presentan entre dos y tres alelos (Tabla 2). A partir de las frecuencias de los alelos se puede ver cómo en la mayoría de los *loci* aparece una distribución unimodal y los alelos difieren en 1 par de bases (pb) entre ellos, como corresponde con el modelo de mutación por pasos (SMM) supuesto en el cálculo de la D^2 de Goldstein *et al.* (1995). El único cpSSR donde esto no se cumple es en el cpSSR-E, donde la diferencia entre los dos alelos, de 160 y 162 pb, es de 2 pb, pero este fenómeno podría deberse sólo a que no se ha detectado el alelo intermedio de 161 pb.

Utilizando los seis *loci* polimórficos se han encontrado 9 haplotipos diferentes en las 240 muestras analizadas (Tabla 2); de éstos, 4 (44 %) son únicos, es decir, se han detectado sólo en una muestra. Esto significa que menos del 2 % (4 de 240) de las muestras analizadas presentan un genotipo único. El porcentaje de haplotipos únicos en una población

Tabla 2
Haplotipos detectados mediante 9 cpSSRs en poblaciones españolas de *P. pinea*

Haplotipo	Variantes de CpSSRs (tamaños en pares de bases)								
	N.º	A	B	C	D	E	F	G	H
1	80	111	143	145	160	83	81	103	140
2	79	111	143	144	162	83	81	103	140
3	79	111	143	145	162	82	81	103	140
4	80	111	143	144	162	83	81	103	140
5	80	111	143	145	162	83	81	103	139
6	79	111	143	145	162	83	81	103	140
7	80	111	143	145	162	83	81	103	140
8	80	111	144	145	162	83	81	103	139
9	80	111	143	145	162	83	81	103	141

llega a ser del 33 % en las poblaciones de Tordesillas y Cadalso y del 25 % en el caso de la población de Doñana, mientras en el resto de las poblaciones no existen haplotipos únicos.

En la Tabla 3 se muestra el número de haplotipos detectados en cada población que varía entre un único haplotipo detectado en la población de Tarazona y los seis de la población de Cadalso. El número efectivo de haplotipos varía entre 1 (Tarazona) y 2,8 (Palafrugell). La diversidad genética intrapoblacional basada en la frecuencia de los haplotipos varía entre 0 para la población de Tarazona y 0,67 en la población de Palafrugell. La diversidad haplotípica calculada en el total de las poblaciones es 0,57.

Tabla 3
Haplotipos, Número de regiones polimórficas (P), Distancia (D²), Diversidad genética (h) y número efectivo de haplotipos (Ne) detectados en 10 poblaciones españolas analizadas de *P. pinea* mediante cpSSRs.

Población	Haplotipos	P	h	D ²	Ne
Tordesillas	1-5-7	2	0,24	0,053	1,29
Cadalso	2-3-4-5-6-7	4	0,54	0,120	2,09
Bihar	4-6-7	3	0,16	0,018	1,19
Doñana	4-5-7-8	3	0,54	0,115	2,09
Garrovillas	4-5-7-9	2	0,24	0,028	1,30
Tarazona	7	0	0,00	0,000	1,00
Palafrugell	4-5-7-9	2	0,67	0,114	2,80
Hoyo de Pinares	5-7	1	0,52	0,053	1,99
Bogarra	5-7-9	1	0,62	0,164	2,46
Cartaya	5-7-9	1	0,59	0,083	2,32

El análisis molecular de la varianza (AMOVA) se ha utilizado para hallar las componentes intra e interpoblacional de la varianza (Tabla 4). Considerando los datos generados por los 9 cpSSR analizados, la mayoría de la variación (96,19 %) se ha detectado dentro de las poblaciones, mientras que una pequeña proporción se debe a diferencias entre las poblaciones (3,81 %).

