

Raúl de la Mata Pombo

---

ALTERNATIVAS  
DE MEJORA DE  
*PINUS PINASTER*  
AIT.

EN LA ZONA  
INTERIOR  
DE GALICIA

Tesis doctoral  
Año MMXII  
Universidade de Vigo





UNIVERSIDADE  
DE VIGO

**Alternativas de mejora de *Pinus  
pinaster* Ait. en la zona interior de  
Galicia**

**Raúl de la Mata Pombo**

**Tesis Doctoral**

Departamento de Ingeniería de los Recursos Naturales y Medioambiente

Universidade de Vigo

2012



# Alternativas de mejora de *Pinus pinaster* Ait. en la zona interior de Galicia

Memoria presentada por RAÚL DE LA MATA POMBO para optar al grado de Doctor por la Universidade de Vigo.

Raúl de la Mata Pombo

Aspirante al Grado de Doctor

Los trabajos que han dado lugar a esta memoria de tesis doctoral han sido realizados en el Centro de Investigaciones Forestales de Lourizán (Xunta de Galicia) y en la Misión Biológica de Galicia (CSIC), bajo la dirección del Dr. Rafael Zas Arregui y la Dra. Esther Merlo Sánchez.



RAFAEL ZAS ARREGUI, Doctor Ingeniero de Montes y Científico Titular en la Misión Biológica de Galicia (CSIC), y ESTHER MERLO SÁNCHEZ, Doctora Ingeniera de Montes, informan que esta memoria ha sido realizada bajo nuestra dirección y que tiene la entidad suficiente para constituir un trabajo de Tesis Doctoral, y por tanto autorizamos su presentación ante la Comisión Académica del Programa de Doctorado de Tecnología Medioambiental y la Comisión de Estudios de Posgrado, con la aprobación del Dr. JOSÉ CARLOS SOUTO OTERO profesor titular del Departamento de Ingeniería de los Recursos Naturales y Medioambiente de la Universidade de Vigo y tutor de la presente tesis.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Pontevedra a 26 de junio de 2012.

VºBº de los directores de tesis

VºBº del tutor de la tesis

Dr. Rafael Zas Arregui

Dr. José Carlos Souto Otero

Dra. Esther Merlo Sánchez

Los resultados de esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

*Producción principal*

**Raúl de la Mata**, Rafael Zas (2010) Performance of maritime pine Spanish Mediterranean provenances at young ages in a transitional region between Atlantic and Mediterranean climates in NW Spain. *Silvae Genetica* 59 (1):8-17

**Raúl de la Mata**, Rafael Zas (2010) Transferring Atlantic maritime pine improved material to a region with marked Mediterranean influence in inland NW Spain: a likelihood-base approach on spatially adjusted field data. *European Journal of Forest Research* 129 (4):645-658

**Raúl de la Mata**, Jordi Voltas, Rafael Zas (2012) Phenotypic plasticity and climatic adaptation in an Atlantic maritime pine breeding population. *Annals of Forest Science* 69 (4):477-487

**Raúl de la Mata**, Esther Merlo, Rafael Zas (2012) Genetic variation and phenotypic plasticity to water stress of Atlantic and Mediterranean origins and their hybrids. Manuscrito en preparación.

*Otras publicaciones derivadas de la tesis:*

**Raúl de la Mata**, Rafael Zas, Esther Merlo (2008) Control de la autocorrelación espacial mediante diseños experimentales y métodos de análisis espacial en ensayos de progenie de *Pinus pinaster*. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 24:33-38

Rafael Zas, Patricia Martínez, **Raúl de la Mata** (2008) Autocorrelación espacial: un problema común...mente olvidado. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 24:139-146

**Raúl de la Mata**, Rafael Zas, Esther Merlo (2008) Eficiencia estadística de diseños experimentales de bloques incompletos para el análisis de variables espacialmente autocorrelacionadas. En: Maestre F, Escudero A, Bonet A (eds) *Introducción al análisis espacial de datos en ecología y ciencias ambientales: métodos y aplicaciones*. Universidad Rey Juan Carlos, Asociación Española de Ecología Terrestre y Caja de Ahorros del Mediterráneo, Madrid, Spain, pp 762-777

**Raúl de la Mata**, Rafael Zas, Esther Merlo, Luis Sampedro (2009) Alternativas de mejora de *Pinus pinaster* Ait. para el interior de Galicia. En: SECF-Junta de Castilla y León (eds) *5º Congreso Forestal Español. Montes y sociedad: Saber qué hacer*, Ávila, 21-25 Septiembre de 2009. pp 1-14

Esta tesis ha sido financiada con proyectos concedidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA RTA07-100-00, INIA RTA05-173 y AGL2010-18724,) y la Xunta de Galicia (PGIDIT02PXIC50201P). Raúl de la Mata Pombo ha estado financiado por dos becas de la Xunta de Galicia para la formación en tareas investigadoras en el Centro de Investigaciones Forestales de Lourizán (Xunta de Galicia).

## AGRADECIMIENTOS

La elaboración de una Tesis Doctoral y la mayor parte de las actividades relacionadas con la investigación no son tareas individuales, sino que se desarrollan socialmente y sus resultados benefician también a la sociedad en su conjunto. Es fácil entender entonces que el presente trabajo no sea fruto exclusivamente del esfuerzo del autor, ni siquiera si a su nombre se añaden los de sus directores de Tesis. Han sido varias las personas que han puesto una parte importante para la conclusión de este documento, a quienes me gustaría agradecerles para que también sean visibles.

Mi primer agradecimiento es al personal del Centro de investigaciones Forestales de Lourizán, donde Josefa Fernández López me dio la oportunidad de dedicarme a la investigación en el Departamento de Producción Forestal. El arduo trabajo de medición de las parcelas me llevó a compartir el día a día lejos de casa con personas como Emilio Gestido, Manuel Cerviño y Ricardo Ferradás. Para criar las plantas que luego nos ofrecieron valiosos datos conté con la inapreciable ayuda de Lucía, Maribel, Marisa y Araceli. Además Pablo Xesteira y 'Txema' Mendaña fueron quienes me ayudaron eficazmente a gestionar la complicada logística que a veces entraña investigar en el seno de un programa de mejora genética forestal. A Pilar Furones le agradezco su compañía en las habitualmente solitarias tardes en Lourizán, y a Sara Varela el ser una fantástica pupila.

Mi segunda etapa me llevó a la Misión Biológica de Galicia, donde siempre tuve una estupenda acogida, especialmente le agradezco a su directora Rosana Malvar por facilitar que pudiera acabar esta Tesis, algo que valoro profundamente.

Ha sido de especial valor el apoyo científico del Doctor Jordi Voltas, que nos permitió resolver algunas de las cuestiones más relevantes de este trabajo; además el Doctor Trebor Butcher suministró el material del programa de mejora de Australia Occidental y su ayuda fue fundamental para interpretar su comportamiento.

A los doctores Vicente Rozas y Luis Sampetro les agradezco que me sirvieran durante estos años de referencia científica y me ayudaran a sentirme arropado.

Muy especialmente quiero reconocer la labor de mis dos directores de Tesis, Rafael Zas y Esther Merlo. De ellos surgió la semilla conceptual de la Tesis, de ellos he aprendido mis primeras nociones sobre tantos temas y con ellos mantendré siempre un vínculo personal y científico profundo, como padres científicos.

Por último, ha sido mi gente quienes me han aportado el ánimo y las ganas en el momento clave, justamente cuando éstos faltaban. Les agradezco a mis padres Agustín y M<sup>a</sup> Jesús, a mi madrina Loli, a mi hermano Diego, a mi hermano aunque de otros padres Gonzalo y a mi pareja Ana su apoyo personal incondicional. Ellos han sido la ayuda imprescindible y sin duda la parte que no podría haber fallado para conseguir completar este documento.

---

## ÍNDICE

---

<b>0. RESUMEN .....</b>	<b>10</b>
<b>0. SUMMARY .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>18</b>
1.1. Los bosques .....	18
1.2. La mejora genética forestal y los programas de mejora .....	19
1.3. La especie: <i>Pinus pinaster</i> Ait.....	25
1.4. La mejora genética de <i>Pinus pinaster</i> .....	30
1.5. El programa de mejora de <i>Pinus pinaster</i> en Galicia .....	32
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3. CAPÍTULO I. Comportamiento de procedencias de <i>Pinus pinaster</i> del centro de España en la zona interior de Galicia .....</b>	<b>44</b>
3.1. Introducción.....	44
3.2. Material y métodos .....	45
3.3. Resultados.....	48
3.4. Discusión .....	52
<b>4. CAPÍTULO II. Transferencia de material Atlántico mejorado de <i>Pinus pinaster</i> a la zona interior de Galicia.....</b>	<b>60</b>
4.1. Introducción.....	60
4.2. Material y métodos .....	61
4.3. Resultados.....	68
4.4. Discusión .....	76
<b>5. CAPÍTULO III Redefiniendo las áreas de mejora de <i>Pinus pinaster</i> en Galicia mediante análisis retrospectivo de los patrones de interacción G×E: agrupación óptima de ambientes.....</b>	<b>84</b>
5.1. Introducción.....	84

5.2. Material y métodos .....	88
5.3. Resultados.....	94
5.4. Discusión .....	104
5.5. Conclusiones.....	112
<b>6. CAPÍTULO IV Variación genética y plasticidad a la sequía de procedencias Atlánticas, Mediterráneas y sus híbridos .....</b>	<b>116</b>
6.1. Introducción.....	116
6.2. Material y métodos .....	119
6.3. Resultados.....	126
6.4. Discusión .....	133
6.5. Conclusiones.....	141
<b>7. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>144</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>154</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>158</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>179</b>
10.1. ANEXO 1. Parcelas de ensayo y material genético .....	182
10.2. ANEXO 2. Procedimientos estadísticos.....	234
10.3. ANEXO 3. Publicaciones .....	251

## 0. RESUMEN

El pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) se distribuye por una amplia variedad de ambientes en el SO de Europa, desde los típicos climas Mediterráneos hasta áreas en Francia y en el Norte de España con marcada influencia oceánica. Dentro de su área de distribución natural las poblaciones aparecen altamente diferenciadas, mostrando adaptaciones locales a las condiciones ambientales. Ambos climas se encuentran en Galicia, donde se pueden distinguir dos regiones bioclimáticas: la costera y la interior. La región interior es un área fronteriza donde el clima Atlántico de la costa se encuentra con el típico clima Mediterráneo de España Central. En comparación con la costa Atlántica, el clima en esta área tiene una pronunciada sequía estival, baja precipitación anual, y más alta oscilación térmica. A pesar de la alta productividad y la importancia ecológica del Pino marítimo en el interior de Galicia, no existe material forestal de reproducción (MFR) de calidad para esta región, y frecuentemente se utiliza material de otros orígenes con dudosa adaptación. La búsqueda de material alternativo con buen comportamiento en la región interior se ha convertido en un objetivo fundamental con el fin de proporcionar de manera inmediata fuentes de semilla aptas para la plantación en esta área.

Como primera aproximación, se analizó el comportamiento de seis procedencias Mediterráneas en tres sitios del interior de Galicia siete años después de la plantación. Las procedencias de los climas más suaves crecieron más rápido pero mostraron formas del fuste de peor calidad. La interacción *procedencia* × *sitio* fue débil, aunque se observaron cambios de ranking significativos en el sitio más seco. De entre las procedencias ensayadas, Serranía de Cuenca mostró buen crecimiento y forma del fuste aceptable en todos los sitios, siendo un material recomendado para ser usado en la región. El origen de Albarracín mostró también buenos resultados, con excelentes formas del fuste y crecimiento aceptable, especialmente en el sitio más seco. El análisis espacial combinado nos permitió comparar las procedencias ensayadas con materiales de los programas de mejora de Galicia-Costa (GC) y Australia Occidental (WA) plantados en los ensayos de progenie adyacentes. Aunque las diferencias fueron pequeñas, el material Atlántico de ambos programas se comportó ligeramente mejor que las procedencias Mediterráneas, suponiendo un material alternativo recomendado para su uso en repoblaciones en esta región climática de transición.

En base al buen comportamiento del material costero en la región interior, y con el objetivo de aprovechar la ganancia genética de los programas de mejora de GC y WA, se analizó el comportamiento en condiciones de campo de distintas familias de ambos programas. Se evaluó el crecimiento, la calidad del fuste y la ramosidad en cinco ensayos de progenie instalados siguiendo un gradiente costa-interior. Se usaron análisis basados en la verosimilitud para estimar las correlaciones genéticas entre ambientes y para probar estadísticamente las causas y patrones de la interacción *genotipo* × *ambiente*. Los resultados indican que no existen suficientes evidencias para subdividir Galicia en las dos actuales áreas de mejora. Los patrones de interacción no revelan diferencias significativas entre zonas, y existen interacciones con cambios de ranking tanto entre como dentro de ellas. En los sitios del interior, los materiales mejorados Atlánticos superaron claramente a los lotes no mejorados probados en los ensayos de procedencias adyacentes, sugiriendo la posibilidad de usar los materiales mejorados tanto de GC como de WA como fuentes de MFR para repoblación en el interior de Galicia. De los dos, el material de WA mostró excelentes resultados para todos los caracteres por lo que debe considerarse la inclusión de este material en el programa de mejora de *P. pinaster* para Galicia.

En base a los resultados anteriores, nos planteamos integrar la información de la colección completa de ensayos genéticos pertenecientes al programa de mejora de GC. Analizamos entonces los patrones de plasticidad a través de regiones en la población de mejora del programa para evaluar la idoneidad de las actuales áreas de mejora e indagar sobre la respuesta de este material al cambio climático. Se evaluó la altura total tres y ocho años después de la plantación en 16 ensayos establecidos tanto en la costa como en el interior de Galicia. Se analizó la agrupación de ambientes con similar comportamiento genotípico, la sensibilidad del material a los factores climáticos y la estabilidad familiar. Se encontró una considerable variación de la plasticidad entre familias, y se detectaron interacciones *genotipo* × *ambiente* dentro y entre regiones. No fue posible una regionalización alternativa de Galicia en áreas de comportamiento genotípico estable. Se encontró además que el régimen de frío fue el principal factor que moduló las respuestas fenotípicas a la variación de las condiciones ambientales. Los resultados sugieren que la delimitación previa en dos áreas de mejora no está fundamentada, y sugieren un escaso efecto del cambio climático hacia condiciones más Mediterráneas en el éxito biológico de la población.

Como última línea de trabajo, se evaluó la respuesta a la sequía bajo condiciones controladas de diferentes orígenes de la especie y sus híbridos, seleccionados en un gradiente de Mediterraneidad moderada. El análisis de la plasticidad fenotípica de las variables de crecimiento y de distribución de biomasa nos permitió distinguir ciertos patrones adaptativos comunes y otros divergentes entre poblaciones. De manera general, las plantas sometidas a estrés, más que redirigir sus recursos fotosintéticos hacia las estructuras adecuadas para afrontar la sequía, podrían estar mostrando una estrategia conservadora reduciendo su inversión en crecimiento y retrasando el desarrollo ontogénico. Además el reparto de la biomasa estuvo sometido a fuerte control genético en base a un patrón geográfico con divergencia poblacional que segregó a las poblaciones en dos grupos principales: i) poblaciones de carácter Atlántico que mostraron mayor inversión en estructuras de crecimiento, y ii) poblaciones de carácter Mediterráneo que mostraron estrategias de resistencia al estrés hídrico priorizando la inversión en raíces y una distribución de recursos más conservadora. Se detectó además dominancia en el comportamiento de tipo Mediterráneo en los híbridos ensayados, ya que las poblaciones pertenecieron al grupo Mediterráneo en cuanto uno de sus parentales tuvo este origen. Ninguno de los híbridos mostró un crecimiento en altura superior al de la población de mejora de Galicia-Costa, y únicamente la población Soria-Burgos  $\times$  Carballiño tuvo un crecimiento adecuado mientras que mantuvo un patrón de distribución de biomasa más adaptado a la sequía, lo que podría indicar su adecuación para su uso en la zona interior de Galicia.

**Palabras clave:** Adaptación ambiental, programa de mejora, plasticidad fenotípica, interacción *genotipo*  $\times$  *ambiente*, interacción con cambios de ranking, estabilidad ambiental, área de mejora, fuente semillera, recursos genéticos, ensayo de progenies, ensayo de procedencias, *Pinus pinaster*, cambio climático, análisis espacial, correlación genética, modelos mixtos, estimación REML, matriz de varianzas-covarianzas, híbridos interprocedencia, distribución de biomasa, resistencia a la sequía.

## 0. SUMMARY

Maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) occurs naturally in a wide variety of sites around SW Europe, from typical Mediterranean climates to areas in Northern Spain and France with a strong Atlantic influence. Within its distribution range populations are strongly differentiated, showing strong adaptations to local environmental conditions. Both climates encounter each other in Galicia, where two bioclimatic regions can be differentiated: coastal and inland. The inland region is a boundary area where the Atlantic climate of the coastal region meets with the typical Mediterranean climate of Central Spain. Compared to the Atlantic coast, climate in this area has a pronounced summer drought, lower annual precipitation, and higher annual thermal oscillation. Despite the high productivity and ecological importance of maritime pine in inland Galicia, local forest reproductive material (FRM) of high genetic quality is not available for this area. Seed sources originating elsewhere and of unknown adaptation to this area are commonly used for reforestation. Looking for alternative material that performs well in the inland region has become a primary objective in order to provide immediate seed sources suitable for planting in this area.

As a first approximation, we analyzed the performance of six Mediterranean provenances in three sites in the interior of Galicia seven year after planting. Provenances coming from the mildest climates grew faster but showed inferior stem form. The *provenance*  $\times$  *site* interaction was weak, although some significant provenance rank changes were observed in the driest site. Among the tested provenances, Serranía de Cuenca showed good growth in all sites and acceptable stem form, being thus a potential recommended material for using in the area. The Albarracín origin also showed good results, with excellent stem form and acceptable growth, especially in the driest site. A combined spatial analysis allowed us to compare the tested provenances with improved materials from Coastal Galicia (GC) and Western Australia (WA) breeding programs planted in adjacent progeny trials. Although the differences were small, the Atlantic material of both breeding programs performed slightly better than the Mediterranean provenances, and represents a recommended alternative material for use in reforestation in this transitional climate region.

Based on the good performance of the coastal material in the inland region, and with the aim of exploiting the genetic gains of both breeding programmes, we analyzed

the performance in field conditions of improved families of the GC and WA breeding programmes. Growth, stem characteristics and branch habit were evaluated in five progeny trials established following a coastal-to-inland gradient. Likelihood-based analyses were used to estimate genetic correlations between environments and to test statistically for causes and patterns of *genotype × environment* interaction. The results indicated that there is not sufficient evidence to subdivide Galicia into the two current deployment areas. Interaction patterns do not reveal significant differences between zones, and crossover interactions for height growth appeared both between and within areas. On the inland sites, the Atlantic improved materials clearly outperformed unimproved seedlots tested in adjacent provenance trials, suggesting the feasibility of using both the CG and WA breeding materials as sources of FRM for reforestation in inland Galicia. Of the two, the WA material showed excellent results for all traits. The inclusion of this material into the Galician maritime pine breeding population should be strongly considered.

Based on the results above, and aiming to better understand the interaction patterns we integrated the whole collection of genetic trials of the GC breeding program. We analyse then plasticity patterns across regions in the GC breeding population to assess the suitability of current breeding areas and how genetic material will likely respond to future climate. Total height three and eight years after plantation was assessed in 16 trials established along the coast and in inner Galicia. Clustering of environments with similar genotypic performance, family sensitivities to climatic factors and stability analyses were performed. Sizeable genetic variation in plasticity was found among families, and crossover *genotype × environment* interactions were detected within and between regions. Therefore, it was unfeasible to regionalize Galicia into alternative areas of stable genotypic performance. Only the cold regime was found to noticeably underlie the array of phenotypic responses to changing environmental conditions. Results suggest that previous delimitation in two breeding areas is pointless, and indicate reduced effects of a changing climate towards Mediterranean conditions on decreasing population fitness.

As a final line of research, we assessed the drought response under controlled conditions of different origins of the species and their synthetic hybrids. The analysis of phenotypic plasticity of growth and biomass allocation traits allowed us distinguishing common and divergent patterns between populations. In general, plants under stress, rather than redirect their resources towards suitable structures to deal with drought such

roots, they could be showing a conservative strategy by reducing their growth investment and delaying the ontogenic progress. Besides, biomass allocation was under strong genetic control following a clear geographic pattern with population divergence that segregated populations into two main groups: i) Atlantic populations that showed increased investment in growth structures, and ii) Mediterranean populations that showed water stress tolerance strategies prioritizing root investment and a more conservative resource allocation pattern. Dominance of the Mediterranean-like behaviour was also detected in the tested hybrids, since populations were grouped within the Mediterranean group whenever one of its parents had this origin. Neither of the hybrids showed a height growth higher than the GC breeding population, and only Soria-Burgos  $\times$  Carballiño population had proper growth while maintaining a pattern of biomass allocation more adapted to drought, which may indicate its suitability for use in inland Galicia.

**Keywords:** Environmental adaptation, breeding program, *Pinus pinaster*, phenotypic plasticity, *genotype*  $\times$  *environment* interaction, crossover interaction, environmental stability, breeding area, seed origin, genetic resources, progeny trial, provenance trial, climate change, spatial analysis, genetic correlation, mixed models, REML estimation, variance-covariance matrix, interprovenance hybrids, biomass allocation, drought resistance.



---

# **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

## **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **1.1. Los bosques**

Los bosques pueden definirse como comunidades de plantas caracterizadas por una alta densidad de árboles, y constituyen algunos de los ecosistemas más importantes de la biosfera Terrestre. Los bosques albergan alrededor del 80% de la actual biodiversidad terrestre del planeta, funcionan como hábitats animales, modulan los flujos hidrológicos, conservan el suelo evitando la desertificación y suponen reservorios estables de grandes cantidades de carbono debido a sus altos ratios de biomasa por unidad de superficie. Pero al mismo tiempo suponen una importante fuente de recursos de la que viven alrededor de 1.600 M de personas, contribuyendo significativamente al desarrollo humano.

Su importancia ha sido ampliamente reconocida por la comunidad internacional, y tanto el año 1985 como el 2011 fueron declarados por la ONU (Organización de las Naciones Unidas) como años internacionales de los bosques, en un esfuerzo para que los estados miembros tomaran conciencia sobre la necesidad de protegerlos.

Los bosques ocupaban en 2005 una superficie cercana a los 4.000 M de ha, el 30% de las tierras emergidas del planeta. Se estima, sin embargo, que en los últimos 8.000 años se habría perdido cerca del 40 % de la superficie original, debido sobre todo a la explotación maderera y a la sustitución del bosque por cultivos intensivos (WRI 1997). En los cinco primeros años del siglo XXI la pérdida neta de superficie forestal mundial alcanzó los 7,3 M ha al año (0,18% de la superficie de bosques del planeta) (FAO 2009). Esta cifra es inferior a la de décadas anteriores (en la década de 1980 se perdían 15,5 M ha anualmente, mientras que en los 90 la tasa anual de deforestación se estimó en 8,8 M ha) lo que significa que se ha venido frenando de manera progresiva el ritmo de deforestación debido fundamentalmente a los bosques plantados.

El consumo mundial anual de madera en 2005 fue aproximadamente de 3.500 M m<sup>3</sup>, el 53% de este volumen fue utilizado como combustible, fundamentalmente en países subdesarrollados, los cuales poseen la mayoría de las reservas boscosas de especies latifoliadas, y el 47% restante fue utilizado por la industria, predominando la utilización de madera de coníferas. La principal fuente de abastecimiento de madera del mundo siguen siendo los bosques naturales. Sin embargo los bosques plantados que ocupaban en 2005 una superficie de 270 M ha (el 7% del total de la superficie forestal)

produjeron ese año unos 1.200 M m<sup>3</sup> de madera, equivalente al 34% del consumo total y al 73% del industrial (FAO 2009).

Las proyecciones para los próximos años esperan que debido al crecimiento demográfico y el incremento del PIB (producto interior bruto) de los países Asiáticos, Africanos y de Europa del Este, se produzca un aumento en la demanda de productos forestales, que crecerá un 10% más que la población. Se espera además un mayor uso de la madera como combustible alternativo, debido a la escalada de los precios de los combustibles fósiles y al aumento de la preocupación por el cambio climático. Los cálculos proyectados para el año 2050 indican que la demanda mundial de madera en rollo industrial podría llegar hasta los 3.100 M m<sup>3</sup> anuales (Carle y Holmgren 2009).

Las restricciones ambientales asumidas por los países desarrollados hacen que la tendencia sea asegurar el incremento de las necesidades de abastecimiento mediante bosques implantados con especies de rápido crecimiento. Será la superficie de plantaciones la que tendrá que crecer para satisfacer por completo la demanda. El área de las plantaciones se cuadruplicó entre 1990 y 2000, y se prevé que esta tendencia se mantendrá sobre todo en los países en desarrollo. Una previsión para 2030 indica que el área de bosques plantados puede incrementarse para entonces un 30%, y un 50% su producción, teniendo en cuenta que se espera una mayor productividad (Carle y Holmgren 2009).

Por lo tanto la importancia de los bosques plantados parece que aumentará en las próximas décadas de forma significativa al ser la madera una materia prima vital para la industria y fuente cada vez más competitiva de bioenergía, y por la importancia de los bosques para reducir los efectos negativos del cambio climático, ya que la plantación de bosques está considerada como una de las opciones para el secuestro de carbono en la mitigación del Calentamiento Global, dentro del denominado Mecanismo de Desarrollo Limpio (uno de los tres Mecanismos de Flexibilización que establece el Protocolo de Kyoto). Además los bosques procedentes de plantaciones podrán también ayudar de forma indirecta a reducir la pérdida de bosques naturales.

## **1.2. La mejora genética forestal y los programas de mejora**

Aunque el ser humano viene manejando los bosques desde que aprendió a utilizar el fuego, hace pocos siglos que asentó las primeras bases para el uso sostenible de sus recursos, abandonando la concepción de cazador-recolector. Y sólo ha sido en los

últimos 60 años cuando la gestión de las masas arbóreas se ha convertido en intensiva mediante las plantaciones forestales, que buscan principalmente la producción de madera de calidad en grandes cantidades en el periodo más corto y a un costo razonable. Desde ese momento se comienzan a aplicar en los árboles forestales técnicas de mejora genética como las que ya se venían aplicando con los cultivos agrícolas y con la producción animal, buscando el mismo objetivo: la segregación de individuos con unas características fenotípicas deseables (lo que ha constituido una herramienta fundamental en el desarrollo humano y que en cierto modo ya estaba presente desde los primeros procesos de domesticación del hombre primitivo). En las últimas décadas la mejora genética forestal ha desempeñado una función cada vez más importante en el logro de los objetivos que persiguen las plantaciones forestales, aumentando la productividad de los bosques que tienen este fin.

La mejora genética forestal comparte los fundamentos de cualquier otro tipo de mejora vegetal, sin embargo tiene unas peculiaridades que le confieren ciertas ventajas y también limitaciones con respecto a la mejora de los cultivos agrícolas:

*Ventajas:* fácil conservación del material mejorado por tiempo indefinido mediante la multiplicación vegetativa (huertos semilleros, bancos clonales, etc.); la alta variabilidad genética y su elevada estructuración geográfica existentes en los rodales naturales, que han sufrido cambios menos importantes por la acción del hombre.

*Limitaciones:* el gran tamaño de los árboles dificulta su medición y manipulación, además exige grandes superficies para la conservación de los recursos genéticos; el problema del tiempo al manejar árboles, debido a su maduración tardía, la lentitud de crecimiento y en algunos casos a las malas correlaciones juvenil-adulto; gran variabilidad ambiental en los terrenos forestales que reduce la correlación genotipo-fenotipo; desconocimiento de los requerimientos futuros del sector forestal, lo que obliga a ser precavidos en la toma de decisiones debido al tiempo que transcurre hasta la observación de sus consecuencias.

Los programas de mejora genética forestal surgen ante la necesidad de intensificar los procesos de mejora, organizando sus actividades en base a una estrategia que busca la maximización de la ganancia genética, en el menor tiempo y con el mínimo coste. El primer paso en el establecimiento de un programa de mejora es la

identificación de los objetivos de mejora. En la mayor parte de los programas el objetivo principal ha sido la producción de madera, aunque en ciertos casos puntuales fue la producción de otro tipo de recursos forestales (frutos, resinas, conservación de suelos, etc.). Una vez identificados los objetivos del programa, es necesario decidir qué caracteres deben ser mejorados para alcanzarlos, teniendo en cuenta siempre que cuantos más caracteres se incluyan en el programa de mejora más difícil resultarán sus actividades. Las primeras etapas de los programas de mejora más importantes en el mundo se han enfocado en caracteres ligados al crecimiento y a la calidad de las formas de los árboles. Sin embargo, a medida que los programas han ido avanzando, otros caracteres como la resistencia a plagas y enfermedades, las características estructurales de la madera o la adaptación a efectos ambientales críticos han tomado un papel relevante para dar respuesta a las cambiantes necesidades de los mercados, a los nuevos problemas fitosanitarios y a las amenazas del cambio global.

Todos los programas incipientes de mejora genética forestal constan de algún modo de las siguientes etapas: determinación de las especies y fuentes geográficas dentro de una especie que deben utilizarse en un área determinada; determinación de la cantidad, tipo y causas de la variabilidad dentro de la especie; agrupamiento de las cualidades deseadas en individuos mejorados para obtener árboles que combinen estas características; producción a gran escala de los individuos mejorados para utilizarlos en plantaciones forestales; y desarrollo y mantenimiento de una población con una base genética lo bastante amplia como para satisfacer las necesidades de las generaciones avanzadas (Zobel y Talbert 1988).

Los programas de mejora se basan por lo tanto en la combinación de caracteres de interés de diferentes parentales mediante cruces entre ellos, seguido de la selección de los árboles con mejor comportamiento dentro de su progenie, que se cruzan entre sí para iniciar de nuevo el proceso. Este procedimiento cíclico de selección se denomina *selección recurrente* en el que cada ciclo completo supone cierta ganancia genética del material mejorado debido a la acumulación de alelos deseables en las sucesivas generaciones de mejora (Figura 1.1). Este es un proceso a *largo plazo* que puede ser repetido durante un número muy alto de generaciones siempre que la base genética de la población de mejora sea lo suficientemente amplia como para no sufrir fenómenos de endogamia.

En la práctica el primer paso es determinar la especie y la fuente o fuentes geográficas dentro de ésta que sean adecuadas para cumplir los objetivos previstos en el

área de mejora, utilizando para ello los resultados de los ensayos de comparación de especies y de procedencias. Una vez localizado el origen más conveniente se procede a la composición de una población de mejora mediante la selección de *árboles plus* o *árboles superiores* dentro de sus masas naturales o naturalizadas. Los árboles plus son clonados mediante reproducción vegetativa (estaquillado, injerto, acodo, etc...) para la instalación de huertos semilleros clonales donde realizar los cruces entre parentales y obtener una producción comercial de semilla, y que se denominan *huertos semilleros de primera generación*. Con el objetivo principal de estimar el valor genético de los árboles superiores se evalúa la progenie de cada uno mediante la instalación de *ensayos de progenies* con un adecuado diseño experimental, pudiendo tratarse de medios hermanos o hermanos completos según sean conocidos uno o los dos parentales. En base a los resultados de estos ensayos se seleccionan los mejores descendientes para la instalación de *huertos semilleros de segunda generación*, comenzando de nuevo el ciclo. Cuando el comportamiento de las progenies se utiliza para seleccionar a los mejores parentales para la instalación de nuevos huertos semilleros o el aclarado genético de los de primera generación, a éstos se les denomina *huertos semilleros depurados* o *de generación 1,5*.



**Fig. 1.1** Esquema de selección recurrente. Ciclo de mejora.

El manejo de la población de mejora es fundamental en la consecución de los objetivos establecidos, manteniendo la ganancia obtenida tras cada ciclo de selección y evitando los indeseables efectos de la endogamia. Con este fin se ha comenzado a aplicar recientemente la subdivisión de la población de mejora en múltiples poblaciones

(multiple population breeding system, MPBS (Namkoong et al. 1980)), cada una de las cuales podría tener distintos objetivos de mejora según el carácter a mejorar y/o las condiciones ambientales de uso, confiriendo una gran flexibilidad frente a la incertidumbre de los cambios ambientales, selvícolas y de las prioridades del programa. Otras estrategias con esta misma finalidad son el establecimiento de sublíneas para evitar la endogamia, forzando los cruzamientos entre individuos no emparentados, o la determinación de un núcleo de mejora (“*nucleus breeding*”) donde se aplican procesos de selección más intensivos y se obtienen las mayores ganancias, mientras se mantiene una población de base que garantice la conservación genética a largo plazo.

Como procedimiento alternativo frente a la mejora basada en cruzamientos o propagación sexual se puede destacar la propagación vegetativa, parte fundamental de la selvicultura clonal. Esta metodología está asociada fundamentalmente a estrategias a *corto plazo*, tratándose de un procedimiento de mejora intensivo durante un número pequeño de generaciones con el fin de identificar clones con clara superioridad para reproducirlos vegetativamente. Desde una perspectiva genética, la propagación vegetativa implica la explotación no sólo de la varianza genética aditiva sino también de aquella no aditiva. Algunos de los bosques más productivos del mundo en base a los géneros *Eucalyptus*, *Populus* y *Salix* utilizan selvicultura clonal, que se ha visto potenciada con el auge de las plantaciones para fines energéticos. Sin embargo el uso masivo de la selvicultura clonal comporta ciertos riesgos debido a la drástica reducción de la variabilidad genética de las masas plantadas, que podría tener dramáticas consecuencias frente a los cambios ambientales y a la amenaza de plagas y enfermedades.

Otra vía para la mejora genética de especies forestales es la hibridación entre especies o entre procedencias de la misma especie con el objetivo de producir nuevas combinaciones de genes que de otra manera no ocurrirían de manera natural debido al aislamiento geográfico. El desarrollo de híbridos permite al genetista reunir en un individuo las características convenientes de los progenitores y seleccionar fenotipos a la medida que no existen en la naturaleza. El objetivo más habitual de los procesos de hibridación es la obtención de individuos con requerimientos ambientales convenientes, como la resistencia al frío, a la sequía, a las deficiencias de nutrientes o a plagas y enfermedades. La producción masiva de semilla híbrida entre especies sólo ha tenido éxito en algunos casos como el del híbrido *Pinus rigida* × *Pinus taeda* en Corea del Sur. Por este motivo los híbridos se han utilizado con más frecuencia en especies

relativamente fáciles de reproducir vegetativamente, como álamos, sauces y eucaliptos, asociados a un tipo de selvicultura clonal.

Especie	Región	Superficie plantada (ha)
<i>Cunningamia lanceolata</i>	China	15.393.000
<i>Eucalyptus spp.</i>	Brasil	3.678.000
<i>Eucalyptus globulus</i>	Australia	442.000
<i>Eucalyptus grandis</i>	Sudáfrica	335.000
<i>Eucalyptus nitens</i>	Sudáfrica	231.000
<i>Larix spp.</i>	Europa	2.030.000
<i>Picea abies</i>	Europa	5.506.000
<i>Pinus caribaea</i> y <i>Pinus elliottii</i>	Brasil	1.879.000
<i>Pinus elliottii</i>	EE.UU.	2.733.000
	Sudáfrica	207.000
<i>Pinus massoniana</i>	China	4.964.000
<i>Pinus patula</i>	Sudáfrica	359.000
<i>Pinus radiata</i>	Australia y N. Zelanda	2.408.000
	Chile	1.879.000
<i>Pinus resinosa</i>	EE.UU.	682.000
<i>Pinus sylvestris</i>	Europa	8.962.000
<i>Pinus taeda</i>	EE.UU.	11.090.000
<i>Populus spp.</i>	China	3.220.000

**Tabla 1.1** Programas de mejora genética forestal con mayor superficie de plantación en diferentes regiones del mundo. La superficie plantada es la declarada por los respectivos países a la FAO y no distingue entre material mejorado y no mejorados ni el nivel de mejora. Algunos países Europeos no han aportado datos por lo que las cifras para la región podrían ser mayores que las mostradas (FAO 2006).

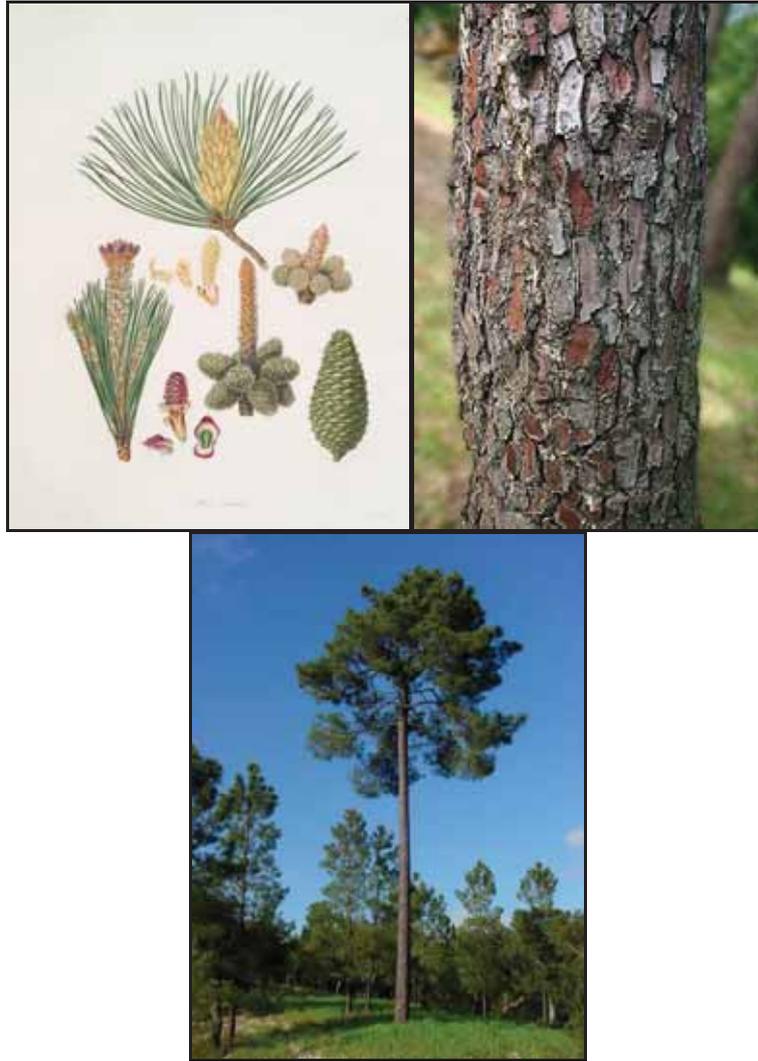
Los primeros programas de mejora genética forestal en el mundo se iniciaron en la década de 1950. En la actualidad y debido a la creciente importancia de las plantaciones forestales y al mayor desarrollo científico y tecnológico a escala global, son muchos los programas de mejora en curso para un número muy grande de especies con interés productivo. Prácticamente todos los países desarrollados o en vías de desarrollo y que tienen territorios adecuados para la producción forestal han iniciado actividades de mejora para sus especies de interés. De manera generalizada se puede decir que los mayores esfuerzos de mejora están altamente correlacionados con las grandes plantaciones operativas de vocación productiva, situación en la que las inversiones en mejora genética resultan más rentables. El 28% de la superficie de los bosques plantados en el mundo corresponde a especies del género *Pinus*, llegando al 37% si añadimos la superficie ocupada por los géneros *Eucalyptus* y *Acacia* (Carle y

Holmgren 2009), y es con estas especies con las que se han desarrollado los principales programas de mejora a escala mundial (Tabla 1.1).

### **1.3. La especie: *Pinus pinaster* Ait.**

El pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) es una especie de conífera perteneciente a la familia de las *Pinaceas* dentro del orden de las *Coniferales*. Dentro del género de los Pinos, que comprende más de 100 especies, se encuadra en el subgénero caracterizado por tener dos haces fibrovasculares por acícula (*Diploxylon*), en la sección *Pinea* de pinos de carácter Mediterráneo (*P. brutia*, *P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. roxburghii*, etc.).

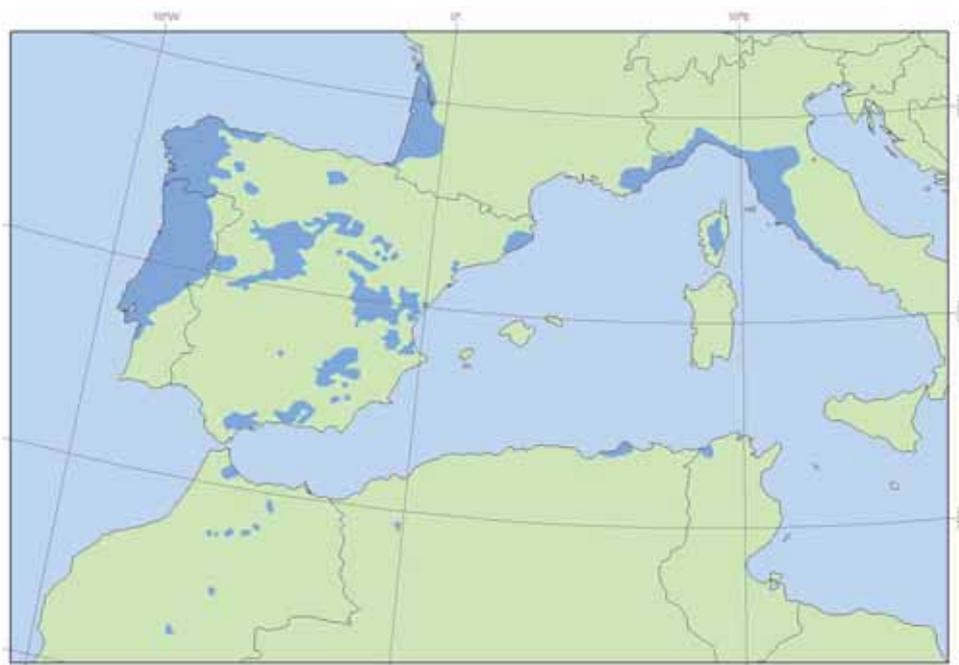
Es de carácter monoico, con dispersión polínica anemófila. Sus piñas son cónicas y grandes, de 10 a 20 cm de largo con escamas punzantes. Los piñones tienen una longitud de 8 a 10 mm con un ala de 20 a 25 mm que facilita su dispersión anemófila. Las hojas aciculiformes se agrupan por pares, persisten por varios años, son de color verde oscuro y brillante con una longitud que oscila entre los 15 cm y los 25 cm (Figura 1.2). Muestra buenos crecimientos, alcanzando los 25-30 m en climas Atlánticos, aunque en los climas Mediterráneos no suele sobrepasar los 20 m. No es una especie particularmente longeva (200-300 años) con respecto a otras especies del género. La forma de sus fustes es muy variable, frecuentemente curvado en la base, aunque a nivel general puede clasificarse como recto. Muestran tendencia al policiclismo, aunque nuevamente con gran variabilidad entre poblaciones e individuos (Sierra de Grado 1993). Su copa es piramidal y bastante clara. La corteza es gruesa, negruzca y profundamente agrietada sobre todo en la base, con surcos muy irregulares que conforman unas placas que pueden ser desde lisas a rugosas, y rojizas cuando se desprende la capa externa, aunque los caracteres de corteza son una vez más muy variables entre poblaciones (Figura 1.2).



**Fig. 1.2** Principales características morfológicas de *Pinus pinaster* Ait.

*Pinus pinaster* es una especie del Mediterráneo occidental, cuya área de distribución natural se extiende por el suroeste de Europa y el noroeste de África ocupando unas 4,2 Mha (Figura 1.3). En base a los caracteres fenotípicos más evidentes se han distinguido tradicionalmente los orígenes de la fachada Atlántica frente a aquellos asociados al clima Mediterráneo, sin embargo como han señalado ciertos autores, estos caracteres distintivos no se muestran constantes ni siquiera en sus áreas de origen (Franco 1986). Estudiando la estructuración genética de la especie mediante el uso de marcadores bioquímicos (terpenos), Baradat y Marpeau (1988) diferenciaron 18 razas geográficas elementales, reunidas a su vez en tres grupos, uno Atlántico que incluiría los orígenes Portugueses, los de Castilla León, Tabuyo y del noroeste de España, y los de las Landas y Medóc en Francia; el grupo Mediterráneo Europeo comprendería el sureste de España, sureste de Francia, Italia, Córcega y Cerdeña; y el

grupo Magrebí, que incluiría los orígenes de Marruecos, Argelia, Túnez y de Sierra Bermeja (España). Sin embargo estudios más recientes utilizando diferentes marcadores moleculares, además de confirmar la elevada estructuración geográfica de la variación genética intraespecífica (González-Martínez et al. 2002; Burban y Petit 2003; Bucci et al. 2007), distinguieron tres grupos dentro de la especie: un grupo del este que incluye las poblaciones de África occidental, África oriental, noroeste de Italia, Córcega y Cerdeña, un segundo grupo formado por la mayoría de las poblaciones de la Península Ibérica, incluidas las Portuguesas, y un tercer grupo formado por las poblaciones del norte y noroeste de España y suroeste de Francia en el que se incluirían las poblaciones Gallegas (Bucci et al. 2007).



**Fig. 1.3** Área de distribución natural de *Pinus pinaster* Ait. (Alía y Martín 2009).

Desde un punto de vista biogeográfico se sabe que al término del periodo máximo glacial tardío (LGM) (comprendido hace 17.000-25.000 años), *P. pinaster* se extendió desde sus refugios glaciares en la península ibérica siguiendo ciertas rutas de colonización postglacial. Las evidencias paleoecológicas y genéticas invitan a pensar que los dos refugios principales se ubicarían en el sureste de España (Salvador et al. 2000) y en el centro de la costa Atlántica portuguesa (Ribeiro et al. 2001), a partir de las cuales se habría producido la recolonización hasta alcanzar el actual área de distribución natural de la especie. A partir del refugio del sureste de España se pudo haber

establecido una ruta siguiendo la franja costera Mediterránea en dirección al norte, dando origen a las poblaciones del sur de Francia y noroeste de Italia. Otra ruta desde este refugio se habría dirigido hacia el centro y oeste de España hasta encontrarse con la ruta de colonización procedente del refugio Portugués (Bucci et al. 2007), punto a partir del cual la especie colonizaría en primer término Galicia y posteriormente el norte de España y la región de Landas en el suroeste de Francia. El contacto entre estas dos rutas de colonización pudo constituir el punto de encuentro entre los acervos genéticos de carácter Atlántico y Mediterráneo que diferencian fenotípicamente a la especie.

*Pinus pinaster* es además una especie de gran diversidad ecológica, se caracteriza por una elevada diversidad fenotípica y muestra adaptaciones a suelos y climas muy variados. Su tolerancia al frío es un carácter adaptativo de gran importancia dada la gran diversidad existente en sus masas naturales, encontrándose correspondencia entre tolerancia y el régimen de heladas en los lugares de origen (Alazard 1986). Además muestra una buena adaptación a la sequía, algo común en las especies del género, mostrando una correlación negativa a nivel de procedencia entre vigor y resistencia a este factor (Fernández 1996). Una de sus características más sobresalientes es su tolerancia a los suelos de escasa fertilidad, especialmente los arenosos, donde muy pocas especies forestales de interés económico pueden desarrollarse, motivo por el que ha sido muy empujado en repoblaciones. Prefiere suelos drenados pero también soporta suelos ácidos pobremente drenados. Tiene preferencia por litologías silíceas pero vegeta también sobre calizas, y en suelos con pHs que van desde 4,5 hasta 8,7.

Las poblaciones en su área de distribución se caracterizan por estar muy fragmentadas y aisladas, lo que puede ser una causa probable de su alta diversificación, mostrando frecuentemente fuertes adaptaciones a las condiciones ambientales locales, como sustratos específicos, regímenes de precipitación, rango de altitud, frecuencia de incendios, o regímenes de heladas (González-Martínez et al. 2004; Tapias et al. 2004; Fernandes y Rigolot 2007). Los regímenes de sequía y heladas son probablemente los principales factores que regulan la divergencia poblacional (Guyon y Kremer 1982; González-Martínez et al. 2002; Chambel et al. 2007). La diferenciación entre procedencias ha sido también ampliamente documentada para muchos caracteres cuantitativos en diferentes ensayos de procedencia tanto en la región Atlántica (Molina 1965; Danjon 1994; Correia et al. 2004) como en el área Mediterránea (Matziris 1982; Alía et al. 1995; Harfouche et al. 1995a).

En base a la metodología divisiva y a partir de las características geográficas, climáticas, edáficas y genéticas de las poblaciones de *P. pinaster* se establecieron en España 20 regiones de procedencia (1-20) y siete procedencias de área restringida (A-F) (Alía et al. 1996) (Figura 1.4). La mayor parte de Galicia se encuadraría en la procedencia Noroeste (1), dentro de la cual se distinguirían a su vez dos subregiones: la Noroeste-Costera (1A) y la Noroeste-Interior (1B).



**Fig. 1.4** Regiones de procedencia de *Pinus pinaster* en España (Alía et al. 1996). Galicia está prácticamente comprendida en la región de procedencia Noroeste (1), que se subdivide en las subregiones Noroeste-Costera (1A) y Noroeste-Interior (1B)

En cuanto a la plasticidad fenotípica, *P. pinaster* es una especie moderadamente plástica con notable divergencia entre poblaciones para esta característica (Chambel 2006). Se encontró que la interacción Genotipo  $\times$  Ambiente ( $G \times E$ ) no fue significativa en diferentes ensayos de familias y procedencias para caracteres de crecimiento y forma (Guyon y Kremer 1982; Matziris 1982; Butcher y Hopkins 1993; Hopkins y Butcher 1994), lo que indica homogeneidad en la plasticidad fenotípica de los diferentes orígenes genéticos presentes en dichos ensayos. Sin embargo esta interacción sí cobra un papel relevante en otros estudios de mayor amplitud geográfica donde el material testado es más representativo de la variabilidad global de la especie dentro de su área de distribución natural (Alía et al. 1997; Tognetti et al. 2000; Chambel et al. 2007; Correia

et al. 2010), siendo las procedencias más interactivas aquellas que más crecen en lugares con buenas condiciones de crecimiento como lo son las de origen Atlántico.

#### **1.4. La mejora genética de *Pinus pinaster***

La frugalidad de la especie y su rápido crecimiento incluso en condiciones adversas ha favorecido la amplia plantación de la especie tanto dentro de su área de distribución natural como fuera de ella. En España ocupa 1,7 Mha y produce el 28% de la madera total del estado (MARM 2010). En Francia ocupa 1,4 Mha y supone el 25% de la producción maderera francesa, centrándose dicha producción en las Landas (Aquitania) que constituye el bosque artificial más grande de Europa. En Portugal ocupa casi 1 Mha y produce el 38% de la madera portuguesa (MADRP 1999). Además ha sido introducido con fines productivos fuera de su área de distribución natural en las regiones templadas del hemisferio sur, en países como Chile (120.000 ha), Australia (90.000 ha), Sudáfrica (40.000 ha), Nueva Zelanda (25.000 ha), Argentina (20.000 ha) y Uruguay (18.000 ha) (Rauscent 1999).

La gran trascendencia económica como productor de madera blanda en algunos de estos países, ha llevado al desarrollo de importantes programas de mejora genética a largo plazo generalmente en base a las procedencias Atlánticas de la especie.

En Francia existe probablemente el programa más avanzado. Iniciado en la década de 1960, el programa está localizado en la región de las Landas (Aquitania) y sigue un diseño clásico de selección recurrente en base a la procedencia Atlántica local por sus buenos crecimientos y resistencia al frío, que ya ha alcanzado la tercera generación de mejora. La primera población de mejora se seleccionó fenotípicamente en los bosques de la región en base al crecimiento y forma del fuste. Posteriormente se seleccionó material de la procedencia Córcega en los ensayos de procedencia instalados en Aquitania en base al crecimiento, rectitud, ramosidad, resistencia al lepidóptero *Dioryctria sylvestrella* y su resistencia al frío, con el objetivo de conformar una segunda población de mejora en base a los híbridos Landas × Córcega para mejorar la rectitud del tronco y la ramosidad. El futuro del programa pasa por una mayor atención al manejo de la diversidad genética y por incluir nuevos criterios de selección como la calidad de la madera, la tolerancia a la sequía y la resistencia a plagas y enfermedades (Raffin 2002).

Unos pocos años antes se iniciaba en Australia Occidental otro programa de mejora para la especie que ya había sido introducida con anterioridad para la producción maderera. El objetivo era mejorar el crecimiento, la ramosidad y la calidad del fuste en base a la procedencia Portuguesa de Leiría que demostró su superioridad con respecto a otras procedencias de la especie ensayadas en la región. Para ello se realizaron selecciones fenotípicas de árboles superiores en la región de procedencia original de Leiría, en la raza local de Australia Occidental con origen también en Leiría y además se incluyeron fenotipos seleccionados en Sudáfrica que tenía un programa de mejora en curso en base a la misma procedencia. El programa ha seguido una estrategia de selección recurrente que ya tiene en plena producción los huertos semilleros clonales de segunda generación. El futuro del programa pasa por usar el material mejorado en regiones con una menor precipitación con respecto a las que en principio eran las áreas objetivo dentro del estado de Australia Occidental, por lo que la resistencia a la sequía se ha convertido en el principal carácter de mejora (Boardman et al. 2002; Butcher 2007).

Aproximadamente en las mismas fechas que los programas de Francia y Australia se inició en Sudáfrica otro programa en base a la procedencia de Leiría que por su superior comportamiento era la única que ya se venía utilizando en las plantaciones comerciales desde la década de 1930. El programa incluyó paralelamente procedimientos de mejora genética y selvícola para su plantación fundamentalmente en las provincias Occidental y Oriental del Cabo en base a selección recurrente y alcanzando la tercera generación de mejora. Sin embargo el carácter invasor de la especie en la región (Global Invasive Species Database 2011) y la mayor productividad de otras especies de pinos como *P. elliotii* o *P. radiata*, han hecho que a partir del año 2003 todas las plantaciones de *P. pinaster* en Sudáfrica hayan sido sustituidas por otras especies, eliminadas o se haya recuperado el bosque original (de Ronde 2005).

Dada la importancia de *P. pinaster* también en Portugal, se instalaron en la década de 1970 los dos primeros huertos semilleros de primera generación en el país. El programa ha seguido una estrategia de selección recurrente a partir de una primera selección fenotípica de árboles plus en base a sus características de crecimiento, rectitud del fuste, equilibrio de copa, grosor de ramas y poda natural en diferentes rodales selectos en Portugal, estableciéndose cuatro poblaciones independientes. En base a los resultados de los ensayos de progenie se instalaron a principios del S.XXI dos nuevos

huertos semilleros depurados y seis huertos de brinzales, y camina hacia la selección e instalación de huertos semilleros de segunda generación (Roulund et al. 1988).

### **1.5. El programa de mejora de *Pinus pinaster* en Galicia**

Galicia es el gran músculo maderero de España, que suponiendo solamente el 8% de la superficie forestal arbolada llegó a cortar en el año 2008 el 60% de la madera de todo el estado. Esto demuestra la clara vocación productiva de sus masas por estar localizadas en la fachada Atlántica, mientras que en la mayor parte del territorio español predomina el clima Mediterráneo en el cual las masas ejercen una función eminentemente protectora (88% de la superficie arbolada española). El hecho de que España sea un país deficitario en madera, que consume casi el doble de la madera que produce, hace si cabe más importante el papel de Galicia como productor de esta materia prima estratégica (MARM 2010).

Dentro del sector forestal gallego, *Pinus pinaster* Ait. es posiblemente la especie arbórea más importante, ocupando más de 400.000 ha en masas puras y más de 200.000 ha en masas mixtas junto al eucalipto, el roble y otras frondosas, alcanzando el 44% de la superficie forestal gallega (Xunta de Galicia 2005). Esta especie produce anualmente en Galicia un volumen cercano a los 2 M m<sup>3</sup>, lo que supone el 37% de la producción maderera gallega y entre el 15 y el 20% de la Española (Xunta de Galicia 2003) (MARM 2010). En el año 2005 fue la especie más plantada en Galicia con 3.147 ha (Álvarez et al. 2005), si bien es cierto que el ritmo de plantación depende substancialmente de la política de subvenciones.

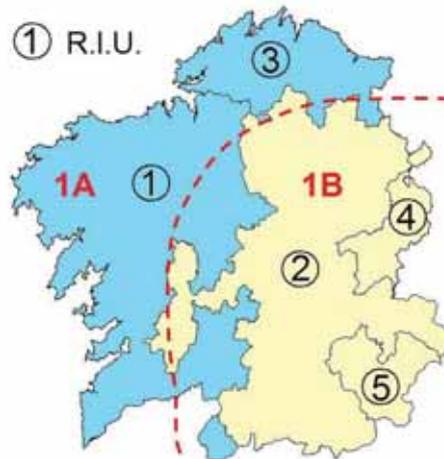
La especie vegeta en Galicia en una enorme diversidad de suelos, de rangos altitudinales y de condiciones climáticas. Esta diversidad se ve acentuada por el hecho de que Galicia, situada en el extremo noroccidental de España, está a caballo entre el típico clima Atlántico de las regiones costeras caracterizado por elevadas precipitaciones anuales (1.500-2.500 mm) bien repartidas a lo largo del año y una baja oscilación térmica anual (10-11 °C), y el típico clima Mediterráneo del interior Peninsular. De este modo la zona de interior de Galicia es una zona de transición entre ambas regiones bioclimáticas, caracterizada por una pronunciada sequía estival (60-100 mm), baja precipitación anual (600-1.200 mm) y más alta oscilación térmica anual (13-14 °C) debido a una mayor influencia continental.

A pesar de los grandes crecimientos en volumen de la especie en la Comunidad, la mayor parte de la madera producida es de baja calidad y se destina a la industria de trituración. Sólo el 2% de la madera utilizada en la industria del aserrado es de origen Gallego, y ésta tiene como objetivo la obtención de productos de bajo valor añadido como tabla o tablón para encofrados. Por este motivo el aumento de la calidad de las masas Gallegas ha sido un objetivo prioritario durante los últimos 30 años que permitiría un uso más noble de la madera con el consecuente aumento del beneficio económico. Con este objetivo se iniciaron actividades de mejora genética como herramienta para aumentar la productividad y la calidad de las plantaciones de *P. pinaster*.

Atendiendo a las características de las masas de *P. pinaster* en Galicia con las que iniciar un programa de mejora genética forestal para la especie, se identificaron importantes diferencias en los patrones de crecimiento (Bará y Toval 1983; Álvarez-González et al. 2005) y en las características fenotípicas entre las regiones ambientales de la costa y del interior. Las masas de la costa poseen un típico fenotipo Atlántico con buenos crecimientos, adecuadas características tecnológicas y una buena adaptación a las condiciones ambientales, debido quizás al largo periodo de naturalización que vivió la especie en esta zona. El origen de estas poblaciones pudo ser en el S. XVIII cuando se produjo un trasiego masivo de semilla procedente de Portugal (procedencia Atlántica de reconocido buen comportamiento en cuanto a crecimiento, forma y ramosidad) que pudo mezclarse con los relictos autóctonos de los arenales costeros que habrían permanecido tras la profunda deforestación de los siglos anteriores (Ruíz-Zorrilla 1980; Gil 1991). Por otro lado, las masas establecidas en el interior tienen claramente una peor calidad en cuanto a crecimiento, formas y ramosidad, por provenir en gran medida de plantaciones realizadas durante la segunda mitad del siglo XX con semilla foránea de origen desconocido y dudosa adaptación (Ruíz-Zorrilla 1980; Gil 1991).

En base a las mencionadas características climáticas, fenotípicas y de los patrones de crecimiento, se establecieron en Galicia dos zonas de mejora con un criterio de división altitudinal que fijó el límite físico en la cota de los 600 m. Por debajo de esta cota se consideró zona costera y por encima la interior (Toval 1987). Posteriormente y siguiendo este criterio se reconocieron en Galicia dos Regiones de Procedencia: la Noroeste-Costera (1A) que corresponde aproximadamente con las Regiones de Identificación y Utilización del material forestal de reproducción (RIUs) número 1 y 3;

y la Noroeste-Interior (1B) que corresponde con las RIUs número 2, 4 y 5, (Figura 1.5; Alía et al. 1996; García et al. 2001).



**Fig. 1.5** División territorial de Galicia en las dos principales regiones climáticas: costa (color azul) e interior (amarillo). Los números corresponden a las 'regiones de identificación y uso de los materiales forestales de reproducción' (RIUs). La línea punteada define aproximadamente las dos regiones de procedencia para *Pinus pinaster* reconocidas en Galicia: Noroeste-Costera (1A) y Noroeste-Interior (1B).

Partiendo de esta división en zonas de mejora y en base a los resultados de un ensayo de procedencias previo instalado en As Neves (Pontevedra) dentro de la zona costera, en el que la procedencia local demostró su superioridad frente a otros orígenes del rango de distribución de la especie (Molina 1965), se inició un programa de mejora genética para la especie en 1985 sobre la procedencia local Galicia-Costa (Vega et al. 1993; para más detalles ver Anexo 1). El programa se planteó como un programa de mejora clásico con objetivos a largo plazo basado en selección recurrente y mejora paulatina de caracteres deseables a través de sucesivos ciclos.

El programa se inició con la selección fenotípica masal de 128 árboles superiores en masas naturales dentro de la región costera por sus buenas características de crecimiento, espesor de corteza, ramosidad y rectitud del fuste. De los árboles seleccionados se recogieron púas para la clonación por injerto, de los cuales 116 lo hicieron con éxito y se establecieron en 1991 en el primer huerto semillero clonal en Sergude (A Coruña; 42° 49' N, 8° 28' O), que fue replicado con el mismo material y diseño en Monfero (A Coruña; 43° 15' N, 8° 0' O) en 1998. Finalmente en 2008 se instaló en A Braxe (A Coruña; 43° 40' N, 7° 58' O) un huerto semillero depurado o de generación 1,5 donde están representados únicamente aquellos genotipos que demostraron superioridad en los ensayos de progenies.

En paralelo a la instalación de los huertos se establecieron ensayos de progenies, todos ellos con familias de polinización abierta, para evaluar la superioridad de los árboles plus, estimar los parámetros genéticos y como base para seleccionar una nueva población de mejora de segunda generación. En 1991 se instalaron los dos primeros ensayos de progenies provisionales en la zona costera con una pequeña representación de las familias del huerto, y en 1994-95 se instaló una serie más completa de cuatro ensayos también dentro de la zona costera. Posteriormente se instaló en 2001 una serie de 5 ensayos situados tanto en la zona costera como en la interior, y finalmente en 2005 se instaló la serie definitiva formada por siete ensayos con la totalidad de las familias siguiendo un gradiente costa-interior (para más detalles ver Anexo 1).

La superioridad del material de primera generación ha sido ampliamente demostrado en ensayos bajo condiciones controladas (Zas y Fernández-López 2005) y en distintas series de ensayo en campo (Vega et al. 1997; Martíns et al. 2008) con ganancias de casi un 30% en los ensayos en campo. Además la estimación de parámetros genéticos en los ensayos de progenies indica que los principales caracteres de mejora muestran heredabilidades individuales moderadas y son susceptibles de mejora por selección recurrente (Zas et al. 2004a). Utilizando los valores de mejora obtenidos en los ensayos de progenies y seleccionando los mejores parentales o selección hacia atrás (“*backward selection*”), se instaló el huerto semillero depurado de A Braxe y se estableció una población élite obtenida mediante cruces controlados entre individuos superiores, además se propuso una recogida selectiva en los huertos de primera generación lo que añadiría en su conjunto un plus de ganancia genética a la selección fenotípica masal (Zas y Merlo 2008). Los resultados obtenidos permiten actualmente además la selección entre las progenies o selección hacia adelante (“*forward selection*”) de los mejores individuos para convertir los ensayos de progenies en huertos semilleros de brinzales, y la selección de genotipos que constituyan la segunda generación de mejora que una vez clonados se establecerían en huertos semilleros clonales de segunda generación con material mejorado para la zona costera de Galicia, iniciando de nuevo el ciclo de selección recurrente.

Sin embargo los importantes avances en el programa de mejora para la zona costera no han tenido un paralelismo en la zona interior, donde *P. pinaster* ocupa una gran superficie y tiene importancia productiva. La disponibilidad de material forestal de reproducción de calidad para la zona interior más allá de la categoría *identificado* se limita únicamente a tres rodales selectos, claramente insuficientes para satisfacer las

necesidades de plantación en la región, por lo que ha sido necesario introducir material de otras procedencias con cuestionable adaptación a esta área y que frecuentemente muestran bajos crecimientos y pobres calidades de forma.

Debido al pobre comportamiento de las masas en el interior que impide la selección fenotípica individual para constituir la población de base, y a la más que probable procedencia foránea de la mayor parte de estas masas con un comportamiento inferior a las poblaciones costeras, no es posible el desarrollo de un programa de mejora clásico similar al iniciado para la zona costera. La búsqueda de un material alternativo con buen comportamiento en la región interior se ha convertido, por lo tanto, en un objetivo fundamental con el fin de proporcionar materiales genéticos adecuados para repoblación en esta zona. Además las predicciones de los modelos climáticos locales en Galicia muestran un incremento de la temperatura media anual con picos de calor más extremos en el verano, frío menos extremo en el invierno, e importantes cambios en la distribución de las lluvias a lo largo del año (Pérez-Muñuzuri et al. 2009). Estas predicciones hacen que la identificación de materiales adecuados a las condiciones más Mediterráneas del interior tenga además un especial valor también en la costa desde el punto de vista adaptativo y de resiliencia de las masas en un escenario de cambio climático.

---

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) es una especie de gran importancia económica y ecológica en toda Galicia tanto en el área costera, de marcado carácter Atlántico, como en la interior, que es una zona de transición hacia el clima más continental y Mediterráneo característico del interior de la Península Ibérica. Actualmente las masas de pinaster del interior de Galicia están muy por debajo del potencial de la especie en esta zona, ya que proceden de repoblaciones realizadas durante el siglo XX con diversos orígenes de semilla, de procedencia diversa y desconocida, que ha derivado en un mosaico con bajo nivel de adaptación en crecimiento y forma. El mal comportamiento de las masas de *P. pinaster* del interior limita la oferta de material genético de calidad para esta zona y desaconseja un programa de mejora similar al iniciado en la zona costera, basado en selección recurrente a partir de las masas locales. Ante estas circunstancias, las plantaciones realizadas en los últimos años en el interior de Galicia han empleado materiales genéticos de otros orígenes con un comportamiento no contrastado en la región.

El objetivo del presente trabajo de investigación es evaluar diferentes alternativas de mejora genética de *P. pinaster* para el interior de Galicia, que permitan definir la estrategia de selección y proponer recursos genéticos de calidad contrastada para ser usados en la región interior de Galicia. En concreto el contexto en el que se desarrollan las alternativas propuestas y los objetivos específicos perseguidos por cada una son:

1. Ensayos de procedencias establecidos a lo largo de España demostraron que las procedencias Atlánticas crecieron más en las localidades con clima más suave, siendo la procedencia local la mejor de todas las probadas en un ensayo en la zona costera de Galicia (Molina 1965), pero las procedencias Atlánticas también mostraron mala adaptación en los sitios con un periodo de sequía largo (Alía et al. 1995; Alía y Moro 1996; Alía et al. 2001). Por otra parte las procedencias de media montaña Españolas crecieron de manera intermedia pero con buenas formas del fuste en todos los sitios, demostrando un comportamiento estable.

A pesar de contar con los resultados de estos ensayos, falta información acerca del comportamiento de otras procedencias de *P. pinaster* en la región interior de Galicia.

Con el objetivo de seleccionar posibles orígenes alternativos de la especie de otras regiones de procedencia españolas que puedan tener potencialidad para ser usadas en el interior de Galicia, se evaluó un ensayo de procedencias multiambiente instalado en tres localidades de esta región y se comparó su comportamiento con material Atlántico mejorado plantado en ensayos adyacentes (Capítulo I).

2. Las importantes ganancias y los buenos resultados obtenidos en los programas de mejora de *P. pinaster* para la zona costera de Galicia y Australia Occidental en base a orígenes Atlánticos (Butcher 2007; Zas y Merlo 2008), invitan a explorar la posibilidad de usar este material mejorado en la zona interior, aprovechando así la ganancia genética debida al avance de los programas y permitiendo la disponibilidad de material mejorado para el interior en un corto espacio de tiempo. Sin embargo, las familias del programa de mejora Galicia-Costa se han probado únicamente en la zona costera y no existe información sobre su comportamiento en la zona interior, al igual que para el material de origen australiano.

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de transferencia de material de mejora Atlántico a la zona interior se estudió en el Capítulo II el comportamiento en campo de materiales procedentes de los programas de mejora de Galicia-Costa y Australia Occidental en un ensayo de progenies multiambiente instalado en Galicia siguiendo un gradiente climático costa-interior. Además se realizó una primera aproximación de la magnitud y la relevancia de la interacción G×E dentro y entre las dos áreas de mejora actualmente operativas en el programa de mejora de *P. pinaster* en Galicia (costa e interior) con el objetivo de contrastar la idoneidad de esta zonificación y sus posibles alternativas: o bien unir las dos áreas de mejora aunando los esfuerzos y minimizando los costes o seleccionar material costero adaptado a las condiciones ambientales específicas del interior de Galicia.

3. La subdivisión en las dos zonas de mejora previamente establecidas asume implícitamente que la interacción G×E dentro de zonas es mínima en comparación con la interacción entre zonas. Sólo de esta manera se justificarían las complicaciones

operativas que esta subdivisión conlleva tanto en relación al desarrollo de dos programas de selección y mejora paralelos como para la gestión de la producción y uso del material mejorado. Sin embargo, los resultados obtenidos en el Capítulo II mostraron cambios de ranking fenotípicos tanto entre como dentro de las zonas, indicando que esta subdivisión territorial parece no ser adecuada ya que no define áreas genotípicamente estables (de la Mata y Zas 2010b).

Teniendo en cuenta que los resultados anteriores se basaron en series parciales de ensayos de progenies del programa de mejora Galicia-Costa con un número limitado de localidades, en el Capítulo III se planteó integrar la información de la totalidad de los ensayos genéticos instalados dentro del programa con el objetivo de valorar de manera precisa la adecuación de la actual zonificación. La amplia información aportada por estos ensayos nos permitirá además estudiar el patrón y las causas de la interacción G×E en la población de mejora para el conjunto del territorio de Galicia con el objetivo de optimizar la delimitación de las áreas de mejora. Esta optimización podría llevar a replantearnos la zonificación inicial, en cuyo caso se buscará algún tipo de agrupación ambiental que nos permita regionalizar Galicia en áreas geográficas de comportamiento estable y se tratará de identificar aquellas variables ambientales que mejor expliquen esa regionalización. En caso de que no sea posible la regionalización en áreas homogéneas o ésta carezca de sentido práctico, trataremos de buscar una subpoblación de genotipos estables al conjunto del territorio.

4. La hibridación interprocedencia puede ser de especial interés para la combinación en el híbrido de caracteres parentales deseables, como ya ha sido demostrado en diversos estudios con coníferas (Nilsson 1973; Owino y Zobel 1977; Bolstad et al. 1991) y particularmente con *P. pinaster* (Harfouche et al. 1995b). Estos resultados invitan a pensar en la posibilidad de combinar las buenas características de crecimiento y forma del material Atlántico de *P. pinaster* con los caracteres adaptativos a las condiciones de Mediterraneidad y continentalidad propios de ciertas procedencias Mediterráneas.

Con el objetivo de testar la eficiencia de la estrategia de hibridación para obtener genotipos con requerimientos ambientales adecuados para ser usados en la región de transición interior de Galicia, se obtuvo material mediante polinización controlada entre una selección de genotipos Atlánticos superiores en características de forma del fuste y crecimiento, y una selección de procedencias en base a los resultados de la red de ensayos de procedencia existente en España. En el Capítulo IV se evaluó este material

en un ensayo en condiciones controladas con dos tratamientos experimentales de disponibilidad hídrica donde se analizó su variación genética, su plasticidad y su capacidad adaptativa frente a la sequía en edades juveniles.



---

### **3. CAPÍTULO I: Comportamiento de procedencias de *Pinus pinaster* del centro de España en la zona interior de Galicia**

---

Los resultados de este capítulo han dado lugar a la siguiente publicación:

**Raúl de la Mata**, Rafael Zas (2010) Performance of maritime pine Spanish Mediterranean provenances at young ages in a transitional region between Atlantic and Mediterranean climates in NW Spain. *Silvae Genetica* 59 (1):8-17

### **3. CAPÍTULO I. Comportamiento de procedencias de *Pinus pinaster* del centro de España en la zona interior de Galicia**

#### **3.1. Introducción**

Estudios con diferentes marcadores moleculares a través del todo el rango de distribución del pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) revelan que sus poblaciones presentan una alta estructuración geográfica de la variación genética intraespecífica (González-Martínez et al. 2002; Burban y Petit 2003; Bucci et al. 2007), mostrando marcadas adaptaciones a las condiciones ambientales locales (Tapias et al. 2004). La resistencia al frío y a la sequía son probablemente algunos de los principales factores que controlan la divergencia poblacional (Guyon y Kremer 1982; González-Martínez et al. 2002; Chambel et al. 2007). La diferenciación entre procedencias de *P. pinaster* también ha sido ampliamente documentada para muchos caracteres cuantitativos en diversos ensayos de procedencias tanto en la región Atlántica (Molina 1965; Danjon 1994; Correia et al. 2004) como en la Mediterránea (Matziris 1982; Alía et al. 1995; Harfouche et al. 1995a).

Frente al típico clima Atlántico de la región costera de Galicia, la región interior constituye una zona de transición hacia el clima más Mediterráneo y continental típico de las áreas centrales de la Península Ibérica, con sequía estival prolongada y amplia oscilación térmica. La falta de material genético de calidad adaptado específicamente a esta zona Interior, junto con la alta estructuración geográfica de las adaptaciones ambientales en la especie, invitan a buscar otros orígenes genéticos que demuestren buenos comportamientos frente a estas condiciones más extremas.

En un ensayo de procedencias establecido en la zona costera de Galicia bajo un típico clima Atlántico, la procedencias Atlánticas fueron superiores en cuanto a crecimiento en altura y ramosidad, siendo la procedencia local la mejor de todas las evaluadas (Molina 1965). Por otra parte, en un ensayo de procedencias multilocalidad establecido en cinco sitios de la región central de España con diferentes calidades de estación y condiciones climáticas, las procedencias Atlánticas mostraron un crecimiento más alto solamente en los sitios más suaves, pero mostraron una mala adaptación cuando el periodo de sequía era largo, mientras que las procedencias de media montaña Españolas se comportaron bien en todos los sitios (Alía et al. 1995; Alía y Moro 1996; Alía et al. 2001).

A pesar de los resultados de estos ensayos, carecemos de información acerca del comportamiento de procedencias de *P. pinaster* en la región de transición interior de Galicia. Por lo tanto, en el presente capítulo se analiza el comportamiento de seis procedencias seleccionadas de *P. pinaster* del área Nemoromediterránea de la Península Ibérica plantadas en tres sitios de la zona interior de Galicia, tres y siete años después de la plantación para evaluar la viabilidad de utilizar este material en esta región.

## **3.2. Material y métodos**

### **3.2.1. Material genético y sitios de ensayo**

En marzo (Guntín y Laza) y junio (Becerreá) de 2001 se plantaron tres ensayos de procedencias en el interior de Galicia (serie de 2001-procedencias; ver Figura A1, Anexo 1). Los tres sitios se localizaron en la RIU (Región de Identificación y Utilización del material forestal de reproducción) número 2, que ocupa la mayor parte de la región interior de Galicia (García et al. 2001).

El clima de la región interior difiere claramente del de la zona costera, mostrando una importante influencia continental, con amplia oscilación térmica diaria y anual, baja precipitación anual y acentuada sequía estival. Becerreá es el sitio más frío y el que se sitúa a mayor altitud, con frecuentes nevadas invernales. Durante el periodo de estudio, las temperaturas mínimas en este sitio bajaron de cero una media de 50 días al año (Tabla A1, Anexo 1) con episodios de nieve todos los años. Guntín y Laza mostraron una marcada influencia Mediterránea, con bajas precipitaciones anuales y estivales. La sequías estivales más pronunciadas se produjeron en Laza donde hubo un severo periodo seco durante el verano de 2005 (ver Tabla A1, Anexo 1).

Los tres ensayos siguieron un diseño de bloques completos al azar con diez réplicas y unidades experimentales de cinco árboles en fila. El marco de plantación fue de 3 x 2 m en Guntín y Becerreá, y de 2,5 x 2 m en Laza, todos ellos marcos típicos en las plantaciones de *P. pinaster* en la región.

En cada sitio se evaluaron seis procedencias Españolas del área Mediterránea (Bajo Tiétar, Sierra de Gredos, Montaña de Soria-Burgos, Serranía de Cuenca, Albarracín y Sierra Segura-Alcaraz), que fueron seleccionadas en base a la capacidad de producción maderera de sus masas naturales y por su comportamiento en ensayos de procedencias anteriores (Molina 1965; Alía et al. 2001). Los detalles de las principales

características climáticas en el origen de cada procedencia se muestran en la Tabla A3, Anexo 1 (ver Anexo 1 para más información sobre las procedencias ensayadas).

Cada uno de los ensayos de procedencias fue plantado de modo adyacente a un ensayo de progenies con 111 familias de medios hermanos de primera generación del programa de mejora de Galicia-Costa (GC) y seis familias del programa de mejora desarrollado en Australia Occidental (WA) a partir de cruces de árboles superiores seleccionados dentro de la procedencia portuguesa de Leiría (ver Anexo 1 para más información sobre los programas de mejora de GC y WA). Estos ensayos de progenies siguieron un diseño de bloques completos al azar con 25 réplicas y unidades experimentales de un solo árbol. Las plantas de los ensayos de progenies fueron cultivadas junto con las procedencias siguiendo los mismos protocolos de cultivo en vivero. Tanto las procedencias como las progenies fueron plantadas al mismo tiempo, con el mismo marco de plantación y preparación del suelo, y fueron medidas en las mismas fechas.

Las plantas de ambos ensayos se cultivaron en contenedores relativamente pequeños (Superleach 125 cm<sup>3</sup>) durante un largo periodo (más de 19 meses), lo que pudo haber causado deformaciones radicales y escasa estabilidad de los árboles tras la plantación (Climent et al. 2008), como se ha observado previamente en otras plantaciones de *P. pinaster* en la zona (Zas et al. 2004a).

### **3.2.2. Mediciones**

Se midieron caracteres de crecimiento, forma del fuste y ramosidad de todos los árboles en cada sitio a los tres y siete años después de la plantación, excepto aquellas plantas muertas o desaparecidas. Los caracteres de crecimiento incluyeron la altura total (H) medida con una pértiga en centímetros y el diámetro a la altura de pecho (D) medido con una forcípula en milímetros (mediciones sólo a los siete años). Los caracteres de forma del fuste y ramosidad fueron medidos siguiendo el protocolo mostrado en Galera et al. (1997). La forma del fuste de cada árbol fue evaluada adjudicándole un valor de rectitud (REC: 1 = recto a 6 = muy torcido) y un valor de inclinación (INC: 1 = vertical a 4 = inclinación severa). Se contó también el número de verticilos (VER) como una medida de la abundancia de ramas. El ensayo de procedencias situado en Becerreá se vio afectado por la construcción de una pista forestal en 2005, dejando disponible solamente la medición a los tres años.

### 3.2.3. Análisis estadísticos

Debido a la frecuente presencia de autocorrelación espacial en los ensayos genéticos forestales procedimos a la corrección de la variable dependiente mediante herramientas de estadística espacial. Los ajustes espaciales se llevaron a cabo utilizando el método de Análisis Espacial Iterativo (ISA; Zas 2006), que trata de corregir la heterogeneidad espacial no absorbida por el diseño experimental (ver el Anexo 2 para más detalles y códigos SAS). Este ajuste se realizó de manera independiente en cada sitio de ensayo, incluyendo tanto los árboles de los ensayos de procedencias como los de los ensayos de progenies adyacentes, y considerando un único efecto genético (procedencia o familia) para obtener los residuos correspondientes. Una vez se corrigió espacialmente la variable dependiente, los ensayos de procedencias y progenies se analizaron de manera independiente.

Los análisis de los datos corregidos (u originales cuando la variable presentaba un patrón espacial aleatorio) se basaron en las medias por unidad experimental. Se realizó un análisis conjunto de los tres sitios de ensayo para cada variable utilizando el siguiente modelo mixto:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + P_j + BC_k(S_i) + S \times P_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad [3.1]$$

donde  $Y_{ijk}$  es el valor de la unidad experimental  $ijk$ ,  $\mu$  es la media global,  $S_i$  es el efecto fijo del sitio  $i$ ,  $P_j$  es el efecto fijo de la procedencia  $j$ ,  $BC_k(S_i)$  es el efecto aleatorio del bloque  $k$  dentro del sitio  $i$ ,  $S \times P_{ij}$  es la interacción fija entre el sitio  $i$  y la procedencia  $j$ , y  $\varepsilon_{ijk}$  es el término aleatorio del error. Las procedencias se consideraron como un efecto fijo, limitando la inferencia del análisis a las seis procedencias evaluadas. Estos modelos mixtos fueron implementados con el procedimiento MIXED de SAS. Se realizaron comparaciones estadísticas por pares de procedencias utilizando la opción DIFF de la sentencia LSMEANS del procedimiento MIXED, que realiza un t-test para obtener la significación estadística de la diferencia entre las medias mínimocuadráticas de todos los posibles pares de procedencias (SAS-Institute 1999).

Se comparó además el comportamiento de las procedencias evaluadas con el material de los ensayos de progenies adyacentes. A pesar de que los ensayos de procedencias y de progenies vecinos se instalaron en base a diseños experimentales independientes, fue posible realizar comparaciones entre ellos gracias a que los ajustes

espaciales conjuntos absorbieron las posibles diferencias microambientales entre ambos tipos de ensayo. Dentro de cada sitio, se comparó el comportamiento de la mejor de las seis procedencias, de la mejor de las seis familias de WA, y el comportamiento medio de las 18 mejores familias de las 111 totales de GC incluidas en cada ensayo (i.e., se aplicó una intensidad de selección de 1:6 para cada grupo de materiales). Se analizaron las diferencias significativas entre los distintos grupos genéticos mediante la construcción de los intervalos de confianza para la media de cada grupo. Cuando estos intervalos de confianza no se solaparon, se interpretó como la existencia de diferencias significativas.

### 3.3. Resultados

Los residuos después de eliminar los efectos familiares revelaron estructuras espaciales no aleatorias para los caracteres de crecimiento y número de verticilos en los tres sitios de ensayo. Los caracteres de forma del fuste revelaron estructuras espaciales aleatorias a excepción de Becerreá donde REC e INC mostraron una ligera autocorrelación espacial. La estructura espacial para la mayoría de las variables se ajustó bien a un semivariograma teórico de tipo esférico ( $r^2 > 0,85$ ;  $P < 0,001$ ). El tamaño del parche osciló entre 34 y 112 m. El porcentaje de la variación residual total explicado por el patrón espacial varió desde el 10,6% para VER en Becerreá a los tres años hasta el 73,2% para H en Laza a los siete años. La altura a los siete años fue la variable que mostró las mayores intensidades de dependencia espacial.

La estructura en bloques del diseño experimental absorbió parte de la variación espacial dentro del ensayo, lo que quedó de manifiesto por la existencia de varianzas entre bloques significativas en todos los sitios de ensayo cuando se utilizaron datos no ajustados espacialmente. Sin embargo, la varianza del bloque fue claramente más baja que el porcentaje de variación explicada por el patrón espacial, indicando que el diseño de bloques no fue suficiente para absorber toda la variación espacial presente (datos no mostrados). Tras el ajuste espacial la varianza del bloque se anuló, y la varianza residual se redujo significativamente en todos los casos. Además, el F-ratio para analizar los efectos de las procedencias aumentó substancialmente después de la corrección espacial. Para algunas variables, como H y VER a los siete años, únicamente se detectaron diferencias significativas entre procedencias después del ajuste espacial.

Las diferencias entre sitios fueron significativas ( $P < 0,05$ ) para todas las variables a los tres años, y para H, D, INC y REC a los siete años (Tabla 3.1). Con respecto al crecimiento en altura a los tres años, las procedencias de Bajo Tiétar (BT) y Serranía de Cuenca (CU) mostraron el mejor comportamiento, mientras que Sierra de Segura-Alcaraz (SS) y Montaña de Soria-Burgos (SO) fueron las peores (Figura 3.1a). Para la altura a los siete años, Bajo Tiétar mantuvo el mayor crecimiento, siendo Sierra de Gredos (GR) la segunda. Serranía de Cuenca perdió algunas posiciones a los siete años con respecto a los tres. Sierra de Segura-Alcaraz y Montaña de Soria-Burgos continuaron mostrando los peores crecimientos.

Bajo Tiétar y Serranía de Cuenca, las dos procedencias que crecieron más rápido, tuvieron el mayor número de verticilos, indicando fuerte policiclismo. Por otra parte, Sierra de Segura-Alcaraz y Montaña de Soria-Burgos mostraron el menor número de verticilos, débil policiclismo, y crecimiento mediocre (Figura 3.1b).

La mejor procedencia en cuanto a los caracteres relacionados con la forma del fuste fue Albarracín (AL), y las peores Bajo Tiétar y Sierra de Gredos, procedencias que por otro lado estuvieron entre las que más crecieron (Figura 3.1).

**Tabla 3.1** Resultados del modelo mixto para el análisis de diferentes variables evaluadas a los tres y siete años en los tres ensayos de procedencias de *P. pinaster* en el interior de Galicia. Se presentan los F-ratios y los niveles de significación<sup>1</sup>.

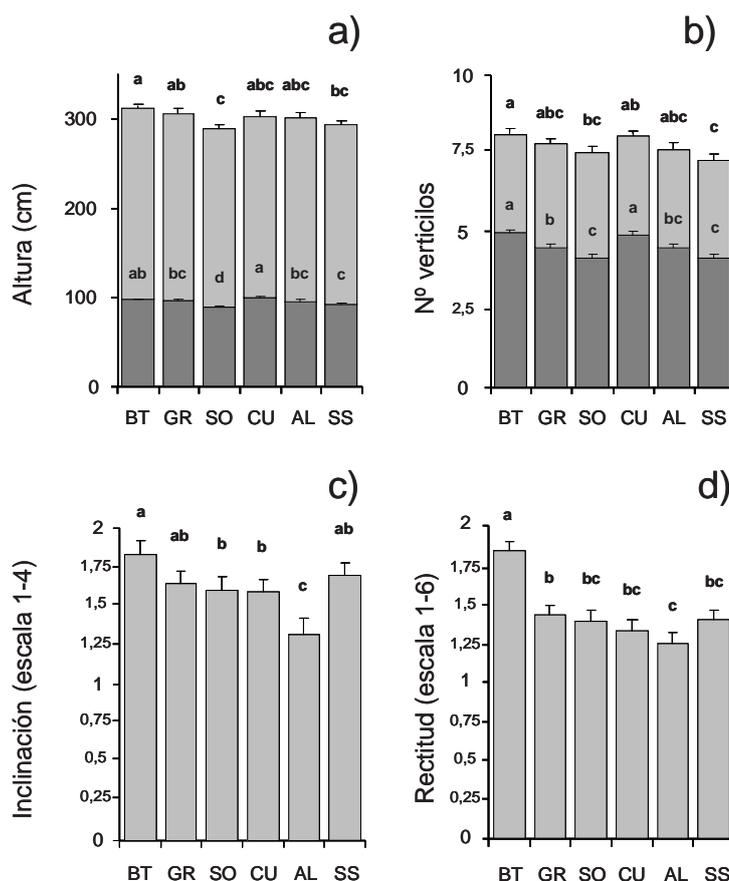
EDAD	VARIABLE	SITIO (S)	PROCEDENCIA (P)	S x P
3 años	Altura	261,41 ***	8,75 ***	1,87 *
	Nº verticilos	55,40 ***	9,71 ***	1,50
	Inclinación	95,63 ***	2,80 *	2,59 **
	Rectitud	11,20 ***	3,80 **	1,29
7 años	Altura	61,07 ***	2,55 *	1,68
	Diámetro	36,87 ***	1,29	0,77
	Nº verticilos	0,00	2,61 *	0,78
	Inclinación	5,36 *	12,86 ***	1,78
	Rectitud	17,35 ***	3,47 **	1,05

<sup>1</sup> Niveles de significación: \*\*\*=  $P < 0,001$ , \*\*=  $P < 0,01$ , \*=  $P < 0,05$

La interacción procedencia  $\times$  sitio sólo fue significativa para la altura y la inclinación a los tres años (Tabla 3.1). En la Figura 3.2 se muestran las normas de reacción para estas dos variables a través de los tres sitios de ensayo. El ranking de las seis procedencias con respecto al crecimiento en altura fue muy similar en Becerreá y en

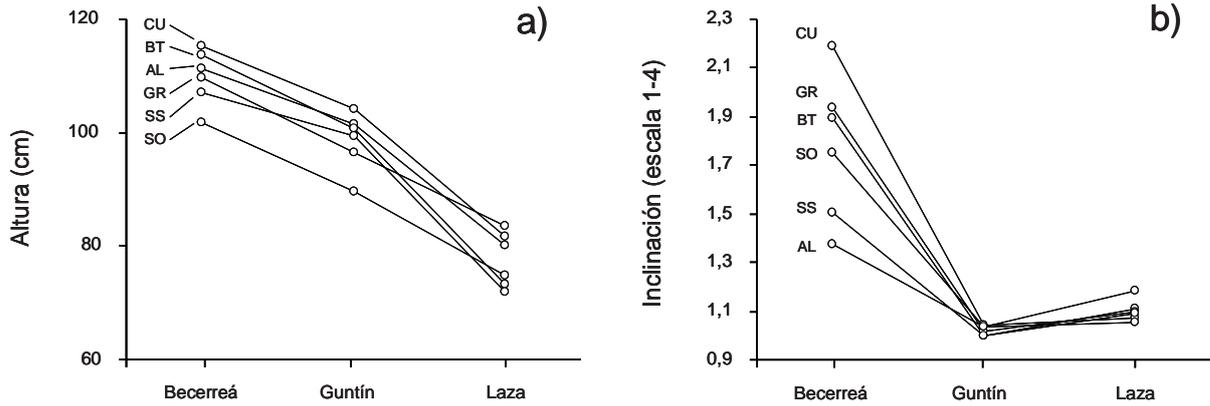
Guntín, pero mostró grandes cambios en Laza. Sierra de Gredos creció bien en este sitio pero no tan bien en Guntín y Becerreá, mientras que Sierra de Segura-Alcaraz y Bajo Tiétar fueron las peores procedencias en Laza y se comportaron relativamente bien en Guntín y Becerreá. En el caso de la inclinación del tronco, es probable que la interacción sea debida a un efecto de escala derivado de la gran variación fenotípica observada en Becerreá para esta variable (Figura 3.2b). La interacción no fue significativa para ninguna variable a los siete años.

**Figura 3.1** Comportamiento promedio de seis procedencias de *P. pinaster* para distintas variables en tres ensayos de procedencias en el interior de Galicia. Las procedencias con la misma letra no son significativamente ( $P < 0.05$ ) diferentes (t-test para las diferencias entre las medias minimocuadráticas). Las barras de color gris oscuro indican variables medidas a los tres años y las barras de color gris claro indican variables medidas a los siete años. Códigos de las procedencias: BT = Bajo Tiétar, GR = Sierra de Gredos, SO = Montaña de Soria-Burgos, CU = Serranía de Cuenca, AL = Albarracín, SS = Sierra de Segura-Alcaraz.

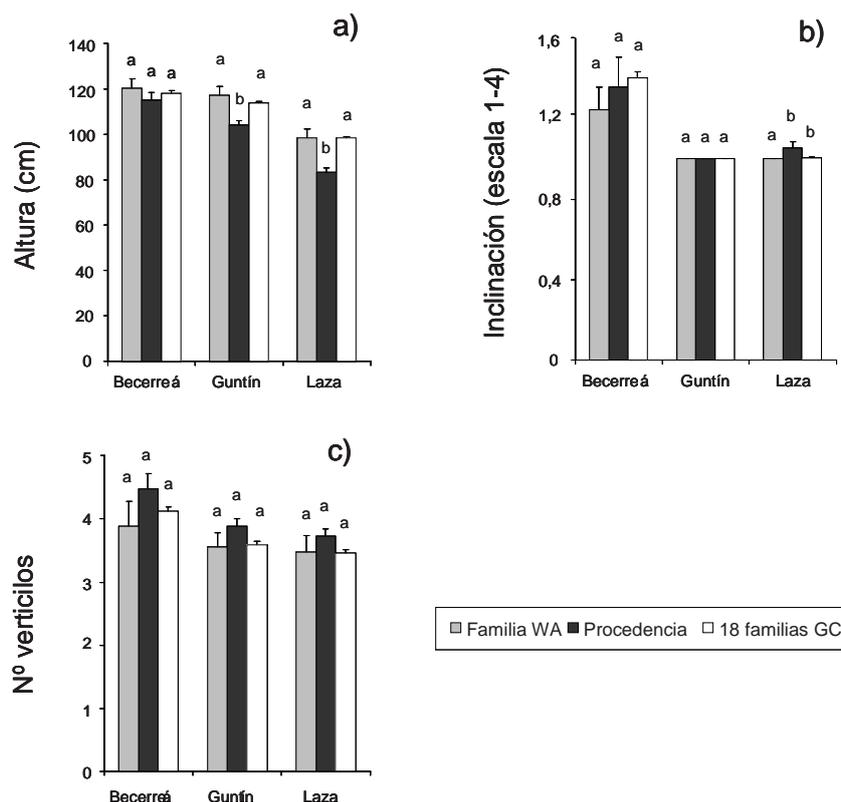


Las diferencias entre las procedencias y las familias de los programas de mejora de GC y WA de los ensayos adyacentes fueron pequeñas para todos los caracteres y sitios, sin embargo el material de WA y la mitad de las familias de GC demostraron en promedio un mayor crecimiento, mejor forma del fuste, y menor número de verticilos que el comportamiento medio de las seis procedencias en los tres sitios (datos no mostrados). Además, el material de WA se comportó ligeramente mejor que las familias de medios hermanos de GC (ver Capítulo II). Estos resultados se mantuvieron cuando las comparaciones se limitaron a la mejor procedencia, la mejor familia de WA y las 18 mejores familias de GC, i.e. aplicando una intensidad de selección para cada variable de

1:6 (Figura 3.3). Las mejores familias tanto de WA como de GC crecieron significativamente mejor en Laza y Guntín, mientras que no se detectaron diferencias significativas en Becerreá. Aunque las mejores familias de WA y GC tendieron a tener menor número de verticilos y mejor forma del fuste que la mejor procedencia en los tres sitios, las diferencias entre ellas no fueron significativas, excepto para INC en Laza.



**Figura 3.2** Normas de reacción de seis procedencias de *P. pinaster* en tres sitios de ensayo en el interior de Galicia para el crecimiento en altura (a) y la inclinación del tronco (b) a los tres años. Códigos de las procedencias: BT = Bajo Tiétar, GR = Sierra de Gredos, SO = Montaña de Soria-Burgos, CU = Serranía de Cuenca, AL = Albarracín, SS = Sierra de Segura-Alcaraz.



**Figura 3.3** Comportamiento de la mejor procedencia de *P. pinaster* (barras negras), la mejor familia de Australia Occidental (WA, barras grises) y el comportamiento promedio de las 18 mejores familias de Galicia-Costa (CG, barras blancas) en tres sitios de ensayo en el interior de Galicia, para tres variables representativas a los tres años. Letras diferentes en cada sitio indican que los intervalos de confianza ( $\alpha = 0.05$ ) de las medias no se solapan.

### 3.4. Discusión

#### 3.4.1 Autocorrelación espacial

Los resultados señalan la existencia una fuerte autocorrelación espacial para todas las variables de crecimiento con estructuras en parches y tamaños del parche relativamente grandes. La estructura de bloques del diseño experimental no fue suficiente para absorber esta heterogeneidad espacial, y los bloques fueron internamente heterogéneos, violando el requisito fundamental de los diseños en bloques. El análisis de estos datos espacialmente autocorrelacionados con modelos convencionales producirían probablemente resultados erróneos, por lo que el ajuste de la variación microambiental es esencial (Dutkowski et al. 2006; Zas 2006). Como se observó en otros estudios, el ajuste espacial eliminó el efecto del bloque y redujo sustancialmente la variación residual, favoreciendo la detección de diferencias significativas entre procedencias. De

hecho, para algunas variables, únicamente se detectaron diferencias significativas entre procedencias después del proceso de corrección espacial.