Tabla 4
Análisis molecular de la varianza (AMOVA) basado en cpSSRs

Fuente de variación	Grados de libertad	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Intrapoblacional	231	0,29377	96,19
Entre poblaciones	9	0.01165	3,81
Total	240	0,30542	

La distribución de las diferencias en el número de repeticiones para cada microsatélite entre individuos se muestran en la Figura 1. Las poblaciones de Doñana, Palafrugell, Cadalso, Cartaya y Hoyo de Pinares muestran una distribución muy similar, diferente a la que muestran Tarazona, Garrovillas, Biar y Tordesillas. La distribución de la población de Bogarra es diferente a la de todas las demás.

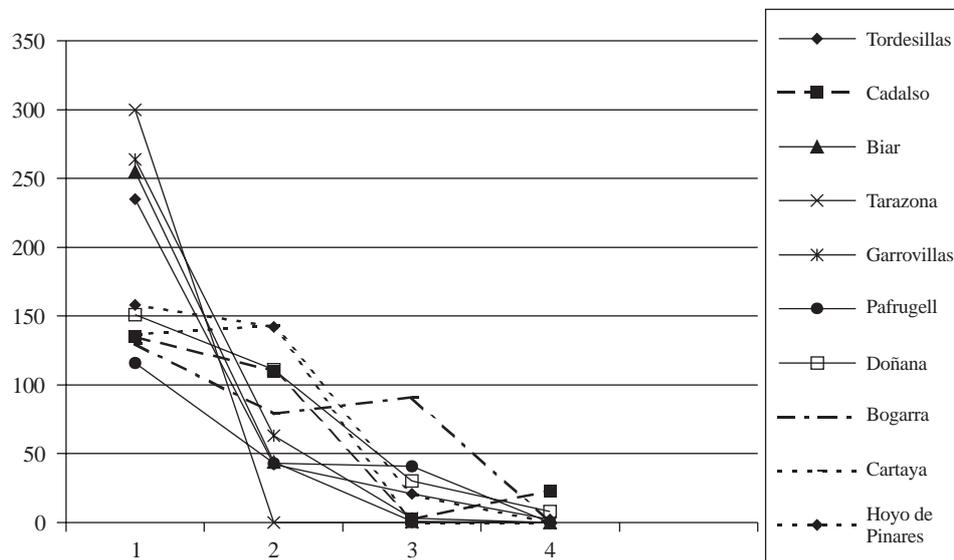


Fig. 1.—Distribución de las diferencias en longitud entre pares de haplotipos detectados mediante cpSSR en 10 poblaciones españolas de *P. pinea*

DISCUSIÓN

Seis de los nueve cpSSRs amplificados han resultado polimórficos; este número de regiones polimórficas es inferior al detectado en otras especies como *P. halepensis* (Gómez, 1998) y *P. pinaster* (Vendramin *et al.* 1998). Sin embargo, el número de variantes que se han detectado para cada cpSSR (2, a excepción del cpSSR-I, que presenta 3 variantes) es similar al que aparece en los ya citados trabajos de *P. halepensis* y *P. pinaster*. Estos números de alelos por *locus* son muy inferiores a los de los microsatélites nucleares en *Pinaceae* (Smith and Devey, 1994; Echt *et al.*, 1998; van de Ven and McNicol, 1996; Pfeiffer *et al.*, 1997), mostrando la evidente conservación del genoma plastidial comparado con el genoma nuclear.

Estas diferencias entre el número de regiones polimórficas son las que resultan en la definición de tan sólo 9 haplotipos en 10 poblaciones (240 muestras) de *P. pinea* frente a los 28 presentes en 6 poblaciones (144 muestras) de *P. halepensis* (Gómez 1998) o los 34 detectados en 10 poblaciones (240 muestras) de *P. pinaster* (Vendramin *et al.*, 1998).

El nivel de diversidad genética intrapoblacional detectado en *P. pinea*, empleando otras técnicas de análisis como son las isoenzimas, es similar entre todas las poblaciones analizadas (datos no mostrados). El uso de los cpSSRs muestra, sin embargo, diferencias entre las poblaciones ($h = 0\%$ en Tarazona hasta $h = 67\%$ en Palafrugell). Se explica este fenómeno considerando que el tamaño efectivo de las poblaciones es la mitad en el caso del genoma del cloroplasto (haploide) que en el genoma nuclear que se analiza mediante las isoenzimas y que, por lo tanto, los factores que incidan en el tamaño de la población, el flujo del polen, etc., afectan de forma más importante al genoma plastidial.