Otra característica del análisis espacial empleado es que nos permite comparar materiales genéticos incluidos en los ensayos adyacentes dentro de cada sitio, pero instalados en base a diseños experimentales independientes. Utilizando aproximaciones convencionales, los efectos ambientales del micrositio podrían confundir las comparaciones entre estos ensayos, y los diseños experimentales independientes serían incapaces de absorber esta variación ambiental a pequeña escala. Mediante el uso del método ISA (Zas 2006) fuimos capaces de tener en cuenta simultáneamente la heterogeneidad espacial de ambos ensayos, permitiendo realizar comparaciones entre los materiales genéticos de ambos.

### **3.4.2. Comportamiento de las procedencias**

La superioridad de la procedencia local en cuanto al crecimiento en altura y supervivencia a los 18 años detectada por (Molina 1965) en un ensayo de procedencias instalado en el área costera de Galicia, fue corroborada también por otros autores (Danjon 1994; Correia et al. 2004), sugiriendo que una gran parte de la variabilidad genotípica en *P. pinaster* es el resultado de adaptaciones locales a las condiciones ambientales mediante selección natural. De acuerdo con esto, en los ensayos de procedencias instalados en el área central de España (Alía et al. 1995; Alía et al. 2001) medidos a los 19 y 32 años, las procedencias Atlánticas mostraron mala adaptación cuando el periodo de sequía fue largo, y fueron claramente superadas por otras procedencias Mediterráneas. Las procedencias Españolas de media montaña (Sierra de Gredos, Montaña de Soria-Burgos y Serranía de Cuenca) tuvieron un buen comportamiento en todos los sitios de este ensayo multiambiente, demostrando su viabilidad para las zonas interiores de España (Alía y Moro 1996). Los resultados presentados en este capítulo indican que en la región interior de Galicia, que es una zona de transición entre los climas Atlántico y Mediterráneo, las procedencias de orígenes con influencia Atlántica (Sierra de Gredos y Bajo Tiétar) fueron las que crecieron más rápido, y por tanto fueron aparentemente las mejor adaptadas a las condiciones ambientales locales de esta región. Específicamente, el buen comportamiento en cuanto a crecimiento en altura de Sierra de Gredos, un origen con fuerte influencia Atlántica y altas precipitaciones (Tabla A3, Anexo 1), coincide con los resultados de Molina (1965) y con el buen crecimiento en altura y diámetro de esta procedencia en la región

Mediterránea de España (Alía et al. 1995; Alía y Moro 1996; Alía et al. 2001), sugiriendo una alta versatilidad para ser usada a través de un amplio rango de condiciones climáticas. La procedencia de Bajo Tiétar fue la mejor en crecimiento en altura, pero la peor en cuanto a la forma del fuste. Esto coincide con las características típicas de las masas de origen (Alía et al. 1996) mostrando, como en el caso de Sierra de Gredos, un comportamiento intermedio entre las procedencias Atlánticas y Mediterráneas, pero con formas de baja calidad y fustes revirados de forma helicoidal. Serranía de Cuenca también tuvo un buen crecimiento en altura, y mostró formas aceptables, como las masas naturales en su origen (Alía et al. 1996). Es importante destacar aquí que ésta es uno de los orígenes más variables, quizás debido a la gran extensión y heterogeneidad ambiental de esta región de procedencia, y porque ésta constituyó uno de los más importantes refugios glaciales en el sur de Europa desde donde la especie se expandió (Salvador et al. 2000; Carrión et al. 2003). Dentro de esta amplia región de procedencia, el origen de Boniches estuvo entre los mejores en cuanto a crecimiento en altura en los ensayos de procedencias españoles (Alía et al. 1995; Alía et al. 2001). Las restantes procedencias ensayadas, Montaña de Soria-Burgos, Sierra de Segura-Alcaraz, y Albarracín, mostraron pobres crecimientos pero estuvieron entre las mejores en cuanto a calidad del fuste. En otros ensayos de procedencias estos orígenes mostraron comportamientos intermedios tanto en crecimiento como en calidad del fuste. En la serie de ensayos de procedencias instalada en la región central de España, las mejores formas fueron las de las procedencias de montaña como Marruecos, Córcega, Sierra de Gredos y algunos orígenes de Serranía de Cuenca, lo que coincide con los resultados de otros ensayos de procedencias en Portugal medidos a los ocho años (Correia et al. 2004), en Francia a los 36 años (Danjon 1994), en Grecia a los nueve años (Matziris 1982) y en la zona costera de Galicia a los 18 años (Molina 1965), sugiriendo que este tipo de variables están menos afectadas por las condiciones ambientales. De acuerdo con estos resultados, Sierra de Cuenca mostró una forma del fuste aceptable en nuestra serie de ensayos, al igual que Montaña de Soria-Burgos, que también mostró excelentes formas en la costa de Galicia (Molina 1965). Sin embargo, contrariamente a los resultados previos (Alía et al. 1995; Alía y Moro 1996; Alía et al. 2001), en nuestros ensayos Sierra de Gredos no mostró buenas formas, mientras que Albarracín manifestó claramente las mejores características de forma a pesar de que en otros ensayos de procedencias este origen mostró calidades de forma intermedias. Estos resultados contradictorios podrían deberse a que la planta de nuestros ensayos se cultivó

en vivero en contenedores relativamente pequeños durante un largo periodo, favoreciendo las deformaciones en la raíz y un pobre anclaje después de la plantación. En otros trabajos se mostró que los problemas de estabilidad de las plantas en contenedor pueden desembocar en inclinaciones y curvaturas del tronco (Lario y Ocaña 2004), y podrían alterar las comparaciones entre diferentes materiales genéticos (Climent et al. 2008). Se debe destacar que aquellas procedencias con mejor crecimiento en altura son además las que muestran peores formas. Esta correlación negativa entre crecimiento y forma del fuste ha sido observada en otros ensayos de procedencias y progenies de la especie (Molina 1965; Matziris 1982; Danjon 1994; Aguiar et al. 2003; Correia et al. 2004), y puede haberse visto amplificada en nuestro ensayo debido a que aquellas procedencias que crecieron más rápido son probablemente las que produjeran los sistemas radicales más extensos dentro de los pequeños contenedores, sufriendo así mayores problemas radicales y mostrando peores formas en campo.

### **3.4.3. Interacción procedencia $\times$ sitio**

Contrariamente a lo observado en la zona central de España (Alía et al. 1997; Chambel 2006) la interacción procedencia  $\times$  sitio fue débil, probablemente porque el número de procedencias evaluadas y el número de sitios de ensayo fue mucho más bajo. Con respecto al crecimiento en altura, los ensayos de Guntín y Becerreá se comportaron de una manera similar, mientras que en Laza las procedencias se comportaron de manera relativamente diferente, mostrando los mayores cambios de ranking (ver Figura 3.2). Desde un punto de vista climático, la diferencia más importante entre los sitios de ensayo que pudiera explicar este patrón es la sequía estival, reducida en Becerreá y Guntín, y pronunciada en Laza (ver Tabla A1, Anexo 1). Estos resultados sugieren que la sequía estival es uno de los factores más importantes como impulsor de la diferenciación en *P. pinaster* (Danjon 1994), y las divergencias poblacionales en las adaptaciones locales a este factor limitante se expresan diferencialmente en cada sitio de ensayo, dependiendo de la intensidad de la sequía.

En el caso de la inclinación del tronco, la interacción procedencia  $\times$  sitio tuvo su origen probablemente en un efecto de escala debido a la gran variación en Becerreá en relación a los otros dos sitios (ver Figura 3.2), causado probablemente por la fuerte pendiente en este sitio, la alta frecuencia de tormentas de nieve, y los problemas de enraizamiento mencionados antes, que podrían ser más intensos en este ensayo ya que

se plantó tres meses después que los otros. La interacción no fue significativa a los siete años, probablemente porque a esta edad solo se analizaron dos sitios, pero también por una reducción de la interacción con el tiempo, tal como han observado otros autores (Alía et al. 1997).

#### **3.4.4. Comparaciones con el material costero mejorado**

Cuando se compararon las procedencias con el material mejorado de GC y WA evaluado en los ensayos de progenies adyacentes, se puede observar que ambos materiales mejorados se comportaron ligeramente mejor que las procedencias Mediterráneas, aunque las diferencias fueron mínimas (ver Figura 3.3). Por lo tanto, parece que los materiales mejorados mostraron una adaptación razonablemente buena al interior de Galicia, reflejando la ganancia genética obtenida en los correspondientes programas de mejora. Estos resultados sugieren la versatilidad de los materiales procedentes de ambos programas de mejora para ser utilizados en diferentes regiones climáticas, aprovechando la ganancia genética añadida obtenida durante los procesos de selección (ver Capítulo II). Considerando estos resultados, parece posible la extensión del área de mejora de *P. pinaster* costero a zonas de interior donde la sequía estival y el frío invernal son más extremos.

#### **3.4.5. Implicaciones prácticas**

Existen dos puntos débiles detrás de los resultados presentados en este capítulo. En primer lugar, aunque siete años es una edad razonable para propósitos de selección en una especie de crecimiento rápido, siete años en campo es probablemente un periodo demasiado corto para que quede reflejada la adaptación de las procedencias a las condiciones climáticas locales. En el futuro, posibles episodios climáticos extremos como sequías severas o temperaturas excepcionalmente bajas en invierno o primavera podrían alterar el ranking de procedencias observado. Por lo tanto, los resultados y las recomendaciones prácticas deben ser manejadas con cuidado y deben ser confirmadas con posteriores mediciones a edades más adultas. En segundo lugar, el escenario de cambio climático previsto para la región podría alterar también el comportamiento relativo de las procedencias estudiadas. Los modelos climáticos locales predicen un incremento de las temperaturas, especialmente durante el verano, e importantes cambios en la distribución de las precipitaciones a lo largo del año, con una progresiva evolución hacia condiciones más Mediterráneas (Pérez-Muñuzuri et al. 2009). En función de cómo

se cumplan estas predicciones, los resultados y recomendaciones presentados podrían ser más o menos válidos. Sin embargo, en el peor de los escenarios, el clima Atlántico del área costera podría asemejarse al clima actual en el interior de Galicia, por lo que estos resultados podrían ser especialmente relevantes para comprender cómo responderían los materiales estudiados al cambio climático en la zona costera.

A pesar de las limitaciones comentadas, los resultados presentados ofrecen una valiosa información para identificar materiales forestales de reproducción aptos para su uso en la región interior de Galicia. Como recomendación práctica final, Serranía de Cuenca es la procedencia con mejor comportamiento en todos los sitios, con alto crecimiento en altura y relativamente buenas formas, siendo así un material recomendado para su utilización en el área interior de Galicia. Sin embargo, esta procedencia es muy variable (Alía et al. 1996), y se podrían obtener distintos resultados en función del rodal de recogida dentro de la procedencia (F.J. Lario, comunicación personal). Albarracín mostró también buenos resultados, siendo la mejor en cuanto a forma y con crecimientos aceptables en los tres sitios. Siendo una procedencia bien adaptada a la sequía estival (Alía et al. 1996), se puede recomendar su uso en las zonas más secas del interior de Galicia.

La importación de semillas de las regiones de procedencia recomendadas en función de los resultados obtenidos en este capítulo, representa una clara alternativa para el suministro de materiales forestales de reproducción que puedan ser utilizados para repoblación en el interior de Galicia. No obstante, parece preferible el uso de material mejorado de los programas de mejora de GC y WA. Para explotar las ganancias genéticas de estos programas en la zona interior, se pueden considerar diferentes estrategias de selección, entre las cuales cabría destacar la conversión de los ensayos de progenies en huertos semilleros de brinzales, o la selección en los ensayos familiares de una nueva población de mejora con la cual establecer nuevos huertos semilleros clonales.



25

228

238

30

231

50

---

## 4. CAPÍTULO II. Transferencia de material Atlántico mejorado de *Pinus pinaster* a la zona interior de Galicia

---

Los resultados de este capítulo han dado lugar a la siguiente publicación:

**Raúl de la Mata**, Rafael Zas (2010) Transferring Atlantic maritime pine improved material to a region with marked Mediterranean influence in inland NW Spain: a likelihood-base approach on spatially adjusted field data. *European Journal of Forest Research* 129 (4):645-658

## 4. CAPÍTULO II. Transferencia de material Atlántico mejorado de *Pinus pinaster* a la zona interior de Galicia

### 4.1. Introducción

Las importantes ganancias y los buenos resultados obtenidos en el programa de mejora de pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) para la zona costera de Galicia invitan a explorar la posibilidad de usar este material mejorado en la zona interior, aunando los esfuerzos de mejora entre zonas y minimizando los costes. Si la interacción genotipo  $\times$  ambiente entre zonas no es mayor que la interacción dentro de cada zona, podría considerarse Galicia como una única área de mejora, permitiendo la disponibilidad de material mejorado para el interior en un corto espacio de tiempo. Sin embargo, las familias del programa de mejora Galicia-Costa (GC) se han probado únicamente en la zona costera y no existe información sobre su comportamiento en la zona interior. Resultados previos muestran una interacción genotipo  $\times$  ambiente (G $\times$ E) relevante en la población de mejora tanto en condiciones de campo en la zona costera (Zas et al. 2004b; Martíns et al. 2009), como en condiciones controladas bajo distintos regímenes de sequía (Zas y Fernández-López 2005). Sin embargo, la interacción G $\times$ E tuvo su origen en un pequeño número de familias especialmente sensibles a la variación ambiental, mientras que la mayor parte de ellas mostraron un comportamiento estable. Se ha sugerido la selección por estabilidad como una opción para obtener material adaptado a ambas regiones climáticas (Zas y Fernández-López 2005).

En la década de 1950 se inició un programa de mejora en Australia Occidental (WA) con la selección de árboles superiores dentro de la región de procedencia de Leiría (Portugal), completando hasta la fecha varios ciclos de mejora y obteniendo importantes ganancias en crecimiento, forma del fuste y ramosidad (Perry y Hopkins 1967; Butcher y Hopkins 1993; Butcher 2007). La procedencia de Leiría tiene un carácter marcadamente Atlántico, mientras que las zonas de WA actualmente plantadas con *P. pinaster* corresponden a sitios agrícolas abandonados, con precipitaciones medias-bajas (400-600 mm) y marcada influencia Mediterránea (Butcher 2007). Por este motivo la tolerancia a la sequía es un importante carácter de selección en este programa de mejora (Butcher 2007; Butcher y Chandler 2007). El ejemplo de Australia Occidental demuestra la viabilidad de obtener buenos resultados mediante selección recurrente a partir de material Atlántico para usarlo en condiciones Mediterráneas

caracterizadas por fuerte sequía estival (Butcher 2007; Butcher y Chandler 2007) (ver Anexo 1 para más información sobre el programa de mejora de WA y el material mejorado utilizado).

En el presente capítulo se evalúa el comportamiento en campo de materiales mejorados con diferentes niveles de selección (procedentes de los programas de mejora de Galicia-Costa (GC) y Australia Occidental (WA) en la zona interior de Galicia. Además se analiza en detalle la magnitud y la relevancia de la interacción G×E dentro y entre las dos áreas de mejora actualmente operativas (Galicia-Costa y Galicia-Interior) con el objetivo de contrastar la idoneidad de esta zonificación. Con este fin, se evalúa el comportamiento de 111 familias de medios hermanos del programa GC y seis familias del programa WA en cinco sitios, dos en la zona costera y tres en la zona interior de Galicia, tres y siete años después de la plantación. Además se compararon los materiales mejorados de origen Atlántico con materiales no mejorados plantados en ensayos de procedencias adyacentes para comprobar su viabilidad en los sitios de interior con condiciones ambientales más extremas.

## **4.2. Material y métodos**

### ***4.2.1. Material genético y sitios de ensayo***

El material estudiado consistió en 111 familias de medios hermanos obtenidas de otros tantos árboles plus representados en el huerto semillero clonal de primera generación de Sergude (A Coruña; 42° 49' N, 8° 28' O) que proporciona semilla de alta calidad genética para repoblación en la zona costera de Galicia (ver Figura A1, Anexo 1). Los árboles plus fueron seleccionados individualmente en masas adultas de la zona costera de Galicia, por altos crecimientos y buenas características de forma del fuste y ramosidad.

Además se incluyeron en todos los ensayos seis familias del programa de mejora WA (WA1-WA6). Estas familias se obtuvieron por polinización abierta en el huerto semillero clonal de segunda generación de Manjimup (34° 14' S, 116° 8' E, Australia Occidental). Los padres fueron seleccionados por sus características de vigor, forma del fuste, ramosidad y resistencia a la sequía en los ensayos de progenies instalados en Australia Occidental a partir de polinizaciones controladas entre los árboles superiores originales seleccionados en Leiría y árboles superiores seleccionados dentro de la raza local de Australia Occidental. El lote de semilla WA6 fue una mezcla de diferentes

familias y se puede considerar que es representativo del comportamiento promedio del huerto semillero de Manjimup (T. Butcher, comunicación personal) (ver Anexo 1 para más información).

Plántulas en contenedor del material genético descrito fueron plantadas durante el año 2001 en cinco localidades. Las características de los sitios de ensayo se presentan en la Tabla A1, Anexo 1 (serie de 2001-progenies). Los sitios de Daneiro y Laracha se sitúan en la RIU (Región de Identificación y Utilización del material forestal de reproducción) número 1 que constituye, a priori, el área de uso del material procedente de los huertos semilleros de Galicia-Costa (Figura A1, Anexo 1). Estos dos sitios tienen un clima típicamente Atlántico caracterizado por una alta precipitación anual, baja sequía estival y baja oscilación térmica (Tabla A1, Anexo 1). Los otros tres sitios, Becerreá, Guntín y Laza, se sitúan dentro de la RIU número 2 que incluye la mayor parte de la zona interior de Galicia y constituye una región de transición hacia características climáticas más Mediterráneas y continentales propias del centro de la Península Ibérica, con prolongada sequía estival y amplia oscilación térmica (Tabla A1, Anexo 1). Becerreá es el sitio más frío, mientras que Guntín y Laza muestran bajas precipitaciones anuales y estivales, siendo Laza el sitio más seco de los dos.

Los cinco sitios de ensayo siguen un diseño experimental de bloques completos al azar con 25 réplicas (excepto Daneiro, con 23 réplicas), unidades experimentales de un árbol y un marco de plantación de 3 x 2 m (excepto Laza, con un marco de 2,5 x 2 m), que es el marco típico en las plantaciones de *P. pinaster* en la región.

En los tres sitios de interior, se instalaron sendos ensayos de procedencias simultáneamente y de forma adyacente a los ensayos de progenies. En cada uno se evaluaron seis procedencias españolas del área Mediterránea (Bajo Tiétar, Sierra de Gredos, Montaña de Soria-Burgos, Serranía de Cuenca, Albarracín y Sierra Segura-Alcaraz) (ver Capítulo I y Anexo 1 para más información), que fueron seleccionadas en base a la capacidad de producción maderera de sus masas naturales y por su comportamiento en ensayos de procedencias previos (Molina 1965; Alía et al. 2001). Los tres ensayos de procedencias siguieron un diseño de bloques completos al azar con diez réplicas y unidades experimentales de cinco árboles en línea. Las plantas de los ensayos de procedencias se cultivaron conjuntamente con las de los ensayos de progenies siguiendo los mismos protocolos de cultivo. Ambos tipos de ensayos se plantaron al mismo tiempo, con el mismo marco de plantación y preparación del suelo, y se midieron en las mismas fechas. Los datos de las procedencias se utilizaron para

predecir el comportamiento de fuentes de semilla no mejoradas y contrastarlo con el comportamiento de los materiales de origen Atlántico.

#### **4.2.2. Mediciones**

Se midieron caracteres de crecimiento, forma del fuste y ramosidad de todos los árboles en cada sitio a los tres y siete años después de la plantación, excepto aquellas plantas muertas o desaparecidas. Los caracteres de crecimiento incluyeron la altura total (H) medida con una pértiga en centímetros y el diámetro a la altura de pecho (D) medido con una forcípula en milímetros (mediciones sólo a los siete años). Los caracteres de forma del fuste y ramosidad fueron medidos siguiendo el protocolo mostrado en Galera et al. (1997). La forma del fuste de cada árbol fue evaluada adjudicándole un valor de rectitud (REC: 1 = recto a 6 = muy torcido) y un valor de inclinación (INC: 1 = vertical a 4 = inclinación severa). Se contó también el número de verticilos (VER) como una medida del policiclismo y de la abundancia de ramas.

Los dos sitios de ensayo costeros, Daneiro y Laracha, fueron afectados por plagas y enfermedades, por lo que únicamente se midieron a los tres años. Los árboles en Daneiro fueron atacados por el gorgojo del pino, *Hyllobius abietis* L., que mata a las plántulas mediante el anillado del tronco. En Laracha, el hongo radical *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink causó la muerte de cerca del 65% de las plantas tres años después de la plantación (ver Zas et al. 2007). Además, el ensayo de procedencias de Becerreá se vio afectado por la construcción de una pista forestal en 2005, dejando disponible solamente la medición a los tres años.

#### **4.2.3. Análisis estadísticos**

Debido a la frecuente presencia de autocorrelación espacial en los ensayos genéticos forestales procedimos a la corrección de la variable dependiente mediante herramientas de estadística espacial (ver Anexo 2 para más detalles y códigos SAS). El ajuste espacial se realizó de manera independiente en cada sitio de ensayo, incluyendo tanto los árboles de los ensayos de progenies como los de los ensayos de procedencias adyacentes, y considerando un único efecto genético (familia o procedencia) para obtener los residuos correspondientes. Una vez se corrigió espacialmente la variable dependiente, los ensayos de progenies y procedencias se analizaron de manera independiente como se muestra a continuación.

#### 4.2.3.1. Análisis basados en la verosimilitud de la interacción familia $\times$ sitio

Los datos espacialmente corregidos (para los caracteres con estructuras espaciales no aleatorias) y los datos originales sin corregir (para los caracteres espacialmente independientes) fueron analizados mediante modelos mixtos con el sitio como factor fijo, y el bloque dentro del sitio, la familia y la interacción familia  $\times$  sitio como factores aleatorios (Yang 2002; Crossa et al. 2004). Los modelos mixtos se ajustaron utilizando el procedimiento MIXED de SAS (Littell et al. 2006), adaptando los programas de Yang (2002) a nuestro diseño experimental (ver códigos SAS en Anexo 2). Se estimaron los componentes de la varianza usando el método REML (máxima verosimilitud restringida) (para más información ver Anexo 2). Se ajustaron distintos modelos asumiendo distintas estructuras de la matriz de varianzas y covarianzas familiares (varianzas y covarianzas a través de sitios), utilizando para ello las opciones SUBJECT y TYPE en la sentencia RANDOM. La heterogeneidad de las varianzas residuales a través de sitios se implementó con la opción GROUP de la sentencia REPEATED. Se especificaron en la sentencia PARMS los parámetros de inicio para facilitar la convergencia y acelerar los cálculos.

Con el objetivo de explorar e interpretar la interacción  $G \times E$ , se ajustaron diferentes modelos reducidos con restricciones en diferentes elementos de la estructura de covarianza familiar. Estas restricciones fueron especificadas seleccionando adecuadamente los modelos de covarianza predefinidos para la opción TYPE en la sentencia RANDOM, y/o fijando algunos parámetros de covarianza específicos mediante la opción HOLD de la sentencia PARMS (Yang 2002; Crossa et al. 2004; Fry 2004). Se evitó la estimación fuera de rango ( $>1$  o  $<-1$ ) de las correlaciones familiares incluyendo las opciones UPPERB y LOWERB en la sentencia PARMS. En la Tabla 2.1 se muestra de forma detallada una lista de los diferentes modelos y las correspondientes hipótesis analizadas. El test de hipótesis con respecto a las restricciones impuestas en la estructura de covarianza familiar se realizó mediante la comparación del logaritmo de verosimilitud restringida (RLL) del modelo con restricciones (modelo reducido) y del modelo sin restricciones (habitualmente se refiere al modelo saturado con una estructura de covarianza familiar sin estructura predefinida, ver más adelante). Bajo la hipótesis nula de que el modelo saturado no es diferentes del modelo reducido, el 'ratio del logaritmo de verosimilitud'  $LLR = -2 (RLL_{\text{modelo reducido}} - RLL_{\text{modelo saturado}})$  sigue una distribución aproximada chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con tantos grados de libertad como la

diferencia existente entre el número de parámetros a estimar entre el modelo saturado y el reducido (Fry 2004).

Debido a que tratamos ambientes diferentes (tres o cinco dependiendo de la variable) se empleó la siguiente estrategia. En primer lugar, analizamos los datos con el modelo mixto convencional utilizado en mejora genética forestal, que asume una varianza y covarianza comunes a través de sitios [i.e. una estructura de covarianza de tipo ‘simetría compuesta’ (CS)], y homogeneidad de varianzas residuales. Este modelo fue comparado con otro menos restrictivo en el cual se permitió que las varianzas residuales variaran entre sitios, constituyendo éste un test significativo para contrastar la heterogeneidad de varianzas del error. La homogeneidad de las varianzas residuales es una premisa fundamental en los análisis estadísticos convencionales, y se sabe que el incumplimiento de este requisito es una posible causa de interacciones espurias (Yang 2002).

**Tabla 4.1** Descripción del modelo saturado y los modelos reducidos para testar diferentes hipótesis relacionadas con la interpretación de la interacción genotipo × ambiente.

Modelo e hipótesis testada	Restricciones	EstrucCov	Parámetros a estimar	#parámetros	
				5 sitios	3 sitios
H0 Modelo saturado. Se permiten todas las causas de interacción genotipo x ambiente	Ninguna	UNR	$\sigma_{G1}^2, \sigma_{G2}^2, \sigma_{G3}^2, \sigma_{G4}^2, \sigma_{G5}^2$ $\rho_{12}, \rho_{13}, \rho_{14}, \rho_{15}, \rho_{23}, \rho_{24}, \rho_{25}, \rho_{34}, \rho_{35}, \rho_{45}$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	20	9
H1 Sin interacción familia x sitio	$\sigma_{Gi}^2 = \sigma_{Gj}^2 = \sigma_G^2 \forall i, j; \sigma_{GxE}^2 = 0$	CS*	$\sigma_G^2$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	6	4
H2 Homogeneidad de varianzas familiares a través de sitios	$\sigma_{Gi}^2 = \sigma_{Gj}^2 = \sigma_G^2 \forall i, j$	CS	$\sigma_G^2, \sigma_{GxE}^2$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	7	5
H3 Correlación familiar perfecta entre pares de sitios	$\rho_{Gij} = 1 \forall i \neq j$	CSH*	$\sigma_{G1}^2, \sigma_{G2}^2, \sigma_{G3}^2, \sigma_{G4}^2, \sigma_{G5}^2$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	10	6
H4 Homogeneidad de la covarianza familiar entre pares de sitios	$\rho_{Gij} = \rho_{Gi'j'} = \rho_G \forall i \neq j, i' \neq j'$	CSH	$\sigma_{G1}^2, \sigma_{G2}^2, \sigma_{G3}^2, \sigma_{G4}^2, \sigma_{G5}^2$ $\rho$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	11	7
H5 Correlación familiar perfecta entre sitios dentro de áreas	$\rho_{Gij} = 1 \forall i, j \in \text{mismo área}$	UNR*	$\sigma_{G1}^2, \sigma_{G2}^2, \sigma_{G3}^2, \sigma_{G4}^2, \sigma_{G5}^2$ $\rho_{14}, \rho_{15}, \rho_{24}, \rho_{25}, \rho_{34}, \rho_{35}$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	16	-

En el modelo saturado, la estructura de las matrices de covarianza familiar ( $\Sigma_G$ ) y del error ( $\Sigma_e$ ) son:

$$\Sigma_G = \begin{matrix} & \begin{matrix} \text{Sitios interiores} & \text{Sitios costeros} \end{matrix} \\ \begin{matrix} \sigma_{G1}^2 & \rho_{12} & \rho_{13} & \rho_{14} & \rho_{15} \\ \rho_{12} & \sigma_{G2}^2 & \rho_{23} & \rho_{24} & \rho_{25} \\ \rho_{13} & \rho_{23} & \sigma_{G3}^2 & \rho_{34} & \rho_{35} \\ \rho_{14} & \rho_{24} & \rho_{34} & \sigma_{G4}^2 & \rho_{45} \\ \rho_{15} & \rho_{25} & \rho_{35} & \rho_{45} & \sigma_{G5}^2 \end{matrix} \end{matrix}$$

$$\Sigma_e = \begin{matrix} & \begin{matrix} \text{Sitios interiores} & \text{Sitios costeros} \end{matrix} \\ \begin{matrix} \sigma_{e1}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{e2}^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{e3}^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \sigma_{e4}^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \sigma_{e5}^2 \end{matrix} \end{matrix} \left. \begin{matrix} \text{Sitios interiores} \\ \text{Sitios costeros} \end{matrix} \right\}$$

donde  $\sigma_{Gi}^2$  y  $\sigma_{ei}^2$  son la varianza familiar y residual en el sitio  $i$ , y  $\rho_{ij}$  es la correlación familiar entre el sitio  $i$  y el  $j$ . Los modelos reducidos restringen diferentes elementos de la estructura de varianzas-covarianzas familiares especificando en la sentencia RANDOM del PROC MIXED diferentes tipos de estructuras de covarianza (EstrucCov), y/o fijando diferentes parámetros de covarianza con la opción HOLD de la sentencia PARMS. Las restricciones adicionales en elementos específicos de la matriz de varianzas-covarianzas se indican con un \* en el campo EstrucCov. Se muestran los parámetros a estimar en cada modelo para los análisis que incluyen cinco sitios (caracteres medidos a los tres años). También se muestra el número total de parámetros a estimar (#parámetros) para los análisis que incluyen tanto cinco como tres sitios. Todos los modelos asumen heterogeneidad de varianzas residuales a través de sitios. Todas las hipótesis están testadas mediante la comparación de los modelos reducidos frente al modelo saturado, a excepción de la hipótesis H2 que fue testada comparando el modelo H2 frente al modelo H4.

Para testar la significación de la familia y de la interacción familia  $\times$  sitio se comparó el RLL de modelos que incluyeron dichos factores frente a modelos que los excluían. Este test para la presencia de interacción  $G \times E$ , aunque es comúnmente usado, podría no ser apropiado en el caso de varianzas familiares y/o covarianzas heterogéneas a través de sitios. Un análisis más preciso de la interacción  $G \times E$  en sentido amplio se implementó mediante la comparación del modelo CS sin el término  $G \times E$  (modelo H1 en la Tabla 4.1) con el modelo de covarianza sin estructura predefinida (el modelo saturado H0), en el cual se permiten todas las posibles causas de  $G \times E$  (i.e. heterogeneidad familiar entre sitios y desviaciones de la correlación familiar perfecta entre ambientes) (Yang 2002). En segundo lugar, testamos de manera específica la contribución de cada una de las posibles causas de  $G \times E$ . La heterogeneidad de la varianza familiar se analizó comparando el modelo de la estructura de covarianza familiar tipo CS (modelo H2 en la Tabla 4.1) con el modelo de estructura de covarianza de tipo ‘simetría compuesta heterogénea’ (CSH, modelo H4 en la Tabla 4.1). Las desviaciones de las correlaciones perfectas, que puede interpretarse como un test de presencia de interacción con cambios de ranking (Yang 2007), se analizaron mediante la comparación de un modelo en el que todas las correlaciones se fijaron a 1 (modelo H3 en la Tabla 4.1) con el modelo saturado H0. Finalmente, si se detectaron desviaciones significativas de la correlación familiar perfecta, examinamos entonces si las correlaciones familiares entre sitios fueron constantes a través de todos los pares de ambientes (modelo H4 en la Tabla 4.1) o si fueron diferentes según el par de sitios considerado (modelo saturado H0). Además, para caracteres medidos tanto en los sitios costeros como de interior (i.e., caracteres medidos a los tres años), también probamos si las interacciones con cambios de ranking fueron debidas a desviaciones de la correlación familiar perfecta entre sitios pertenecientes a diferentes áreas. Esta hipótesis se analizó comparando el modelo saturado con un modelo en el cual todas las correlaciones familiares entre sitios de la misma área se fijaron a 1, mientras que las correlaciones familiares entre sitios de áreas diferentes se mantuvieron sin restricciones (modelo H5 en la Tabla 4.1). En el Anexo 2 se muestran los códigos SAS para desarrollar todos estos análisis.

#### *4.2.3.2. Comparaciones entre los materiales mejorados de GC y WA*

Con el objetivo de analizar las diferencias estadísticas entre las familias de los programas de mejora de GC y WA, reanalizamos los datos incluyendo el programa de

mejora y la interacción programa  $\times$  sitio como efectos fijos en los modelos mixtos, y anidando las familias dentro de los programas de mejora. Además, se comparó estadísticamente el mejor predictor lineal insesgado (BLUP) de cada una de las familias de WA con el BLUP del promedio de las 111 familias de GC usando la sentencia ESTIMATE del procedimiento MIXED (Littell et al. 2006, Cap. 6).

#### 4.2.3.3. Superioridad de los materiales mejorados

Ya que en la serie de ensayos utilizada en este capítulo (serie 2001-progenies, ver Anexo 1) no se incluyó ningún lote control, utilizamos los ensayos de procedencias adyacentes para obtener predicciones sobre fuentes de semilla no mejorada con las cuales comparar los materiales seleccionados. A pesar de que las procedencias y las progenies pertenecían a dos ensayos independientes, con distintos diseños experimentales, fue posible realizar comparaciones estadísticas fidedignas entre ambos materiales debido a que el ajuste espacial conjunto tuvo en cuenta las posibles diferencias microambientales entre ambos ensayos. Se estimaron los intervalos de confianza al 95% de los BLUPs de cada familia y procedencia en el conjunto de los tres sitios de ensayo del interior utilizando la sentencia ESTIMATE del procedimiento MIXED (Littell et al. 2006). Cuando los intervalos de confianza no se solaparon, se interpretó como la existencia de diferencias significativas entre las familias mejoradas y las procedencias no mejoradas. Becerreá no fue considerada para las variables medidas a los siete años por la ausencia de datos a esta edad.

### 4.3. Resultados

Los promedios de altura fueron notablemente diferentes en los distintos sitios de ensayo, lo que indica calidades de estación muy variables. Las alturas medias variaron desde los 78,6 cm en Daneiro hasta los 133,9 cm en Laracha a los tres años, y desde los 295,1 cm en Becerreá hasta los 350,3 cm en Guntín a los siete años (Tabla A1, Anexo 1). La dispersión de las alturas individuales dentro de cada ensayo fue, a su vez muy alta, con coeficientes de variación por encima del 40%. Por ejemplo, en Laza las alturas individuales abarcaron desde los 52 cm hasta los 683 cm, i.e. más de 5 m entre el árbol más alto y el más bajo. Los datos espacialmente corregidos para cada carácter mostraron la misma media por sitio que los datos originales no corregidos, pero mostraron una

dispersión claramente menor, con coeficientes de variación comprendidos entre un 15 y un 20%.

La supervivencia en los sitios costeros fue anormalmente baja (39 y 35% en Daneiro y Laracha a los tres años, respectivamente) debido a los problemas sanitarios ya mencionados. De entre los sitios de interior, los ratios de supervivencia fueron aceptables en Guntín y Laza con valores cercanos al 93% a los siete años, mientras que fue notablemente más bajo en Becerreá (58% a los siete años).

#### **4.3.1. Dependencia espacial y homocedasticidad**

Los residuos después de sustraer los efectos familiares revelaron pronunciadas estructuras espaciales no aleatorias para los caracteres de crecimiento y número de verticilos en todos los sitios (Tabla 4.2). Los semivariogramas teóricos de tipo esférico se ajustaron bien a los semivariogramas observados para la mayoría de estos caracteres ( $r^2 > 0,85$ ,  $P < 0,001$ ). La variación explicada por el patrón espacial varió desde un 10,6% para VER en Becerreá a los tres años hasta un 73,2% para H en Laza a los siete años (Tabla 4.2). La altura a los siete años mostró las mayores intensidades de dependencia espacial, con valores que variaron entre el 41,4 y el 73,2%. El Rango ( $a_0$ ) o tamaño del parche del semivariograma teórico fue muy variable, desde los 29,3 m para H en Daneiro a los tres años hasta los 103,9 m para H en Laza también a los tres años (Tabla 4.2). Los caracteres relacionados con la forma del fuste revelaron estructuras espaciales aleatorias a excepción de Becerreá y Daneiro, donde REC e INC mostraron una ligera autocorrelación espacial.

Se observó heterogeneidad de varianzas residuales para todos los caracteres y edades. Los ratios del logaritmo de verosimilitud de los modelos de heterogeneidad de varianzas fueron mucho más bajos que los de los modelos que asumieron igualdad de varianzas, y las diferencias fueron altamente significativas ( $P < 0,001$ ) en todos los casos. Debido a la heterogeneidad de las varianzas residuales, todos los análisis mostrados en los siguientes apartados se basaron en modelos con varianzas residuales heterogéneas, y en aquellos casos donde se detectaron estructuras espaciales no aleatorias (Tabla 4.2) se utilizaron datos espacialmente corregidos.

**Tabla 4.2** Tamaño del parche (rango en metros,  $a_0^1$ ) e intensidad de la estructura del patrón espacial (ratio entre la varianza del parche y la varianza umbral o asintótica,  $I(\%) = [C/(C+C_0)] \times 100$ ) derivados de los semivariogramas teóricos ajustados para las diferentes variables, una vez eliminados los efectos genéticos en los cinco sitios de ensayo a los tres y siete años después de la plantación.

	COSTA				INTERIOR						
	Daneiro		Laracha		Becerreá		Guntín		Laza		
	$a_0$ (m)	I (%)	$a_0$ (m)	I (%)	$a_0$ (m)	I (%)	$a_0$ (m)	I (%)	$a_0$ (m)	I (%)	
<b>3 años</b>											
Altura	29,3	19,3	78,9	25,8	53,6	29,5	36,8	24,1	103,9	38,1	
Nº verticilos	grad <sup>2</sup>	16,5 <sup>3</sup>	e.i. <sup>4</sup>		61,8	10,6	44,1	11,4	70,0	22,5	
Inclinación	99,0	26,6	e.i.		77,6	12,0	e.i.		e.i.		
Rectitud	grad	29,8	e.i.		77,2	15,8	e.i.		e.i.		
<b>7 años</b>											
Altura					42,7	41,4	94,6	47,5	47,8	73,2	
Diámetro					48,0	32,6	88,0	42,1	34,9	57,9	
Nº verticilos					112,5	60,9	grad	25,6	33,8	35,3	
Inclinación					113,5	17,7	e.i.		e.i.		
Rectitud					grad	18,1	e.i.		e.i.		

<sup>1</sup> El tamaño del parche mostrado ( $a_0$ ) es el parámetro  $a_0$  del modelo esférico, pero es  $a_0 \times 3$  para el modelo exponencial (Webster y Oliver 1990).

<sup>2</sup> grad = gradiente (semivariograma lineal).

<sup>3</sup> Para modelos lineales, la intensidad de la estructura del patrón espacial se calculó para una distancia de 100 m como  $100 \cdot C / (100 \cdot C + C_0)$ .

<sup>4</sup> e.i.= variable espacialmente independiente.

#### 4.3.2. Variación familiar e interacción familia $\times$ sitio

En la Tabla 4.3 se muestran los resultados del análisis convencional que incluye la familia y la interacción familia  $\times$  sitio como efectos al azar (i.e., asumiendo una estructura de covarianza familiar de tipo ‘simetría compuesta’ con varianza y covarianza constantes). Usando este modelo, la variación familiar fue altamente significativa para todas las variables y edades, y la interacción familia  $\times$  sitio fue significativa ( $P < 0,05$ ) o marginalmente significativa ( $P < 0,10$ ) para siete de las nueve variables. El número de verticilos a los tres años y el valor de inclinación a los siete fueron las variables que mostraron una interacción familia  $\times$  sitio no significativa. El ratio entre la varianza de la interacción y la familiar ( $\sigma_{f \times s}^2 / \sigma_f^2$ ) fue relativamente pequeño en todos los casos y varió entre 0,10 para la inclinación a los siete años y 0,54 para la altura a los tres años.

**Tabla 4.3** Resumen de los análisis con modelos mixtos para las diferentes variables medidas a los tres y siete años utilizando una estructura de tipo ‘simetría compuesta’ para la matriz de varianzas-covarianzas familiares a través de sitios.

Edad	Variables	Sitio	Familia	Familia x sitio
		F <sup>a</sup>	VC ± SE	VC ± SE
3	Altura	1067,0 ***	20,316 ± 3,496***	11,053 ± 1,937***
	Nº verticilos	407,0 ***	0,046 ± 0,008***	0,005 ± 0,005 <sup>ns</sup>
	Inclinación	329,4 ***	0,001 ± 0,0003***	0,0005 ± 0,0004 <sup>ns</sup>
	Rectitud	75,1 ***	0,018 ± 0,003***	0,009 ± 0,003***
7	Altura	635,6 ***	124,850 ± 24,946***	52,487 ± 16,651***
	Diámetro	261,0 ***	4,513 ± 1,143***	1,617 ± 1,052*
	Nº verticilos	109,3 ***	0,075 ± 0,015***	0,022 ± 0,010**
	Inclinación	101,5 ***	0,002 ± 0,001**	0,0002 ± 0,001 <sup>ns</sup>
	Rectitud	86,3 ***	0,010 ± 0,003***	0,003 ± 0,002 <sup>ns</sup>

Para los efectos fijos (sitio), se muestra el F-ratio y los niveles de significación asociados; para los efectos aleatorios (familia, e interacción familia × sitio), se muestran las estimaciones de los componentes de la varianza ± errores estándar (VC ± SE) y los niveles de significación asociados a cada componente obtenidos mediante el test del ratio del logaritmo de verosimilitud.

Los asteriscos de los componentes de la varianza indican el nivel de significación (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ; ns =  $p > 0,05$ ) asociado al valor chi-cuadrado equivalente a dos veces la diferencia del logaritmo de verosimilitud del modelo con ese factor incluido frente al modelo sin ese factor. Debido a que los componentes de la varianza tienen que ser positivos, el test utilizado para su significación es de una cola (Fry 2004).

<sup>a</sup> F<sub>4,118</sub> para las variables a los 3 años y F<sub>2,67</sub> a los 7 años.

En la Tabla 4.4 se muestra un análisis exhaustivo basado en la verosimilitud de la relevancia e interpretación de la interacción familia × sitio para tres caracteres seleccionados. Cuando se consideran todas las posibles causas de interacción, la interacción familia × sitio fue altamente significativa en todos los casos. Estos resultados contradicen aquellos mostrados en la Tabla 4.3 para el número de verticilos a los tres años y para la rectitud a los siete años. Estas discrepancias surgen debido a que los resultados presentados en la Tabla 4.3 están basados en un modelo que asume homogeneidad de varianzas y covarianzas familiares a través de sitios, supuestos claramente inapropiados en estos casos. De hecho, la importante heterogeneidad familiar a través de sitios para estas variables (Tabla 4.4) es responsable de la interacción familia × sitio significativa. Por otro lado, la falta de correlación familiar perfecta entre sitios contribuyó significativamente a la interacción familia × sitio en los casos de la altura a ambas edades, y la rectitud a los tres años, sugiriendo cambios de ranking familiares a través de sitios para esas variables. Además, los resultados de la hipótesis H4 indican que la covarianza familiar a través de sitios para el crecimiento en

altura fue constante para todos los pares de sitios (Tabla 4.4). Por lo tanto, es probable que los cambios de ranking familiares se distribuyan por igual entre todos los pares de sitios, y ningún sitio o grupo de sitios determinado sea el responsable de la interacción con cambios de ranking (ver la escasa variación en las correlaciones familiares entre sitios en la Tabla 4.5). Este no es el caso de la rectitud a los tres años, donde el modelo de covarianza convencional (H4) se ajustó significativamente peor que el modelo de covarianzas sin estructura predefinida (Tabla 4.4). Las correlaciones familiares entre sitios (Tabla 4.5) indican que Becerreá, que no muestra correlaciones familiares significativas con ningún otro sitio, tiene un comportamiento claramente anómalo para esta variable. Además, en el caso de la altura y la rectitud a los tres años, existen desviaciones de las correlaciones familiares perfectas tanto dentro como entre las dos áreas de mejora (Galicia-Costa y Galicia-Interior). Los modelos que asumieron correlación perfecta entre sitios pertenecientes a la misma área, permitiendo cambios de ranking familiares entre sitios de áreas diferentes (hipótesis H5) mostraron un ajuste significativamente peor que el modelo saturado.

**Tabla 4.4** Ratios de verosimilitud para testar diferentes hipótesis relacionadas con la relevancia e interpretación de la interacción genotipo × ambiente para diferentes variables medidas a los tres y siete años.

Hipótesis nula	GL	Altura		Nº verticilos		Rectitud	
		$\chi^2$	p> $\chi^2$	$\chi^2$	p> $\chi^2$	$\chi^2$	p> $\chi^2$
<i>3 años</i>							
H1: Sin interacción familia × sitio	14	100,7	<0,001	72,1	<0,001	912,8	<0,001
H2: Homogeneidad de varianzas familiares a través de sitios	4	15,8	0,003	60,0	<0,001	19,5	<0,001
H3: Correlación familiar perfecta entre pares de sitios	10	77,3	<0,001	12,6	0,248	67,4	<0,001
H4: Homogeneidad de la covarianza familiar entre pares de sitios	9	14,6	0,102	10,6	0,304	64,2	<0,001
H5: Correlación familiar perfecta entre sitios dentro de áreas (Galicia costera e interior)	4	59,5	<0,001	4,7	0,319	41,0	<0,001
<i>7 años</i>							
H1: Sin interacción familia × sitio	5	21,3	<0,001	26,8	<0,001	256,3	<0,001
H2: Homogeneidad de varianzas familiares a través de sitios	2	4,5	0,100	19,2	<0,001	26,6	<0,001
H3: Correlación familiar perfecta entre pares de sitios	3	12,3	0,006	6,3	0,098	4,2	0,241
H4: Homogeneidad de la covarianza familiar entre pares de sitios	2	1,1	0,576	1,4	0,500	4,2	0,121

Los valores chi-cuadrado mostrados equivalen a dos veces la diferencia entre el logaritmo de verosimilitud del modelo saturado (matriz de varianzas-covarianzas sin estructura predefinida) y diferentes modelos reducidos con restricciones en ciertos elementos de la estructura de covarianza familiar a través de sitios (ver Tabla 4.1). Los grados de libertad (GL) asociados a los valores chi-cuadrado se obtuvieron de la diferencia entre el número de parámetros de covarianza especificados en el modelo saturado y cada uno de los reducidos. P valores más bajos de 0,05 indican que se rechaza la hipótesis nula.

**Tabla 4.5** Estimaciones REML de las correlaciones genéticas entre sitios utilizando una matriz de varianzas-covarianzas sin estructura predefinida a través de sitios para diferentes variables medidas a los tres (sobre la diagonal) y siete años (bajo la diagonal).

Variable	Sitio	Interior			Costa	
		Becerreá	Guntín	Laza	Daneiro	Laracha
Altura	Becerreá		0,63***	0,62***	0,77***	0,62***
	Guntín	0,63***		0,60***	0,42**	0,74***
	Laza	0,67***	0,79***		0,84***	0,67***
	Daneiro					0,60***
	Laracha					
Nº verticilos	Becerreá		0,79***	1,00***	0,24 <sup>ns</sup>	0,54**
	Guntín	0,86***		0,95***	1,00*	0,60**
	Laza	0,68***	0,82***		1,00*	0,80***
	Daneiro					1,00 <sup>ns</sup>
	Laracha					
Rectitud	Becerreá		0,28 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>	-0,41 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>
	Guntín	1,00 <sup>ns</sup>		1,00***	1,00***	0,47**
	Laza	0,29 <sup>ns</sup>	1,00*		0,89***	0,45**
	Daneiro					0,10 <sup>ns</sup>
	Laracha					

Los sitios están agrupados según las dos principales regiones climáticas (Galicia-Costa y Galicia-Interior). Los asteriscos indican el nivel de significación (\*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ; ns =  $p > 0,05$ ) asociado al valor chi-cuadrado equivalente a dos veces la diferencia del logaritmo de verosimilitud del modelo con ese factor incluido frente al modelo sin ese factor (fijado a cero).

**Tabla 4.6** Efectos del Programa de Mejora del que proceden las familias (Galicia-Costa y Australia Occidental), y su interacción con los sitios para diferentes variables medidas a los siete años en los tres sitios de interior.

Efectos	GL	Altura		Nº verticilos		Rectitud	
		F	p> F	F	p> F	F	p> F
Programa	1 115	11,4	0,001	4,6	0,034	5,1	0,026
Sitio	2 67	138,7	<0,001	17,1	<0,001	26,0	<0,001
Programa × sitio	2 230	3,2	0,043	1,5	0,217	2,0	0,132

#### 4.3.3. Comportamiento del material mejorado de GC y WA

Agrupando las familias según el programa de mejora de origen (GC y WA) e incluyendo este origen y su interacción con los sitios de ensayo como efectos fijos en los modelos mixtos, se obtuvieron diferencias significativas entre programas para todas

las variables (Tabla 4.6). Las familias del programa WA se comportaron, por término medio, significativamente mejor que las del programa GC (Figura 4.1). En el caso de los caracteres de crecimiento, la interacción programa  $\times$  sitio fue significativa (Tabla 4.6), indicando que la superioridad del material de WA no fue homogénea a través de los sitios. La superioridad del material de WA en cuanto al crecimiento en altura fue más evidente en Laza y Guntín (Tabla 4.7). Entre las diferentes familias evaluadas de WA, WA4 siempre se clasificó en la parte alta del ranking para todas las variables en cada uno de los tres sitios del interior (Tabla 4.7), mientras que WA1 mostró peor crecimiento y forma del fuste. Otras familias de WA mostraron resultados intermedios.

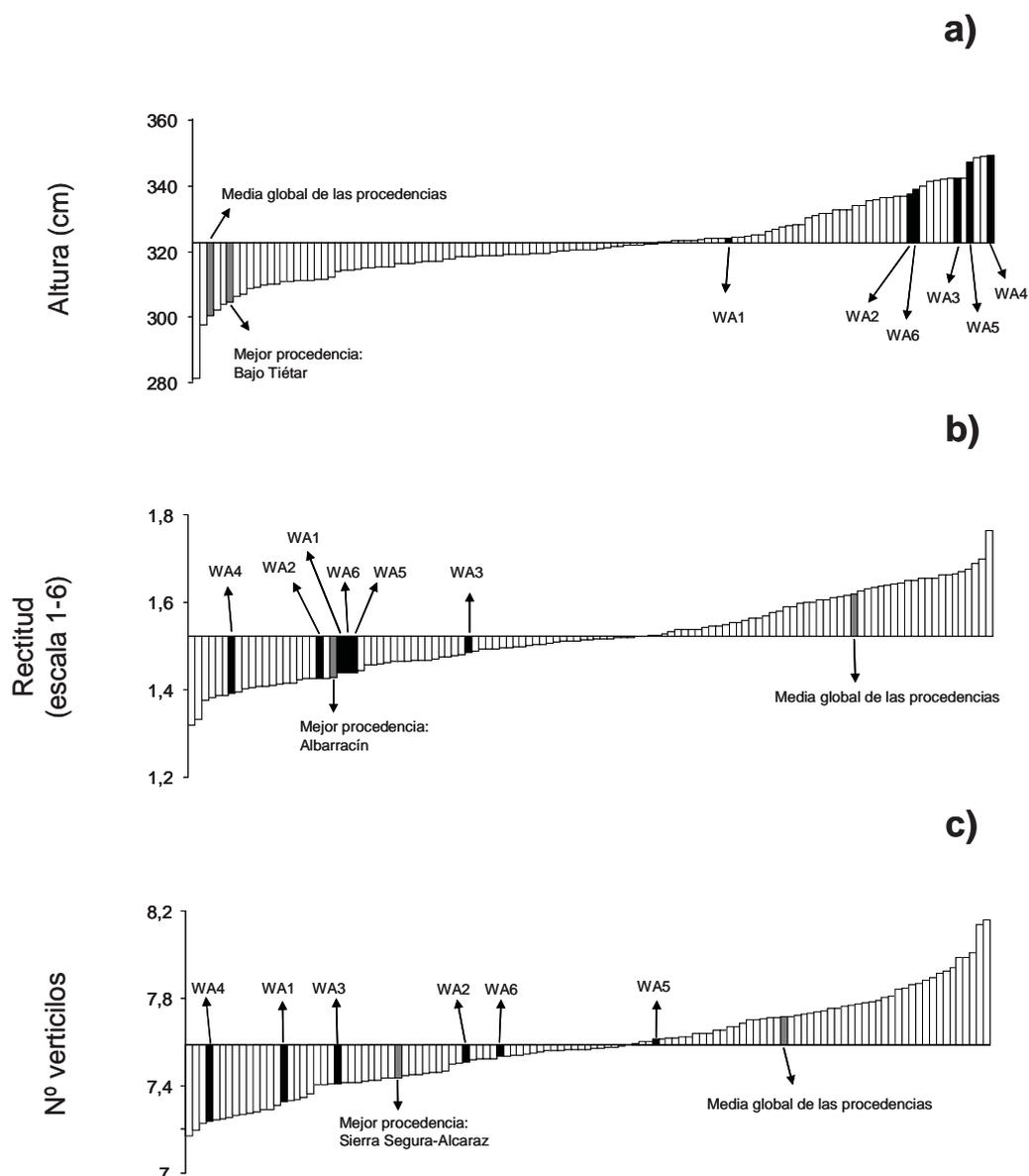
**Tabla 4.7** Ranking de los BLUPs de las familias de Australia Occidental (WA) en los tres sitios del interior para la altura, rectitud y número de verticilos a los siete años (N= 117 entradas genéticas).

Familias WA	Altura			Nº verticilos			Rectitud		
	Becerreá	Laza	Guntín	Becerreá	Laza	Guntín	Becerreá	Laza	Guntín
WA1	47	44	43	12	19	9*	39	23	46
WA2	16	14*	15*	83	63	70	7	15	4*
WA3	7*	9**	3***	16	22	21	35	58	31
WA4	4**	3**	1***	1**	1**	6*	3*	6	2*
WA5	61	16*	10*	70	65	74	36	27	35
WA6	15	13*	13*	32	30	59	28	26	21

Los asteriscos indican el nivel de significación asociado al contraste específico entre el BLUP de cada familia de WA y el BLUP del comportamiento promedio de las 111 familias de GC para cada variable.

Niveles de significación: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$

El crecimiento de los materiales mejorados tanto de GC como de WA fue significativamente superior que el crecimiento promedio de los orígenes no mejorados testados en los ensayos de procedencias adyacentes, y en concreto ninguna de las procedencias se comportó mejor que el promedio del material mejorado (Figura 4.1). Sin embargo, aunque el comportamiento promedio de las seis procedencias en cuanto a los caracteres de forma del fuste fue peor que el promedio de los materiales mejorados, hubo algún origen concreto que destacó por la rectitud de sus fustes y el bajo número de verticilos (Figura 4.1).



**Fig. 4.1** Mejores predictores lineales insesgados (BLUPs) para las 111 familias de medios hermanos del huerto semillero de GC (barras blancas) y las seis familias del programa de mejora de WA (barras negras, WA1-WA6), para las variables a) altura, b) rectitud, y c) número de verticilos a los siete años en dos sitios (Guntín y Laza) localizados en la región interior de Galicia. También se muestra el mejor predictor lineal insesgado (BLUP) de la mejor procedencia y la media global de todas las procedencias testadas en los ensayos de procedencias adyacentes (barras grises). El eje x corta al eje y en el punto correspondiente a la media global de los ensayos de progenies.

#### 4.4. Discusión

El presente capítulo proporciona información sobre el comportamiento de material Atlántico mejorado en la región interior de Galicia, donde el clima Atlántico de la costa está completamente modificado por la influencia continental y Mediterránea. Es sabido que los patrones de crecimiento del *Pinus pinaster* en Galicia difieren entre el área costera y la interior, como consecuencia tanto de factores ambientales como genéticos

(Álvarez-González et al. 2005; Barrio-Anta et al. 2006). Nuestros resultados coinciden con esta afirmación, ya que el crecimiento en altura del material estudiado en los sitios de interior fue más bajo que el observado a edades similares en una serie de ensayos precedente situada en la región costera (Zas et al. 2004a). En todo caso, el crecimiento en altura promedio en los tres sitios de interior se encuadra entre las calidades de estación media y alta para las plantaciones de *P. pinaster* en esta región (Álvarez-González et al. 2005), sugiriendo que el material costero se comporta relativamente bien en las condiciones más secas y frías propias de la región interior.

Los resultados de los análisis de la interacción G×E basados en métodos de máxima verosimilitud también indican que no hay suficientes evidencias para garantizar la subdivisión del territorio en dos áreas de mejora independientes, Galicia-Costa y Galicia-Interior. Únicamente se podría justificar esta división si la relevancia de la interacción G×E fuera mucho más pequeña dentro de áreas que entre ellas. La interacción G×E sólo es de importancia cuando implica cambios de ranking familiares a través de los sitios, y en este caso, las áreas de mejora deberían agrupar sitios de tal manera que las interacciones con cambios de ranking dentro de áreas fueran estadísticamente despreciables (e.g. Crossa et al. 2004). En este estudio, la interacción familia × sitio fue altamente significativa para la mayoría de caracteres estudiados; sin embargo, esta interacción fue debida a desviaciones de la correlación familiar perfecta entre sitios únicamente en el caso del crecimiento en altura y la rectitud a los tres años. Las correlaciones genéticas imperfectas entre ambientes sugieren interacciones con cambios de ranking (Crossa et al. 2004; Yang 2007). Por lo tanto, para estas variables podría ser contraproducente la unión de ambas áreas en una sola zona de mejora. Sin embargo, el análisis de otras hipótesis adicionales con respecto a las correlaciones genéticas entre sitios reveló que, en el caso del crecimiento en altura, las interacciones con cambios de ranking son tan importantes dentro de áreas como entre ellas. Cuando se restringen las correlaciones genéticas entre sitios de la misma área de mejora a 1 (i.e. evitando los cambios de ranking familiares dentro de áreas) se redujo significativamente el logaritmo de verosimilitud del modelo, dando lugar a un modelo inapropiado en comparación con el modelo saturado sin restricciones. Por otra parte, las correlaciones genéticas entre sitios fueron similares tanto para los pares de sitios de la misma área como de áreas diferentes, y los modelos mixtos que asumían una correlación familiar constante entre pares de sitios se ajustaron tan bien como el modelo saturado sin

restricciones. Por lo tanto, el patrón de las interacciones con cambios de ranking para el crecimiento en altura resultó semejante entre todos los posibles pares de sitios, con independencia de que los sitios pertenecieran a la misma o a diferentes áreas de mejora.

La interpretación de las interacciones con cambios de ranking para la rectitud a los tres años fue diferente. No fue apropiado asumir una correlación familiar constante entre pares de sitios, siendo Becerreá el sitio que pareció tener un comportamiento claramente anómalo. Las correlaciones familiares entre éste y los otros cuatro sitios no fueron significativas e incluso fueron negativas en algunos casos, mientras que el resto de correlaciones que no implicaron a este sitio fueron significativas y positivas. Los resultados anómalos para la rectitud en Becerreá, un sitio cercano al límite altitudinal de la especie, probablemente se originan por la pendiente pronunciada e irregular y la presencia de nieve durante el invierno en este sitio de ensayo. Además, la rectitud se midió como un carácter ordinal (escala de 1 a 6), y los residuos de los modelos mixtos se separaron significativamente ( $P < 0,05$ ; Test de Kolmogorov-Smirnov) de la distribución normal, aunque los histogramas de residuos fueron unimodales y relativamente simétricos. La normalidad de los residuos es un requisito fundamental en los modelos mixtos (Littell et al. 2006), por lo que los resultados relacionados con esta variable deben ser manejados con cautela. Los modelos mixtos lineales generalizados suponen un método de análisis más apropiado para una variable ordinal como ésta (Bolker et al. 2008). Sin embargo el ajuste de este tipo de modelos a nuestro extenso conjunto de datos y la imposición de restricciones en la estructura familiar de covarianza provocó fallos de convergencia.

Los problemas de plagas y enfermedades ocurridos en los sitios costeros podrían estar distorsionando también los resultados con respecto a la comparación entre el comportamiento en la costa y el interior. Tanto el hongo como la plaga redujeron significativamente la supervivencia y el crecimiento de las plantas (Zas et al. 2007) y pudieron haber favorecido la aparición de deformidades severas en los troncos (Sampedro et al. 2009). Además, el crecimiento en altura y la rectitud de los fustes en los cinco sitios estudiados se podrían haber visto fuertemente afectados por los problemas de enraizamiento inducidos por un periodo de vivero relativamente largo (más de 19 meses) en los pequeños envases utilizados (Superleach 125 cm<sup>3</sup>; Climent et al. 2008).

La variación tanto entre como dentro de sitios fue muy alta para las variables estudiadas. Los resultados indicaron una fuerte autocorrelación espacial para todas las

variables de crecimiento, reflejando la pronunciada heterogeneidad dentro del sitio, mientras que no se detectó patrón espacial para las variables relacionadas con la forma del fuste, excepto en Becerreá y Daneiro. La dependencia espacial de los caracteres de forma del fuste en estos sitios podría estar causada por la pendiente acusada e irregular y la presencia de nieve durante el invierno en Becerreá, y por la existencia de zonas de encharcamiento en Daneiro, que causaron deformidades severas en el tronco. Los patrones espaciales no aleatorios son muy comunes en las variables medidas en ensayos genéticos forestales (Fu et al. 1999; Dutkowski et al. 2006). Se ha demostrado que la ampliación de los modelos estándar de análisis incluyendo los componentes espaciales incrementa la precisión de las estimaciones de los parámetros genéticos y la correlación del tratamiento entre ensayos (Qiao et al. 2000; Dutkowski et al. 2006; Zas 2006). El impacto de la autocorrelación espacial en el análisis de ensayos genéticos forestales puede ser tan dramático que varios autores aseguran que dejar los datos sin ajustar en presencia de autocorrelación espacial es inaceptable (Costa-Silva et al. 2001; Dutkowski et al. 2006; Zas 2006). El procedimiento MIXED de SAS permite el ajuste de modelos que incorporan la correlación espacial en los cuales se permite la autocorrelación de los residuos, siendo la autocorrelación una función de la distancia (Littell et al. 2006, Cap. 11; Saenz-Romero et al. 2001). Los modelos mixtos utilizados en el presente estudio podrían haber sido así ampliados permitiendo una estructura autocorrelacionada de la variación residual dentro de cada sitio. Sin embargo, el ajuste simultáneo de modelos autocorrelacionados con heterogeneidad de varianzas residuales y estructura de covarianza familiar no predefinida a través de sitios es muy exigente desde el punto de vista computacional. La integración de todas esas estructuras de covarianza familiar y residual en un único modelo mixto sería muy difícil con un ordenador personal convencional. Es por ello, que el procedimiento utilizado en este caso, en el cual primero se ajustan los datos en base a la autocorrelación espacial (Zas 2006) y posteriormente se ajustan los complejos modelos mixtos, parece ser una manera operativa de evitar este problema.

La serie de ensayos estudiada careció de un lote de semilla control de origen local con el que comparar el comportamiento de los materiales mejorados. De hecho, encontrar un lote de semilla representativo de los diversos orígenes habitualmente utilizados en las plantaciones de *P. pinaster* en el interior de Galicia sería una tarea difícil. En este caso se aprovecharon los ensayos de procedencias adyacentes para obtener estimaciones acerca de fuentes de semilla no mejoradas en esta región. Las

comparaciones entre los ensayos adyacentes con diseños experimentales independientes fueron posibles gracias a que se realizó previamente un ajuste espacial conjunto, que tuvo en cuenta la variación microambiental existente entre los dos ensayos dentro de cada sitio. Los resultados indican que los materiales mejorados tanto de GC como de WA crecieron significativamente más que cualquiera de las procedencias testadas. Por término medio, la forma del fuste y la ramosidad de los materiales mejorados también fueron mejores, aunque alguna procedencia concreta de España Central se comportó claramente mejor con respecto a estos caracteres. Es conocido que los orígenes Atlánticos presentan peores formas y son superados en los ensayos de procedencias por otros orígenes de montaña como Marruecos, Córcega y Sierra de Gredos (Alía et al. 1995). De hecho, el programa de mejora Francés para *P. pinaster* desarrollado en base a la procedencia Atlántica de Landas, ha realizado cruces interprocedencia con el origen de Córcega para mejorar la rectitud del fuste de la población local (Harfouche et al. 1995b; Harfouche y Kremer 2000). Nuestros resultados también sugieren que la superioridad de los materiales mejorados Atlánticos en el interior de Galicia podría ser complementada mediante la introducción de genes favorables en cuanto a la rectitud y ramosidad a través de introgresión. Se debe considerar por lo tanto la posibilidad de realizar cruces interprocedencia con orígenes como Albarracín (buena rectitud) y Sierra de Segura-Alcaraz (reducido número de verticilos), o con otros orígenes de montaña (e.g. Marruecos, Córcega o Sierra de Gredos; Alía et al. 1995; Harfouche y Kremer 2000; Sierra de Grado et al. 2008).

El programa de mejora de Australia Occidental, desarrollado a partir de una procedencia Atlántica, ha alcanzado muy buenos resultados y amplias ganancias para su uso en áreas con intensa sequía dentro de esa región (Butcher 2007). La considerable variación genotípica dentro de procedencias (Petit et al. 1995; Mariette et al. 2001) y la característica plasticidad fenotípica de la especie (Alía et al. 1997; Chambel 2006) ofrecen una explicación verosímil para esta gran flexibilidad. El comportamiento del material de WA en el interior de Galicia fue también muy bueno, siempre por encima de la media global en cada sitio. La superioridad de las familias de WA fue evidente para los tres principales caracteres estudiados: crecimiento, rectitud y ramosidad (Figura 4.2; Tablas 4.6 y 4.7). Sin embargo, el comportamiento de las familias de WA fue muy variable a través de los tres sitios de interior (Tabla 4.7). Como era de esperar, el mejor comportamiento de este material se produjo en los sitios más secos (Guntín y Laza), mientras que el peor comportamiento fue en el sitio más frío (Becerreá). De entre las

diferentes familias de WA, WA4, procedente de polinización controlada entre clones seleccionados por su alta capacidad de floración, resistencia a la sequía, buen crecimiento y fuerte dominancia apical, fue uno de los más estables y se destaca como una de las mejores familias para los tres principales caracteres en los tres sitios de interior. Las restantes familias de WA, excepto WA1, también mostraron un crecimiento superior en Laza y Guntín, pero sólo un comportamiento intermedio en cuanto a la forma del fuste. Los resultados del lote WA6, que es una mezcla de diferentes familias de polinización abierta procedentes del huerto semillero clonal de segunda generación de Manjimup (WA), indicaron que, en promedio, el material de este huerto semillero se comporta mejor que el procedente del huerto semillero de Galicia-Costa, aunque las diferencias solo fueron significativas en el caso del crecimiento en los dos sitios más cálidos y secos. Debido a que el programa de mejora para *P. pinaster* en WA ha seguido progresando durante los últimos años (Butcher 2007), se esperarían incluso mayores ganancias para los nuevos materiales de WA con mayor nivel de selección. Sería por tanto altamente recomendable probar nuevos lotes de semilla de WA en la zona interior de Galicia.

Como conclusión práctica, los resultados de este capítulo sugieren la viabilidad de utilizar los materiales mejorados tanto de GC como de WA como posible fuente de materiales forestales de reproducción para la región interior de Galicia. Específicamente, en base a los excelentes resultados del material de WA, se debería considerar la importación de semilla de este origen para repoblación en el interior de Galicia y/o la inclusión de genotipos específicos seleccionados de WA en la población local de mejora. Además, a juzgar por los resultados de los análisis de la interacción G×E, no hay evidencias suficientes para subdividir Galicia en las dos áreas de mejora actuales, Galicia-Costa y Galicia-Interior. Los patrones de interacción no revelan diferencias significativas entre zonas, y las interacciones con cambios de ranking para el crecimiento en altura aparecen tanto entre como dentro de áreas. Aunque indudablemente es necesaria una estrategia para mitigar el efecto de las interacciones con cambios de ranking, en base a los resultados de este estudio, se podrían fusionar ambas zonas en una única área de mejora.



---

## **5. CAPÍTULO III: Redefinición de las áreas de mejora de *Pinus pinaster* en Galicia: agrupación óptima de ambientes**

---

Los resultados obtenidos de este capítulo han dado lugar a la siguiente publicación:

**Raúl de la Mata**, Jordi Voltas, Rafael Zas (2012) Phenotypic plasticity and climatic adaptation in an Atlantic maritime pine breeding population. *Annals of Forest Science* 69 (4):477-487

## 5. CAPÍTULO III Redefiniendo las áreas de mejora de *Pinus pinaster* en Galicia mediante análisis retrospectivo de los patrones de interacción G×E: agrupación óptima de ambientes

### 5.1. Introducción

El análisis de los patrones de interacción genotipo × ambiente (G×E) es un paso crucial en todo programa de mejora genética. Por un lado, la interacción G×E condiciona los procesos de selección al reducir la correspondencia genotipo – fenotipo, mientras que, por otro, ofrece información relevante para identificar regiones o parámetros ambientales para los que ciertos genotipos están específicamente adaptados (Romagosa et al. 2008). Pero no todas las fuentes de interacción G×E tienen el mismo significado biológico. Así, se distingue la interacción G×E *no repetible*, causada por la heterogeneidad de varianzas genéticas, residuales y/o por la variación del micrositio propias de cada ambiente de prueba, y la interacción G×E *repetible*, un componente de variación que es en parte heredable y explotable a través de selección, y que se muestra mediante cambios de ranking genotípicos entre ambientes (COI, por sus iniciales en inglés “*Cross-Over Interaction*”) (Dickerson 1962; Hammer y Cooper 1996). Sólo la interacción G×E *repetible* tiene importancia práctica en las estrategias de mejora genética vegetal (Baker 1988; Delacy et al. 1996). La interacción *no repetible* carece de relevancia en los procesos de selección, si bien para un correcto análisis genético es necesario tenerla en cuenta y utilizar procedimientos estadísticos adecuados para tratarla.

Cuando existe interacción G×E dentro de un ámbito geográfico y su causa fundamental es el cambio de ranking genotípico, los procesos de selección se complican y el mejorador debe decidir entre i) subdividir el área de estudio en subregiones genéticamente homogéneas con mínima interacción G×E y seleccionar genotipos específicamente adaptados a cada una de ellas o ii) seleccionar aquellos genotipos estables adaptados al conjunto de ambientes descartando aquellos más interactivos o sensibles a la variación ambiental. La primera opción implica una estrategia multipoblacional o de sub-líneas con multiplicación de los procesos de selección y mejora para cada subregión. Con esta estrategia se maximizan las ganancias genéticas pero se encarecen los procesos de mejora, así como se dificulta el uso del material mejorado. La segunda opción, mucho más barata y fácil de implementar, conlleva importantes

pérdidas de ganancia al desecharse genotipos de excelente comportamiento en ambientes concretos.

Determinar la proporción relativa de la interacción G×E repetible y no repetible es, por tanto, de vital importancia para un correcto análisis e interpretación de los ensayos multiambiente (METs por sus siglas en inglés “*Multi-Environment Trials*”). Desde que esta partición fue mostrada por primera vez (Robertson 1959), los métodos estadísticos disponibles para su cuantificación han progresado notablemente. Muir et al. (1992) definieron métodos para descomponer la interacción en función de si ésta se debe a la heterogeneidad de varianzas genéticas o a la falta de correlación genética entre ambientes. Yang y Baker (1991) propusieron pruebas estadísticas para estimar la significación de los diferentes orígenes de la interacción en base a un análisis de varianza multivariante (MANOVA). Más recientemente, Yang (2002) mejoró estos métodos utilizando modelos mixtos y aproximaciones de máxima verosimilitud restringida (REML). Las aproximaciones REML basadas en modelos mixtos son más flexibles y robustas, y permiten ajustar estructuras de varianza y covarianzas más realistas, lo que es muy útil no sólo para modelizar la heterogeneidad de varianzas genéticas y las correlaciones genéticas entre ambientes (e.g. Yang 2002; Smith et al. 2005), sino también para modelizar la estructura de covarianzas de los residuos en cada ambiente fruto de la heterogeneidad microambiental (e.g. Nyquist 1991). Los modelos mixtos permiten, a su vez, implementar el concepto de estabilidad genotípica para identificar genotipos con comportamientos consistentes y de alta productividad (Piepho 1999).

La presencia de autocorrelación espacial en la variable dependiente dentro de cada ensayo individual fruto de la variabilidad ambiental a microescala conlleva una importante reducción de la precisión de las estimaciones genéticas y un aumento de la interacción G×E no repetible (Haapanen 1996; Dutkowski et al. 2006). Debido a que la heterogeneidad espacial es frecuente e intensa en ensayos genéticos forestales (Magnussen 1990; Dutkowski et al. 2006; Zas 2006) es particularmente importante corregir sus efectos mediante alguno de los métodos disponibles (técnicas del vecino más próximo, kriging, post-blocking, funciones polinómicas o splines suavizadas). Los modelos mixtos utilizados para descomponer la interacción G×E también permiten corregir la autocorrelación espacial mediante un adecuado ajuste de la matriz de covarianzas residuales (Saenz-Romero et al. 2001; Littell et al. 2006). Sin embargo, la

modelización simultánea de las matrices de varianzas y covarianzas genéticas y de la matriz de covarianzas residuales requiere una enorme capacidad de computación todavía no disponible en los ordenadores personales, y dificulta enormemente la convergencia de los modelos. Para resolver estos problemas, Cappa et al. (2009) proponen un análisis en dos etapas en el que primero se corrigen espacialmente los datos para absorber la variación microambiental, y después se aplican los modelos mixtos y los distintos análisis para cuantificar los cambios de ranking sobre los datos corregidos.

Sorprendentemente y a pesar de su importancia y de los avances en los procedimientos de análisis disponibles, la literatura forestal ha prestado escasa atención a la descomposición de la interacción  $G \times E$  y hasta épocas muy recientes los métodos utilizados para evaluarla se basaban en simples modelos lineales de dos vías y en la comparación de las correlaciones genéticas entre ambientes. Los modelos lineales son adecuados para evaluar comportamientos genotípicos medios y estimar la magnitud global de la interacción  $G \times E$ , pero no permiten determinar los orígenes de ésta y generan resultados erráticos con datos desequilibrados o heterocedásticos. Las correlaciones genéticas entre ambientes proporcionan una medida de la magnitud de la interacción  $G \times E$  que se puede relacionar con cambios de ranking entre genotipos. Algunos autores asocian correlaciones genéticas significativamente menores que 1 con interacción de tipo COI (e.g. Yang y Baker 1991; Muir et al. 1992). Sin embargo, cuando el número de ambientes es grande, su utilidad para interpretar los patrones de interacción es limitada. Esta aproximación en base a las correlaciones genéticas fue introducida en la mejora forestal por Burdon (1977) denominadas como “correlaciones de Tipo B”, y ha sido ampliamente utilizada en este ámbito (Dieters 1996). Sin embargo es probable la existencia de interacción tipo COI por debajo de los umbrales de correlación que habitualmente se han utilizado para clasificar la interacción como relevante (de la Mata y Zas 2010b), en cuyo caso la selección en base a las medias globales conlleva importantes pérdidas de ganancia y problemas de adaptabilidad.

En el caso particular del pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) en Galicia, la distinción de las procedencias Noroeste Litoral y Noroeste Interior (Alía et al. 1996), así como las diferencias en los patrones de crecimiento entre las masas de la costa y del interior (Álvarez-González et al. 2005), han motivado la subdivisión de la Comunidad en dos zonas de mejora y uso del material forestal de reproducción, la zona costera

(RIUs 1 y 3) y la zona interior (Rius 2, 4 y 5) (Zas 2008). Esta subdivisión, cuyo límite se establece en la cota de los 600 m (Toval 1987), asume implícitamente que la interacción G×E dentro de zonas es mínima en comparación con la interacción entre zonas. Sólo de esta manera se justificarían las complicaciones operativas que esta subdivisión conlleva tanto en relación al desarrollo de dos programas de selección y mejora paralelos como para la gestión de la producción y uso del material mejorado. Además, ante la falta de un material forestal de reproducción de calidad para la zona interior de Galicia, la posibilidad de utilizar en ésta el material del programa de mejora costero iniciado en 1985 es operativamente muy atractiva. Pero ello implicaría replantear la zonificación inicial Costa-Interior mediante el estudio detallado de la interacción G×E. En las evaluaciones de la población de mejora Galicia-Costa realizadas hasta la fecha, tanto en condiciones de campo dentro de la zona costera (Zas et al. 2004b; Martins et al. 2009), como bajo condiciones controladas (Zas y Fernández-López 2005), se encontró que existía una interacción G×E cuantitativamente importante, aunque la mayor parte de esta interacción se debía a unas pocas familias altamente interactivas (Zas et al. 2004b). Al evaluar el comportamiento de este material en un ensayo multilocalidad que incluye ensayos tanto en la zona interior como en la costera, se encontró que había cambios de ranking (COI) tanto entre como dentro de las zonas de mejora previamente establecidas (Costa e Interior), indicando que esta subdivisión territorial parece no ser adecuada ya que no define áreas genotípicamente estables (de la Mata y Zas 2010b; ver Capítulo II). Estos resultados previos se han basado en series parciales de ensayos con un número reducido de los genotipos de la población de mejora, y/o un limitado número de sitios de ensayo.

En el presente capítulo buscamos integrar la información de la totalidad de ensayos genéticos instalados de la población del programa de mejora Galicia-Costa, para valorar la adecuación de la zonificación Costa-Interior, o buscar otras subdivisiones geográficas o agrupaciones de genotipos que minimicen el impacto de la interacción G×E en el desarrollo del programa de mejora y en el uso del material mejorado de *P. pinaster* en Galicia. Para ello se empleará un proceso de análisis en dos etapas en el que primero se corrige la autocorrelación espacial en cada ensayo con técnicas de geoestadística y después se realiza un análisis pormenorizado de la interacción G×E mediante una aproximación REML basada en modelos mixtos para un análisis conjunto de todos los sitios. La amplia información aportada por estos ensayos

nos permitirá estudiar el patrón y causas de la interacción G×E en esta población para el conjunto del territorio de Galicia. En base a los resultados anteriormente descritos, la hipótesis de partida es que la división tradicional en áreas de mejora Costa- Interior podría ser poco adecuada. Si esto se confirmara, se tratará de buscar algún tipo de agrupación ambiental que nos permita regionalizar Galicia en áreas geográficas de comportamiento estable para las familias del programa de mejora. Si la búsqueda de áreas geográficas con comportamiento genotípico homogéneo es fructífera, trataremos de identificar aquellas variables ambientales que mejor expliquen esa regionalización del territorio. En caso de que no sea posible la regionalización en áreas homogéneas o ésta carezca de sentido práctico, trataremos de buscar una subpoblación de genotipos estables al conjunto del territorio.

## **5.2. Material y métodos**

### **5.2.1. Material genético, sitios de ensayo y mediciones**

El material estudiado consiste en 116 familias de medios hermanos obtenidas de otros tantos árboles plus representados en el huerto semillero clonal de primera generación de Sergude (A Coruña; 42° 49' N, 8° 28' O) que proporciona semilla de alta calidad genética para repoblación en la zona costera de Galicia (ver Figura A1, Anexo 1). Los árboles plus fueron seleccionados individualmente en masas adultas de la zona costera de Galicia, por altos crecimientos, y buenas características de forma del fuste y ramosidad.

Los datos medidos proceden de tres series de ensayos multiambiente (METs) instalados en 1995 (serie de 1995), 2001 (serie de 2001-progenies) y 2005 (serie de 2005) respectivamente, en base a diferentes diseños experimentales, sumando un total de 16 ensayos individuales cada uno con entre 73 y 116 familias de la colección global. Las principales características ambientales, localización, diseño y crecimiento promedio de cada uno de los sitios se muestran en la Tabla A1, Anexo 1.

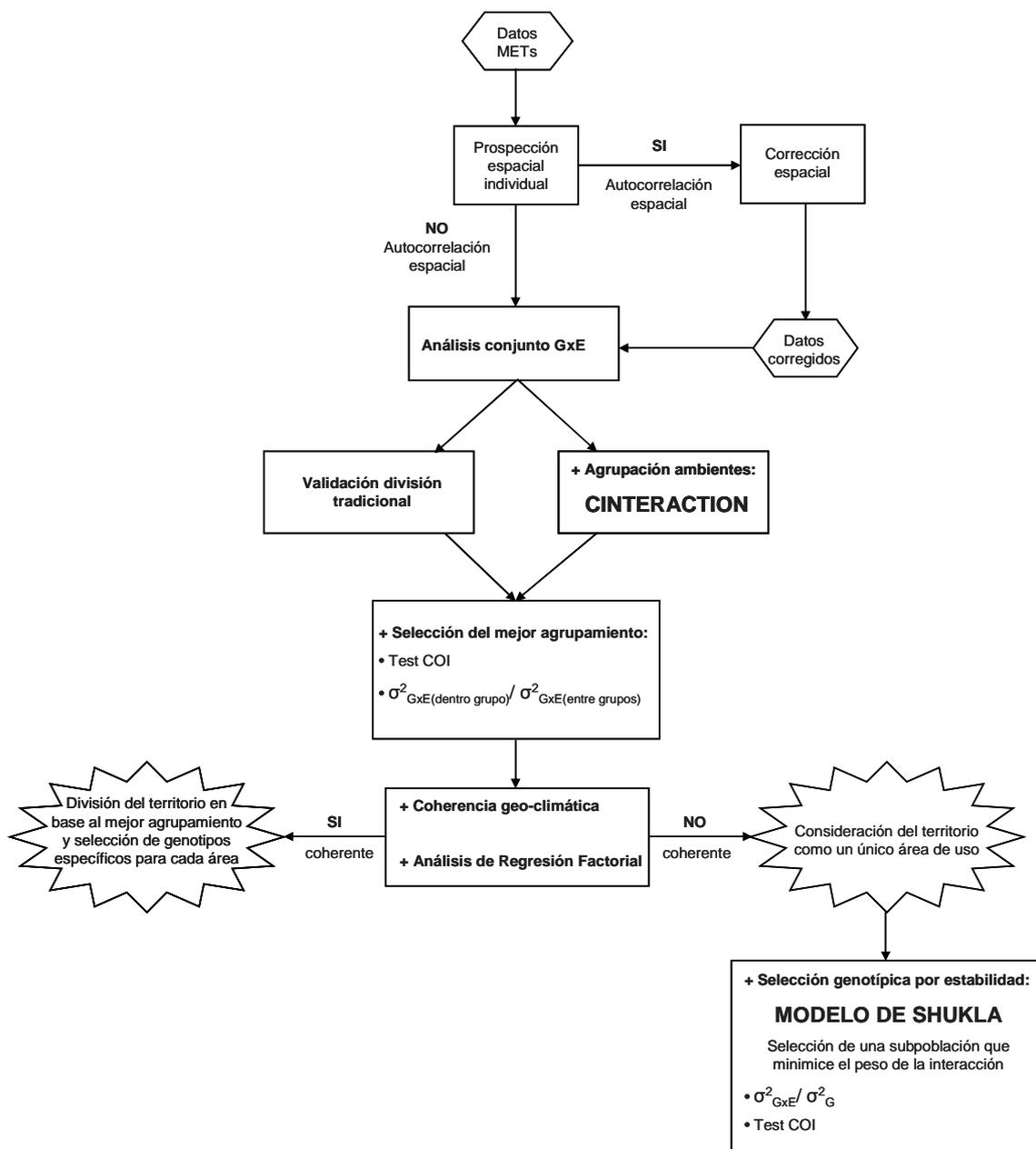
La variable objeto de estudio fue la altura total (H) de todas las plantas de cada ensayo salvo aquellas muertas o desaparecidas, medidas desde el cuello de la raíz hasta el extremo de la yema apical con una pértiga en centímetros. Se realizaron mediciones a los tres, siete y ocho años dependiendo del sitio de ensayo, si bien las mediciones a los siete y ocho años se han considerado como una misma edad (referida a partir de aquí como H7), ya que no se esperan cambios de ranking significativos entre ambas edades.

En adelante se consideran mediciones a los tres y siete años. En cuatro de los sitios de ensayo se midió la altura a las dos edades, en otros nueve sitios se midió únicamente H3 y en los restantes tres sitios se midió solamente H7 (ver Tabla A1, Anexo 1). Para las mediciones tres años después de la plantación dispusimos de datos de las 116 familias que conforman el programa de mejora Galicia costa, mientras que para H7 sólo dispusimos de 106 de ellas.

La conveniencia de utilizar la evaluación a una edad tan joven como tres años se comprobó analizando la correlación genética entre ambas edades en base a un análisis mixto multivariante de medidas repetidas según el modelo de Holland (2006), utilizando los cuatro sitios de ensayo en los cuales hay mediciones a las dos edades.

### ***5.2.2. Análisis estadísticos***

Debido a la frecuente presencia de autocorrelación espacial en los ensayos genéticos forestales y a que la información disponible pertenece a distintas series de ensayos multilocalidad, con diferentes diseños experimentales y años de establecimiento, procedimos en una primera etapa a la corrección de la variable dependiente mediante herramientas de estadística espacial de manera independiente en cada sitio de ensayo (ver Anexo 2 para más detalles). En una segunda etapa se realizó un análisis conjunto en el que se descomponen los efectos de la interacción G×E a partir de los datos espacialmente corregidos (Cappa et al. 2009). Un esquema de la estrategia utilizada para el estudio de la interacción G×E en este capítulo se muestra en la Figura 5.1.



**Fig. 5.1** Resumen de los métodos estadísticos utilizados para el análisis de la interacción G×E en el conjunto de ensayos multiambiente (METs): el primer paso fue la corrección de los datos de forma independiente en cada sitio de ensayo cuando tras la prospección espacial se detectó autocorrelación de la variable dependiente. Con los datos corregidos se realizó un análisis conjunto mediante el ajuste de modelos mixtos. A continuación se trató de generar agrupaciones de ambientes que minimizaran la importancia de la interacción G×E utilizando el procedimiento CINTERACTION de GenStat, y se seleccionó aquella agrupación que minimizó la interacción con cambio de ranking (COI) o que redujo en mayor medida la varianza de la interacción dentro de cada grupo con respecto a la varianza entre grupos. Seleccionada la mejor agrupación se comprobó si ésta respondía a condicionantes geográficos o climáticos con un análisis de regresión factorial. Sólo cuando la mejor agrupación se corresponde con áreas geográficas continuas y homogéneas, se puede subdividir el territorio en áreas de mejora y utilización diferentes, seleccionando genotipos específicos para cada una de ellas. Sin embargo si la mejor agrupación carece de sentido geográfico se optó por considerar todo el territorio como una única área de mejora y uso, seleccionando un subconjunto de genotipos estables mediante el Modelo de estabilidad de Shukla.

### 5.2.2.1. Relevancia de la Interacción

Como primera aproximación para valorar la importancia de la interacción se ajustó con los datos brutos de todas las familias un modelo lineal mixto de doble entrada:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_j + G \times S_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad [5.1]$$

donde  $Y_{ijk}$  es el valor de la variable dependiente,  $\mu$  es la media global,  $G_i$  es el efecto aleatorio de la familia  $i$ ,  $S_j$  es el efecto fijo del sitio  $j$ ,  $G \times S_{ij}$  es la interacción aleatoria entre la familia  $i$  y el sitio  $j$  y  $\varepsilon_{ijk}$  es el término aleatorio del error (Yang 2002; Crossa et al. 2004). Por tratarse de datos corregidos espacialmente, se obvia el efecto del bloque en el modelo por no ser significativo. Los modelos mixtos se ajustaron usando el procedimiento MIXED de SAS (Littell et al. 2006) y los componentes de la varianza se estimaron por el método REML (máxima verosimilitud restringida).

### 5.2.2.2. Agrupación ambiental

Con el fin de generar agrupamientos de sitios que minimicen la interacción  $G \times E$  dentro de grupos y la maximicen entre grupos, analizamos el conjunto de ensayos multiambiente con el procedimiento CINTERACTION de GenStat (Payne et al. 2006), desarrollado por J. Thiessen y J. de Bree (Romagosa et al. 2008) en base al método definido por Corsten y Denis (1990).

En nuestro caso nos hemos centrado en la agrupación de ambientes, utilizando las medias familiares por sitio para aquellas familias representadas en todos los sitios en cada edad (76 y 57 familias para H3 y H7 respectivamente). Como varianza del error y grados de libertad, parámetros de partida necesarios para ejecutar el procedimiento, se han utilizado respectivamente el promedio de la varianza residual del ANOVA para cada sitio y el promedio del número de réplicas por familia en cada sitio.

Para determinar la agrupación óptima y por tanto el punto de corte más razonable en el dendrograma cluster resultante del procedimiento CINTERACTION, aplicamos la prueba de hipótesis para interacción con cambio de ranking (COI) definida por Yang (2002), que estima el nivel de significación de los cambios de ranking dentro de los grupos, analizando en qué medida las correlaciones genéticas entre todos los pares de sitios de cada grupo se desvían de la correlación perfecta  $R_G = 1$  (ver Anexo 2). El análisis se realizó para todas las agrupaciones del dendrograma (desde dos a doce

grupos para H3 y desde dos a seis grupos para H7), con el sitio como efecto fijo y la familia y la interacción familia  $\times$  sitio como factores al azar. Se evaluó además la agrupación original Costa-Interior, actualmente operativa. Para estos análisis se utilizaron los datos brutos con las mismas 76 y 57 familias (H3 y H7) utilizadas en el procedimiento CINTERACTION. El agrupamiento óptimo vendrá dado por aquel en el que deja de ser significativa la interacción con cambio de ranking dentro de grupos.

Dado que la existencia de correlación genética perfecta entre sitios es una condición suficiente pero no estrictamente necesaria para la no existencia de COI (Crossa et al. 2004), se empleó además una forma complementaria para la determinación de la agrupación óptima, basado en la descomposición de las varianzas en base al siguiente modelo mixto (Romagosa et al. 2008):

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + SS_j + S_k(SS_j) + G \times SS_{ij} + G \times S(SS)_{ik(j)} + \varepsilon_{ijkl} \quad [5.2]$$

donde  $Y_{ijkl}$  es el valor de la variable dependiente,  $\mu$  es la media global,  $G_i$  es el efecto aleatorio de la familia  $i$ ,  $SS_j$  es el efecto fijo del grupo de sitios  $j$ ,  $S_k(SS_j)$  es el efecto fijo del sitio  $k$  dentro del grupo de sitios  $j$ ,  $G \times SS_{ij}$  es la interacción aleatoria entre la familia  $i$  y el grupo de sitios  $j$ ,  $G \times S(SS)_{ik(j)}$  es la interacción aleatoria entre la familia  $i$  y el sitio  $k$  dentro del grupo de sitios  $j$ , y  $\varepsilon_{ijkl}$  es el término aleatorio del error. Para ajustar este modelo mixto se utilizó el procedimiento MIXED de SAS (SAS-Institute 1999). El ratio de las varianzas de las interacciones ( $\sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_{G \times SS}$ ) determina la importancia relativa de la varianza dentro de grupos ( $\sigma^2_{G \times S}$ ) frente a la varianza entre grupos ( $\sigma^2_{G \times SS}$ ). Se calculó este ratio para todas las agrupaciones del dendrograma, siendo esperable una disminución de este parámetro a medida que consideramos un mayor número de grupos. La agrupación óptima será aquella donde se produzca un punto de inflexión en la reducción del ratio, minimizando la varianza dentro de grupos y maximizando aquella entre grupos.

Como medida de confirmación se compararon estadísticamente (ANOVA de una vía) los niveles de correlación genética entre sitios de un mismo grupo y entre sitios de grupos distintos para la agrupación óptima y también para aquellas agrupaciones cercanas al punto de inflexión. Las correlaciones genéticas entre sitios para cada edad se obtuvieron a partir de la matriz de covarianzas  $G$  obtenida en un modelo mixto sin

restricciones con una estructura de esta matriz sin restricciones (type UNR, ver Anexo 2 para más detalles).

#### 5.2.2.3. *Significado ambiental de la agrupación*

Como primer paso, para sintetizar el conjunto de parámetros ambientales que pudieran explicar el patrón geográfico de la interacción G×E, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) sobre las ocho variables ambientales consideradas: altitud, precipitación anual, precipitación estival, temperatura media anual, Índice de Gausson, número días con heladas por año, temperatura mínima absoluta y temperatura media de las mínimas del mes más frío, que caracterizaron cada sitio de ensayo (ver Tabla A1, Anexo 1).

Con el fin de analizar la coherencia ambiental de los patrones de interacción observados se aplicaron Modelos de Regresión Factorial, que explican la interacción G×E en base a la variación de las sensibilidades genotípicas frente a variables ambientales explícitas. Estos modelos fueron implementados con el procedimiento MIXED de SAS (SAS-Institute 1999) en los que además del efecto fijo del sitio y el aleatorio de la familia, se introdujeron secuencialmente distintos parámetros ambientales como covariables fijas, sustituyendo la interacción G×S por la interacción aleatoria con esta covariable (Romagosa et al. 2008). Los dos primeros componentes principales que explicaron una mayor proporción de la variación ambiental se introdujeron también como un parámetro ambiental más. A través del análisis de regresión factorial se evalúa la interacción de los genotipos con cada uno de los parámetros ambientales. Esta interacción representa la variación de las pendientes de covariación de cada genotipo con el parámetro en cuestión. Biológicamente, los modelos de regresión factorial nos informan de cuál es el parámetro ambiental que produce comportamientos más diferenciados entre los genotipos testados, o dicho de otro modo, para qué factor ambiental la población de mejora muestra una mayor variación genética en su plasticidad fenotípica.

#### 5.2.2.4. *Análisis de la estabilidad genotípica*

Para el análisis de la estabilidad genotípica se seleccionó el modelo de estabilidad de la varianza de Shukla (Shukla 1972) como el más adecuado y fácil de implementar para cuantificar la estabilidad familiar en el abanico de ambientes. El modelo se ajustó con el

procedimiento MIXED de SAS utilizando el modelo mixto descrito en Piepho (1999) (ver Anexo 2). Se utilizaron las medias familiares por sitio con el número máximo de familias que permitió la convergencia del modelo (100 y 68 familias para H3 y H7 respectivamente). El modelo de Shukla difiere del modelo simple de doble entrada, en que el factor aleatorio de la interacción  $(G \times S)_{ij}$  requiere de varianzas independientes (o estabildades genotípicas) para cada genotipo, es decir  $\sigma^2_{G \times S(i)}$ . El modelo se ajusta asumiendo los genotipos como factor fijo y los ambientes como factor aleatorio y utilizando una matriz de varianzas-covarianzas con estructura 'UN(1)' (Littell et al. 2006), en la cual las varianzas de la diagonal se interpretan como la estabilidad ambiental de cada genotipo (Piepho 1999). Valores más altos de la varianza de la estabilidad corresponden a los genotipos más interactivos.

Para valorar la contribución relativa de las familias más interactivas a la importancia de la interacción se calculó el ratio entre la varianza de la interacción y la varianza genética ( $\sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_G$ ) para diferentes subconjuntos de la población original de mejora, en los que se fueron eliminando genotipos individuales de manera secuencial empezando por aquellos más interactivos. Con el fin de definir una subpoblación de familias estables, se aplicó la prueba estadística para interacción con cambio de ranking (test COI) propuesta por Yang (2002) (ver Anexo 2) en estos subconjuntos de familias, considerando todos los sitios de ensayo como pertenecientes a una única región que abarcaría todo el territorio gallego.