Los menores valores de diversidad detectados en la población de Tarazona indican una reducida base genética, siendo además el único haplotipo presente en esta población el haplotipo que es común a todas las demás poblaciones.

El coeficiente de variación interpoblacional R_{ST} , basado en los haplotipos detectados mediante cpSSRs, muestra un valor muy bajo de diferenciación entre poblaciones, 3,81 %, típico de la mayoría de las coníferas analizadas (Hamrick y Godt, 1989). El análisis de la distribución de los haplotipos en las poblaciones muestra algunos que sólo están presentes en una de ellas, pero, al estar representados por una única muestra, no se pueden considerar como diferenciadores de las mismas, sino que este resultado se puede deber al tamaño de muestra analizado.

El hecho de que sólo el 3,81 % de la variación genética total se atribuya a la diferencia entre las poblaciones se corresponde con lo esperado en el caso de las coníferas, que son especies alógamas con una elevada dispersión de polen responsable de la herencia del cloroplasto, aunque también podría ser el resultado de la intervención humana en la dispersión de la especie. Las actividades forestales que se lleven a cabo en la actualidad en el pino piñonero, debido a estas escasas diferencias detectadas, van a suponer un impacto ligero en la estructura genética.

Los resultados que se muestran de la variación genética existente en el pino piñonero, mediante estos marcadores, son superiores a los que cabría esperar si se considera la introducción y una fuerte expansión por parte del hombre (Franco *et al.*, 2000) y apoyan el origen natural de la especie en la Península Ibérica, como ya señalan restos arqueológicos cuya antigüedad se remonta incluso al período Tardiglaciario (Metcalf, 1958; Rubio, 1988; Badal, 1991; Prada *et al.*, 1996; Gil, 1999).

En el establecimiento de programas de conservación y uso sostenible de los recursos genéticos se deben considerar dos aspectos de la variación genética: las diferencias genéticas medidas como similitudes o distancias en la composición alélica y que se pueden emplear para identificar poblaciones, y la diversidad genética que se basa en las frecuencias de los alelos. La mayor o menor trascendencia que pueden tener ambas medidas, composición alélica y diversidad genética, varía según el objetivo del estudio. Cuando éste es la evaluación de los recursos genéticos de una especie, las medidas basadas en la composición alélica son más importantes (Ferguson *et al.*, 1998). De este modo, las estrategias de conservación de recursos genéticos que tiendan a incluir poblaciones con una mayor contribución a la riqueza alélica son, *a priori*, las más adecuadas.

La premisa en el momento de seleccionar las poblaciones más adecuadas para la conservación de los recursos genéticos de una especie forestal como el pino piñonero, sometida a cambios medioambientales durante la vida de los individuos, debe ser la conservación de la mayor diversidad posible (Hattemer, 1995). Los marcadores moleculares son una herramienta muy útil en relacionar las diferencias genéticas con la adaptación al medio ambiente (Marmioli *et al.*, 1999); de este modo se deben considerar prioritariamente las poblaciones que permitan conservar todos los alelos detectados en el estudio (Cadalso, Palafrugell, Tordesillas y Doñana), maximizando así la diversidad genética disponible.

Sin embargo, las diferencias ecológicas que han servido de base para la determinación de las Regiones de Procedencia hacen imprescindible la conservación de poblaciones que pertenecen a estas diversas áreas eco-geográficas, así como de aquellas que posean un valor histórico-cultural especial.