### 5.3. Resultados

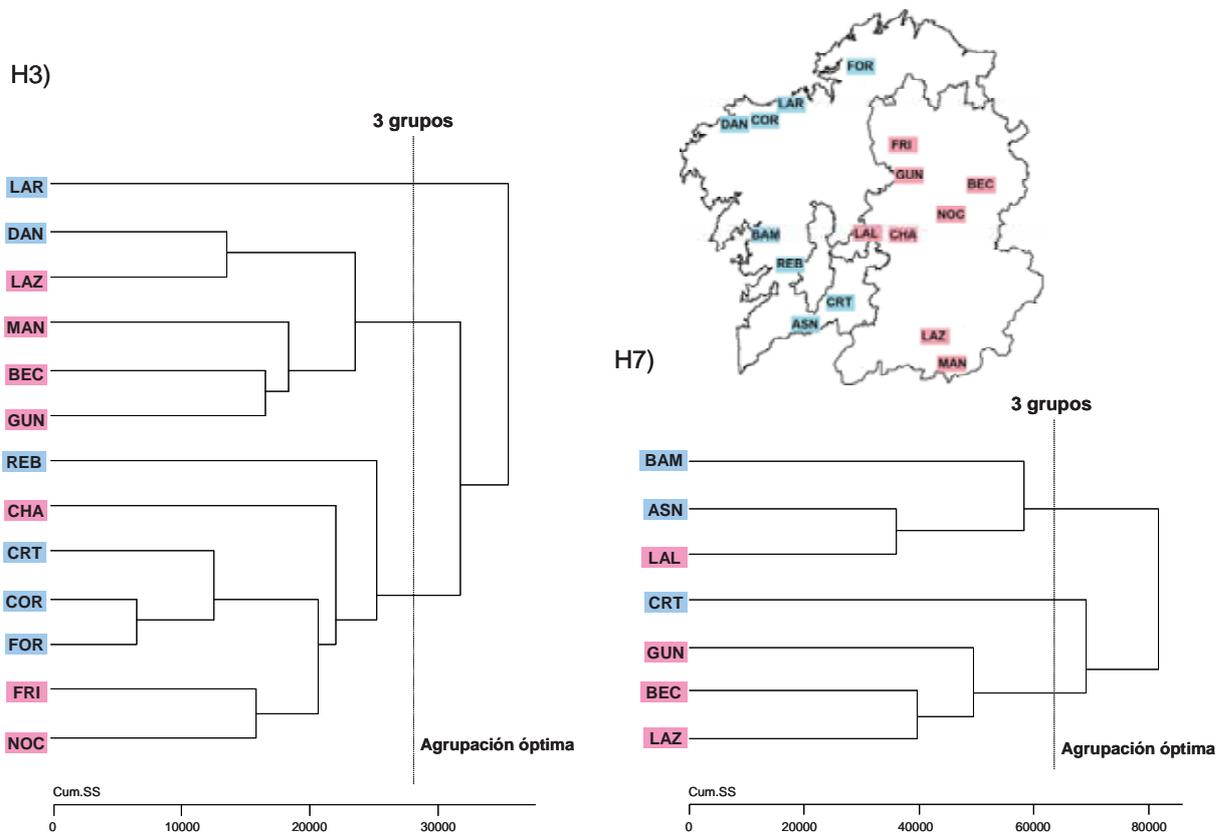
La calidad de estación de los sitios de ensayo mostró grandes diferencias, evidenciado por las alturas medias alcanzadas en cada sitio a cada edad. La altura media osciló entre 78,2 cm en Forgoselo y 155,4 cm en Rebordelo a los tres años, y entre 294,9 cm en Becerreá y 558,1 cm en Cortegada a los siete y ocho años respectivamente (ver Tabla A1, Anexo 1).

El ratio de la varianza de la interacción ( $\sigma^2_{G \times S}$ ) y la familiar ( $\sigma^2_G$ ) para el modelo simple de doble entrada fue de 134 y 111 % para la altura a los tres y siete años respectivamente, sugiriendo presencia de interacción  $G \times E$  relevante.

La correlación genética entre edades fue de  $0,708 \pm 0,085$ , razonablemente alta como para justificar que la edad de tres años es representativa de lo que pasa después a los siete.

### 5.3.1. Agrupación de ambientes

En la agrupación cluster de los sitios de ensayo obtenida con el procedimiento CINTERACTION se observa una cierta tendencia a la agrupación de sitios costeros y sitios de interior, aunque en ambos grupos se incluye algún sitio inesperado de la otra zona además de detectarse sitios de ensayo anárquicos, como Laracha a los tres años (Figura 5.2).



**Fig. 5.2** Dendrograma de la agrupación ambiental producido por el procedimiento CINTERACTION para la altura a los tres (H3) y siete (H7) años analizando las 76 y 57 familias presentes en los 13 y 7 sitios de ensayo respectivamente. Los sitios pertenecientes a la región 'Costa' de la división tradicional aparecen en color azul, mientras que aparecen en color rojo los pertenecientes a la 'Interior'. Se muestra también el punto de corte que genera la agrupación óptima.

### 5.3.2. Agrupación óptima

La verosimilitud de los modelos que asumen ausencia de COI dentro de grupos (i.e. modelos que asumen correlaciones genéticas perfectas ( $r_G = 1$ ) entre todos los sitios de un mismo grupo) resultó significativamente inferior (mayor  $-2L$  en Tabla 5.1) que la del modelo saturado (sin restricciones en la estimación de las correlaciones genéticas) para todas las agrupaciones resultantes del dendrograma de la Figura 5.2 a ambas edades,

con la única excepción de la agrupación en 12 grupos a los tres años, sugiriendo que existe interacción con cambio de ranking entre sitios en todas las agrupaciones a excepción de ésta última. La agrupación Costa-Interior tampoco redujo la interacción COI dentro de zonas, siendo la agrupación con menor verosimilitud de todas las analizadas (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1** Comparación de la verosimilitud del modelo saturado (sin agrupación y sin restricciones en los parámetros de la covarianza entre sitios) frente a la agrupación clásica Costa-Interior y a 11 modelos que representan las distintas agrupaciones reveladas en la clusterización del procedimiento CINTERACTION (Ver Figura 5.2), en los que la correlación genética entre aquellos sitios pertenecientes a un mismo grupo se fuerza a 1 ( $r_g = 1$ , *correlación perfecta*). La variable dependiente es la altura a los tres y siete años (H3 y H7).

Modelo	3 AÑOS				7 AÑOS			
	-2L <sup>a</sup>	LRT <sup>b</sup>	gl <sup>c</sup>	p>X <sup>2d</sup>	-2L <sup>a</sup>	LRT <sup>b</sup>	gl <sup>c</sup>	p>X <sup>2d</sup>
<b>Saturado</b>	178980	-	-	-	137566	-	-	-
12 Grupos	178980	0	1	1,000				
11 Grupos	178989	8,3	3	0,040				
10 Grupos	178991	10,5	4	0,033				
9 Grupos	178991	11,2	5	0,048				
8 Grupos	178998	17,8	6	0,007				
7 Grupos	179007	26,9	8	<0,001				
6 Grupos	179019	38,5	14	<0,001	137587	21,4	1	<0,001
5 Grupos	179026	45,5	19	<0,001	137588	22,8	2	<0,001
4 Grupos	179077	96,5	25	<0,001	137591	25,8	4	<0,001
3 Grupos	179085	104,9	31	<0,001	137610	44,2	6	<0,001
2 Grupos	179088	108,1	36	<0,001	137629	63,5	9	<0,001
<b>Costa-Int</b>	179144	163,6	36	<0,001	137640	74,5	11	<0,001

<sup>a</sup> - 2 Res Log Likelihood (logaritmo de verosimilitud restringida). Mejor ajuste cuanto más bajo.

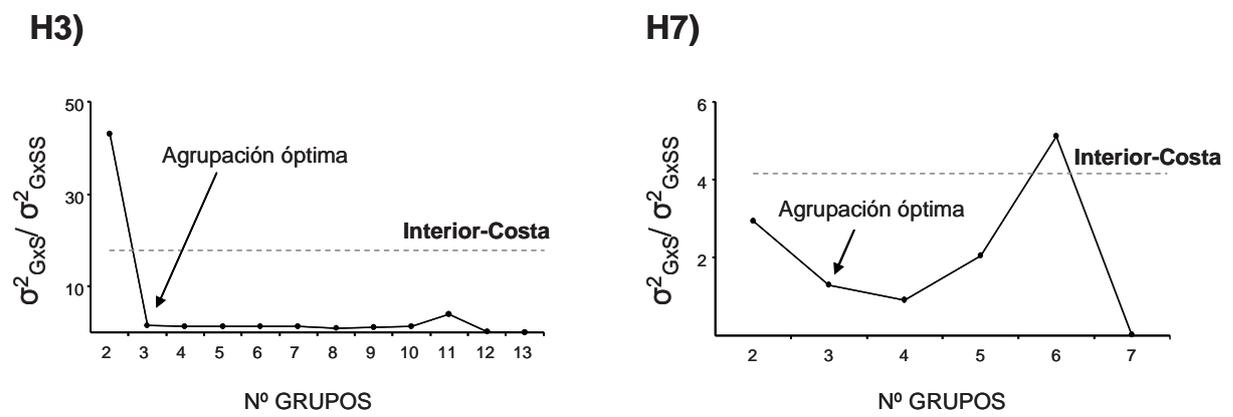
<sup>b</sup> Estadístico del ratio de verosimilitud obtenido como la diferencia de la verosimilitud de cada modelo con la del modelo de referencia o saturado.

<sup>c</sup> El estadístico LRT sigue una distribución Chi-cuadrado con tantos grados de libertad (gl) como la diferencia del número de parámetros de covarianza a estimar entre cada modelo y el de referencia.

<sup>d</sup> Significación del test Chi-cuadrado para el estadístico del ratio de verosimilitud (LRT). Valores de *P* menores de 0,05 indican que el modelo reducido se ajusta significativamente peor que el de referencia.

La eficiencia del proceso de agrupación ambiental también pudo analizarse comparando la varianza de la interacción G×E debido a la variación dentro de cada grupo ( $\sigma^2_{GXS}$ ), y el componente debido a las diferencias entre grupos ( $\sigma^2_{GXSS}$ ), para cada uno de los niveles de agrupación del dendrograma (Figura 5.3). Cuanto mayor sea la segunda en comparación con la primera mayor es la eficiencia de la agrupación. Para la variable a los tres años se observa una fuerte reducción del ratio  $\sigma^2_{GXS} / \sigma^2_{GXSS}$  al pasar de una agrupación en dos a tres grupos de ambientes, manteniéndose luego estable para el

resto de agrupaciones y siempre muy por debajo del ratio para la agrupación tradicional Costa-Interior. A los siete años la evolución del ratio según la agrupación presenta un comportamiento más anómalo, disminuyendo hasta el nivel de agrupación en cuatro grupos y aumentando luego incluso por encima de la agrupación tradicional. El cambio de pendiente más pronunciado se produjo al agrupar en tres grupos ambientales tanto para los tres como para los siete años. A pesar del anómalo comportamiento para los siete años la práctica totalidad de las agrupaciones cluster muestran ratios más bajos que la agrupación original ‘Costa-Interior’.



**Fig. 5.3** Ratio entre la variancia de la interacción G×E debido a la variación dentro de grupos ( $\sigma^2_{GxS}$ ) y la debida a las diferencias entre grupos ( $\sigma^2_{GxSS}$ ) en un análisis conjunto con los sitios anidados dentro de los grupos. Se han considerado doce y seis tipos de agrupación según la altura a los tres y siete años respectivamente, en base a la clusterización del CINTERACTION (ver Figura 5.2). La línea horizontal discontinua muestra el ratio para la agrupación original Costa-Interior.

Las correlaciones genéticas entre todos los sitios de ensayo obtenidas a partir del modelo saturado para ambas edades se muestran en la Tabla 5.2. Asumiendo una agrupación en tres subregiones, puede observarse que las correlaciones genéticas entre sitios dentro del mismo grupo son en su mayoría significativas ( $P < 0,001$ ) y con valores altos, en algunos casos alcanzando la correlación perfecta ( $r_G = 1$ ). Por el contrario, la mayor parte de las correlaciones entre sitios pertenecientes a diferentes grupos no son significativas (Tabla 5.2). Sin embargo se encuentran múltiples excepciones a este patrón general, con correlaciones altas y significativas entre sitios pertenecientes a diferentes grupos. En cualquier caso, asumiendo una agrupación en tres subregiones, las correlaciones genéticas entre sitios dentro de grupos fueron significativamente mayores que aquellas entre sitios de distinto grupo (Figura 5.4). Los

$F_{ratio}$  de esta comparación fueron mucho menores para otros niveles de agrupamiento tanto a los tres como a los siete años (datos no mostrados).

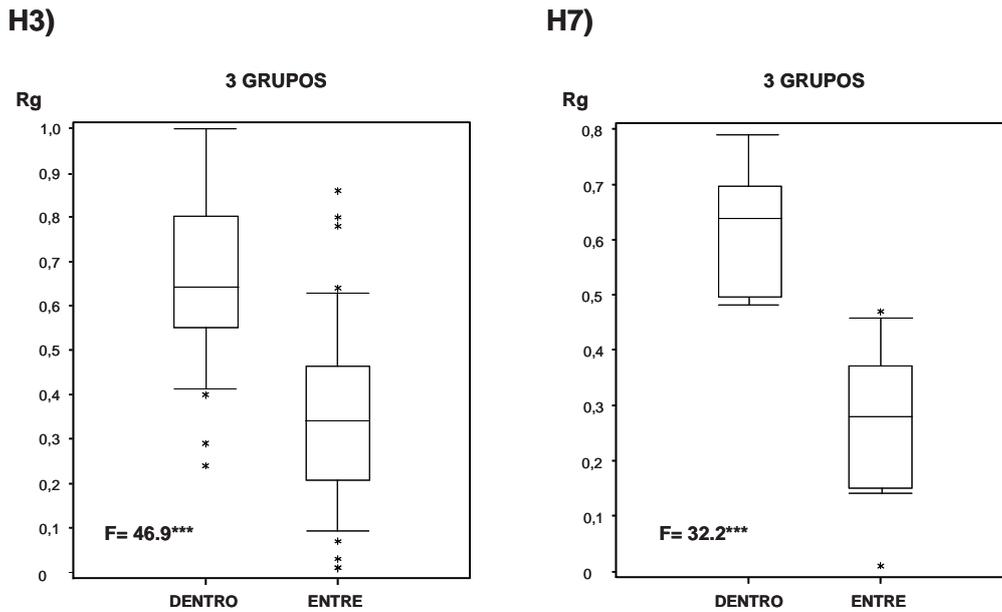
**Tabla 5.2** Estimación REML de las correlaciones genéticas entre sitios de ensayo para la altura a los tres (H3) y siete (H7) años obtenidas a partir del análisis conjunto de 13 y 7 sitios de ensayo, respectivamente, utilizando un modelo saturado sin restricciones en la matriz de varianzas-covarianzas. Los sitios de ensayo aparecen agrupados según la agrupación óptima (ver Figuras 5.2 y 5.3), apareciendo sombreadas las correlaciones dentro de grupos.

3 AÑOS													
	GR 1		GR 2				GR 3						
	LAR	DAN	LAZ	MAN	BEC	GUN	REB	CHA	CRT	COR	FOR	FRI	NOC
LAR		0,43*	0,55***	0,25	0,41	0,62***	0,34	0,64**	0,51**	0,18	0,78***	0,30	0,14
DAN			0,84***	0,60*	0,63***	0,24	0,01	0,26	0,63***	0,42	0,43*	0,38	-0,01
LAZ				0,54**	0,56***	0,41**	0,07	0,38*	0,46***	0,35	0,55***	0,22	0,20
MAN					0,40	0,29	0,12	0,86***	0,31	0,80***	0,31	0,46	0,09
BEC						0,59***	0,34	0,41	0,28	-0,32	0,25	-0,12	0,03
GUN							0,12	0,52**	0,40**	0,46*	0,37*	0,21	0,32
REB								1***	0,64***	1***	0,87***	0,55*	1***
CHA									0,58***	0,69***	0,78***	0,52*	0,74***
CRT										0,72***	0,75***	0,64***	0,51**
COR											1***	0,79**	0,80***
FOR												0,56*	0,86***
FRI													0,78**

7 AÑOS							
	GR 1		GR 2	GR3			
	BAM	ASN	LAL	CRT	GUN	BEC	LAZ
BAM		0,67***	0,50***	0,46*	0,31	0,21	0,28
ASN			0,48**	0,14	0,14	0,30	0,47**
LAL				0,37	0,25	0,16	0,37
CRT					0,40	0,01	0,15
GUN						0,60*	0,79***
BEC							0,70**

<sup>1</sup> Niveles de significación: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ; la falta de asteriscos indica que la correlación no es significativa ( $p > 0,05$ ) [obtenidos con el test de Wald para las estimaciones de los parámetros de la covarianza del Proc Mixed de SAS].

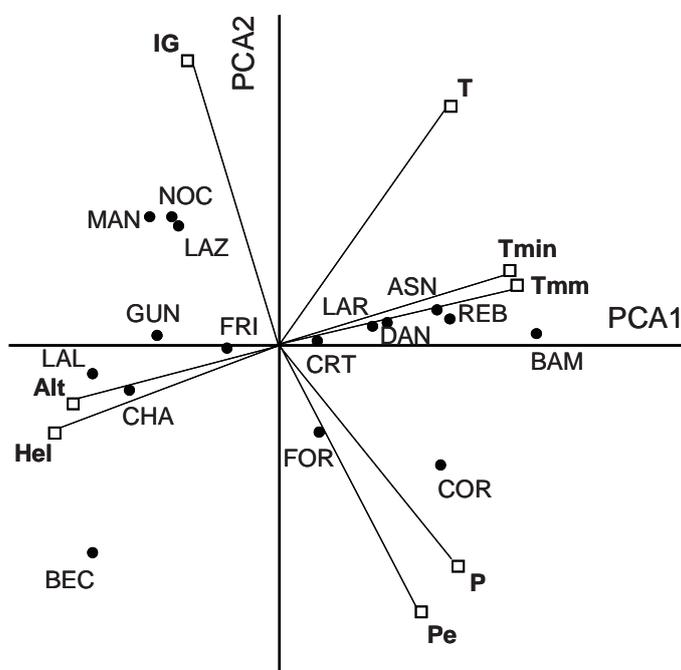


**Fig. 5.4** Diagrama de cajas de las correlaciones genéticas entre sitios ‘dentro’ y ‘entre’ grupos para la altura a los tres y siete años, asumiendo la agrupación en tres grupos en base a la clusterización del CINTERACTION. La longitud de las cajas representa el rango intercuartil (entre Q1: 25% de los datos y Q3: 75% de los datos), la línea horizontal dentro de la caja representa la mediana (Q2: 50% de los datos), la parte superior del bigote determina el último valor observado por debajo del límite superior (Ls:  $Q3+1,5x(Q3-Q1)$ ), la parte inferior del bigote determina el último valor observado por encima del límite inferior (Li:  $Q1-1,5x(Q3-Q1)$ ) y los asteriscos representan los valores atípicos por debajo o por encima de los límites inferior o superior respectivamente. Se incluye el F ratio y nivel de significación asociado de la comparación estadística para cada edad de ambos conjuntos de datos.

### 5.3.3. Significado ambiental de la interacción $G \times E$

El análisis de componentes principales (PCA) sintetizó eficientemente los parámetros ambientales que caracterizan cada sitio de ensayo, observándose que los dos primeros componentes principales absorben la mayor parte de la variación entre las variables ambientales seleccionadas, con un porcentaje de varianza acumulada del 81 %. Representando las variables ambientales y los sitios de ensayo en el plano de los dos primeros ejes principales (Figura 5.5), se deduce que la primera componente viene determinada por las temperaturas mínimas y los efectos del frío, mientras que la segunda componente se relaciona con la precipitación y el estrés debido al déficit hídrico durante los meses más cálidos. Además se observa que Becerreá, Chantada, Friol, Guntín y Lalín presentan un carácter frío y precipitaciones bien repartidas; Laza, Mandín y Noceda también presentan bajas temperaturas pero con déficit hídrico estival; Coristanco y Forgoselo tienen un clima lluvioso y más cálido; mientras que As Neves, Bamio, Cortegada, Daneiro, Laracha y Rebordelo se caracterizan también por

temperaturas mínimas más altas que la media y precipitaciones ligeramente a la baja o cercanas a la media. Los resultados del análisis de componentes principales utilizando las series climáticas en los sitios evaluados a los tres y siete años por separado fueron esencialmente equivalentes.



**Fig. 5.5** Representación gráfica de las variables ambientales (cuadrados blancos) y sitios de ensayo (puntos negros) sobre el plano de los dos primeros componentes principales. P: Precipitación anual (mm); Pe: Precipitación estival (mm); IG: Índice de Gausse; Alt: Altitud (m); Hel: Nº heladas anual; T: Temperatura media anual (°C); Tmin: Temperatura mínima absoluta (°C); Tmm: Temperatura media de las mínimas del mes más frío (°C).

Los Modelos de Regresión Factorial indican variación genética en la sensibilidad a la mayoría de los parámetros ambientales (Tabla 5.3). De entre ellos, la interacción genotípica con la temperatura media de las mínimas del mes más frío resultó la más variable seguida por la interacción con el primer componente principal (PC1) para H3. Los resultados a los siete años fueron similares.

**Tabla 5.3** Resumen del análisis de regresión factorial con modelos mixtos para la altura a los tres y siete años. Se muestra el componente de la varianza del efecto aleatorio de la interacción de los genotipos con los parámetros ambientales.

Parámetro ambiental	3 años	7 años
	$\sigma^2_{G \times \text{Parámetro}}$	$\sigma^2_{G \times \text{Parámetro}}$
Altitud	0	0
Precipitación anual	no converge	0,00006 ± 0,00001***
Precipitación estival	0,00035 ± 0,00012**	0,007 ± 0,002***
Tª media anual	0,082 ± 0,027**	0,788 ± 0,127***
Índice de Gaussen	0,00094 ± 0,00067 <sup>ns</sup>	0
Nº Heladas	0,003 ± 0,001*	0,014 ± 0,006*
Tª mínima	0,131 ± 0,062*	1,184 ± 0,436**
Tª media de las mínimas	1,090 ± 0,240***	6,652 ± 1,516***
PC1 <sup>1</sup>	0,573 ± 0,143***	7,777 ± 1,848***
PC2 <sup>1</sup>	0,002 ± 0,126 <sup>ns</sup>	2,058 ± 2,577 <sup>ns</sup>

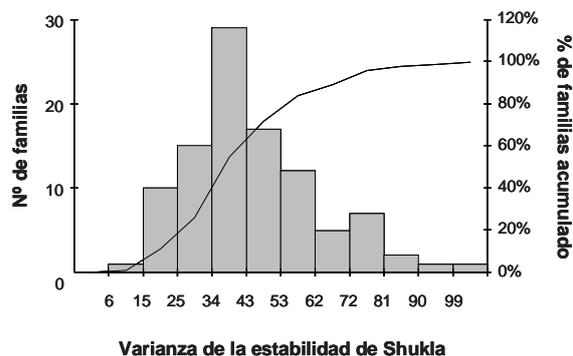
<sup>1</sup> PC1: Primer componente principal; PC2: Segundo componente principal

<sup>2</sup> Niveles de significación: \*\*\* = p<0,001; \*\* = p<0,01; \* = p<0,05; ns= no significativo (obtenidos con el test de Wald para las estimaciones de los parámetros de la covarianza del Proc Mixed de SAS).

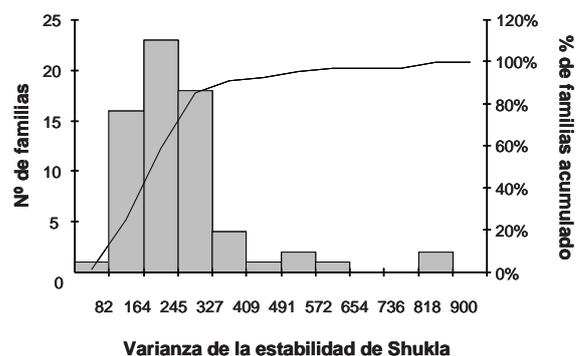
#### 5.3.4. Análisis de la estabilidad genotípica

Los resultados del modelo de Shukla a los tres y siete años indican que en la población de mejora existe variación en la sensibilidad genética a la variación ambiental. La estabilidad genética se distribuye según una distribución unimodal en forma de campana de Gauss con asimetría hacia valores altos, lo que indica que existe un número reducido de familias especialmente interactivas (Figura 5.6).

H3)

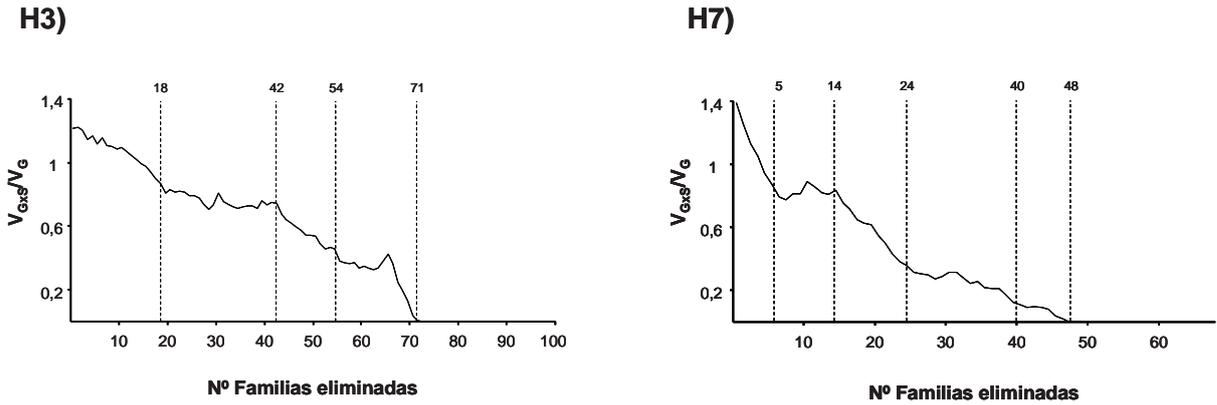


H7)



**Fig. 5.6** Histogramas de frecuencias y proporción acumulada de las varianzas de la estabilidad de Shukla de 100 familias a los tres años y 68 familias a los siete años.

Si calculamos el ratio de la varianza de la interacción y la varianza genotípica ( $V_{G \times S}/V_G$ ) para subgrupos del conjunto de familias en los que fuimos eliminando una a una las familias más interactivas, observamos que el ratio va disminuyendo hasta que el efecto de la interacción desaparece cuando hemos eliminado entorno al 70% de las familias menos estables tanto a los tres como a los siete años (Figura 5.7). Sin embargo se aprecia que esta reducción no es lineal, sino que se producen cambios en la pendiente que determinan subgrupos de familias que afectan en mayor o menor medida a la importancia de la interacción. Se identificaron los puntos críticos donde se producen estos cambios de pendiente (Figura 5.7) para tratar de localizar el número más pequeño posible de familias que es preciso eliminar para conseguir que desaparezcan las interacciones con cambio de ranking (COI).



**Fig. 5.7** Ratio de la varianza de la interacción ( $\sigma^2_{G \times S}$ ) con la varianza genotípica ( $\sigma^2_G$ ) según el número de familias eliminadas, empezando por eliminar aquellas más interactivas. Se representa además el número de familias eliminadas que supone un marcado cambio de pendiente en el ratio de varianzas.

Utilizando estos niveles de selección críticos en base a la estabilidad familiar y considerando a Galicia como un solo área de mejora, se observa que los efectos de cambio de ranking familiares desaparecen (diferencias no significativas con respecto al modelo saturado) al eliminar 24 familias a los siete años (Tabla 5.4), lo que supone un 35% de las familias iniciales. Para los tres años no desaparecen tales efectos para ninguna intensidad de selección crítica, sin embargo el modelo saturado no convergió al eliminar 71 de las familias, punto donde según la Figura 5.7 desaparece totalmente el efecto de la interacción. El porcentaje de familias a eliminar considerando la evaluación a los tres años para que desaparezca el efecto de cambio de ranking estaría entonces entre el 54 y el 71%.

**Tabla 5.4** Comparación de la verosimilitud del modelo saturado (sin restricciones en los parámetros de la covarianza entre sitios) y el modelo restringido en el que la correlación genética entre todos los pares de sitio se fuerza a 1 ( $r_g = 1$ , *perfect correlation*), utilizando diferentes niveles de selección críticos en base a la estabilidad familiar. La variable dependiente es la altura a los tres y siete años (H3 y H7).

Edad	Nº familias eliminadas	Modelo saturado	Modelo restringido	Comparación modelos		
		-2L <sup>a</sup>	-2L <sup>a</sup>	LRT <sup>b</sup>	gl <sup>c</sup>	p>X <sup>2d</sup>
3 años	18	188599,6	188857,1	257,5	78	<0,001
	42	132899,1	133027,7	128,6	78	<0,001
	54	105873,9	105981,2	107,3	78	0,015
	71	nc <sup>e</sup>	66155,1	-	78	-
7 años	5	148015,7	148092,5	76,8	21	<0,001
	14	127195,5	127236,9	41,4	21	0,005
	24	103118,1	103136,1	18,0	21	<b>0,649</b>
	40	64473,1	64484,4	11,3	21	<b>0,957</b>
	48	47002,3	47010,0	7,7	21	<b>0,996</b>

<sup>a</sup> - 2 Res Log Likelihood.

<sup>b</sup> Estadístico del ratio de verosimilitud para comparar los distintos modelos con el modelo de referencia.

<sup>c</sup> Los grados de libertad (g.l.) asociados al test Chi-cuadrado resultan de la diferencia del número de parámetros de covarianza a estimar entre el modelo restringido y el saturado.

<sup>d</sup> Significación del test Chi-cuadrado para el estadístico del ratio de verosimilitud (LRT).

<sup>e</sup> nc: el modelo no converge.

## 5.4. Discusión

### 5.4.1. Magnitud y descomposición de la interacción G×E

En el presente trabajo el ratio entre la varianza de la interacción y la varianza familiar (134 y 111% a los tres y siete años respectivamente) sugiere una elevada importancia de la interacción G×E para la población de mejora de Galicia-Costa en el conjunto del territorio de la Comunidad gallega. Zas et al. (2004b) obtuvieron un valor muy parecido para la altura a los ocho años (108%) analizando parte de esta población en cuatro de los 16 sitios aquí considerados, todos pertenecientes a la zona costera. De la Mata y Zas (2010b; ver Capítulo II) obtuvieron valores relativamente inferiores para las mismas variables analizando la misma población de mejora en otros cinco de los sitios aquí utilizados, tanto en la costa como en el interior (42% y 54% a los tres y siete años respectivamente). Sin embargo, a pesar de la aparente pequeña magnitud de la interacción G×E, ésta fue relevante ya que las interacciones con cambio de ranking fueron significativas tanto entre como dentro de zonas, lo que pone de manifiesto la importancia de testar no sólo la magnitud global sino también el origen de la interacción

(de la Mata y Zas 2010b; Capítulo II). Sorprendentemente, gran parte de los trabajos que afrontan el estudio de la interacción G×E en especies del género *Pinus* se enfocan básicamente en cuantificar su peso global para valorar su importancia basándose habitualmente en umbrales de referencia como el sugerido por Shelbourne (1972), que indica que sólo si la varianza de la interacción supera la mitad de la varianza aditiva ( $\sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_S > 50\%$ ) la ganancia de la selección puede verse seriamente afectada. Sólo en los últimos años aparecen trabajos que tienen como objetivo descomponer el origen o la causa de la interacción (Costa-Silva et al. 2006; Ding et al. 2007; Hannrup et al. 2008).

En el programa de mejora de *P. pinaster* para zonas secas del Oeste de Australia, desarrollado a partir de familias de la procedencia Atlántica de Leiría (Portugal), la interacción G×E resultó significativa para el crecimiento en altura pero con valores bajos del ratio  $\sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_S$ , (16-30% en función de la serie de ensayo), concluyéndose una escasa relevancia de la interacción en este programa de mejora (Hopkins y Butcher 1994). Resultados similares para *P. pinaster* en base a ensayos de procedencias fueron obtenidos en Francia (Guyon y Kremer 1982), en el interior de Galicia (de la Mata y Zas 2010a; Capítulo I) y en Grecia (Matziris 1982), donde incluso la interacción no fue significativa, si bien es cierto que en el primer caso los sitios eran muy homogéneos y en los dos últimos las procedencias escasas y muy parecidas en cuanto a su origen. Sin embargo, con una mayor representación de los distintos orígenes de la especie en sitios de ensayo en el interior peninsular con ambientes contrastados, Alía et al. (1997) obtuvieron un ratio  $\sigma^2_{G \times S} / \sigma^2_S$  de 191% para el crecimiento en volumen, lo que muestra la importancia de la interacción procedencia × sitio. El mismo resultado fue obtenido por Correia et al. (2010) testando varias poblaciones de procedencias portuguesas en ese mismo país.

A juzgar por los resultados obtenidos en todos estos trabajos sobre interacción G×E en *P. pinaster*, los altos valores globales de la interacción G×E observados para la población estudiada en este trabajo pueden parecer sorprendentes, dado el escaso tamaño del área de estudio y que esta población fue seleccionada dentro de una única procedencia (Galicia-Costa) en base a los mismos caracteres fenotípicos, conformando una subpoblación previsiblemente más homogénea en su comportamiento adaptativo. Sin embargo los resultados de otros ensayos de procedencias con estructura familiar con *P. pinaster* (Corcuera et al. 2010) y otros pinos tropicales indican que la varianza de la interacción familia × sitio puede ser muy superior a la de la interacción procedencia ×

sitio (e.g. Hodge y Dvorak 1999). Aunque en el caso de los pinos tropicales esto puede ser debido en parte a una escasa diferenciación ecotípica entre procedencias (Dvorak et al. 1996), estos resultados también indican la existencia de una alta variación genética en la plasticidad intrapoblacional. Esta variación genética permite que la plasticidad fenotípica de una determinada población evolucione en respuesta a las condiciones ambientales en las que se desarrolla, favoreciendo la divergencia entre poblaciones si las condiciones ambientales difieren entre ellas (Chambel et al. 2007). Así, la característica elevada plasticidad fenotípica de las poblaciones Atlánticas (Alía et al. 1997; Chambel et al. 2007) podría ser fruto de la gran heterogeneidad ambiental desde el punto de vista orográfico y climático de las regiones donde éstas habitan (Schlichting y Pigliucci 1998).

Conviene resaltar, sin embargo, que la reducida edad de evaluación de nuestros ensayos (tres y siete años) pudo haber favorecido una elevada interacción G×E de tipo no repetible, originada por variaciones estocásticas que no reflejan la adaptación real de los genotipos a los distintos ambientes. De hecho el peso de la interacción G×E en nuestro estudio se reduce desde los tres a los siete años. La disminución del peso de la interacción G×E con la edad es un hecho frecuente en pinos (e.g. Dieters et al. 1995; Hodge y Dvorak 1999), aunque también se han observado resultados opuestos, con aumento de la interacción con el tiempo (e.g. Gwaze et al. 2001; Yeiser et al. 2001), e incluso ausencia de relación alguna entre la interacción y la edad (e.g. Haapanen 1996; Hannrup et al. 2008). Estos resultados muestran nuevamente la complicación del estudio de la interacción G×E, con resultados desiguales incluso dentro de la misma especie. En nuestro caso la disminución del peso de la interacción es pequeña y la correlación entre las dos edades es alta, por lo que podríamos usar cualquiera de ellas o ambas, como es el caso, si la información disponible a cada edad es complementaria.

#### **5.4.2. Agrupación de ambientes**

Una manera de reducir el importante efecto de la interacción detectado y sus consecuencias es agrupar los sitios de ensayo en macroambientes dentro de las cuales el ranking de los genotipos sea similar (Zobel y Talbert 1988). Aplicando este criterio con el procedimiento CINTERACTION se obtuvo un dendrograma donde hubo cierta tendencia a la agrupación de los sitios costeros y los interiores entre sí, si bien en ambos grupos aparecen sitios que geográficamente corresponden a la otra zona, así como sitios

con un comportamiento muy diferente a todos los demás con dificultades de agrupación (Figura 5.2).

El punto de corte sobre el dendrograma clúster que determina la agrupación óptima resultó ser aquel que generó tres grupos ambientales de sitios tanto a los tres como a los siete años. Este punto de corte surge de la comparación entre el componente de la varianza de la interacción debido a la variación dentro y entre grupos para los diferentes niveles de agrupación (ver Figura 5.3). El análisis basado en modelos mixtos para detectar interacción con cambio de ranking sobre estos niveles de agrupación del dendrograma no resultó funcional para este fin ya que detectó cambios de ranking significativos para cualquier nivel de agrupación (ver Tabla 5.1). Estos resultados, además de indicar que los cambios de ranking son una causa principal de la interacción y que ésta debe ser tomada en cuenta para cualquier proceso de selección, ponen de manifiesto que este tipo de análisis es demasiado restrictivo y no resulta útil para determinar el agrupamiento óptimo, probablemente porque la correlación perfecta en la que se basa este análisis es condición suficiente pero no estrictamente necesaria para la ausencia de cambios de ranking (Crossa et al. 2004). Por su parte, el análisis de las correlaciones genéticas entre sitios (ver Tabla 5.2) también respalda la agrupación óptima en tres regiones. Las correlaciones entre sitios pertenecientes a una misma región son significativamente más altas que aquellas entre sitios de regiones diferentes, y el estadístico F de esta comparación es máximo para la agrupación en tres regiones (ver Figura 5.4). Sin embargo, también existen algunas correlaciones altas entre sitios pertenecientes a diferentes grupos y bajas entre sitios del mismo grupo, lo que nuevamente muestra la heterogeneidad territorial de Galicia y la dificultad de establecer regiones de comportamiento genotípico estable.

En base a la agrupación en tres regiones ambientales, Laracha aparece a los tres años como un sitio con comportamiento anárquico, algo que puede ser justificado por el hecho de que este ensayo fue atacado por el hongo radical *Armillaria ostoyae* (Romagn.) lo que obliga a tomar con cautela los resultados en este sitio de ensayo (ver Zas et al. 2007). Por su parte, Daneiro, un sitio eminentemente costero, aparece a los tres años agrupado con sitios claramente interiores. Esta parcela tuvo también problemas con el ataque del gorgojo *Hylobius abietis* L. que mata a las plantas juveniles mediante anillado y causa importantes pérdidas de crecimiento (Sampedro et al. 2009), circunstancias que de nuevo obligan a tener precaución con sus interpretaciones.

Al margen de Daneiro y Laracha, se observa que los sitios con una pertenencia anómala a la agrupación que a priori le correspondería, son aquellos situados en el tercio central de Galicia, relativamente cerca del límite de la zonificación tradicional Costa-Interior, donde las condiciones climáticas no alcanzan a ser extremas (Chantada, Cortegada, Friol, Lalín y Noceda, ver Figura 5.2). Esto nos lleva a pensar que este límite es artificioso, y más bien existiría para la especie un gradiente difuso entre las áreas costeras de marcado clima Atlántico, que se va endureciendo de una manera muy irregular hacia las zonas interiores con un clima más extremo en cuanto a precipitaciones y temperatura. La irregularidad de este gradiente nuevamente aparece relacionada con la heterogeneidad propia del territorio en Galicia (Martínez et al. 1999), que genera una alta variabilidad ambiental también a escalas intermedias, además de la heterogeneidad del micrositio y la regional a gran escala.

Por otra parte, la verosimilitud del modelo de agrupación tradicional Costa-Interior es la menor de todos los modelos de agrupación (mayor -2L en la Tabla 5.1) y donde se producen en consecuencia una mayor cantidad de cambios de ranking familiares (ver Tabla 5.1). Además, el ratio de la variación dentro-entre grupos de la actual división del territorio es en casi todos los casos superior al del resto de agrupaciones clúster obtenidas mediante el procedimiento CINTERACTION (ver Figura 5.2). De estos resultados se concluye que la regionalización tradicional para *P. pinaster* en Galicia en cuanto al empleo y mejora del material forestal de reproducción es inconsistente. A esta misma conclusión han llegado otros autores con otras especies en los que una regionalización territorial previa en base a características climáticas y geográficas no se correspondió posteriormente con el comportamiento de los genotipos cuando se estudió la interacción G×E en profundidad (e.g. White y Ching 1985; Isik et al. 2000).

Por su parte, al tratar de dar un sentido geográfico o ambiental a la agrupación óptima para redefinir las áreas de mejora y utilización de *P. pinaster* en Galicia, se concluye que ésta no se corresponde geográfica ni ambientalmente con una compartimentación ni efectiva ni lógica del territorio (ver Figura 5.2 y Figura A1, Anexo 1). Aún obviando los sitios de comportamiento anómalo, es difícil establecer una línea divisoria específica por causa de aquellos situados en la parte central de Galicia en transición entre la costa al oeste y los macizos montañosos de la parte este, donde el efecto de la interacción sobre los genotipos es confuso y los sitios pueden aparecer agrupados indistintamente con los de la costa o del interior.

#### **5.4.3. Variación en la sensibilidad climática del material costero**

Los Modelos de Regresión Factorial ayudaron a modelizar ambientalmente el patrón de la interacción G×E, e indicaron que el régimen térmico, especialmente el régimen de frío, es el que mejor explica este patrón (ver Tabla 5.3). Las variaciones entre sitios de este régimen generaron la mayor respuesta fenotípica, lo que implica un mayor peso de esta variable en los comportamientos familiares relativos y un mayor número de cambios de ranking. El régimen de precipitaciones, tanto anual como estival, tuvo menor poder explicativo de la interacción, en contra de lo que cabría esperar (ver Tabla 5.3). Parece que la población de mejora costera presenta una buena adaptación a la sequía, al menos a los niveles de sequía de la zona interior de Galicia, de tal manera que las variaciones en los regímenes de precipitaciones no suponen cambios de ranking pronunciados. Dicho de otra forma, el límite inferior de precipitaciones que caracteriza a los ensayos más secos de Galicia se encuentra dentro de la capacidad admisible para la población de Galicia-Costa y conlleva comportamientos diferenciales entre familias menos relevantes que los ocasionados por variaciones en el régimen de frío. Otra procedencia de origen Atlántico como es la de Landas (SO Francia), donde no existen limitaciones en cuanto a la precipitación, ha demostrado en ensayos previos una gran resistencia a la sequía (Corcuera et al. 2010), justificada por los autores por su adaptación a fuertes vientos y suelos arenosos. Quizás en la población de Galicia-Costa se produjo el mismo proceso adaptativo, favoreciendo una gran resistencia a la sequía que permitiría el uso de esta población en regiones con precipitaciones inferiores, pero donde los vientos y la capacidad de retención de los suelos no es tan limitante. Por el contrario, los resultados indican que las variaciones en el régimen térmico sí condicionan el comportamiento relativo del material de mejora de Galicia-Costa, existiendo una fuerte variación genética en los niveles de sensibilidad al frío invernal. La importancia del régimen térmico en los patrones de interacción coincide con los resultados para plántulas jóvenes de otras especies menos termófilas como *P. sylvestris* (Sonesson y Eriksson 2000) o *Pseudotsuga menziesii* (Campbell y Sorensen 1978), especie esta última para la que el régimen de precipitaciones también altera en menor medida que el frío el comportamiento genotípico (Joly et al. 1989; Kaya 1992). En otros pinos termófilos como *P. taeda*, sin embargo, el régimen de precipitaciones es el factor que mejor explica la interacción G×E (e.g. Cannell et al. 1978; Waxler y van-Buijtenen 1981).

En cualquier caso, los resultados de los modelos de regresión factorial indican que prácticamente todos los parámetros ambientales tienen efectos significativos sobre la interacción G×E (ver Tabla 5.3), siendo difícil aislar un único parámetro ambiental explícito que permita la compartimentación del territorio en zonas libres de interacción repetible. Estudios con *P. pinaster* en Portugal también encontraron incongruencias macroambientales de los patrones de la interacción, dificultando la asociación del comportamiento de las poblaciones con los ambientes (Correia et al. 2010). La misma dificultad a la hora de identificar el patrón ambiental de la interacción se muestra en trabajos con otras especies de pinos (e.g. Haapanen 1996; Gwaze et al. 2001; Hannrup et al. 2008). En otros trabajos, sin embargo, sí se identificaron ciertos parámetros ambientales (precipitación, tipo de suelo, calidad de estación,...) como principales responsables de la interacción G×E (e.g. Johnson y Burdon 1990; Hodge y White 1992; Adams et al. 1994; Dieters 1996), si bien en ninguno de estos casos el patrón fue suficientemente explicativo o los efectos esperables sobre la ganancia genética fueron suficientes como para motivar una subdivisión del área de mejora. Por otra parte, se ha sugerido que además de las variables ambientales habitualmente utilizadas para caracterizar los sitios de ensayo, existen otros factores tanto o más importantes en la definición de los patrones de interacción, como son los riesgos a los ataques biológicos, otras propiedades del suelo diferentes a las frecuentemente evaluadas o la variación de todos estos factores a escalas espaciales más pequeñas que el nivel macroclimático (Costa-Silva et al. 2006). En relación a los riesgos bióticos, estos autores resaltan además la dificultad de valorar su peso en el patrón de la interacción debido a la existencia de variación genética en la resistencia, al elevado número de posibles organismos responsables de los ataques, al efecto estocástico de los mismos y a su variación con el tiempo, necesitando un sofisticado análisis de riesgos para la definición de los tipos de sitio desde este punto de vista.

#### **5.4.4. Agrupación de genotipos**

El análisis de la estabilidad familiar indica que existe un pequeño número de familias especialmente interactivas que son las principales responsables del efecto de la interacción (ver Figura 5.6). Esto coincide con los resultados encontrados anteriormente para la misma población de mejora en una representación parcial de los ensayos (Zas et al. 2004b; Martíns et al. 2009) y en un ensayo en condiciones controladas (Zas y Fernández-López 2005). De hecho estos resultados son muy frecuentes y se han

observado en ensayos multiambiente para muchas especies del género (e.g. Johnson 1992; Dieters 1996; Sonesson y Eriksson 2000; McKeand et al. 2006), y otras coníferas (e.g. StClair y Kleinschmit 1986; Stonecypher et al. 1996). La eliminación de las familias más inestables supone una alternativa a la subdivisión de la población de mejora para reducir los efectos negativos de la interacción G×E. Así, muchos autores sugieren realizar una selección en base al comportamiento medio a lo largo de los distintos sitios de ensayos junto con la estabilidad a través de éstos (e.g. Matheson y Raymond 1984; StClair y Kleinschmit 1986; Durel y Roman Amat 1987; Johnson y Burdon 1990; Johnson 1992; Pswarayi et al. 1997). Hopkins y Butcher (1994) también recomiendan esta estrategia para eliminar totalmente el ya de por sí escaso efecto de la interacción G×E en el programa de mejora de *P. pinaster* en el oeste de Australia. La selección en base a parámetros de estabilidad en ambientes contrastados, es además una elección segura frente a un escenario de cambio global incierto, situación en la que una selección de genotipos de adaptación específica puede conducir a problemas de adaptabilidad en el futuro (Ledig y Kitzmiller 1992).

En nuestro caso la eliminación del 70% de las familias anula completamente el efecto de la interacción (ver Figura 5.7), si bien con la eliminación de entre un tercio y la mitad de las familias más inestables se minimiza la interacción repetible con cambio de ranking a ambas edades (ver Tabla 5.4). Este umbral parece, por tanto, el adecuado para seleccionar una segunda generación de mejora lo suficientemente estable como para ser utilizada en cualquier parte de Galicia con la garantía de un crecimiento adecuado. La falta de relación entre la estabilidad (varianza de Shulka) y el crecimiento medio ( $r^2 = 0,0013$ ;  $P > 0,05$ ), al contrario de lo encontrado por otros autores (e.g. Johnson 1992) donde algunos de los mejores genotipos fueron los más inestables, permite, además, seleccionar genotipos estables sin que ello suponga una reducción indirecta en el crecimiento.

Se sabe que los parámetros de estabilidad cambian según el carácter considerado, de tal manera que las familias inestables no son las mismas para los distintos caracteres (Mullin 1985; Sonesson y Eriksson 2000; Zas et al. 2004b). Aunque ciertos autores recomiendan combinar caracteres en un índice de selección, la consideración de múltiples caracteres provocaría un aumento del número de familias que contribuyen a la interacción (McKeand et al. 1997). Por otro lado, los caracteres de crecimiento habitualmente sufren un mayor efecto de la interacción G×E que aquellos

relacionados con la forma o la calidad de madera (Johnson y Burdon 1990; Koch y Fins 2000; Li y Wu 2005; Sykes et al. 2006). La evaluación subjetiva de los caracteres de forma y las complicaciones metodológicas para la evaluación de los caracteres de calidad de madera pueden, a su vez, contribuir a la aparición de interacción G×E no repetible, sin grandes repercusiones en los procesos de selección (Pswarayi et al. 1997; Gwaze et al. 2001). El crecimiento en altura parece, por lo tanto, un parámetro adecuado para la toma de decisiones con respecto a la interacción G×E en el programa de mejora Galicia-Costa, de finalidad meramente productiva. Su versatilidad para describir la capacidad adaptativa de las familias, su evaluación sencilla y objetiva y su gran sensibilidad a la variación ambiental permiten una buena descripción de la interacción G×E.

### 5.5. Conclusiones

1. El análisis estadístico en dos etapas, en el que en una primera se corrigen espacialmente los datos en cada sitio, seguida del empleo de modelos mixtos para el análisis conjunto de todos los sitios, se valora como un método adecuado y preciso para valorar y descomponer los posibles orígenes de la interacción. Sin embargo, las pruebas estadísticas para la detección de interacción con cambio de ranking basadas en los modelos mixtos descritos por Yang (2002) fueron en muchos casos demasiado restrictivas y no resultaron útiles para detectar la agrupación óptima.
2. El origen y magnitud de la interacción G×E para el crecimiento en altura de la población de mejora de *Pinus pinaster* para Galicia es suficientemente importante como para tenerla en cuenta en el avance del programa de mejora para la especie. La división tradicional Costa-Interior diseñada para reducir el efecto de esta interacción es inconsistente, y no se ajusta a los patrones de interacción encontrados, detectándose interacción con cambios de ranking tanto dentro como entre zonas.
3. No fue posible encontrar una zonificación geográfica o ambiental alternativa que redujera los efectos de la interacción, ya que la mejor agrupación de sitios no resultó coherente geográfica ni ambientalmente. La posible subdivisión del territorio en zonas de mejora genotípicamente estables no es, en base a los resultados, una alternativa recomendable para Galicia.

4. El régimen de frío invernal es el factor ambiental que mayor efecto tuvo sobre los cambios de ranking familiares para la población de mejora, si bien otros factores, como la sequía estival, también contribuyen a la interacción G×E.

5. La selección combinada por crecimiento promedio en el conjunto de sitios y estabilidad genotípica, en la que se eliminaría entre un tercio y la mitad de las familias más inestables, es la estrategia más recomendable para afrontar la importante interacción G×E. Esta estrategia permite configurar una única población de mejora estable, utilizable en toda Galicia, lo que supone una importante reducción de costes frente a otras alternativas y facilita enormemente la gestión del material forestal de reproducción mejorado. Además es una estrategia de selección segura frente al incierto escenario de cambio climático futuro.



---

**6. CAPÍTULO IV. Variación genética y  
plasticidad a la sequía de procedencias de  
*Pinus pinaster* Atlánticas, Mediterráneas y  
sus híbridos**

---

## **6. CAPÍTULO IV Variación genética y plasticidad a la sequía de procedencias Atlánticas, Mediterráneas y sus híbridos**

### **6.1. Introducción**

La disponibilidad hídrica es uno de los recursos más limitantes para el reclutamiento de las especies forestales Mediterráneas (Pigott y Pigott 1993). Tolerar la sequía en las primeras etapas del desarrollo puede ser particularmente importante ya que el escaso crecimiento radical de las plantas juveniles las vuelve muy vulnerables al déficit hídrico. De hecho, el estado juvenil es un momento crítico del ciclo de vida de los árboles por ser cuando se producen las presiones de selección más relevantes (Leck et al. 2008). Se espera, por tanto, que bajo los patrones de variación geográfica de las poblaciones Mediterráneas a lo largo de los gradientes naturales de disponibilidad de agua subyazcan mecanismos adaptativos implicados en la tolerancia a la sequía en etapas juveniles.

Las plantas pueden cambiar los patrones de distribución de biomasa en respuesta al ambiente (Bloom et al. 1985), adquiriendo éstos un carácter funcional clave con fuertes implicaciones en la capacidad competitiva de las especies a lo largo de los gradientes ambientales y en definitiva, en el éxito biológico (Aerts et al. 1991). La distribución de recursos entre las diferentes actividades biológicas de la planta conforma la base de la ‘teoría de historia vital’ (Gadgil y Bossert 1970; Iwasa y Roughgarden 1984; Stearns 1992), determinando en gran medida la capacidad de las plantas para captar recursos (Poorter et al. 2012), para competir con los vecinos (Grime 1979; Tillman 1988), y para reproducirse (Abrahamson y Gadgil 1973; Bazzaz y Reekie 1985; Schmid y Weiner 1993). Concretamente, se ha encontrado que la disponibilidad de agua influye en la distribución de biomasa, y los diferentes patrones observados a lo largo de gradientes de disponibilidad hídrica se han interpretado como un mecanismo adaptativo que permite maximizar la ganancia de carbono y minimizar las pérdidas de agua (Chapin 1980). Por ejemplo, se ha predicho que una alta inversión en raíces y una baja inversión en acículas es un mecanismo asociado a la resistencia al estrés hídrico, maximizando la captura de agua y minimizando las pérdidas a través de la transpiración (Ludlow 1989). De acuerdo con esta idea, varios estudios con distintas especies de pinos han encontrado una alta inversión en raíces (Nguyen y Lamant 1989; Cregg y

Zhang 2001) y una baja área foliar específica (Fernandez et al. 1999) en las poblaciones procedentes de sitios más secos.

El pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) es una importante especie forestal del suroeste europeo que muestra una alta variación entre poblaciones para diferentes caracteres fenotípicos, con un probable valor adaptativo (Guyon y Kremer 1982; Danjon 1994; Guehl et al. 1995; Alía et al. 1997; Tognetti et al. 2000; Chambel et al. 2007). Es considerada una especie con una estrategia evitadora de la sequía, con una alta sensibilidad estomática cuando el suelo se seca (Granier y Loustau 1994; Picon et al. 1996; Fernández et al. 2000), aunque cuenta también con mecanismos asociados a la estrategia de tolerancia, tales como el ajuste osmótico (Nguyen-Queyrens et al. 2002) o cambios en el reparto de biomasa (Aranda et al. 2010; Sánchez-Gómez et al. 2010). Además se observa una alta variación entre poblaciones para los caracteres asociados a la resistencia al estrés hídrico, como la distribución de biomasa (Aranda et al. 2010), la eficiencia en el uso del agua (WUE) (Corcuera et al. 2010) y el ajuste osmótico (Nguyen y Lamant 1989; Nguyen-Queyrens et al. 1998). La diferenciación entre procedencias de *P. pinaster* ha sido también ampliamente documentada para muchos caracteres cuantitativos en diferentes ensayos de procedencia tanto en la región Atlántica (Molina 1965; Danjon 1994; Correia et al. 2004) como en el área Mediterránea (Matziris 1982; Alía et al. 1995; Harfouche et al. 1995a) o en zonas de transición entre ambas (de la Mata y Zas 2010a; ver Capítulo I). La asociación entre potencial de crecimiento y la disponibilidad de agua en la región de origen observada en los ensayos de procedencia para la especie en la Península Ibérica demuestra la relevancia adaptativa de este carácter para la especie (Alía et al. 1997; Corcuera et al. 2010). Se observa además una gran variación entre individuos dentro de las poblaciones frente al estrés hídrico (Correia et al. 2008; Aranda et al. 2010), sugiriendo que los costes asociados a estos mecanismos o/y la interacción con otros factores ambientales, impide la fijación de los mimos de acuerdo a las condiciones ambientales particulares de cada población. Por otro lado, esta variación intrapoblacional permite que las poblaciones puedan responder evolutivamente a las presiones ambientales. En cualquier caso, el hecho de que la mayoría de los caracteres estudiados variaron entre poblaciones siguiendo un patrón geográfico acorde a la variación ambiental sugiere que éstos están involucrados en procesos de diferenciación adaptativa frente al estrés hídrico. Diversos estudios han encontrado, a su vez, una alta plasticidad fenotípica frente a la sequía en

esta especie (Hopkins y Butcher 1993; Zas y Fernández-López 2005; Chambel et al. 2007; Correia et al. 2008).

La zona de interior de Galicia es una zona de transición entre las regiones bioclimáticas Atlántica y Mediterránea, caracterizada por una pronunciada sequía estival (60-100 mm) y baja precipitación anual (600-1.200 mm) (ver más detalles en la Introducción). Además las predicciones de los modelos climáticos locales en Galicia predicen un incremento de la temperatura media anual con picos de calor más extremos en el verano, frío menos extremo en el invierno, e importantes cambios en la distribución de las lluvias a lo largo del año (Pérez-Muñuzuri et al. 2009). Esto hace que la identificación de materiales genéticos de *P. pinaster* adaptados a las condiciones más xéricas del interior tenga también un especial valor desde el punto de vista adaptativo y de resiliencia de las masas de la zona Atlántica del noroeste español.

La hibridación interprocedencia ha sido usada en múltiples especies forestales como una herramienta para mejorar caracteres de interés productivo mediante el aprovechamiento del vigor híbrido o de la combinación de características deseables específicas. Mientras que en unos pocos casos los resultados han sido prometedores (Eriksson y Ilstedt 1986; Orr-Ewing 1966), en la mayor parte de los estudios con coníferas los híbridos mostraron normalmente un comportamiento intermedio a los de sus procedencias parentales (Morgenstern 1973; Owino y Zobel 1977; Kaya 1992; Nilsson 1992). Sin embargo, más allá de las ganancias obtenidas por heterosis, la hibridación interprocedencia puede ser de especial interés para la combinación en el híbrido de caracteres parentales deseables, como ya ha sido demostrado en diversos estudios con coníferas (Nilsson 1973; Owino y Zobel 1977; Bolstad et al. 1991) y particularmente con *P. pinaster* (Harfouche et al. 1995b). Trabajos anteriores han demostrado la posibilidad de combinar mediante hibridación las buenas características de crecimiento de la población Atlántica de *P. pinaster* de Landas con las buenas características de forma y resistencia al insecto *Matsucoccus feytaudi* Duc. de la procedencia de Córcega (Harfouche et al. 1995b; Harfouche y Kremer 2000). Estos resultados invitan a pensar en la posibilidad de hibridar procedencias de carácter Atlántico con otras caracterizadas por un mayor grado de Mediterraneidad, para obtener híbridos que mantengan los buenos crecimientos de los parentales Atlánticos pero que muestren caracteres adaptativos frente a la sequía más propios de las procedencias más xéricas.

En este estudio se evaluó la plasticidad y la variación genética frente a la sequía en juveniles de *P. pinaster* de 12 poblaciones procedentes de la región Atlántica y Mediterránea y de los híbridos interprocedencia entre ellas. Para ello se instaló un ensayo en condiciones controladas con dos tratamientos experimentales de disponibilidad hídrica durante seis meses y se evaluó la supervivencia, el crecimiento y la distribución de biomasa entre los diferentes tejidos funcionales de la planta, que fueron indicadores de la capacidad adaptativa frente a la sequía. Las principales hipótesis a testar fueron: i) la existencia de variación intraespecífica en los caracteres funcionales relacionados con la resistencia al estrés hídrico, ii) la adaptación de las poblaciones a las características ambientales en el origen explican los patrones de plasticidad frente al estrés hídrico, iii) el comportamiento de los híbridos entre procedencias con diferentes grados de Mediterraneidad es intermedio entre sus parentales y iv) la posibilidad de seleccionar híbridos que reúnan buenas características de crecimiento y de resistencia a la sequía, que puedan constituir un material adecuado para ser usado en la zona de transición interior de Galicia.

## **6.2. Material y métodos**

### ***6.2.1. Origen, polinizaciones y multiplicación del material genético***

El material estudiado consistió en 12 poblaciones de *Pinus pinaster*, cinco de origen puro y siete híbridas, seleccionadas en un gradiente de Mediterraneidad moderada y caracterizadas por vegetar bajo diferentes regímenes de precipitación (Tabla 6.1). Cinco de ellas se obtuvieron por polinización abierta dentro de tres regiones de procedencia españolas, dos de carácter Atlántico (Noroeste-Litoral y Noroeste-Interior) y una con una notable influencia Mediterránea (Montaña de Soria-Burgos) (Alía et al. 1996). La población Noroeste-litoral se trató de una representación de la población de mejora del programa Galicia-Costa (GC) obtenida del huerto semillero de Sergude (42° 49' N; 8° 28' O). Otras tres poblaciones corresponden a los tres rodales selectos declarados en Galicia para la región de procedencia Noroeste-Interior, localizados en Carballiño (IN1, Ourense), Guitiriz (IN2, Lugo) y Sober (IN3, Lugo). La población de la Montaña de Soria-Burgos (SB) se recolectó en el huerto semillero de esta procedencia situado en Valsain (Segovia, 40° 52' N, 3° 60' O), que incluye 56 genotipos seleccionados por sus buenas aptitudes para la producción de madera (Tablas 6.1 y 6.2; ver Anexo 1 para más detalles). En cada una de estas poblaciones se seleccionaron cinco parentales en base a

sus características genotípicas y/o fenotípicas superiores (crecimiento, rectitud del fuste y ramosidad) de los que se obtuvieron tanto semilla de polinización abierta como polen.

Además de estas cinco poblaciones de polinización abierta se obtuvieron otras siete poblaciones híbridas interprocedencia mediante polinizaciones controladas realizadas en el año 2003 en los dos huertos semilleros citados. En todos los casos las polinizaciones se realizaron sobre los mismos genotipos seleccionados para caracterizar las poblaciones de polinización abierta. En el huerto de Valsain (SB), los cinco genotipos fueron polinizados con mezclas de polen de los individuos seleccionados en el resto de poblaciones puras de origen Atlántico (GC, IN1, IN2 e IN3). En el huerto de Sergude (GC) los cinco genotipos seleccionados se polinizaron con mezclas de polen de la población IN1 y de otras dos procedencias de origen Francés: Landas (L) con carácter Atlántico pero con buen comportamiento frente a la sequía (Corcuera et al. 2010) y Córcega con fuerte carácter Mediterráneo. El polen de la población de Landas se obtuvo de una selección al azar de cinco árboles en una plantación con material de esta procedencia situada en La Garganta (Ciudad Real, 38° 29' N, 4° 27' O). En el caso de Córcega se utilizó una mezcla de polen de una selección de cinco árboles en un ensayo de procedencias plantado en 1967 y localizado en Espinoso del Rey (Toledo, 39° 36' N, 4° 49' O) (Tablas 6.1 y 6.2; ver Anexo 1 para más detalles).

**Tabla 6.1** Promedios de las principales características geográficas y climáticas en el origen de las procedencias de las que se obtuvieron las poblaciones en polinización abierta y de las que participaron en las hibridaciones.

	Galicia-Costa	Carballiño	Guitiriz	Sober	Córcega	Landas	Soria-Burgos
Longitud	8° 33' O	8° 05' O	7° 54' O	7° 35' O	9° 10' E	1° 14' O	2° 53' O
Latitud	42° 33' N	42° 26' N	43° 11' N	42° 28' N	41°05' N	44°12' N	41°56' N
Altitud (m)	200	550	450	450	600	20	1000
Precipitación anual (mm)	1500	1050	1080	630	670	900	685
Precipitación estival (mm)	150	110	120	90	45	190	105
Tª media anual (°C)	13,1	11,7	11,5	12,1	14,7	12,7	11,3
Media Tª mínimas (°C) <sup>1</sup>	4,0	2,5	2,4	1,4	3,0	2,0	-2,5
Oscilación térmica (°C) <sup>2</sup>	11,4	13,3	11,5	14,9	14,0	14,5	17,1

<sup>1</sup> Media de las mínimas diarias del mes más frío (°C).

<sup>2</sup> Diferencia entre la temperatura media del mes más cálido y la del mes más frío (°C).

El presente capítulo se centra en un ensayo bajo condiciones controladas de disponibilidad hídrica y forma parte de un estudio más amplio sobre el mismo material genético que comprendió además un ensayo bajo condiciones controladas de frío y tres

ensayos en condiciones de campo en tres localidades gallegas de clima contrastado. Debido a que la semilla disponible no era suficiente para satisfacer las necesidades de material vegetal de todos estos ensayos, fue necesario poner a punto un sistema de multiplicación vegetativa mediante mini-estaquillado en cascada (Alazard 1992). En primer lugar se sembró el material disponible (marzo-2006) y después de tres meses de crecimiento en invernadero se obtuvo una única estaquilla de 4-6 cm de longitud por cada planta procedente de la yema terminal. Estas estaquillas iniciales constituyen el material utilizado en el presente capítulo. Cuando los brotes epicórmicos inducidos por el descabezamiento de la planta alcanzaron una longitud aproximada de 5 cm se realizó un nuevo proceso de estaquillado del que se obtuvieron otras 4-5 estaquillas por cada planta y que se emplearon en el resto de ensayos mencionados. Para el enraizado se sumergieron las estaquillas en una solución acuosa al 0,05% de ácido indolbutírico (AIB) durante seis segundos (ensayos preliminares permitieron optimizar las dosis de hormona y el tiempo de aplicación). Las estaquillas se dispusieron en bandejas rellenas de sustrato 4:1:1 (perlita : turba : corteza de pino compostada), en un invernadero con condiciones controladas de temperatura (22-27°C) y humedad ( $H_r > 70\%$ ). Nueve meses después del estaquillado se repicó la planta procedente de la yema terminal (marzo-2007) y se trasladó al envase definitivo para el establecimiento del ensayo en condiciones controladas con dos regímenes de disponibilidad hídrica (Varela 2007).

**Tabla 6.2** Código, nombre, origen climático y tipo de polinización de las poblaciones puras e híbridas evaluadas en el ensayo.

<b>COD.</b>	<b>POBLACIÓN</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>POLINIZACIÓN</b>
GC	Galicia-Costa	Atlántico	Abierta
GC×C	Galicia-Costa × Córcega	Atlántico × Mediterráneo	Cruzada
GC×L	Galicia-Costa × Landas	Atlántico × Atlántico	Cruzada
GC×IN1	Galicia-Costa × Carballiño	Atlántico × Atlántico	Cruzada
SB	Montaña de Soria-Burgos	Mediterráneo	Abierta
SB×GC	Soria-Burgos × Galicia-Costa	Mediterráneo × Atlántico	Cruzada
SB×IN1	Soria-Burgos × Carballiño	Mediterráneo × Atlántico	Cruzada
SB×IN2	Soria-Burgos × Guitiriz	Mediterráneo × Atlántico	Cruzada
SB×IN3	Soria-Burgos × Sober	Mediterráneo × Atlántico	Cruzada
IN1	Galicia-Interior Carballiño	Atlántico	Abierta
IN2	Galicia-Interior Guitiriz	Atlántico	Abierta
IN3	Galicia-Interior Sober	Atlántico	Abierta

### 6.2.2. Condiciones experimentales y mediciones

El ensayo se llevó a cabo en un invernadero del CIF de Lourizán (Pontevedra; 42° 24' N, 8° 40' O; 50 m s.n.m.) bajo luz natural y temperatura semicontrolada (12-30 ° C). Se utilizaron macetas de 650 cm<sup>3</sup> dispuestas sobre bandejas de 6×3 macetas, colocando una plantilla de tela permeable en el fondo de cada una para evitar la pérdida de sustrato y la salida de las raíces. Cada maceta se rellenó con 840 g de arena de río lavada y cribada para asegurar su homogeneidad, y se añadió 1 g por maceta de fertilizante de liberación gradual Multicote 8 (15-7-15 + 2MgO + micronutrientes, Haifa®) para asegurar la disponibilidad de nutrientes durante todo el ensayo.

En el ensayo se incluyeron tres de los cinco parentales seleccionados en cada procedencia materna, de tal manera que éstos fueron comunes para aquellas poblaciones que compartían madre (GC, GC×IN1, GC×C y GC×L para las procedentes de Sergude; SB, SB×GC, SB×IN1, SB×IN2 y SB×IN3 para las procedentes de Valsaín). Para minimizar el efecto de la posible heterogeneidad ambiental dentro del invernadero, las plantas se dispusieron siguiendo un diseño 'split-plot' con siete bloques, donde los dos tratamientos de disponibilidad hídrica actuaron como factor principal ('whole plots') y las 12 poblaciones como factor secundario ('split-plots'). En cuatro de los bloques, cada población dentro de la combinación bloque × tratamiento estuvo representada por tres familias en fila, procedentes de cada uno de los parentales seleccionados, mientras que en los restantes tres bloques, y debido a la falta de material, cada población estuvo representada solamente por dos familias. De esta manera el ensayo incluyó 36 plantas por población (2 tratamientos × (3×4 + 2×3) = 36) y 432 plantas en total.

Tras el repicado de las estaquillas y su trasplante a las macetas definitivas las plantas se regaron periódicamente (cada 2-3 días) hasta capacidad de campo. Cinco meses después del repicado (10-agosto-2007), cuando las plantas tenían una altura media de 15,49 ± 3,90 cm y un diámetro en el cuello de la raíz de 3,71 ± 0,63 mm, comenzó la aplicación de los dos tratamientos de disponibilidad hídrica durante un periodo de seis meses (180 días). La mitad de las plantas fueron sometidas a un régimen hídrico sin estrés, mientras que la otra mitad sufrieron un déficit hídrico que se intensificó con el tiempo para permitir que las plantas desarrollaran respuestas adaptativas de manera gradual. Ante la dificultad de mantener una relación constante entre el contenido volumétrico de agua en el sustrato y un nivel fijo de estrés a lo largo del experimento, los dos regímenes de riego se establecieron en base al nivel de saturación del sustrato. En el tratamiento sin estrés el sustrato se mantuvo a un 80-90%

del nivel medio de saturación durante todo el ensayo, mientras que en el tratamiento de estrés se mantuvo a un 30-40% del nivel medio de saturación durante los dos primeros meses y luego se redujo a un 20-30% durante los cuatro últimos. La necesidad de riego y la cantidad de agua aportada, idéntica para todas las plantas del mismo tratamiento, se determinó diariamente mediante el pesado de una bandeja por cada combinación bloque  $\times$  tratamiento, pesando las macetas de cada bandeja de manera conjunta para obtener un promedio por maceta. Cuando el contenido de agua descendió por debajo del umbral mínimo, se realizaron riegos manuales con una probeta (con una precisión de 1 ml) hasta alcanzar el nivel de saturación correspondiente a cada tratamiento. Para aumentar la precisión en la estimación del contenido del agua en el sustrato se consideró además el incremento del peso de cada planta a lo largo del periodo de ensayo. Para ello se modelizó el peso verde total frente a la longitud del tallo y el diámetro en el cuello de la raíz en un ensayo previo con una muestra de plantas de todas las poblaciones y tamaños.

Seis meses después del inicio de la aplicación de los tratamientos (5-febrero-2008) se contabilizó la supervivencia a través de una variable binaria (SUR) y se evaluó la altura total de todas las plantas vivas. A partir de la altura al inicio de los tratamientos y la altura final se calculó el crecimiento en altura durante el ensayo ( $\Delta H$ , cm). A continuación se cosecharon las 324 plantas supervivientes, se lavaron las raíces para separarlas del sustrato y se secaron en una estufa a 80 °C durante 48 h. Atendiendo a las distintas características funcionales de los tejidos se dividió cada planta en cinco compartimentos (Körner 1994) que se pesaron separadamente ( $\pm 0,001$  g) obteniendo la biomasa seca de tallos y ramas (SDW, g), de raíces gruesas ( $>2$  mm de diámetro, CRDW, g), de raíces finas ( $<2$  mm de diámetro, FRDW, g), de acículas adultas (ALDW, g) y de acículas juveniles (JLDW, g). A partir de estas biomásas se derivaron la biomasa seca total (TDW, g), el ratio entre la biomasa seca de las acículas adultas y las juveniles ( $AJR = ALDW/JLDW$ ,  $g\ g^{-1}$ ) y las fracciones de la biomasa total que supone cada uno de los compartimentos [tallos y ramas ( $SMF = SDW/TDW$ ,  $g\ g^{-1}$ ), raíces gruesas ( $CRMF = CRDW/TDW$ ,  $g\ g^{-1}$ ), raíces finas ( $FRMF = FRDW/TDW$ ,  $g\ g^{-1}$ ), acículas adultas ( $ALMF = ALDW/TDW$ ,  $g\ g^{-1}$ ) y acículas juveniles ( $JLMF = JLDW/TDW$ ,  $g\ g^{-1}$ )]. El uso de las fracciones de biomasa en lugar de las biomásas secas u otros ratios entre partes (i.e. ratio entre la raíz y la parte aérea) tiene las ventajas de una mayor independencia con respecto al tamaño total de la planta (ver siguiente sección) y de formar parte integral del concepto de análisis del crecimiento y economía del carbono (Poorter et al. 2012).

### 6.2.3. Análisis estadísticos

Para la caracterización de las repuestas plásticas adaptativas se seleccionaron dos variables vinculadas al crecimiento ( $\Delta H$  y TDW), cinco variables relacionadas con la distribución de biomásas (SMF, CRMF, FRMF, ALMF, JLMF) y una relacionada con el estado ontogénico (AJR). Para todas estas variables se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en base al siguiente modelo mixto que tuvo en cuenta el diseño experimental ‘split-plot’ para considerar los términos adecuados del error:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + T \times P_{ij} + B_k + T \times B_{ik} + \varepsilon_{ijkl} \quad [6.1]$$

donde  $Y_{ijkl}$  es el valor de la variable dependiente,  $\mu$  es la media global,  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento de riego  $i$ ,  $P_j$  es el efecto fijo de la población  $j$ ,  $T \times P_{ij}$  es la interacción fija entre el tratamiento  $i$  y la población  $j$ ,  $B_k$  es el efecto aleatorio del bloque  $k$ ,  $T \times B_{ik}$  es la interacción aleatoria entre el tratamiento  $i$  y el bloque  $k$  y  $\varepsilon_{ijkl}$  es el término aleatorio del error. El modelo mixto se ajustó usando el procedimiento MIXED de SAS (Littell et al. 2006) y los componentes de la varianza se estimaron por el método REML (máxima verosimilitud restringida). El efecto significativo del tratamiento indicaría la existencia de plasticidad fenotípica frente a la sequía para la variable analizada, y el efecto significativo de la interacción tratamiento  $\times$  población indicaría variación en plasticidad entre las poblaciones consideradas (Schlichting 1986).

Cuando fue necesario se utilizaron las transformaciones  $\log_{10}(x)$  o  $\sqrt{x}$  de las variables dependientes para cumplir con las presunciones del modelo. Se calcularon las medias ajustadas de los tratamientos, poblaciones y combinaciones tratamiento  $\times$  población mediante la sentencia LSMEANS del procedimiento MIXED de SAS y se estimaron las correlaciones de Pearson entre las medias poblacionales utilizando el procedimiento CORR de SAS (SAS-Institute 1999).

La variable binaria de supervivencia (SUR) se analizó ajustando un modelo mixto generalizado con los mismos términos que el modelo [6.1] utilizando el procedimiento GLIMMIX de SAS, con distribución de errores tipo BINOMIAL y una función de vínculo canónica LOGIT (Littell et al. 2006). Se calcularon además las medias ajustadas de supervivencia para los tratamientos y las poblaciones con la sentencia LSMEANS del procedimiento GLIMMIX.

Los patrones de distribución de recursos pueden cambiar con el tamaño de la planta durante su crecimiento (Pearsall 1927) y algunos autores han argumentado que ciertos cambios observados en la distribución de biomasa tras la aplicación de un determinado tratamiento pueden ser en realidad consecuencia indirecta de cambios en el tamaño de las plantas más que una respuesta directa a los propios tratamientos (Weiner y Thomas 1992; Coleman et al. 1994). Se sabe por ejemplo, que cuanto mayor es el tamaño de la planta, mayor es la inversión en tejidos estructurales con respecto a los fotosintéticos (Niklas 1994), especialmente en especies leñosas (Poorter et al. 2012). Ya que es esperable una diferencia sustancial en el crecimiento de las plantas en función de la disponibilidad hídrica, es conveniente aplicar un análisis alométrico para estudiar cómo influye el tamaño en los patrones de distribución de biomasa entre plantas de diferentes tratamientos (Coleman et al. 1994; Poorter y Nagel 2000). Para analizar el efecto del tamaño en las variables de distribución de biomasa se ajustaron modelos de regresión lineal entre las diferentes fracciones de biomasa y el logaritmo decimal de la biomasa seca total para el conjunto de los tratamientos (Poorter y Nagel 2000). Además, para comparar las trayectorias alométricas de los dos tratamientos, se ajustaron modelos de regresión lineal entre el logaritmo decimal del peso seco de cada compartimento y el logaritmo decimal del peso seco del resto de la planta (Müller et al. 2000). Para estudiar las respuestas plásticas a la disponibilidad de agua en el reparto de biomasa, se analizaron las diferencias entre las pendientes y los interceptos de las regresiones de cada tratamiento mediante un análisis de covarianza (ANCOVA), utilizando para ello el procedimiento MIXED de SAS (Littell et al. 2006). Cuando en el análisis alométrico la relación lineal es alta y las regresiones de los dos tratamientos se solapan entre sí, se detectarán diferencias entre pendientes y/o interceptos únicamente si el tratamiento fue el responsable de los cambios en la distribución de biomasa. Las diferencias entre sus pendientes indican variación en la forma en que el tamaño relativo de cada compartimento cambia con el tamaño total de la planta, mientras que las diferencias entre sus interceptos indican variación en el tamaño proporcional del compartimento independientemente del tamaño total (Schlichting y Pigliucci 1998).

A su vez, para estudiar el comportamiento de las poblaciones frente a la disponibilidad de agua se representó gráficamente la posición de cada una en el espacio definido por su media fenotípica en el tratamiento de déficit hídrico (eje  $x$ ) y en el tratamiento sin estrés (eje  $y$ ) (gráfico ambiente  $\times$  ambiente; Pigliucci y Schlichting 1996). Cuando los dos ejes se representan en la misma escala, este gráfico demuestra

interesantes propiedades desde el punto de vista biológico. La diagonal principal representa la ausencia de plasticidad entre tratamientos, y la magnitud de la plasticidad viene definida por la pendiente del ángulo formado por el *eje x* y la línea que une cada población con el origen, denominado índice angular de cambio fenotípico (APCI, Via 1993). La ventaja de este índice con respecto a los procedimientos habituales basados en la diferencia entre los valores fenotípicos medios en cada ambiente (Scheiner y Lyman 1991) -representados en esta figura ambiente  $\times$  ambiente por las distancias ortogonales hasta la diagonal- es que la pendiente refleja el cambio fenotípico en términos relativos e informa del sentido del cambio (pendiente mayor o menor de 1), aportando un mayor significado biológico.

Con el fin de integrar la información de las distintas variables consideradas se realizó, además, un análisis de componentes principales (PCA) para las variables a las que se aplicó el modelo mixto [6.1]. Este análisis permitió identificar grupos de poblaciones potencialmente homogéneos en cuanto a la distribución de biomasa, crecimiento y estado ontogénico. Para la realización de este análisis se utilizó el procedimiento PRINCOMP de SAS (SAS-Institute 1999).

### 6.3. Resultados

#### 6.3.1. Respuestas plásticas al estrés hídrico

Después de seis meses de aplicación de los tratamientos de riego la altura media fue significativamente diferente entre ambos (sin estrés:  $28,02 \pm 0,90$ ; déficit hídrico:  $21,44 \pm 0,93$ ; media y error estándar, cm). Los porcentajes de supervivencia fueron del 95,4 y 54,6% en el tratamiento sin estrés y en el de déficit hídrico respectivamente. El modelo mixto generalizado para la supervivencia no fue capaz de converger cuando se incluyó el término de la interacción tratamiento  $\times$  población. Eliminando este término del modelo el efecto del tratamiento fue altamente significativo como cabría esperar, mientras que no se detectaron diferencias significativas entre poblaciones (Tabla 6.3). El modelo mixto tampoco detectó diferencias significativas entre poblaciones cuando se consideraron únicamente las plantas sometidas a estrés hídrico (datos no mostrados). A pesar de este resultado, los porcentajes de supervivencia para cada población en condiciones de déficit hídrico variaron ampliamente, siendo SB $\times$ IN3 y SB las que tuvieron comportamientos extremos con el 76,5 y el 27,8% de supervivencia respectivamente.

El análisis de varianza para las variables de crecimiento ( $\Delta H$  y TDW) muestra que el efecto del tratamiento de riego absorbió la mayor parte de la variación, y como cabría esperar fueron las plantas no sometidas a estrés las que más crecieron (Tablas 6.3 y 6.4). Sin embargo a nivel poblacional, mientras se detectaron diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) para el crecimiento en altura, el nivel de significación fue menor ( $p < 0.05$ ) para la biomasa seca total (Tabla 6.3). En cuanto a la distribución de biomasa se detectaron diferencias significativas entre tratamientos para tallos y ramas, raíces gruesas y acículas juveniles, y el efecto de la población fue altamente significativo en todas las variables (Tabla 6.3). El efecto de la interacción tratamiento  $\times$  población únicamente fue significativo para el crecimiento en altura (Tabla 6.3).

**Tabla 6.3** Resultados del modelo mixto [6.1] para la supervivencia, el crecimiento y la distribución de biomasa. Se presentan los F-ratios y los niveles de significación<sup>1</sup> de los efectos fijos del modelo (tratamiento de disponibilidad hídrica, población y la interacción entre ambos).

Tipo variable	Variable	Tratamiento (F <sub>1,6</sub> )	Población (F <sub>11,288</sub> )	Tratam. $\times$ Pob. (F <sub>11,288</sub> )
Supervivencia	Muertos/vivos	51,85 ***	1,31 ns <sup>2</sup>	- <sup>3</sup>
Crecimiento	Crecimiento en altura (cm)	108,79 ***	5,66 ***	1,98 *
	Biomasa seca total (g)	54,68 ***	2,09 *	0,78 ns
Distribución de biomasa	Fracción de tallos y ramas	13,58 *	6,14 ***	1,01 ns
	Fracción de raíces gruesas	42,98 ***	2,62 **	1,30 ns
	Fracción de raíces finas	0,32 ns	2,91 **	1,67 ns
	Fracción de acículas adultas	3,05 ns	7,23 ***	0,37 ns
	Fracción de acículas juveniles	25,64 **	5,63 ***	0,57 ns
	Ratio acículas adultas/juveniles	2,57 ns	6,37 ***	0,43 ns

<sup>1</sup> Niveles de significación: \*\*\*=  $P < 0,001$ , \*\*=  $P < 0,01$ , \*=  $P < 0,05$ , ns= no significativo.

<sup>2</sup> F<sub>11,407</sub>

<sup>3</sup> El modelo implementado con el PROC GLIMMIX de SAS no incluye el efecto de la interacción *Tratamiento  $\times$  Población* ya que al incluir éste el modelo no converge.

Estudiando las fracciones de biomasa para las que hubo un efecto significativo del tratamiento, se observó que las plantas sin estrés desarrollaron el doble de fracción de raíces gruesas y ligeramente más fracción de tallos y ramas que las plantas sometidas a estrés, mientras que presentaron una menor fracción de acículas juveniles (Tabla 6.4).

**Tabla 6.4** Medias (*Least Square means*  $\pm$  error estándar) del conjunto de las poblaciones en los dos tratamientos de disponibilidad hídrica y niveles de significación del efecto del tratamiento para las variables de supervivencia, crecimiento y distribución de biomásas.

Tipo variable	Variable	No estresado	Estresado	Efecto del tratamiento
Supervivencia	Muertos/Vivos	0,96 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,10	***
Crecimiento	Crecimiento en altura (cm)	12,40 $\pm$ 0,80	6,20 $\pm$ 0,80	***
	Biomasa seca total (g)	6,80 $\pm$ 0,20	4,90 $\pm$ 0,20	***
Distribución de biomásas	Fracción de tallos y ramas	0,16 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	*
	Fracción de raíces gruesas	0,11 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	***
	Fracción de raíces finas	0,26 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01	ns
	Fracción de acículas adultas	0,24 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	ns
	Fracción de acículas juveniles	0,19 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	**
	Ratio acículas adultas/juveniles	1,30 $\pm$ 0,10	1,10 $\pm$ 0,10	ns

Niveles de significación: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ; ns =  $p > 0,05$ .

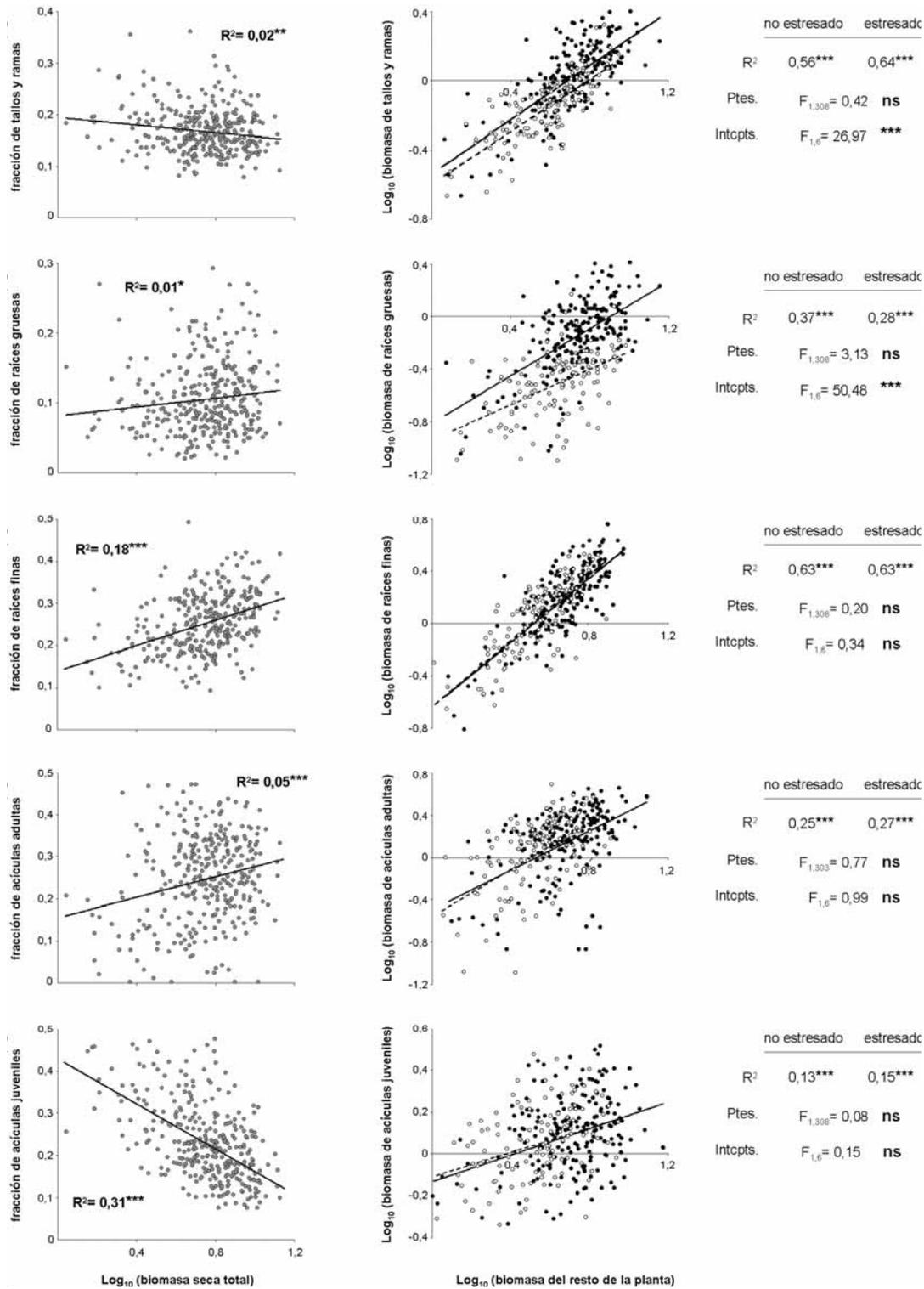
### 6.3.2. Trayectorias alométricas

En base a las medias poblacionales se observaron correlaciones significativas y positivas entre el crecimiento en altura y las fracciones de tallos y acículas juveniles, mientras que éstas fueron negativas con respecto a la fracción de acículas adultas. La fracción de tallos se correlacionó positivamente con la fracción de raíces gruesas y de acículas juveniles, y negativamente con la fracción de acículas adultas. Ambas fracciones de acículas estuvieron negativamente correlacionadas entre sí (Tabla 6.5).

**Tabla 6.5** Coeficientes de correlación de Pearson entre variables en base a las medias poblacionales en los dos tratamientos de disponibilidad hídrica ( $n = 12$ ).

	TDW	SMF	CRMF	FRMF	ALMF	JLMF
Crecimiento en altura ( $\Delta H$ )	0,26 <sup>ns</sup>	0,76**	0,27 <sup>ns</sup>	-0,44 <sup>ns</sup>	-0,78**	0,86***
Biomasa seca total (TDW)		0,12 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	0,41 <sup>ns</sup>	-0,32 <sup>ns</sup>	0,15 <sup>ns</sup>
Fracción de tallos y ramas (SMF)			0,73**	-0,53 <sup>ns</sup>	-0,88***	0,78**
Fracción de raíces gruesas (CRMF)				-0,27 <sup>ns</sup>	-0,54 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>
Fracción de raíces finas (FRMF)					0,27 <sup>ns</sup>	-0,55 <sup>ns</sup>
Fracción de acículas adultas (ALMF)						-0,88***
Fracción de acículas juveniles (JLMF)						-

Niveles de significación: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ; ns =  $p > 0,05$ .



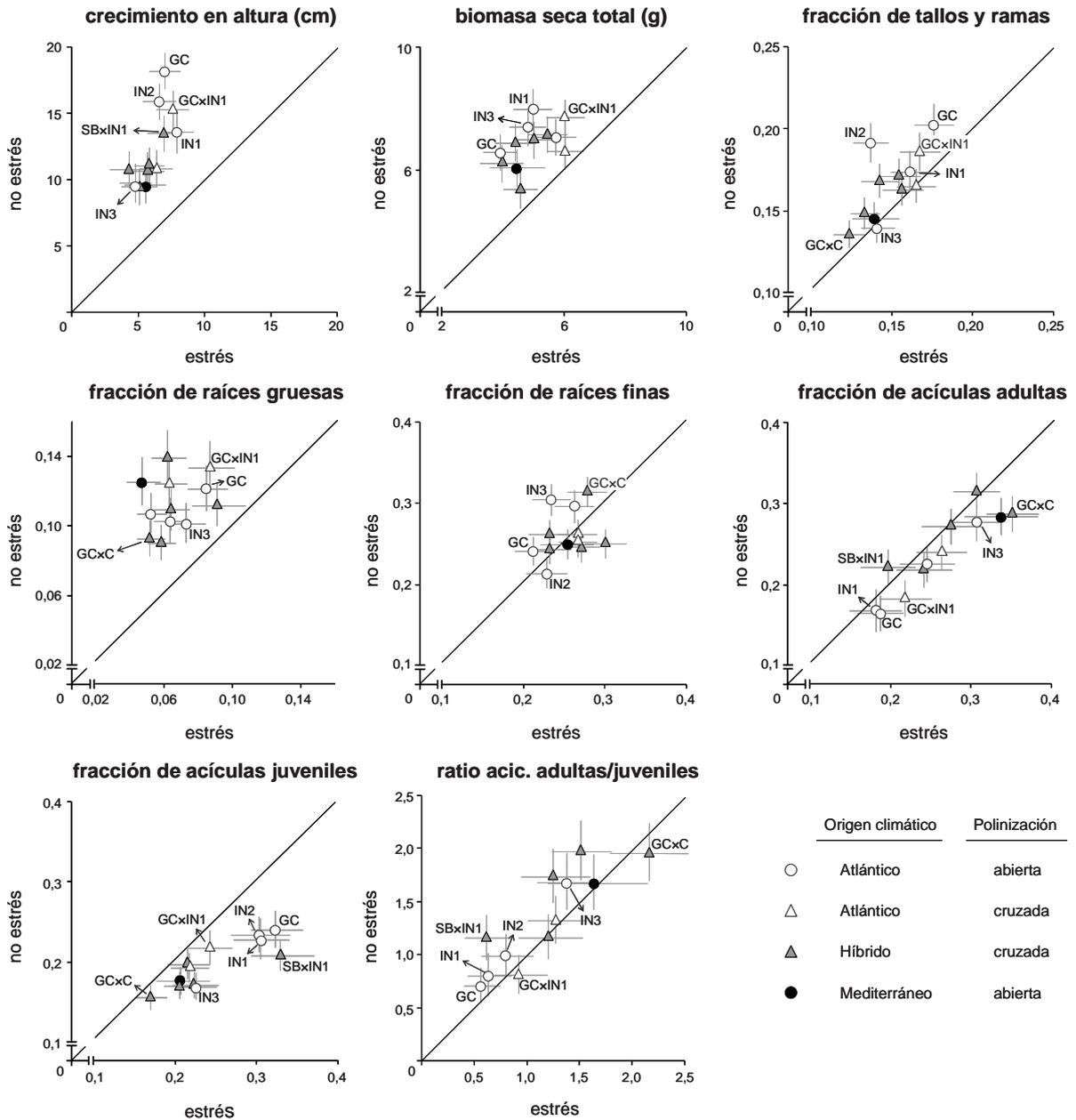
**Fig. 6.1** Regresiones alométricas ( $R^2$ -ajustado y nivel de significación) de cada fracción de biomasa frente a la biomasa seca total en escala logarítmica para el global de los dos tratamientos (●) (figuras de la izquierda) [ $n= 324$ ]. Trayectorias alométricas para cada tratamiento (no estresado: ● y línea continua [ $n= 206$ ]; estresado: ○ y línea punteada [ $n= 118$ ]) de la biomasa seca de cada compartimento frente a la biomasa seca del resto de la planta, ambas en escala logarítmica (figuras de la derecha). En las tablas se muestra el  $R^2$ -ajustado y el F-ratio y nivel de significación asociado de las regresiones alométricas de estas últimas figuras y los resultados del análisis de covarianza analizando diferencias entre las pendientes e interceptos de cada tratamiento (Poorter y Nagel 2000). Niveles de significación: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ; ns =  $p > 0,05$ .

Los coeficientes de regresión lineal entre las fracciones de biomasa y la biomasa seca total fueron generalmente muy bajos, a excepción de las acículas juveniles, con una tendencia moderada a disminuir la fracción de acículas juveniles a medida que las plantas tuvieron más biomasa (Figura 6.1, figuras de la izquierda).

Las trayectorias alométricas entre la biomasa de cada compartimento y la del resto de la planta tuvieron un elevado grado de solapamiento entre tratamientos y en general una alta relación lineal para cada uno de ellos (Figura 6.1, figuras de la derecha), indicando su adecuación para hacer comparaciones entre tratamientos. El análisis de covarianza no detectó diferencias significativas entre las pendientes de las trayectorias alométricas de cada tratamiento para ninguno de los compartimentos, mientras que sí detectó diferencias significativas entre los interceptos para los tallos y las raíces gruesas (Figura 6.1, tablas), sugiriendo respuestas plásticas directas al estrés hídrico en la adjudicación de recursos a estos compartimentos.

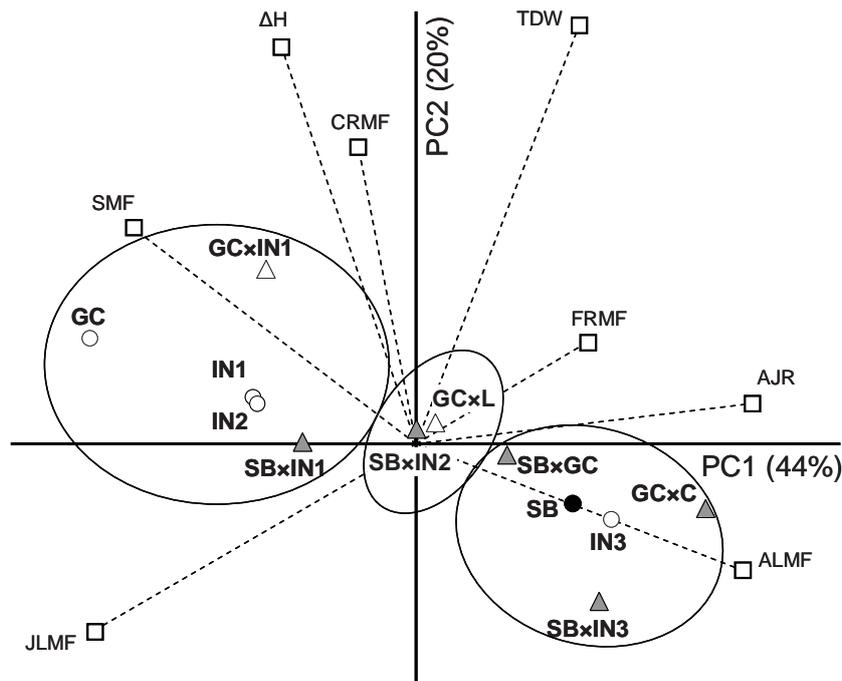
### **6.3.3. Variación entre poblaciones**

Las gráficas ambiente  $\times$  ambiente definen un grupo formado por las poblaciones GC, GC $\times$ IN1, IN1, IN2 y SB $\times$ IN1, que se caracterizó por un mayor crecimiento en altura y una mayor fracción de tallos y de acículas juveniles que el resto de poblaciones en ambos tratamientos, mientras que la fracción de acículas adultas y raíces finas fue menor (Figura 6.2). Este conjunto de poblaciones mostró además un cambio fenotípico angular (APCI) especialmente alto para  $\Delta H$  y JLMF. El factor común de las poblaciones pertenecientes a este grupo es su procedencia Atlántica, a excepción de SB $\times$ IN1 que posee un parental con moderado carácter Mediterráneo (Tabla 6.1). El resto de poblaciones que tuvieron por lo menos un parental de origen Mediterráneo (GC $\times$ C, SB, SB $\times$ GC, SB $\times$ IN2 y SB $\times$ IN3), mostraron un comportamiento completamente opuesto con una mayor fracción de acículas adultas y menor de acículas juveniles y de tallos y ramas. Estas poblaciones de carácter Mediterráneo tuvieron además una mayor fracción de raíces finas y menor fracción de raíces gruesas que las del grupo Atlántico, pero este comportamiento de las raíces sólo fue evidente bajo el tratamiento de estrés hídrico, mostrando los mayores índices de plasticidad fenotípica para CRDW. Las poblaciones IN3 y GC $\times$ L tuvieron un comportamiento anómalo teniendo en cuenta su origen Atlántico. La población IN3 se comportó de manera análoga al grupo de poblaciones con algún parental Mediterráneo, y la población GC $\times$ L se situó en una posición intermedia entre los dos principales grupos (Figura 6.2).