Se ha demostrado con este trabajo la utilidad de los polimorfismos de los cpSSRs en el análisis de la diversidad del genoma del cloroplasto de *P. pinea*. Cuando estos marcadores se estudian junto a marcadores nucleares, se puede obtener una información muy valiosa sobre la historia y la estructura genética de esta especie. Estos conocimientos deben considerarse en los programas de conservación y mejora genética del pino piñonero, pero sin perder la perspectiva que supone el uso de otros parámetros, razones estéticas, históricas, culturales y ecológicas de las poblaciones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos UE-FAIR CT95-0097. «Adaptation and selection of Mediterranean *Pinus* and *Cedrus* for sustainable afforestation of marginal lands» y SC99-017 «Modelos selvícolas para el aprovechamiento sostenible de las masas de *Pinus pinea*». Agradecemos la colaboración del Dr. G.G. Vendramin en la realización de este trabajo.

SUMMARY

***Pinus pinea* L. Spanish genetics resources characterization by chloroplast microsatellite markers**

Gene conservation analysis in *Pinus pinea* L. was performed by chloroplast microsatellite markers. Genetic diversity and allelic richness of 10 Spanish populations belonging to diverse origin regions were determined using genetic variation at 9 cpSSR *loci*. Six amplified *loci* have been polymorphic. The variants detected at the cpSSR regions combined into 9 different haplotypes.

Most haplotypes are in common among populations. One haplotype has been detected in all populations included the population with the most reduced genetic base, in which all the samples showed the same haplotype.

Number of polymorphic regions, number of haplotypes and genetic diversity index deduced from haplotype frequencies show lower genetic diversity in stone pine than in other Mediterranean *Pinus*. Differentiation between the studied populations is low ($R_{ST} = 3.81$) and most of the detected genetic diversity is due to the within population component.

The results obtained increases the knowledge of genetic resources of *Pinus pinea* in Spain assessing genetic breeding and conservation programs.

Key words: genetic diversity, haplotype, polymorphic region, cpSSR, *Pinus pinea*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIMI M., CIANCIO O., 1994. Le pin pignon (*Pinus pinea* L.). Monographie. Provisional proceedings, 16.º CFFSA/CEF/CFPO. meeting, Silva Mediterranea, FAO, Larnaca, Cyprus, 115 pp.
- BADAL, E., 1991. La vegetación durante el paleolítico superior en el País Valenciano y Andalucía. Resultados antracológicos. En Arqueología medioambiental a través de macrorrestos vegetales, C.S.I.C./Ayto. Madrid.
- BUCCI G., ANZIDEI M., MADAGHIELE A., VENDRAMIN G.G., 1998. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in *halepensis*-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. *Molecular Ecology* 7, 1633-1643.
- CATO S.A., RICHARDSON T.E., 1996. Inter- and intraspecific polymorphism at chloroplast SSR *loci* and the inheritance of plastids in *Pinus radiata* Don. *Theor. Appl. Genet.* 93, 587-592.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
- ECHT C.S., DEVERNO L.L., ANZIDEI M., VENDRAMIN G.G., 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology*, 7(3), 307-316.
- EXCOFFIER L., 1995. Arlequin, Versión 1.1.
- FALLOUR D., FADY B., LEFEVRE F., 1997. Study on isozyme variation in *Pinus pinea* L.: Evidence for low polymorphism. *Silvae Genetica* 46, 4, 201-207.
- FERGUSON M.E., FOR-LLOYD B.V., ROBERTSON L.D., MAXTED N., NENBURY H.J., 1998. Mapping the geographical distribution of genetic variation in the genus *Lens* for the enhanced conservation of plant genetic diversity. *Molecular Ecology*, 7, 1743-1755.
- FRANCO F., GÓMEZ-MANZANEQUE F., MALDONADO J., MORLA C., POSTIGO J.M., 2000. El papel de los pinares en la vegetación holocena de la Península Ibérica. *Ecología*, 14, 61-77.
- GIL, L., 1999. La transformación histórica del paisaje: la permanencia y la extinción del pino piñonero. Separata de «Los montes y su historia, una perspectiva política, económica y social», Servicio de Publicaciones de la Universidad de Huelva.
- GOLDSTEIN D.B., LINARES A.R., CAVALLI-SFORZA L.L., FELDMAN M.W., 1995. An evaluation of Genetic Distances for use with microsatellite *loci*. *Genetics* 139, 463-471.
- GÓMEZ A., 1998. Análisis de la variabilidad genética de poblaciones españolas de *Pinus halepensis* mediante marcadores RAPD y microsatélites del cloroplasto. Tesis Doctoral. ETSI Agrónomos Universidad Politécnica de Madrid. Directores: Dra. M.ª Angeles Bueno Pérez y Dr. Ricardo Alía Miranda, 162 pp.
- HAMRICK J.L., GODT M.J.W., 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Differentiation patterns in higher plants (Urbanska K. ed.) Academic press, N.Y. pp. 53-67.
- HATTEMER H.H., 1995. Concepts and requirements in the conservation of forest genetic resources. *Forest Genetics* 2(3), 125-134.
- MARMIROLI N., MAESTRI E., LIVIERO L., MASSARI A., MALCEVSCI A., MONCIARDINI P., 1999. Application of genomics is assessing biodiversity in wild and cultivated barley. *Molecular Ecology* 8, S95-S106.
- METCALF C. R., 1958. Gorham's Cave: Report on the plants remains. *Bulletin of the Institute of Archaeology*, 4, 219.
- MORGANTE M., FELICE N., VENDRAMIN G.G., 1998. Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halepensis* reveals a dramatic genetic bottleneck. In: Molecular tools for screening biodiversity. Edited by Angela Karp. Peter, G. Isaac and David S. Ingram, Published in 1998 by Chapman and Hall, London, ISBN 0 412 63830 4. Pp. 407-412.