**Fig. 6.2** Representación de la posición de cada población en el espacio definido por sus medias fenotípicas bajo los tratamientos de estrés y no estrés (gráfico ambiente  $\times$  ambiente). La línea diagonal determina el comportamiento estable o sin plasticidad fenotípica. Las barras representan los errores estándar. En la leyenda se muestra el símbolo utilizado para cada población en función de su origen climático y el tipo de polinización de la que se obtuvo la semilla. Se muestran los códigos (ver Tabla 6.2) de aquellas poblaciones con un comportamiento destacable.

Las poblaciones híbridas mostraron siempre un comportamiento más parecido a uno de los parentales que no un comportamiento intermedio. Las poblaciones híbridas con algún parental de origen Mediterráneo se comportaron de una manera parecida a éste, mientras que los híbridos de comportamiento Atlántico siempre derivan de cruces entre parentales con este origen, a excepción de SB $\times$ IN1 (Figura 6.2).



**Fig. 6.3** Representación gráfica de las variables (cuadrados blancos) y las poblaciones ensayadas (mismos códigos que en la Tabla 6.2 y misma simbología que en la Figura 6.2) sobre el plano de los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2, se muestra además el porcentaje de varianza explicada por cada uno).  $\Delta H$ : crecimiento en altura durante el ensayo (cm),  $TDW$ : biomasa seca total (g),  $CRMF$ : fracción de biomasa de raíces gruesas,  $FRMF$ : fracción de biomasa de raíces finas,  $SMF$ : fracción de biomasa de tallos y ramas,  $ALMF$ : fracción de biomasa de acículas adultas,  $JLMF$ : fracción de biomasa de acículas juveniles,  $AJR$ : ratio de la biomasa de acículas adultas entre la biomasa de las juveniles. Las elipses muestran los tres grupos que pueden ser definidos en función de la posición de las poblaciones en el plano.

Los dos primeros componentes principales explicaron el 64% de la varianza de los datos en el conjunto de los tratamientos. El primer componente principal (PC1) explicó el 44% de la varianza total y estuvo positivamente correlacionado con la fracción de acículas adultas y el ratio entre adultas y juveniles, y negativamente correlacionado con la fracción de juveniles y con la biomasa adjudicada al tallo. El segundo componente (PC2) explicó el 20% de la varianza total y se correlacionó positivamente con el crecimiento de la planta ( $\Delta H$  y  $TDW$ ). PC1 y PC2 organizaron las poblaciones en tres grupos principales (Figura 6.3). Nuevamente un grupo estuvo formado por las poblaciones de carácter Atlántico GC, GCxIN1, IN1, IN2 y SBxIN1 y se caracterizó por un mayor crecimiento en altura y una mayor fracción de tallos y acículas juveniles. Otro grupo de carácter Mediterráneo formado por SB, SBxIN3, SBxGC, GCxC y la Atlántica IN3 vino definido por el patrón contrario: mayor fracción de acículas adultas, mayor ratio entre acículas adultas y juveniles y un menor crecimiento en altura. SBxIN2 y GCxL constituyen un tercer grupo con un

comportamiento intermedio entre los dos anteriores. Las 12 poblaciones aparecen claramente alineadas siguiendo un gradiente de sentido opuesto para la fracción de tallos y la fracción de acículas adultas, de tal manera que el grupo de poblaciones Atlánticas mostró elevadas fracciones de tallos y bajas de acículas adultas, justo el patrón contrario que el grupo de carácter Mediterráneo.

## 6.4. Discusión

### 6.4.1. Respuestas plásticas al estrés hídrico

En el presente estudio se sometieron a dos niveles de disponibilidad de agua durante seis meses doce poblaciones de *P. pinaster*, siete híbridas interprocedencia y cinco de polinización abierta, seleccionadas en un gradiente de Mediterraneidad moderada. Las plantas utilizadas fueron juveniles obtenidos por estaquillado, por lo que su estado ontogénico no corresponde al de plantas recién germinadas, mostrando caracteres de madurez como la presencia de abundantes acículas adultas (Chambel et al. 2007). El análisis de la plasticidad fenotípica de las variables de crecimiento y de distribución de biomasa nos permitió distinguir ciertos patrones adaptativos frente al déficit hídrico en plantas juveniles de la especie. Algunos de estos patrones fueron comunes y otros divergentes entre poblaciones.

La tasa de mortalidad en el tratamiento de estrés se aproximó al 50% al final del ensayo, indicando que la intensidad de la sequía en el sustrato arenoso fue la adecuada para estimar la eficacia de las respuestas plásticas al estrés hídrico. El tratamiento de estrés disminuyó el crecimiento de las plantas tal como se esperaba (Nguyen-Queyrens et al. 2002), con una reducción del 50% para el crecimiento en altura y del 28% para la biomasa total con respecto al tratamiento control. Sin embargo, a pesar de la gran variación existente entre los porcentajes de supervivencia de las poblaciones en el tratamiento de estrés, con una diferencia superior al 50% entre la de mayor y la de menor supervivencia, el modelo mixto generalizado fue incapaz de detectar diferencias significativas entre ellas. Las poblaciones SB×IN3 y GC mostraron los índices de supervivencia más elevados, un 20% superiores a la media poblacional, y SB mostró la menor supervivencia que fue un 30% inferior a la media, de tal manera que no mostraron mayor supervivencia aquellas poblaciones procedentes de las regiones más secas. Estos resultados hay que tomarlos sin embargo con cautela debido a los elevados errores estándar asociados a la estimación de las medias poblacionales ajustadas,

sugiriendo que el tamaño muestral quizás no fue suficiente para analizar este tipo de variable.

Similarmente a lo observado en otros ensayos de estrés hídrico con poblaciones de la especie de orígenes geográficos contrastados (Aranda et al. 2010; Sánchez-Gómez et al. 2010), no se detectaron diferencias genéticas entre poblaciones en la plasticidad fenotípica al estrés hídrico. El efecto de la interacción tratamiento  $\times$  población no fue significativo para las variables de distribución de biomasa y, aunque sí lo fue para el crecimiento, éste se debió a la heterogeneidad de varianzas entre los tratamientos, con una reducción de la variación entre poblaciones en condiciones de estrés hídrico (datos no mostrados). En todos los casos los gráficos ambiente  $\times$  ambiente indican el mismo sentido de cambio fenotípico para todas las poblaciones. Este patrón común a todas las poblaciones en el comportamiento frente a la sequía sugiere una estrategia general y conservada a nivel específico.

La ‘teoría del equilibrio funcional’ (Brouwer 1963; Bloom et al. 1985), concepto también referido en la literatura como ‘hipótesis del crecimiento equilibrado’ (Shipley y Meziane 2002) o ‘teoría del reparto óptimo’ (Gedroc et al. 1996), establece que las plantas distribuyen más recursos a aquellos órganos relacionados con la adquisición del recurso más limitante en el medio, maximizando de este modo la eficacia biológica. En base a esta hipótesis, cuando el recurso limitante es el agua y las plantas sufren estrés hídrico se esperaría una mayor inversión en biomasa de raíces y menor en tejidos fotosintéticos (Ludlow 1989; Joslin et al. 2000; Pinheiro et al. 2005). Sin embargo, nuestros resultados indican un comportamiento contrario, con un aumento de la fracción de biomasa foliar y un descenso en la fracción radical en las plantas sometidas al tratamiento de estrés. También se encontraron resultados contradictorios con la ‘teoría del reparto óptimo’ en otros estudios con juveniles de la especie sometidos a déficit hídrico. Danjon et al. (2009) encontraron que las plantas fueron capaces de sintetizar biomasa aérea incluso con una baja disponibilidad de agua, parando el crecimiento radical e incrementando los tejidos fotosintéticos. Los autores justificaron el incremento de la fracción de acículas como una estrategia para mantener constante la producción de biomasa cuando el suelo estuvo demasiado seco para el crecimiento de las raíces. Sánchez-Gómez et al. (2010) tampoco encontraron un aumento significativo en la inversión en raíces bajo el tratamiento de déficit hídrico mientras que sí detectaron cambios en la distribución aérea de la biomasa. Según la hipótesis de estos autores las plantas mantuvieron invariable la proporción de biomasa invertida en acículas mientras

que acortaron la longitud del entrenudo en respuesta a la sequía, produciendo en consecuencia una mayor inversión relativa en acículas y un descenso en tallos con respecto a aquellas plantas sin limitaciones.

Con una descomposición más detallada del reparto de biomasa entre las diferentes fracciones de la planta, nuestros resultados indican que la fracción de raíces finas, las encargadas de la absorción de agua y nutrientes (Cody 1986), y la fracción de acículas adultas que suponen el tejido fotosintético definitivo, no variaron significativamente entre tratamientos durante el periodo de seis meses que duró el estrés. No existió por tanto plasticidad fenotípica en estas dos fracciones. Este resultado unido a la fuerte estructuración genética para estos caracteres sugiere que los dos tejidos encargados de la captación inmediata de recursos para la planta estuvieron optimizados para cada población. Por otro lado, las restantes fracciones de biomasa sí mostraron plasticidad frente al déficit hídrico, de tal manera que las plantas sometidas a estrés tuvieron menor fracción de tallos y de raíces gruesas y una mayor fracción de acículas juveniles. Mientras que las fracciones de tallos y raíces gruesas no tuvieron relación alguna con el peso total de la planta y mostraron trayectorias alométricas diferentes entre tratamientos, la fracción de acículas juveniles tendió a ser menor en las plantas de mayor tamaño y se detectó una única trayectoria alométrica para esta variable independientemente del tratamiento de estrés. Estos resultados sugieren que el aumento de la fracción de tallos y raíces gruesas ante la disponibilidad de agua se debió a una respuesta activa al tratamiento, mientras que la reducción de la fracción de acículas juveniles fue más bien consecuencia indirecta del aumento de tamaño y el consiguiente avance en el estado de desarrollo producido por el propio tratamiento de riego no limitante. Las plantas sometidas a estrés, más que redirigir sus recursos fotosintéticos hacia las estructuras adecuadas para afrontar la sequía, podrían estar mostrando una estrategia conservadora reduciendo su inversión en crecimiento y retrasando el desarrollo ontogénico, lo que se traduce en una mayor fracción de acículas juveniles. Las plantas que no sufrieron estrés aumentaron su inversión en tejidos estructurales, estimuladas por la disponibilidad de agua, mientras que vieron reducida su fracción de acículas juveniles como consecuencia del mayor crecimiento de la planta. El crecimiento de tallos y ramas constituye un mecanismo fundamental de competencia aérea por la luz, especialmente en especies leñosas propias de las primeras etapas de sucesión ecológica (Shukla y Ramakrishnan 1986), mientras que las raíces gruesas son las principales responsables de la prospección del suelo en busca de agua y nutrientes

(Cody 1986), por lo que el aumento de ambas fracciones supone una inversión por parte de la planta para obtener en el futuro recursos que apoyen su crecimiento. En base a estos resultados, *P. pinaster* parece describir un patrón de respuesta a la disponibilidad de agua común a todas las poblaciones ensayadas, basado en la inversión en tejidos estructurales cuando hubo disponibilidad de agua, que se detuvo cuando los recursos hídricos fueron escasos, reduciendo la captación de carbono y frenando el desarrollo ontogénico como han sugerido otros autores para la misma especie (Sánchez-Gómez et al. 2010). Esta estrategia coincide con la de las especies *evitadoras* de la sequía y que es típica de los pinos Mediterráneos, caracterizada por el cierre estomático antes de que se produzca un descenso acusado en el potencial hídrico de las hojas (Martínez-Ferri et al. 2000). Resultados anteriores con otra especie Mediterránea del género (*P. halepensis*) sugieren la existencia de procesos de regulación estomática isohídrica que producen el cierre estomático y una reducción en la absorción de CO<sub>2</sub> en situaciones de déficit hídrico, pudiendo desembocar en la inanición de la planta cuando la sequía es extrema (Ferrio et al. 2003; Klein et al. 2011). El ratio entre la biomasa de acículas adultas y juveniles, un indicador del grado de madurez de la planta, no demostró sin embargo este retraso ontogénico en las plantas sometidas a estrés hídrico y, aunque se observó una tendencia a tener mayor porcentaje de acículas adultas con respecto a las juveniles ante la abundancia de agua, las diferencias en el ratio AJR no fueron significativas entre tratamientos. Esta variable no demostró por lo tanto la variación ontogénica inducida por el efecto del tratamiento de riego durante los seis meses de ensayo, que pudo deberse a la abundancia de acículas adultas que tuvieron las plantas procedentes de estaquilla ya desde el principio del ensayo.

#### **6.4.2. Variación entre poblaciones**

Por otro lado y a pesar del patrón común descrito, el efecto de la población fue altamente significativo para el crecimiento en altura y la distribución de biomasa en todas las fracciones de la planta, lo que sugiere estructuración genética y existencia de procesos de diferenciación adaptativa en respuesta a las condiciones ambientales de cada población, tal como se ha observado en otros ensayos similares con poblaciones contrastadas de la especie (Aranda et al. 2010; Sánchez-Gómez et al. 2010). Coincidiendo con estos mismos autores, el efecto genético fue más bajo para la biomasa total acumulada que para el reparto en los distintos compartimentos. De estos resultados se deduce que la eficiencia fotosintética varió escasamente entre las poblaciones

ensayadas, al menos durante el periodo del ensayo y con el nivel de estrés aplicado, mientras que el reparto de la biomasa entre las diferentes estructuras de la planta estuvo sometido a fuerte control genético en base a un patrón geográfico con divergencia poblacional. Analizando este patrón geográfico se distinguieron dos grupos principales de poblaciones en base al comportamiento fenotípico medio en cada uno de los ambientes. Uno de los grupos mostró en ambos tratamientos mayor crecimiento en altura y una mayor fracción de tallos y de raíces gruesas, lo que coincide con la estrategia general seguida por la especie cuando hubo disponibilidad de agua. Esta distribución de los recursos se corresponde con aquellas poblaciones de marcado carácter Atlántico, con los dos parentales de este origen, de las que se espera una adaptación a climas con elevada disponibilidad de agua y cortos periodos de déficit hídrico. Este comportamiento sugiere una mayor inversión en estructuras de crecimiento a costa fundamentalmente de una menor fracción de raíces finas, lo que se manifestó en una mayor altura y un mayor índice de plasticidad para este carácter. El otro grupo de comportamiento contrario estuvo formado por las poblaciones de carácter Mediterráneo o, por lo menos, con un parental de este origen. Este grupo mostró menor crecimiento en altura y mayor inversión en raíces finas a costa de tallos y raíces gruesas. Estas poblaciones invirtieron más en los tejidos responsables de la absorción del recurso hídrico existente a expensas de los tejidos destinados al crecimiento en altura y a la prospección de nuevos recursos. Este comportamiento fue especialmente marcado bajo el tratamiento de estrés, lo que sugiere una mayor plasticidad de las poblaciones Mediterráneas en cuanto a su sistema radical frente al déficit hídrico. Procediendo de ambientes más limitantes que las de origen Atlántico en cuanto a la disponibilidad de agua, con menores precipitaciones y episodios de sequía más agudos, estas poblaciones parecen adoptar una estrategia de distribución de recursos más conservadora, limitando de una manera más rápida y eficaz el crecimiento en altura y los tejidos asociados a éste cuando las reservas de agua en el suelo fueron limitadas (Guyon y Kremer 1982; Nguyen y Lamant 1989).

Un resultado también interesante fue la fuerte diferenciación observada entre poblaciones en el ratio entre acículas adultas y juveniles. Las poblaciones Atlánticas tuvieron mayor fracción de acículas juveniles que las de comportamiento más Mediterráneo, y una menor fracción de acículas adultas en ambos tratamientos, exhibiendo así características más juveniles. Las fracciones de acículas adultas y juveniles estuvieron inversamente correlacionadas entre poblaciones, y aquellas

poblaciones con más acículas juveniles y menos adultas fueron, a su vez, las que mayor fracción de tallo y crecimiento en altura mostraron en ambos tratamientos. Diferentes estudios indican que los patrones de desarrollo ontogénico en juveniles de pinos, caracterizados o bien por un cambio heteroblástico temprano o por una prolongada fase juvenil, pueden estar relacionados con las diferentes estrategias evolutivas seguidas por cada especie (Strauss y Ledig 1985; Grotkopp et al. 2002). Se ha demostrado que las acículas juveniles gastan más agua pero son menos costosas de producir que las acículas adultas (Villar y Merino 2001), de tal manera que la prolongación de la fase juvenil sería una estrategia menos costosa pero más arriesgada que una rápida transición hacia formas adultas más tolerantes al estrés (Miller et al. 1995; Darrow et al. 2002). Estos resultados coinciden con los obtenidos para *P. pinaster* en este trabajo, donde las poblaciones de ambientes con menor déficit hídrico invirtieron más en acículas juveniles, menos resistentes a la pérdida de agua pero con menor coste de producción, permitiendo a la planta concentrar su biomasa en las estructuras de crecimiento y prospección de recursos (tallos y raíces gruesas). Este patrón de variación intraespecífico de *P. pinaster* no coincide con el encontrado para *P. canariensis* (Climent et al. 2006) y tampoco con el patrón entre distintas especies de pinos tanto Mediterráneos como Eurosiberianos (Pardos et al. 2009), donde aquellas procedencias o especies de hábitats más secos tendieron a retrasar el cambio heteroblástico y a mantener estadios juveniles más prolongados.

El análisis de componentes principales confirmó el patrón geográfico descrito para el crecimiento y la distribución de los recursos, distinguiendo también entre poblaciones Atlánticas y Mediterráneas a las que añadió un tercer grupo de comportamiento intermedio y al que pertenecieron las poblaciones GC×L y SB×IN2. Sin embargo esta agrupación de las poblaciones con respecto a su origen climático presentó también algunas incongruencias. Las poblaciones GC×L e IN3, ambas de marcado origen Atlántico mostraron, en contra de lo esperado, un comportamiento intermedio en el primer caso y uno claramente Mediterráneo en el segundo. La disparidad de orígenes genéticos, en muchos casos desconocidos, que caracterizan a la región de procedencia Noroeste-Interior y, en concreto, el marcado carácter Mediterráneo en el origen de la población IN3 (Sober, Ourense) podrían justificar este comportamiento. En el caso de la población GC×L parece que el origen Francés de las Landas, el más septentrional de todos los utilizados, aportó al híbrido con el origen de Galicia-Costa un comportamiento de carácter más Mediterráneo. Este resultado está en

consonancia con la resistencia a la sequía mostrada por la procedencia de Landas en ensayos en campo y explicada en términos de adaptación a suelos arenosos con escasa capacidad de retención de agua (Corcuera et al. 2010). El hecho de que el polen de este origen se haya recolectado en una plantación situada en Ciudad Real, bajo fuerte influencia Mediterránea también podría haber afectado al comportamiento del híbrido. Es conocido que el ambiente donde se desarrollan los parentales puede afectar, a través de complejos mecanismos epigenéticos, al fenotipo de la progenie. Son los conocidos como efectos maternos, o plasticidad transgeneracional (Herman y Sultan 2011). Sin embargo, aunque estos efectos pueden ser cuantitativamente importantes en el caso del ambiente materno, no suelen serlo para el ambiente paterno (Etterson y Galloway 2002).

Resultados anteriores con *P. pinaster* apoyan la hipótesis de la existencia de un compromiso (“*trade-off*”) entre la productividad y la tolerancia a la sequía, mostrando una correlación negativa a nivel de procedencia entre vigor y resistencia a este factor (Fernández 1996; Alía et al. 1997; Nguyen-Queyrens et al. 1998). Esto coincide con los resultados encontrados para otras especies del género como *P. halepensis* (Voltas et al. 2008), *P. sylvestris* (Cregg y Zhang 2001) y *P. taeda* (Boltz et al. 1986) donde las poblaciones procedentes de climas más severos, con alta eficiencia en el uso del agua (WUE), presentan menor potencial de crecimiento. En particular, las procedencias de *P. pinaster* adaptadas a la sequía demuestran un menor vigor en condiciones favorables, pero tienen mayor capacidad para sobrevivir a sequías estivales severas, mientras que las de origen Atlántico muestran un mayor crecimiento en altura y diámetro, pero están peor adaptadas a las localidades que presentan un período seco prolongado (Molina 1965; Matziris 1982; Alía et al. 1997; Nguyen-Queyrens et al. 1998). También es característica la elevada plasticidad en el crecimiento de las procedencias Atlánticas, capaces de incrementar notablemente el crecimiento en altura cuando las condiciones ambientales son favorables, mientras que poblaciones adaptadas a sitios secos muestran en general escasas diferencias en crecimiento entre sitios con diferentes niveles de disponibilidad hídrica (Guyon y Kremer 1982; Corcuera et al. 2010). Estos resultados están en consonancia con el patrón geográfico encontrado en el presente capítulo. Las poblaciones de comportamiento Atlántico mostraron un mayor crecimiento en altura y una mayor sensibilidad de éste a la disponibilidad de agua. Por el contrario, los orígenes adaptados a condiciones más secas mostraron estrategias de tolerancia al estrés hídrico priorizando la inversión en raíces. Desde el punto de vista fisiológico, resultados anteriores sugieren que *P. pinaster* tiene una estrategia evitadora, mostrando una

sensibilidad estomática a la disminución en el potencial hídrico más alta que la sensibilidad del ratio de asimilación de CO<sub>2</sub> (Picon et al. 1996). Así, los árboles adaptados a condiciones más secas son menos dependientes del control estomático e invierten más en raíces, mientras que los ecotipos méxicos confían principalmente en el control estomático de las pérdidas de agua para reducir la transpiración, lo que les permite maximizar el crecimiento aéreo en condiciones favorables (Correia et al. 2010). Una alta eficiencia en el uso del agua puede mejorar la productividad y la supervivencia de las plantas en ambientes secos (Jones 1992) pero una estrategia *gastadora* podría ofrecer ventajas adaptativas cuando se tiene en cuenta el efecto de la competencia, especialmente importante en ambientes favorables como los de la área Atlántica (Cohen 1970). La capacidad de consumir grandes cantidades de recursos ha sido interpretada como un síntoma de alta capacidad competitiva (Tilman 1980), y en presencia de competencia por el agua las estrategias de optimización conducirían a mayores tasas iniciales de transpiración agotando así la reserva de agua y evitando que otras plantas la utilicen (Cowan 1982).

#### **6.4.3. Comportamiento de las poblaciones híbridas**

En general, las poblaciones híbridas ensayadas aparecieron en el grupo Mediterráneo cuando por lo menos uno de los parentales tuvo este origen, mientras que solamente estuvieron en el grupo Atlántico aquellas poblaciones con los dos parentales originarios de esta región climática. Este resultado sugiere una dominancia en el comportamiento de tipo Mediterráneo en los híbridos ensayados a excepción de la población SB×IN1, que a pesar de contar con un parental Mediterráneo apareció siempre agrupada con las poblaciones de origen Atlántico. Es también destacable el comportamiento de la población GC×C que mostró el mayor grado de Mediterraneidad, lo que puso de manifiesto la fuerte influencia Mediterránea de la procedencia de Córcega. Estos resultados restan peso a la posible mediación de efectos maternos en el comportamiento del híbrido ya que en ningún caso observamos una tendencia a que el comportamiento del híbrido adquiriera propiedades propias del ambiente materno donde se desarrolló la semilla. En general los híbridos con un parental de origen Mediterráneo mostraron un comportamiento afín a este origen independientemente del ambiente del parental materno donde se generó el híbrido.

Ninguno de los híbridos mostró un crecimiento en altura superior al de la población de mejora de Galicia-Costa de origen Atlántico, lo que coincide con los

resultados encontrados para híbridos de la especie entre la procedencia Atlántica de Landas y otras de carácter Mediterráneo (Córcega y Marruecos) (Harfouche y Kremer 2000). Estos mismos autores encontraron que ciertos cruces híbridos combinaron caracteres deseables de las procedencias parentales, de tal manera que la procedencia de Landas que tuvo el mayor vigor se pudo beneficiar de una mejora significativa en la forma del fuste y la resistencia a plagas de las procedencias Mediterráneas. En nuestro caso únicamente la población SB×IN1 tuvo un crecimiento en altura adecuado mientras que mantuvo un patrón de distribución de biomasa más adaptado a las condiciones de déficit hídrico, lo que podría indicar su adecuación para su uso en la zona de transición interior de Galicia. Además la población GC×IN1 mostró un vigor muy similar a la del programa de mejora de Galicia-Costa mostrando además caracteres ligeramente más Mediterráneos que ésta, pudiendo utilizarse sólo en aquellas áreas menos extremas dentro de la zona de transición.

## 6.5. Conclusiones

Como en anteriores estudios, tanto en campo como bajo condiciones controladas, en este trabajo se ha comprobado la gran variación intraespecífica en las estrategias de *P. pinaster* para hacer frente a la sequía, con una clara diferenciación entre los orígenes Atlántico y Mediterráneo, a pesar de que entre las procedencias estudiadas no se incluyó aquellas de los ambientes más secos dentro del área de distribución natural de la especie. Las poblaciones Atlánticas mostraron mayor crecimiento en altura y una estrategia basada en el crecimiento, especialmente la población del programa de mejora de Galicia-Costa que demostró su mayor nivel de selección con respecto a estos caracteres. Estas poblaciones también mostraron un comportamiento arriesgado frente a las posibles limitaciones hídricas, con una menor inversión en las raíces encargadas de absorber el agua, mayor inversión en acículas juveniles menos resistentes a la pérdida de agua y una limitación menos eficaz del crecimiento cuando existieron restricciones hídricas. Esto sugiere ser cauteloso con el empleo de material de tipo Atlántico de *P. pinaster* en lugares con restricciones en la disponibilidad de agua, más si cabe ante el escenario de cambio climático previsto.

La hibridación entre orígenes con diferente grado de Mediterraneidad ha resultado efectiva en un bajo porcentaje para la obtención de material genético adaptado a zonas de transición climática entre las áreas Atlántica y Mediterránea, ya que en

términos generales los híbridos ensayados, más que mostrar un comportamiento intermedio, se comportaron de manera parecida a los parentales de tipo Mediterráneo. La excepción fueron los híbridos entre las poblaciones de Galicia-Costa y Landas y entre Soria-Burgos y Guitiriz (Lugo) que mostraron comportamientos intermedios. Además, el híbrido entre las poblaciones de Soria-Burgos y Carballiño (Ourense) mostró una elevada tasa de crecimiento, propio de las poblaciones Atlánticas, pero un comportamiento en el reparto de biomasa propio de las poblaciones adaptadas a la sequía, lo que le podría convertir en una hibridación adecuada para su uso en la zona de transición climática interior de Galicia. El híbrido de carácter Atlántico entre las poblaciones de Galicia-Costa y Carballiño (Ourense) también podría ser adecuado, ya que mostró un elevado vigor combinado con características ligeramente más Mediterráneas que la población del programa de mejora, lo que le convierte en una opción más arriesgada que la anterior y poco adecuada para los ambientes más extremos.

Se necesitan futuros estudios sobre el comportamiento del material híbrido en condiciones reales de campo en la zona interior de Galicia para estudiar la adaptación de estas poblaciones a situaciones de estrés hídrico reales, que pueden ser diferentes en cuanto a nivel y duración del estrés con respecto al ensayo bajo condiciones controladas. Los ensayos en campo establecidos con el mismo material híbrido y que cuentan además con representación clonal de los genotipos serán de gran utilidad para este fin. El estudio en condiciones de campo de la relación entre los patrones de crecimiento encontrados en este trabajo y los caracteres asociados al fitness como pueden ser la supervivencia o la capacidad reproductiva, serán de máxima importancia para validar la alternativa de la hibridación y en ese caso seleccionar los híbridos adecuados para la región de Galicia-Interior, que mantengan buenos caracteres de crecimiento pero que aseguren la supervivencia de las masas bajo situaciones de déficit hídrico.

---

## **7. DISCUSIÓN GENERAL**

---

## 7. DISCUSIÓN GENERAL

El Pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) ocupa en el interior de Galicia, una zona de transición entre el típico clima Atlántico de la costa y el más continental y Mediterráneo del interior peninsular, una importante superficie siendo una de las principales especies forestales productivas de la zona. Sin embargo las masas del interior muestran mala calidad y una adaptación deficiente, mermando el rendimiento económico de las plantaciones. Esta situación contrasta con los buenos crecimientos y aceptables formas del fuste de las masas de la zona costera, de clara influencia Atlántica (Álvarez-González et al. 2005). Ante la ausencia de material local de calidad en el interior, la búsqueda de materiales genéticos alternativos con buena adaptación y potencial productivo se ha convertido en un objetivo prioritario. El fin último de esta Tesis fue la evaluación de distintas alternativas para seleccionar material adaptado a las condiciones de la región interior que suponga una mejora con respecto a las masas actuales. Además, teniendo en cuenta que los modelos climáticos locales predicen para Galicia una progresiva evolución hacia condiciones más Mediterráneas (Pérez-Muñuzuri et al. 2009), los resultados de este trabajo son especialmente relevantes para comprender la respuesta esperable del Pino marítimo al cambio climático en Galicia y para seleccionar materiales adecuados a las nuevas condiciones ambientales.

La primera línea de actuación se centró en la búsqueda de orígenes alternativos entre el resto de procedencias españolas, que pudieran tener un buen comportamiento en la región objetivo (Capítulo I). Los resultados obtenidos indicaron que las procedencias de origen con influencia atlántica (Sierra de Gredos y Bajo Tiétar) fueron las de crecimiento más rápido tal y como se ha observado tanto en condiciones meramente Atlánticas (Molina 1965) como en condiciones Mediterráneas méxicas (Alía et al. 2001), aunque las diferencias entre procedencias fueron pequeñas. Sin embargo la calidad del fuste de estas procedencias fue relativamente baja, mientras que otros orígenes con crecimientos aceptables como Sierra de Cuenca y Albarracín mostraron claramente mejores formas, siendo, por tanto, un material recomendable para usar en el área interior de Galicia.

En cualquier caso, cuando se compararon las procedencias con material mejorado de origen Atlántico (Capítulos I y II), este último tendió a mostrar un mayor crecimiento y mejor forma de fuste. Por lo tanto, es preferible el uso de material

mejorado de los programas de mejora de Galicia-Costa (GC) y Australia occidental (WA) aprovechando así la ganancia genética alcanzada en estos programas. En concreto, el comportamiento del material del programa de mejora de WA fue muy bueno, siempre por encima de la media global en cada sitio, especialmente en los sitios más secos. El rendimiento promedio del huerto semillero de segunda generación de este programa (Manjimup, Australia Occidental; Butcher 2007) fue superior al del huerto semillero de Galicia-Costa. Debido a que el programa de WA ha seguido progresando durante los últimos años (Butcher 2007), se esperarían incluso mayores ganancias para los nuevos materiales con mayor nivel de selección. Sería por tanto altamente recomendable probar nuevos lotes de semilla de WA y se debería considerar la importación de semilla de este origen para repoblación en el interior de Galicia y/o la inclusión de genotipos específicos seleccionados de WA en la población local de mejora.

Pero para transferir material Atlántico a la zona interior, de marcada influencia Mediterránea, es necesario profundizar en el patrón y las causas de la interacción  $G \times E$  de este material, lo que constituyó la segunda aproximación de esta Tesis (Capítulos II y III). Los resultados obtenidos sugieren una elevada importancia de la interacción  $G \times E$  para la población de mejora de Galicia-Costa en el conjunto del territorio, lo que podría parecer sorprendente dado el escaso tamaño del área de estudio y que la población estudiada fue seleccionada dentro de una única procedencia en base a los mismos caracteres fenotípicos, conformando una subpoblación previsiblemente más homogénea en su comportamiento adaptativo. Del estudio pormenorizado de los patrones de interacción  $G \times E$  se concluye que la regionalización tradicional para *P. pinaster* en Galicia en cuanto al empleo y mejora del material forestal de reproducción es inconsistente, y no existen suficientes evidencias que justifiquen la subdivisión del territorio en dos áreas de mejora independientes, Galicia-Costa y Galicia-Interior. Esta división únicamente se podría justificar si la relevancia de la interacción  $G \times E$  fuera mucho más pequeña dentro de áreas que entre ellas, pero éste no es el caso. El análisis de distintas hipótesis sobre las causas de la interacción basadas en métodos de máxima verosimilitud reveló que, aunque existen interacciones con cambio de ranking a nivel global, éstas son tan importantes dentro de áreas como entre ellas. Además, las correlaciones genéticas entre sitios fueron similares tanto para los pares de sitios de la misma área como de áreas diferentes, y el patrón de las interacciones con cambios de

ranking para el crecimiento en altura pareció ser semejante entre todos los posibles pares de sitios, con independencia de que los sitios pertenecieran a la misma o a diferentes áreas de mejora. Aunque indudablemente es necesaria una estrategia para mitigar el efecto de las interacciones con cambios de ranking, los resultados sugieren que ambas zonas se podrían fusionar en una única área de mejora.

Una manera de minimizar el impacto de la interacción G×E y sus consecuencias es agrupar los sitios de ensayo en macroambientes dentro de los cuales el ranking de los genotipos sea similar (Zobel y Talbert 1988), lo que constituyó una tercera línea de trabajo en la que se evaluó la posibilidad de regionalizar Galicia en áreas de comportamiento fenotípico estable (Capítulo III). Utilizando distintas aproximaciones estadísticas, los resultados indicaron que las agrupaciones óptimas de ambientes que minimicen el efecto de la interacción no se corresponden geográfica ni ambientalmente con una compartimentación lógica del territorio, y no parece viable subdividir el territorio en zonas de mejora y uso. Esta conclusión cobra todavía más sentido cuando se considera el aumento de los costes asociados a una segregación en distintas áreas de mejora y uso. El ritmo de plantación de *P. pinaster* en Galicia, que asciende a poco más de 3.000 ha anuales en los mejores años (Álvarez et al. 2005), no justifica la subdivisión.

En cualquier caso, sí hubo cierta tendencia a la agrupación de los sitios costeros y los interiores entre sí, pero no fue posible establecer una línea divisoria específica entre ambas. En aquellos sitios de ensayo situados en la parte central de Galicia, donde las condiciones climáticas no alcanzan a ser extremas, el efecto de la interacción sobre los genotipos es confuso y los sitios pueden aparecer agrupados indistintamente con los de la costa o del interior. Esto nos lleva a pensar que más que un límite, existe un gradiente difuso entre las áreas costeras de marcado clima Atlántico, que se va endureciendo de una manera muy irregular hacia las zonas interiores con un clima más extremo en cuanto a precipitaciones y temperatura.

Al profundizar en el estudio de los factores ambientales responsables de la interacción, el régimen térmico, especialmente el régimen de frío, fue el que mejor explicó el patrón de la interacción G×E encontrado (Capítulo III). Las variaciones entre sitios en el régimen térmico generaron la mayor respuesta fenotípica, lo que implica un mayor peso de esta variable en los comportamientos familiares relativos. Por el contrario el régimen de precipitaciones tuvo, en contra de lo que cabría esperar, menor

poder explicativo. Sin embargo, el patrón de la interacción G×E de las procedencias Nemoromediterráneas ensayadas (Capítulo I) dependió principalmente de la sequía estival, lo que sugiere que éste es uno de los factores más importantes como impulsor de la diferenciación entre procedencias de *P. pinaster* (Danjon 1994). A nivel intrapoblacional, sin embargo, la variación genética en la plasticidad a la sequía es menor, y es el régimen térmico el que está condicionando las respuestas fenotípicas a la variación ambiental.

Ante la recomendación de no regionalizar Galicia, la eliminación de las familias más inestables supone una interesante alternativa para reducir los efectos negativos de la interacción G×E. La selección en base a parámetros de estabilidad en ambientes contrastados, es además una elección segura frente a un escenario de cambio global incierto, situación en la que una selección de genotipos de adaptación específica podría conducir a problemas de adaptabilidad en el futuro (Ledig y Kitzmiller 1992). El estudio de la variabilidad en la estabilidad genotípica del material de mejora de Galicia-Costa se realizó en el Capítulo III. Coincidiendo con estudios previos (Zas et al. 2004b), sólo un pequeño número de familias especialmente interactivas fueron las principales responsables del efecto de la interacción. En nuestro caso, la eliminación del 70% de las familias anula completamente el efecto de la interacción, si bien con la eliminación de entre un tercio y la mitad de las familias más inestables se minimiza la interacción repetible con cambio de ranking. Este umbral parece, por tanto, el adecuado para seleccionar una segunda generación de mejora lo suficientemente estable como para ser utilizada en cualquier parte de Galicia con la garantía de un crecimiento adecuado. Además la ausencia de correlación entre la estabilidad y el crecimiento medio facilitaría la inclusión de la estabilidad como criterio de selección.

En la última parte de la Tesis buscamos profundizar más en los mecanismos de adaptación a los principales factores ambientales que diferencian la zona interior y la costera: el frío y la sequía. Lamentablemente el ensayo en condiciones controladas de frío se vio frustrado por problemas operativos en las cámaras de cultivo y se perdió el material recogido para tal fin. Sin embargo, el ensayo en condiciones controladas de respuesta a la sequía ofreció resultados interesantes. A partir de este experimento, que constituye el último capítulo de la tesis (Capítulo IV), pudimos valorar no sólo la variación entre poblaciones y la plasticidad fenotípica en caracteres de interés adaptativo, sino también valorar la adecuación de la hibridación como estrategia para

combinar características deseables entre poblaciones de la especie de origen contrastado.

En este ensayo no se detectaron diferencias genéticas entre poblaciones en la plasticidad fenotípica al estrés hídrico, lo que señala la existencia de un patrón altamente conservado en el comportamiento frente a la sequía y sugiere una estrategia general a nivel específico. Todas las poblaciones ensayadas describieron un patrón de desarrollo basado en la inversión en tejidos estructurales cuando hubo disponibilidad de agua, patrón que se detuvo cuando los recursos hídricos fueron escasos, reduciendo la captación de carbono y frenando el desarrollo ontogénico como han sugerido otros autores para la misma especie (Sánchez-Gómez et al. 2010). Ante una situación de estrés hídrico, las plántulas de pino minimizan las pérdidas de agua mediante un fuerte y eficaz control estomático (Ferrio et al. 2003; Klein et al. 2011), lo que se traduce en una reducción del intercambio de gases, y con ello del desarrollo. Así, las plantas sometidas a estrés, más que redirigir sus recursos fotosintéticos hacia las estructuras adecuadas para afrontar la sequía tal como sugiere el marco teórico, podrían estar mostrando una estrategia conservadora reduciendo su inversión en crecimiento. Esta estrategia isohídrica, característica de los pinos mediterráneos (Martínez-Ferri et al. 2000), parece estar muy conservada entre las distintas poblaciones de *P. pinaster*, independientemente de que su origen sea Mediterráneo o Atlántico.

Por otro lado y a pesar del patrón común de respuestas plásticas al estrés hídrico, los resultados sugieren una fuerte estructuración genética en las estrategias basales para hacer frente a la sequía, y la existencia de procesos de diferenciación adaptativa en respuesta a las condiciones ambientales de cada población, tal como se ha observado en otros ensayos similares (Aranda et al. 2010; Sánchez-Gómez et al. 2010). Las poblaciones de marcado carácter Atlántico mostraron una mayor inversión en estructuras de crecimiento a costa fundamentalmente de una menor fracción de raíces finas. Esta es una estrategia que asume mayores riesgos y coincide con la estrategia general seguida por la especie cuando hubo disponibilidad de agua. Sin embargo, las poblaciones de carácter Mediterráneo invirtieron más en los tejidos responsables de la absorción de agua, las raíces finas, a expensas de los tejidos destinados al crecimiento en altura y a la prospección de nuevos recursos, lo que supone una estrategia más conservadora cuando las reservas de agua en el suelo son más limitadas (Guyon y Kremer 1982; Nguyen y Lamant 1989).

En relación a la hibridación como estrategia de mejora, ninguno de los híbridos mostró un crecimiento en altura superior al de la población de mejora de Galicia-Costa de origen Atlántico, y los resultados sugieren una dominancia en el comportamiento de tipo Mediterráneo en los híbridos ensayados. A juzgar por estos resultados y teniendo en cuenta el buen comportamiento de las poblaciones Atlánticas en el interior, no parece tener sentido profundizar más en este tipo de hibridaciones. La propia población de mejora de Galicia-Costa tiene variabilidad suficiente como para seleccionar material de buen comportamiento en la zona interior y no es necesario recurrir a otros orígenes para introducir genes específicos de adaptación a las condiciones de esta zona. Sin embargo, la superioridad de los materiales mejorados Atlánticos en el interior de Galicia podría ser complementada mediante la introducción de genes favorables en cuanto a la rectitud y ramosidad a través de introgresión, tal como se realizó en el programa de mejora francés introduciendo mejoras en la rectitud del fuste mediante hibridación con la procedencia de Córcega (Harfouche y Kremer 2000). Se podría considerar, por lo tanto, la posibilidad de realizar cruces interprocedencia con orígenes como Albarracín (buena rectitud) y Sierra de Segura-Alcaraz (reducido número de verticilos), o con otros orígenes de montaña (e.g. Marruecos, Córcega) con excelentes formas del fuste.

## **DISCUSIÓN METODOLÓGICA**

Desde un punto de vista metodológico en este trabajo se utilizaron técnicas de análisis estadístico que todavía no son de uso habitual en el ámbito de la genética forestal, y por lo tanto los resultados derivados de ellas tienen un interés añadido (ver Anexo 2 para más detalles).

Los tres primeros capítulos se basaron en la evaluación de ensayos genéticos en campo, donde los patrones espaciales no aleatorios de las variables medidas suelen ser muy comunes (Fu et al. 1999; Dutkowski et al. 2006). La prospección de los patrones espaciales en nuestro caso corrobora estos resultados, ya que señala la existencia de una fuerte autocorrelación espacial para todas las variables de crecimiento con estructuras en parches y tamaños del parche variables (ver Anexo 1), reflejando una pronunciada heterogeneidad dentro del sitio para estas variables. Por el contrario y tal como han observado otros autores (Zas, 2006) no se detectó patrón espacial para las variables relacionadas con la forma del fuste, excepto en ciertos ensayos donde pudo estar causado por circunstancias extraordinarias como la pendiente excesiva e irregular o los encharcamientos estacionales.

El hecho de que estos ensayos siguieron diseños experimentales diferentes, desde bloques completos (BC) con unidades experimentales de distinto tamaño hasta bloques incompletos (BI), permitió, a su vez, indagar acerca de la efectividad de los distintos diseños para absorber la estructura espacial. En general, la estructura de bloques de los diseños experimentales en los ensayos estudiados no fue suficiente para absorber la heterogeneidad espacial encontrada, y los bloques fueron internamente heterogéneos, violando el requisito fundamental de los diseños en bloques. Esta incapacidad de los diseños se agravó a medida que el tamaño del parche fue más pequeño y el tamaño del bloque fue más grande, como ocurre con los diseños en BC de parcelas multi-árbol. Los diseños en BI, con tamaños del bloque más pequeños, se adaptaron mejor a los patrones encontrados y fueron capaces de corregir más eficazmente los efectos de la autocorrelación (de la Mata et al. 2008). Sin embargo, cuando la variación espacial se presentó en manchas de pequeño tamaño, los diseños en BI fueron incapaces de absorberla completamente. A juzgar por estos resultados siempre conviene explorar la estructura espacial de los residuos del modelo correspondiente, y en caso de detectarse patrones de dependencia espacial a escalas inferiores a las del tamaño del bloque sería preciso recurrir a técnicas de análisis espacial como el método de Análisis Espacial Iterativo (ISA) aquí utilizado (Zas 2006) u otros de la amplia gama de métodos de ajuste espacial disponibles (ver en Zas 2008).

El ajuste espacial mediante el método ISA eliminó el efecto del bloque y redujo sustancialmente la variación residual, favoreciendo la detección de diferencias significativas entre entidades genéticas. Estos resultados coinciden con los de otros autores que demostraron que la ampliación de los modelos estándar de análisis al incluir los componentes espaciales, incrementa la precisión de las estimaciones de los parámetros genéticos y la correlación del tratamiento entre ensayos (Qiao et al. 2000; Dutkowski et al. 2006; Zas 2006).

Otra ventaja del análisis espacial empleado es que nos permitió comparar materiales genéticos incluidos en ensayos adyacentes instalados en la misma localidad pero en base a diseños experimentales independientes. Utilizando aproximaciones convencionales, los efectos ambientales del micrositio podrían confundir las comparaciones entre los materiales de estos ensayos, y los diseños experimentales independientes serían incapaces de absorber esta variación ambiental entre ensayos. Mediante el uso del método ISA fuimos capaces de tener en cuenta simultáneamente la heterogeneidad espacial de ambos ensayos realizando previamente un ajuste espacial

conjunto, lo que permitió realizar comparaciones entre los materiales genéticos de ambos.

Por otra parte, la utilización de modelos mixtos en los análisis de varianza y la disponibilidad de métodos de estimación basados en la verosimilitud permitió especificar y testar diferentes estructuras de varianzas y covarianzas genéticas necesarias para caracterizar la interacción G×E. Comparando la verosimilitud de diferentes modelos a los que se aplicaron distintas restricciones en la estructura de covarianza genética entre sitios frente a un modelo completo sin restricciones pudimos testar diferentes hipótesis acerca del origen y las causas de la interacción. Estos métodos se mostraron muy versátiles y eficaces para profundizar en la interpretación de la interacción G×E, pudiéndose diseñar un buen abanico de hipótesis específicas a contrastar (Capítulo II y III). Sin embargo el contraste para valorar la existencia de interacciones con cambio de ranking resultó demasiado restrictivo y no fue útil para determinar el agrupamiento regional óptimo (Capítulo III), probablemente porque la correlación perfecta en la que se basa es condición suficiente pero no estrictamente necesaria para la ausencia de cambios de ranking (Cossa et al. 2004).

El procedimiento MIXED de SAS permite el ajuste de modelos mixtos que incorporan la correlación espacial de los datos, especificando estructuras espaciales de autocorrelación de los residuos (Saenz-Romero et al. 2001; Littell et al. 2006). Así, los modelos mixtos utilizados para el contraste de hipótesis relacionadas con los patrones de interacción G×E podrían haber sido así ampliados permitiendo una estructura autocorrelacionada de la variación residual dentro de cada sitio. Sin embargo, el ajuste simultáneo de modelos autocorrelacionados espacialmente, con heterogeneidad de varianzas residuales y complejas estructuras de covarianza familiar a través de sitios resultó excesivamente exigente desde el punto de vista computacional, de tal manera que la integración de todas esas estructuras de covarianza familiar y residual en un único modelo mixto fue imposible con un ordenador personal convencional. Es por ello, que en este caso nos decantáramos por un análisis en dos etapas, donde en una primera etapa se corrige la variable dependiente mediante herramientas de estadística espacial de manera independiente en cada sitio de ensayo, y una segunda etapa en la que se estudian pormenorizadamente los efectos de la interacción G×E a partir de los datos espacialmente corregidos (Cappa et al. 2009). Esta estrategia en dos etapas evitó los errores de convergencia y redujo notablemente los tiempos de computación.