- PRADA M.A., GORDO J., DE MIGUEL J., MUTKE S., CATALÁN-BACHILLER G., IGLESIAS S., GIL L., 1997. Las regiones de procedencia de *Pinus pinea* en España. ISBN: 84-8014-193-X. Ed. Organismo Autónomo Parques Nacionales. España.
- PFEIFFER A., OLIVIERI A.M., MORGANTE M., 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 40, 411-419.
- POWELL W., MORGANTE M., MCDEVITT R., VENDRAMIN G.G., RAFALSKI J.A., 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetic of pines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7759-7763.
- POWELL W., MORGANTE M., ANDRE C., MCNICOL J.W., MACHRAY G.C., DOYLE J.J., TINGEY S.V., RAFALSKI J.A., 1995. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology*, 5(9), 1023-1029.
- PROVAN J., SORANZO N., WILSON N.J., MCNICOL J.W., FORREST G.I., COTTRELL J., POWELL W., 1998. Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 265(1407), 1697-1705.
- QUEZEL P., 1980. Biogéographie et ecologie des conifères méditerranéen. In: Pesson: Act. Ecol. Forest. Geuthier-Villars, Paris: 201-255.
- RUBIO I., 1988. La economía de subsistencia en el Neolítico hispano. En P. López (Coor.) El Neolítico en España. Cátedra, Madrid, pp. 337-417.
- SAGHAI-MAROOF M.A., BIYASHEV R.M., YANG G.P., ZHANG Q., ALLARD R.W., 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations and populations dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5466-5470.
- SLATKIN M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139, 457-462.
- SMITH D.N., DEVEY M.E., 1994. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome* 37, 977-983.
- TAUTZ D., RENZ M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 12, 4127-4137.
- VAN DE VEN W.T.G., MCNICOL R.J., 1996. Microsatellites as DNA markers in Sitka spruce. *Theor. Appl. Genet.* 93, 613-617.
- VENDRAMIN G.G., LELLI L., ROSSI P., MORGANTE M., 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology* 5, 111-1-111-4.
- VENDRAMIN G.G., ANZIDEI M., MADAGHIELE A., BUCCI G., 1998. Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theor. Appl. Genet.* 97, 446-563.
- VENDRAMIN G.G., ZIEGENHAGEN B., 1998. Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*. *Genome* 40, 857-864.
- WEBER J.L., MAY P.E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 388-396.