---

## **8. CONCLUSIONES**

---

## 8. CONCLUSIONES

1. El origen de Serranía de Cuenca es un material recomendado para su utilización en el área interior de Galicia, siempre y cuando se haga una correcta selección de la fuente semillera dentro de la procedencia. La procedencia de Albarracín mostró muy buenas formas y podría considerarse para su uso en las zonas más secas del interior de Galicia.

2. Sin embargo, los materiales de los programas de mejora de Galicia-Costa (GC) y Australia Occidental (WA) en base a procedencias Atlánticas, se comportaron ligeramente mejor que las procedencias Mediterráneas cuando se evaluaron en el interior de Galicia. Frente a la importación de procedencias del área Nemoromediterránea del interior peninsular, es preferible el uso de material mejorado de ambos programas con el objetivo de explotar en la zona interior las ganancias genéticas obtenidas a través de selección.

3. En base a los excelentes resultados del material de WA, se debería considerar la importación de semilla de este origen para repoblación en el interior de Galicia y/o la inclusión de genotipos específicos seleccionados de WA en la población local de mejora.

4. El origen y magnitud de la interacción G×E para el crecimiento en altura de la población de mejora de *Pinus pinaster* para Galicia es suficientemente importante como para tenerla en cuenta en el avance del programa. La división tradicional Costa-Interior diseñada para reducir el efecto de esta interacción es inconsistente, y no se ajusta a los patrones de interacción encontrados, detectándose interacción con cambios de ranking tanto dentro como entre zonas.

5. No fue posible encontrar una zonificación geográfica o ambiental alternativa que redujera los efectos de la interacción, ya que la mejor agrupación de sitios no resultó coherente geográfica ni ambientalmente. La posible subdivisión del territorio en zonas de mejora genotípicamente estables no es, en base a los resultados, una alternativa recomendable para Galicia.

6. El régimen de frío invernal fue el factor ambiental que mayor efecto tuvo sobre los cambios de ranking familiares en la población de mejora, mientras que otros factores como la sequía estival contribuyeron en menor medida a la interacción G×E. Por lo tanto, es esperable una buena adaptación del material de mejora costero frente a la progresiva evolución hacia condiciones más Mediterráneas predicha por los modelos climáticos en Galicia.

7. La selección combinada por crecimiento promedio en el conjunto de sitios y estabilidad genotípica, en la que se eliminaría entre un tercio y la mitad de las familias más inestables, es la estrategia más recomendable para afrontar la importante interacción G×E. Esta estrategia permite configurar una única población de mejora estable, utilizable en toda Galicia, lo que supone una importante reducción de costes frente a otras alternativas y puede facilitar la gestión del material forestal de reproducción mejorado. Además es una estrategia de selección segura frente al incierto escenario de cambio climático futuro.

8. Las poblaciones Atlánticas de *P. pinaster* mostraron en condiciones controladas de estrés hídrico una estrategia basada en el crecimiento, especialmente la población del programa de mejora de GC que demostró su mayor nivel de selección para este carácter, lo que implica una estrategia arriesgada frente a las posibles limitaciones hídricas. Esto sugiere ser cauteloso con el empleo de material de tipo Atlántico de *P. pinaster* en lugares con altas restricciones en la disponibilidad de agua, más si cabe ante el escenario de cambio climático previsto.

9. *P. pinaster* describió un patrón de respuesta a la sequía muy conservada entre poblaciones basada en procesos de regulación estomática isohídrica que producen el cierre estomático y una reducción en la absorción de CO<sub>2</sub> en situaciones de déficit hídrico, pudiendo desembocar en la inanición de la planta cuando la sequía es extrema.

10. La hibridación entre orígenes con diferente grado de Mediterraneidad ha resultado efectiva en un bajo porcentaje para la obtención de material genético adaptado a las zonas de transición interior de Galicia, ya que en términos generales los híbridos ensayados, más que mostrar un comportamiento intermedio, se comportaron de manera

parecida a los parentales de tipo Mediterráneo. Aunque también existieron ciertas excepciones que suponen una hibridación adecuada para su uso en esta región.

---

## **9. REFERENCIAS**

---

## 9. REFERENCIAS

- Abrahamson WG, Gadgil M (1973) Growth form and reproductive effort in goldenrods (Solidago, Compositae). *American Naturalist* 107 (957):651-661
- Adams WT, White TL, Hodge GR, Powell GL (1994) Genetic parameters for bole volume in longleaf pine: large sample estimates and influences of test characteristics. *Silvae Genetica* 43:357-366
- Aerts R, Boot RGA, Vanderaart PJM (1991) The relation between aboveground and belowground biomass allocation patterns and competitive ability. *Oecologia* 87 (4):551-559
- Aguiar A, Almeida MH, Borralho N (2003) Genetic control of growth, wood density and stem characteristics of *Pinus pinaster* in Portugal. *Silva Lusitana* 11 (2):131-139
- Alazard P (1986) Résistance au froid du pin maritime. *Annales Afocel* 1985:165-217
- Alazard P (1992) Aspects techniques et économiques de la multiplication de masse chez le Pin maritime. In: *Mass Production Technology for genetically improved fast growing forest tree species*. Bordeaux, France,
- Alía R, Gil L, Pardos JA (1995) Performance of 43 *Pinus pinaster* Ait. provenances on 5 locations in central Spain. *Silvae Genetica* 44 (2-3):75-81
- Alía R, Martín S (2009) Guía técnica para la conservación genética y utilización del pino negral (*Pinus pinaster*). *Foresta*, Madrid. España
- Alía R, Martín S, De Miguel J, Galera R, Agúndez D, Gordo J, Catalán G, Gil L (1996) Las regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Ait. OA de Parques Nacionales. DGCONA, Madrid. España
- Alía R, Moro J (1996) Comportamiento de procedencias de *Pinus pinaster* Ait. en el centro de España. *Investigación Agraria Sistemas y Recursos Forestales* 5 (1):57-75
- Alía R, Moro J, Denis J-B (2001) Ensayos de procedencias de *Pinus pinaster* Ait. en el centro de España: resultados a la edad de 32 años. *Investigación Agraria Sistemas y Recursos Forestales* 10 (2):333-354
- Alía R, Moro J, Denis JB (1997) Performance of *Pinus pinaster* provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. *Canadian Journal of Forest Research* 27 (10):1548-1559

- Álvarez-González JG, Ruiz-Gonzalez AD, Rodriguez-Soalleiro R, Barrio-Anta M (2005) Ecoregional site index models for *Pinus pinaster* in Galicia (northwestern Spain). *Annals of Forest Science* 62:115-127
- Álvarez PA, Vega P, Rodríguez-Soalleiro R, Vega G (2005) Influencia de las líneas de ayudas a la reforestación en la actividad repobladora y especies empleadas en Galicia. In: IV Congreso Forestal Nacional, Zaragoza, 2005.
- Aranda I, Alía R, Ortega U, Dantas ÂK, Majada J (2010) Intra-specific variability in biomass partitioning and carbon isotopic discrimination under moderate drought stress in seedlings from four *Pinus pinaster* populations. *Tree Genetics & Genomes* 6:169-178
- Baker RJ (1988) Analysis of genotype-environmental interaction in crops. *ISI Atlas of Science: Animal and Plant Sciences* 1:1-4
- Bará TS, Toval HG (1983) Calidad de estación del *Pinus pinaster* Ait. en Galicia. *Comunicaciones INIA, Recursos Naturales* 24:163 pp.
- Baradat P, Marpeau-Bezard A (1988) Le pine maritime *Pinus pinaster* Ait.: biologie et génétique des terpènes pour la connaissance et l'amélioration de l'espèce. Thesis. Université Bordeaux L.
- Barrio-Anta M, Balboa-Murias Mn, Castedo-Dorado F, Diéguez-Aranda U, Álvarez-González JG (2006) An ecoregional model for estimating volume, biomass and carbon pools in maritime pine stands in Galicia (northwestern Spain). *Forest Ecology and Management* 223:24-34
- Bazzaz FA, Reekie EG (1985) The meaning and measurement of reproductive effort in plants. In: White J (ed) *Studies on plant demography*. Academic Press, London, UK, pp 373-387
- Bloom AJ, Chapin FS, Mooney HA (1985) Resource limitation in plants - an economic analogy. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:363-392
- Boardman R, Bush D, Butcher T, Harwood C, Spencer D, Stackpole D (2002) Australian Low Rainfall Tree Improvement Group: compendium of softwood tree improvement strategies. RIRDC Publication No. 02/028. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen RP, Stevens MH, White JS (2008) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 24:127-135

- Bolstad SB, Kang H, Guries RP, Marty TL (1991) Performance of interprovenance and intraprovenance crosses of Jack pine in Central Wisconsin. *Silvae Genetica* 40 (3-4):124-130
- Boltz BA, Bongarten BC, Teskey RO (1986) Seasonal patterns of net photosynthesis of Loblolly pine from diverse origins. *Canadian Journal of Forest Research* 16 (5):1063-1068
- Brouwer R (1963) Some aspects of the equilibrium between overground and underground plant parts. In: *Jaarb. I.B.S., Wageningen, Netherlands*, pp 31-39
- Bucci G, Gonzalez Martinez SC, Le Provost G, Plomion C, Ribeiro MM, Sebastiani F, Alia R, Vendramin GG (2007) Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Molecular Ecology* 16:2137-2153
- Burban C, Petit RJ (2003) Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Molecular Ecology* 12:1487-1495
- Burdon RD (1977) Genetic correlation as a concept for studying Genotype-Environment Interaction in forest tree breeding. *Silvae Genetica* 26 (5-6):168-175
- Butcher TB (2007) Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 7: Maritime pine and Brutian pine tree improvement programs in Western Australia. *Australian Forestry* 70 (3):141-151
- Butcher TB, Chandler AL (2007) Maritime pine for dry-land Western Australia. In: *Joint Australian Forest Genetics and IUFRO Southern Pines Working Group (2.02.20) Conference. 11-14 April 2007, Hobart Australia. (Proceedings in press as CD and at <http://www.crcforestry.com.au/>)*
- Butcher TB, Hopkins ER (1993) Realised gains from breeding *Pinus pinaster*. *Forest Ecology and Management* 58 (3-4):211-231
- Campbell RK, Sorensen FC (1978) Effect of test environment on expression of clines and on delimitation of seed zones in Douglas-Fir. *Theoretical and Applied Genetics* 51 (5):233-246
- Cannell MGR, Bridgwater FE, Greenwood MS (1978) Seedling growth rates, water stress responses and root-shoot relationships related to eight-year volumes among families of *Pinus taeda* L. *Silvae Genetica* 27 (6):237-248
- Cappa EP, Yanchuk AD, Cartwright CV (2009) Bayesian estimation of genetic (co)variances across sites for spatial adjusted data of large forest genetic trials.

- In: XIII World Forestry Congress, Buenos Aires, Argentina, 18-23 October 2009. pp 1-9
- Carle JB, Holmgren LPB (2009) Wood from planted forests: global outlook to 2030. In: Evans J (ed) Planted Forests: uses, impacts and sustainability. FAO and CAB International, pp 47-59
- Carrión JS, Yll EI, Walker MJ, Legaz AJ, Chain C, Lopez A (2003) Glacial refugia of temperate, Mediterranean and Ibero-North African flora in south-eastern Spain: new evidence from cave pollen at two Neanderthal man sites. *Global Ecology and Biogeography* 12:119-129
- Climent J, Alonso J, Gil L (2008) Root restriction hindered early allometric differentiation between seedlings of two provenances of Canary Island Pine. *Silvae Genetica* 57 (4-5):187-193
- Climent J, Chambel MR, Lopez R, Mutke S, Alia R, Gil L (2006) Population divergence for heteroblasty in the Canary Island pine (*Pinus canariensis*, Pinaceae). *American Journal of Botany* 93 (6):840-848
- Cody ML (1986) Roots in plant ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 1 (3):76-78
- Cohen D (1970) Expected efficiency of water utilization in plants under different competition and selection regimes. *Israel Journal of Botany* 19 (1):50
- Coleman JS, McConnaughay KDM, Ackerly DD (1994) Interpreting phenotypic variation in plants. *Trends in Ecology & Evolution* 9 (5):187-191
- Corcuera L, Gil-Pelegrin E, Notivol E (2010) Phenotypic plasticity in *Pinus pinaster* delta(13)C: environment modulates genetic variation. *Annals of Forest Science* 67 (8)
- Correia I, Alía R, Yan W, David T, Aguiar A, Almeida MH (2010) Genotype × Environment interactions in *Pinus pinaster* at age 10 in a multi-environment trial in Portugal: a maximum likelihood approach. *Annals of Forest Science* 67 (612):1-9
- Correia I, Almeida H, Aguiar A (2004) Variabilidade do crescimento e da forma de proveniências de *Pinus pinaster* Aiton aos 8 anos, na Mata nacional do Escaroupim. *Silva Lusitana* 12 (2):151-182
- Correia I, Almeida MH, Aguiar A, Alía R, David TS, Pereira JS (2008) Variations in growth, survival and carbon isotope composition (  $^{13}C$ ) among *Pinus pinaster* populations of different geographic origins. *Tree Physiology* 28:1545-1552

- Corsten LCA, Denis JB (1990) Structuring interaction in two-way tables by clustering. *Biometrics* 46 (1):207-215
- Costa-Silva J, Dutkowski GW, Gilmour AR (2001) Analysis of early tree height in forest genetic trials is enhanced by including a spatially correlated residual. *Canadian Journal of forest Research* 31 (11):1887-1893
- Costa-Silva J, Potts BM, Dutkowski GW (2006) Genotype by environment interaction for growth of *Eucalyptus globulus* in Australia. *Tree Genetics & Genomes* 2 (2):61-75
- Cowan IR (1982) Water use and optimization of carbon assimilation. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds) *Encyclopedia of plant physiology*. 2. Physiological plantecology, vol 12. pp 589-630
- Cregg BM, Zhang JW (2001) Physiology and morphology of *Pinus sylvestris* seedlings from diverse sources under cyclic drought stress. *Forest Ecology and Management* 154 (1-2):131-139
- Crossa J, Yang R-C, Cornelius PL (2004) Studying crossover genotype x environment interaction using linear-bilinear models and mixed models. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 9:362-380
- Chambel MR (2006) Variabilidad adaptativa y plasticidad fenotípica en procedencias de pinos ibéricos. Thesis. Departamento de Silvopascicultura. Universidad Politécnica de Madrid,
- Chambel MR, Climent J, Alía R (2007) Divergence among species and populations of Mediterranean pines in biomass allocation of seedlings grown under two watering regimes. *Annals of Forest Science* 64 ( ):87-97
- Chapin FS (1980) The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:233-260
- Danjon F (1994) Stand features and height growth in a 36-year-old maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenance test. *Silvae Genetica* 43 (1):52-62
- Danjon F, González G, Meredieu C, Leprovost G, Gion JM, Bert D, Bosc A, Legardère O, Raffin A, Jourdan C (2009) Phenotypic plasticity of *Pinus pinaster* to water stress: biomass allocation and root architecture. In: International Symposium "Root Research and Applications", RootRAP, Boku, Vienna, Austria, 2-4 September 2009.

- Darrow HE, Bannister P, Burritt DJ, Jameson PE (2002) Are juvenile forms of New Zealand heteroblastic trees more resistant to water loss than their mature counterparts? *New Zealand Journal of Botany* 40 (2)
- de la Mata R, Zas R (2010a) Performance of maritime pine Spanish Mediterranean provenances at young ages in a transitional region between Atlantic and Mediterranean climates in NW Spain. *Silvae Genetica* 59 (1):8-17
- de la Mata R, Zas R (2010b) Transferring Atlantic maritime pine improved material to a region with marked Mediterranean influence in inland NW Spain: a likelihood-base approach on spatially adjusted field data. *European Journal of Forest Research* 129 (4):645-658
- de la Mata R, Zas R, Merlo E (2008) Eficiencia estadística de diseños experimentales de bloques incompletos para el análisis de variables espacialmente autocorrelacionadas. In: Maestre F, Escudero A, Bonet A (eds) *Introducción al análisis espacial de datos en ecología y ciencias ambientales: métodos y aplicaciones*. Universidad Rey Juan Carlos, Asociación Española de Ecología Terrestre y Caja de Ahorros del Mediterráneo, Madrid, España. pp 762-777
- de Ronde C (2005) The rise and fall of *Pinus pinaster* plantations in South Africa: from a significant commercial timber source to a declared exotic weed. In: MEDPINE 3. Conservation, regeneration and restoration of Mediterranean pines and their ecosystems, Valenzano. Bari. Italy, 26-30 September 2005. pp 77-83
- Delacy IH, Cooper M, Basford PK (1996) Relationships among analytic methods used to study genotype-by-environment interactions and evaluation of their impact on response to selection. In: Kang MS, Gauch HG (eds) *Genotype by Environment Interaction: new perspectives*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 51-84
- Dickerson GE (1962) Implications of genetic-environment interactions in animal breeding. *Animal Production* 4:47-63
- Dieters MJ (1996) Genetic parameters for Slash pine (*Pinus elliottii*) grown in south-east Queensland, Australia: growth, stem straightness and crown defects. *Forest Genetics* 3 (1):27-36
- Dieters MJ, White TL, Hodge GR (1995) Genetic parameter estimates for volume from full-sib tests of slash pine (*Pinus elliottii*). *Canadian Journal of Forest Research* 25 (8):1397-1408
- Ding M, Tier B, Dutkowski GW (2007) Multi-environment trial analysis on *P. radiata*: step by step to search "real" GxE interaction. In: *Australasian Forest Genetics*

- Conference, The Old Woolstore, Hobart, Tasmania, Australia, 11-14 April 2007.  
pp 1-23
- Durel CE, Roman Amat B (1987) Interaction famille x site dans un test tristationnel de descendances de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). Annales des Sciences Forestieres 44 (2):189-209
- Dutilleul P (1993) Spatial heterogeneity and the design of ecological field experiments. Ecology 74 (6):1646-1658
- Dutkowski GW, Silva JC, Gilmour AR, Wellendorf H, Aguiar A (2006) Spatial analysis enhances modelling of a wide variety of traits in forest genetic trials. Canadian Journal of Forest Research 36 (7):1851-1870
- Dvorak WS, Donahue JK, Vasquez JA (1996) Provenance and progeny results for the tropical white pine, *Pinus chiapensis*, at five and eight years of age. New Forests 12 (2):125-140
- Eberhart SA, Russel WA (1966) Stability parameters for comparing varieties. Crop Science 6:36-40
- Eriksson G, Ilstedt B (1986) Stem volume of intra- and interprovenance families of *Picea abies* (L.) Karst. Scandinavian Journal of Forest Research 1 (1-4):141-152
- Etterson JR, Galloway LF (2002) The influence of light on paternal plants in *Campanula americana* (Campanulaceae): pollen characteristics and offspring traits. American Journal of Botany 89 (12):1899-1906
- FAO (2006) Global planted forests thematic study: results and analysis. del Lungo A, Ball J and Carle J. edn. Planted Forests and Trees Working Paper 38, Roma, Italy
- FAO (2009) Situación de los bosques del mundo. FAO, Roma, Italy
- Fernandes PM, Rigolot E (2007) The fire ecology and management of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). Forest Ecology and Management 241:1-13
- Fernández M (1996) Comportamiento de procedencias de *Pinus pinaster* con vistas a la selección precoz por su resistencia a la sequía. Tesis. ETSIM. Madrid,
- Fernandez M, Gil L, Pardos JA (1999) Response of *Pinus pinaster* Ait. provenances at early age to water supply. I. Water relation parameters. Annals of Forest Science 56 (2):179-187
- Fernández M, Gil L, Pardos JA (2000) Effects of water supply on gas exchange in *Pinus pinaster* Ait. provenances during their first growing season. Annals of Forest Science 57:9-16

- Ferrio JP, Florit A, Vega A, Serrano L, Voltas J (2003) Delta C-13 and tree-ring width reflect different drought responses in *Quercus ilex* and *Pinus halepensis*. *Oecologia* 137 (4):512-518
- Finlay KW, Wilkinson GN (1963) The analysis of adaptation in a plant breeding programme. *Australian Journal of Agricultural Science* 14:742-745
- Franco J (1986) *Pinus*. Flora Ibérica, Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid Vol. I:168-174
- Fry JD (2004) Estimation of genetic variances and covariances by restricted maximum likelihood using PROC MIXED. A.M. Saxton (ed) Genetic analysis of complex traits using SAS. SAS Institute, Cary, NC.,
- Fu YB, Clarke GPY, Namkoong G, Yanchuk AD (1998) Incomplete block designs for genetic testing: statistical efficiencies of estimating family means. *Canadian Journal of Forest Research* 28 (7):977-986
- Fu YB, Yanchuk AD, Namkoong G (1999) Spatial patterns of tree height variations in a series of Douglas-fir progeny trials: implications for genetic testing. *Canadian Journal of Forest Research* 29 (6):714-723
- Gadgil M, Bossert WH (1970) Life historical consequences of natural selection. *American Naturalist* 104:1-24
- Galera R, Martín S, Alía R, Gordo J, Aguado AM, Notivol E (1997) Manual de selección de masas productoras de semillas. Evaluación de caracteres. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. INIA, Madrid
- García JM, De-Miguel J, Alía R, Iglesias S (2001) Regiones de Identificación y Utilización de material forestal de reproducción. Ministerio de Medio Ambiente. Serie Cartográfica, Madrid, España.
- Gedroc JJ, McConnaughay KDM, Coleman JS (1996) Plasticity in root/shoot partitioning: optimal, ontogenetic, or both? *Functional Ecology* 10 (1):44-50
- Gil L (1991) Consideraciones históricas sobre *Pinus pinaster* Aiton en el paisaje vegetal de la Península Ibérica. *Estudios Geográficos* nº 202:5-27
- González-Martínez SC, Alía R, Gil L (2002) Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity* 89:199-206
- González-Martínez SC, Mariette S, Ribeiro MM, Burban C, Raffin A, Chambel MR, Ribeiro CAM, Aguiar A, Plomion C, Alia R, Gil L, Vendramin GG, Kremer A, Reviron MP (2004) Genetic resources in maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton):

- molecular and quantitative measures of genetic variation and differentiation among maternal lineages. *Forest Ecology and Management* 197: 103-115
- Granier A, Loustau D (1994) Measuring and modeling the transpiration of a maritime pine canopy from sap flow data. *Agricultural and Forest Meteorology* 71 (1-2):61-81
- Grime JP (1979) *Plant strategies and vegetation processes*. Wiley & Sons, Chichester
- Grotkopp E, Rejmánek M, Rost TL (2002) Toward a causal explanation of plant invasiveness: seedling growth and life-history strategies of 29 pine (*Pinus*) species. *The American Naturalist* 159 (4):396-419
- Guehl JM, Fort C, Ferhi A (1995) Differential response of leaf conductance, carbon-isotope discrimination and water-use efficiency to nitrogen deficiency in maritime pine and pedunculate oak plants. *New Phytologist* 131 (2):149-157
- Guyon JP, Kremer A (1982) Phenotypic stability of height growth, daily changes in sap pressure and transpiration in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Canadian Journal of Forest Research* 12 (4):936-946
- Gwaze DP, Wolliams JA, Kanowski PJ, Bridgwater FE (2001) Interactions of genotype with site for height and stem straightness in *Pinus taeda* in Zimbabwe. *Silvae Genetica* 50 (3-4):135-140
- Haapanen M (1996) Impact of family-by-trial interaction on the utility of progeny testing methods for Scots pine. *Silvae Genetica* 45 (2-3):130-135
- Hamann A, Namkoong G, Koshy MP (2002) Improving precision of breeding values by removing spatially autocorrelated variation in forestry field experiments. *Silvae Genetica* 51 (5-6):210-215
- Hammer GL, Cooper M (1996) *Plant adaptation and crop improvement*. CAB INTERNATIONAL, Wallingford
- Hannrup B, Jansson G, Danell O (2008) Genotype by Environment Interaction in *Pinus sylvestris* L. in southern Sweden. *Silvae Genetica* 57 (6):306-311
- Harfouche A, Baradat P, Durel CE (1995a) Variabilité intraspécifique chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait) dans le sud-est de la France. I. Variabilité des populations autochtones et des populations de l'ensemble de l'aire de l'espèce. *Annals of Forest Science* 52 (4):307-328
- Harfouche A, Baradat P, Kremer A (1995b) Variabilité intraspécifique chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait) dans le sud-est de la France. II. Hétérosis et

- combinaison de caractères chez des hybrides interracialisés. *Annals of Forest Science* 52 (4):329-346
- Harfouche A, Kremer A (2000) Provenance hybridization in a diallel mating scheme of maritime pine (*Pinus pinaster*). I. Means and variance components. *Canadian Journal of Forest Research* 30 (1):1-9
- Henderson CR, Kempthorne O, Searle SR, Vonkrosigk CM (1959) The Estimation of environmental and genetic trends from records subject to culling. *Biometrics* 15 (2):192-218
- Herman JJ, Sultan SE (2011) Adaptive transgenerational plasticity in plants: case studies, mechanisms, and implications for natural populations. *Frontiers in Plant Genetics and Genomics* 2:102
- Hodge GR, Dvorak WS (1999) Genetic parameters and provenance variation of *Pinus tecunumanii* in 78 international trials. *Forest Genetics* 6 (3):157-180
- Hodge GR, White TL (1992) Genetic parameter estimates for growth traits at different ages in slash pine and some implications for breeding. *Silvae Genetica* 41 (4-5):252-262
- Holland JB (2006) Estimating genotypic correlations and their standard errors using multivariate restricted maximum likelihood estimation with SAS Proc MIXED. *Crop Science* 46:642-654
- Hong N, White JG, Gumpertz ML, Weisz R (2005) Spatial analysis of precision agriculture treatments in randomized complete blocks: guidelines for covariance model selection. *Agronomy Journal* 97:1082-1096
- Hopkins ER, Butcher TB (1993) Provenance comparisons of *Pinus pinaster* Ait. in Western Australia. *CALMScience* (1):55-105
- Hopkins ER, Butcher TB (1994) Improvement of *Pinus pinaster* Ait. in Western Australia. *CALMScience* 1 (2):159-242
- Isik F, Keskin S, McKeand SE (2000) Provenance variation and provenance-site interaction in *Pinus brutia* Ten.: Consequences of defining breeding zones. *Silvae Genetica* 49 (4-5):213-223
- Iwasa Y, Roughgarden J (1984) Shoot/root balance of plants: optimal growth of a system with many vegetative organs. *Theoretical Population Biology* 25 (1):78-105

- Johnson GR, Burdon ED (1990) Family-site interaction in *Pinus radiata* implications for progeny testing strategy and regionalised breeding in New Zealand. *Silvae Genetica* 39 (2):55-62
- Johnson IG (1992) Family-site interaction in radiata pine families in New South Wales, Australia. *Silvae Genetica* 41 (1):55-62
- Joly RJ, Adams WT, Stafford SG (1989) Phenological and morphological responses of mesic and dry site sources of Coastal Douglas-fir to water deficit. *Forest Science* 35 (4):987-1005
- Jones HG (1992) *Plants and microclimate*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Joslin JD, Wolfe MH, Hanson PJ (2000) Effects of altered water regimes on forest root systems. *New Phytologist* 147 (1):117-129
- Kaya Z (1992) The effects of test environment on estimation of genetic parameters for seedling traits in 2-year-old Douglas-fir. *Scandinavian Journal of Forest Research* 7:287-294
- Klein T, Cohen S, Yakir D (2011) Hydraulic adjustments underlying drought resistance of *Pinus halepensis*. *Tree Physiology* 31 (6):637-648
- Koch L, Fins L (2000) Genetic variation in wood specific gravity from progeny tests of ponderosa pine (*Pinus ponderosa* Laws.) in northern Idaho and western Montana. *Silvae Genetica* 49 (4-5):174-181
- Körner C (1994) Biomass fractionation in plants: a reconsideration of definitions based on plant functions. In: Roy J, Garnier E (eds) *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands, pp 173-185
- Lario FJ, Ocaña L (2004) Base mecánica de la inestabilidad de *Pinus pinaster* Ait. en las plantaciones juveniles de climas atlánticos. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 17:175-180
- Leck MA, Parker VT, Simpson RL (2008) *Seedling ecology and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Ledig FT, Kitzmiller JH (1992) Genetic strategies for reforestation in the face of global climate change. *Forest Ecology and Management* 50 (1-2):153-169
- Legendre P (1993) Spatial autocorrelation: a trouble or new paradigm? *Ecology* 74:1659-1673

- Li L, Wu HX (2005) Efficiency of early selection for rotation-aged growth and wood density traits in *Pinus radiata*. Canadian Journal of Forest Research 35 (8):2019-2029
- Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD, Schabenberger O (2006) SAS System for mixed models, second edition. SAS Institute, Cary, NC
- Ludlow MM (1989) Strategies of response to water stress. In: Kreeb KH, Richter H, Hinckley TM (eds) Structural and functional responses to environmental stresses: water shortage. SPB Academic Publishing, The Hague, pp 269-281
- MADRP (1999) IFN 3ª Revisao. Portugal
- Magnussen S (1990) Application and comparison of spatial models in analyzing tree-genetics field trials. Canadian Journal of Forest Research 20:536-546
- Mariette S, Chagne D, Lezier C, Pastuszka P, Raffin A, Plomion C, Kremer A (2001) Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. Heredity 86 (4):469-479
- MARM (2010) Anuario de estadística forestal 2008. Madrid. España.
- Martínez-Ferri E, Balaguer L, Valladares F, Chico JM, Manrique E (2000) Energy dissipation in drought-avoiding and drought-tolerant tree species at midday during the Mediterranean summer. Tree Physiology 20 (2):131-138
- Martínez CA, Pérez AA, Castillo RF, Valcarcel DM, Blanco CR (1999) Atlas climático de Galicia. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela
- Martíns P, Sampedro L, Moreira X, Zas R (2009) Nutritional status and genetic variation in the response to nutrient availability in *Pinus pinaster*. A multisite field study in Northwest Spain. Forest Ecology and Management 258:1429-1436
- Martíns P, Zas R, Sampedro L (2008) Plasticidad fenotípica de *Pinus pinaster* frente a la disponibilidad de nutrientes. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales 24:67-73
- Matheson AC, Raymond CA (1984) The impact of genotype x environment interactions on Australian *Pinus radiata* breeding programs. Australian Forest Research 14:11-25
- Matziris DI (1982) Variation on growth and quality characters in *Pinus pinaster* provenances grown at seven sites in Greece. Silvae Genetica 31 (5-6):168-173
- McKeand SE, Eriksson G, Roberds JH (1997) Genotype by environment interaction for index traits that combine growth and wood density in loblolly pine. Theoretical and Applied Genetics 94 (8):1015-1022

- McKeand SE, Jokela EJ, Huber DA, Byram TD, Allen HL, Li B, Mullin TJ (2006) Performance of improved genotypes of Loblolly pine across different soils, climates, and silvicultural inputs. *Forest Ecology and Management* 227:178-184
- Miller PM, Eddleman LE, Miller JM (1995) *Juniperus Occidentalis* juvenile foliage: advantages and disadvantages for a stress-tolerant, invasive conifer. *Canadian Journal of Forest Research* 25 (3):470-479
- Molina F (1965) Comportamiento racial del *Pinus pinaster* en el noroeste de España. *Anales IFIE* 2 (10):221-238
- Morgenstern EK (1973) Early results of hybridization in Black spruce. In: Illingworth K, Yeatman CW (eds) 14th Meeting of the Canadian Tree Improvement Association, Fredericton, N.B., 28-30 August 1973. Canadian Forest Service, Ottawa, pp 27-37
- Müller I, Schmid B, Weiner J (2000) The effect of nutrient availability on biomass allocation patterns in 27 species of herbaceous plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3:115-127
- Muir W, Nyquist WE, Xu S (1992) Alternative partitioning of the Genotype-by-Environment Interaction. *Theoretical and Applied Genetics* 84 (1-2):193-200
- Mullin TJ (1985) Genotype-nitrogen interactions in full-sib seedlings of Black spruce. *Canadian Journal of Forest Research* 15:1031-1038
- Namkoong G, Barnes RD, Burley J (1980) A philosophy of breeding strategy for tropical forest trees. *Tropical Forestry Paper. No. 16*. Commonwealth Forestry Institute, Oxford, UK
- Nguyen-Queyrens A, Costa P, Loustau D, Plomion C (2002) Osmotic adjustment in *Pinus pinaster* cuttings in response to a soil drying cycle. *Annals of Forest Science* 59:795-799
- Nguyen-Queyrens A, Ferhi A, Loustau D, Guehl JM (1998) Within-ring delta C-13 spatial variability and interannual variations in wood cellulose of two contrasting provenances of *Pinus pinaster*. *Canadian Journal of Forest Research* 28 (5):766-773
- Nguyen A, Lamant A (1989) Variation in growth and osmotic regulation of roots of water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances. *Tree Physiology* 5:123-133
- Niklas KJ (1994) Allometry in plants: the scaling of form and process. University of Chicago Press, Chicago, USA

- Nilsson B (1973) Recent results of interprovenance crosses in Sweden and the implications. In: Illingworth K, Yeatman CW (eds) 14th Meeting of the Canadian Tree Improvement Association, Fredericton, N.B., 28-30 August 1973. Canadian Forest Service, Ottawa, pp 3-14
- Nilsson J-E (1992) Growth and survival of spontaneous provenance hybrids of *Pinus sylvestris*. Scandinavian Journal of Forest Research 7 (1-4):193-203
- Nyquist WE (1991) Estimation of heritability and prediction of selection response in plant-populations. Critical Reviews in Plant Sciences 10 (3):235-322
- Orr-Ewing AL (1966) Inter- and intraspecific crossing in Douglas-fir *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. Silvae Genetica (15):121-126
- Owino F, Zobel B (1977) Genotype x Environment Interaction and genotypic stability in Loblolly pine. 3. Heterosis and Heterosis x Environment Interaction. Silvae Genetica 26 (2-3):114-116
- Pardos M, Calama R, Climent J (2009) Difference in cuticular transpiration and sclerophylly in juvenile and adult pine needles relates to the species-specific rates of development. Trees-Structure and Function 23 (3):501-508
- Payne RW, Harding SA, Murray DA, Soutar DM, Baird DB, Welham SJ, Kane AF, Gilmour AR, Thompson R, Webster R, Tunnicliffe E, Wilson G (2006) GenStat release 9 Reference Manual, part 2 directives. VSN International, Hemel Hempstead, UK
- Pearsall WH (1927) Growth studies. VI. On the relative sizes of growing plant organs. Annals of Botany 41 (163):549-556
- Pérez-Muñuzuri V, Fernández-Cañamero M, Gómez-Gesteira JL (2009) The evidence for and impact of climate change in Galicia. Xunta de Galicia. Consellería de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible. URL: [www.meteogalicia.es](http://www.meteogalicia.es), Santiago
- Perry DH, Hopkins ER (1967) Importation of Breeding Material of *Pinus pinaster* Ait. from Portugal. Bulletin 75, Forests Department, Western Australia
- Petit RJ, Bahrman N, Baradat P (1995) Comparison of genetic differentiation in Maritime Pine (*Pinus pinaster* Ait.) estimated using isozyme, total protein and terpenic loci. Heredity 75:382-389
- Picon C, Guehl JM, Ferhi A (1996) Leaf gas exchange and carbon isotope composition responses to drought in a drought-avoiding (*Pinus pinaster*) and a drought-

- tolerant (*Quercus petraea*) species under present and elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. *Plant Cell and Environment* 19 (2):182-190
- Piepho HP (1999) Stability analysis using the SAS system. *Agronomy Journal* 91 (1):154-160
- Pigliucci M, Schlichting CD (1996) Reaction norms of *Arabidopsis*. IV. Relationships between plasticity and fitness. *Heredity* 76:427-436
- Pigott CD, Pigott S (1993) Water as a determinant of the distribution of trees at the boundary of the Mediterranean Zone. *Journal of Ecology* 81 (3):557-566
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Loureiro ME, Ducatti C (2005) Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. *Annals of Botany* 96 (1):101-108
- Poorter H, Nagel O (2000) The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* 27 (6):595-607
- Poorter H, Niklas KJ, Reich PB, Oleksyn J, Poot P, Mommer L (2012) Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist* 193 (1):30-50
- Pswarayi IZ, Barnes RD, Birks JS, Kanowski PJ (1997) Genotype-Environment Interaction in a population of *Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*. *Silvae Genetica* 46 (1):35-40
- Qiao CG, Basford KE, DeLacy IH, Cooper M (2000) Evaluation of experimental designs and spatial analyses in wheat breeding trials. *Theoretical and Applied Genetics* 100:9-16
- Raffin A (2002) L'amélioration génétique du pin maritime en Aquitaine. *Foret Entreprise* n° 148:17-46
- Rauscent L (1999) Le pin maritime en bois ouvre: Situation et perspectives. In: Propriétés et usages du pin maritime. ARBORA,
- Ribeiro MM, Plomion C, Petit J-M, Vendramin GG, Szmidt A (2001) Variation of chloroplast simple-sequence repeats in Portuguese Maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics* 102:97-103
- Robertson A (1959) The sampling variance of the genetic correlation coefficient. *Biometrics* 15 (3):469-485
- Romagosa I, Voltas J, Malosetti M, van Eeuwijk FA (2008) Interacción genotipo por ambiente. In: Ávila CM, Atienza SG, Moreno MT, Cubero JI (eds) La

- adaptación al ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, pp 109-135
- Roulund H, Alpuim M, Varela C, Aguiar A (1988) A tree improvement plan for *Pinus pinaster* in Portugal. Estação Florestal Nacional, Instituto Nacional de Investigaçao Agraria, Lisbon, Portugal
- Ruiz-Zorrilla P (1980) Notas para la historia del pino en Galicia. In: El Monte en Galicia. Fuentes para su estudio. Ministerio de Cultura, Madrid, España, pp 171-195
- Saenz-Romero C, Nordheim EV, Guries RR, Crump PM (2001) A case study of a provenance/progeny test using trend analysis with correlated errors and SAS PROC MIXED. *Silvae Genetica* 50 (3-4):127-135
- Salvador L, Alia R, Agundez D, Gil L (2000) Genetic variation and migration pathways of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) in the Iberian Peninsula. *Theoretical and Applied Genetics* 100 (1):89-95
- Sampedro L, Moreira X, Martins P, Zas R (2009) Growth and nutritional response of *Pinus pinaster* after a large pine weevil (*Hylobius abietis*) attack. *Trees Structure and Function* 23 (6):1189-1197
- Sánchez-Gómez D, Majada J, Alía R, Feito I, Aranda I (2010) Intraspecific variation in growth and allocation patterns in seedlings of *Pinus pinaster* Ait. submitted to contrasting watering regimes: can water availability explain regional variation? *Annals of Forest Science* 67 (505):1-8
- SAS-Institute (1999) SAS/STAT User's guide, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC
- Scheiner SM, Lyman RF (1991) The genetics of phenotypic plasticity . II. Response to selection. *Journal of Evolutionary Biology* 4 (1):23-50
- Schlichting CD (1986) The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17:667-693
- Schlichting CD, Pigliucci M (1998) Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA
- Schmid B, Weiner J (1993) Plastic relationships between reproductive and vegetative mass in *Solidago altissima*. *Evolution* 47 (1):61-74
- Searle SR (1968) Another look at Hendersons Methods of estimating variance components. *Biometrics* 24 (4):749

- Shelbourne CJA (1972) Genotype-Environment Interaction: Its study and its implications in forest tree improvement. In: IUFRO Genetics-SABRAO joint Symposia, Tokio, 1972. GENETICA, pp 1-28
- Shipley B, Meziane D (2002) The balanced-growth hypothesis and the allometry of leaf and root biomass allocation. *Functional Ecology* 16 (3):326-331
- Shukla GK (1972) Some statistical aspects of partitioning Genotype - Environmental Interaction components of variability. *Heredity* 29:237-245
- Shukla RP, Ramakrishnan PS (1986) Architecture and growth strategies of tropical trees in relation to successional status. *Journal of Ecology* 74 (1):33-46
- Sierra de Grado R (1993) Mejora genética de *Pinus pinaster Aiton* de la procedencia Sierra de Gredos. Caracteres de crecimiento y forma. Thesis. ETSIM. Madrid, España.
- Sierra de Grado R, Pando V, Martínez-Xurimendi P, Penalvo A, Bascones E, Mouliá B (2008) Biomechanical differences in the stem straightening process among *Pinus pinaster* provenances. A new approach for early selection of stem straightness. *Tree Physiology* 28:835-846
- Smith AB, Cullis BR, Thompson R (2005) The analysis of crop cultivar breeding and evaluation trials: an overview of current mixed model approaches. *Journal of Agricultural Science* 143:449-462
- Sonesson J, Eriksson G (2000) Genotypic stability and genetic parameters for growth and biomass traits in a water x temperature factorial experiment with *Pinus sylvestris* L. seedlings. *Forest Science* 46 (4):487-495
- StClair JB, Kleinschmit J (1986) Genotype-Environment Interaction and stability in ten-year height growth of Norway spruce clones (*Picea abies* Karst.). *Silvae Genetica* 35:177-186
- Stearns SC (1992) *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford, UK
- Stonecypher RW, Piesch RF, Helland GG, Chapman JG, Reno HJ (1996) Results from genetic tests of selected parents of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) in an applied tree improvement program. *Forest Science Monograph* 32:35 pp.
- Strauss SH, Ledig FT (1985) Seedling architecture and life history evolution in Pines. *The American Naturalist* 125 (5):702-715

- Sykes R, Li B, Isik F, Kadla J, Chang HM (2006) Genetic variation and genotype by environment interactions of juvenile wood chemical properties in *Pinus taeda* L. *Annals of Forest Science* 63 (8):897-904
- Tapias R, Climent J, Pardos JA, Gil L (2004) Life histories of Mediterranean pines. *Plant Ecology* 171:53-68
- Tilman D (1980) Resources: a graphical-mechanistic approach to competition and predation. *American Naturalist* 116 (3):362-393
- Tilman D (1988) Plant strategies and the dynamics and structure of plant communities. Princeton University Press, Princeton
- Tognetti R, Michelozzi M, Lauteri M, Brugnoli E, Giannini R (2000) Geographic variation in growth, carbon isotope discrimination, and monoterpene composition in *Pinus pinaster* Ait. provenances. *Canadian Journal of Forest Research* 30:1682-1690
- Toval G (1987) Zonificación de áreas de semillas y reproducción de ensayos de procedencias. Lourizán. No publicado
- Varela S (2007) Control xenético da capacidade de rebrote e emisión de raíces adventicias en familias híbridas de procedencias de *Pinus pinaster*. Proyecto Fin de Carrera, EPS Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, España
- Vega P, González M, Moo C, Vega G (1997) Primeros resultados de los ensayos de progenie del huerto semillero de *Pinus pinaster* Ait. en Sergude (Galicia). In: Puertas F, Rivas M (eds) II Congreso Forestal Español, Irati, Navarra, 1997. GENETICA, pp 661-666, PPI
- Vega P, Vega G, González M, Rodríguez A (1993) Mejora del *Pinus pinaster* Ait. en Galicia. In: Silva Pando J (ed) I Congreso Forestal Español, Lourizán, Pontevedra, 1993. RESISTANCE, pp 129-134
- Via S (1993) Adaptive phenotypic plasticity - Target or by-product of selection in a variable environment. *American Naturalist* 142 (2):352-365
- Villar R, Merino J (2001) Comparison of leaf construction costs in woody species with differing leaf life-spans in contrasting ecosystems. *New Phytologist* 151 (1):213-226
- Voltas J, Regina Chambel M, Aranzazu Prada M, Pedro Ferrio J (2008) Climate-related variability in carbon and oxygen stable isotopes among populations of Aleppo pine grown in common-garden tests. *Trees-Structure and Function* 22 (6):759-769

- Waxler MS, van-Buijtenen JP (1981) Early genetic evaluation of Loblolly pine. *Canadian Journal of Forest Research* 11:351-355
- Webster R, Oliver MA (1990) *Statistical methods in soil and land resource survey*. Oxford University Press, Oxford
- Weiner J, Thomas SC (1992) Competition and allometry in 3 species of annual plants. *Ecology* 73 (2):648-656
- White TL, Ching KK (1985) Provenance study of Douglas-fir in the Pacific Northwest Region. 4. Field performance at age 25 years. *Silvae Genetica* 34 (2-3):84-90
- WRI (1997) *The last frontier forests: ecosystems and economies on the edge*. Publications and papers. World Resources Institute, Washington DC. USA
- Xunta de Galicia (2003) *Anuario de estadística agraria 2001*. Santiago de Compostela, España
- Xunta de Galicia (2005) *O monte galego en cifras*. Xunta de Galicia, Dirección Xeral de Montes e Medio Ambiente Natural, Santiago de Compostela, España
- Yang R-C (2002) Likelihood-based analysis of Genotype-Environment Interactions. *Crop Science* 42:1434-1440
- Yang R-C (2007) Mixed-model analysis of crossover Genotype-Environment Interactions. *Crop Science* 47 (3):1051-1062
- Yang RC, Baker RJ (1991) Genotype-Environment Interactions in 2 wheat crosses. *Crop Science* 31 (1):83-87
- Yeiser JL, Lowe W, Van Buijtenen JP (2001) Stability and seed movement for Loblolly pine in the Western Gulf Region. *Silvae Genetica* 50 (2):81-88
- Zas R (2006) Iterative kriging for removing spatial autocorrelation in analysis of forest genetic trials. *Tree Genetics & Genomics* 2 (4):177-185
- Zas R (2008) Autocorrelación espacial y el diseño y análisis de experimentos. In: Maestre F, Escudero A, Bonet A (eds) *Introducción al análisis espacial de datos en ecología y ciencias ambientales: métodos y aplicaciones*. Universidad Rey Juan Carlos, Asociación Española de Ecología Terrestre y Caja de Ahorros del Mediterráneo, Madrid, Spain, pp 542-590
- Zas R, Fernández-López J (2005) Juvenile genetic parameters and genotypic stability of *Pinus pinaster* Ait. open pollinated families under different water and nutrient regimes. *Forest Science* 51 (2):165-174
- Zas R, Merlo E (2008) El programa de mejora de *Pinus pinaster* en Galicia. *Boletín CIDEU* en prensa. URL: <http://www.uhu.es/cideu/Boletin/TemasBoletines.htm>

- Zas R, Merlo E, Fernández-López J (2004a) Genetic parameter estimates for maritime pine in the Atlantic coast of North-west Spain. *Forest Genetics* 11 (1):45-53
- Zas R, Merlo E, Fernández-López J (2004b) Genotype x Environment Interaction in Maritime pine families in Galicia, Northwest Spain. *Silvae Genetica* 53 (4):175-182
- Zas R, Solla A, Sampedro L (2007) Variography and kriging allow screening *Pinus pinaster* resistant to *Armillaria ostoyae* in field conditions. *Forestry* 80 (2):201-209
- Zobel B, Talbert J (1988) Applied forest tree improvement. John Wiley & Sons, New York



---

## **10. ANEXOS**

---



**10.1. ANEXO 1: PARCELAS DE ENSAYO Y  
MATERIAL GENÉTICO**

---

## 10.1. ANEXO 1. Parcelas de ensayo y material genético

Para responder a los objetivos planteados en este trabajo se han testado, en condiciones de campo y bajo condiciones controladas, una amplia variedad de materiales genéticos de pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) con diferentes niveles de estructuración genética. Para el ensayo en condiciones controladas se cultivó y multiplicó material híbrido interprocedencia, y para las evaluaciones en campo se utilizó la red de ensayos genéticos del programa de mejora para Galicia-Costa que tenían la edad suficiente para este tipo de evaluaciones.

A continuación se caracterizan las series de ensayo del programa de mejora utilizadas y el material genético incluido en cada una de ellas así como el utilizado para el ensayo en condiciones controladas. Al final del presente Anexo se muestra información pormenorizada de cada sitio de ensayo de manera individualizada.

### 10.1.1. Series de ensayo

a) Serie de 1995 (Capítulo III): Se trata de un ensayo de progenies de polinización abierta multiambiente que incluye un subconjunto de entre 78 y 101 de las progenies del total de los 116 árboles instalados en los huertos semilleros del programa de mejora. Fue instalada en los años 1994 y 1995 e incluye cuatro sitios: *As Neves*, *Bamio*, *Cortegada* y *Lalín*, todos ellos en la zona costera o en la frontera con la interior (RIU s 1 y 3), que constituye a priori el área de uso del material seleccionado de estos huertos (Figura A1, Anexo 1). El clima en los sitios se caracteriza por un marcado carácter Atlántico con precipitaciones anuales relativamente altas, escasa sequía estival y baja oscilación térmica anual. *Cortegada* y *Lalín* muestran una ligera influencia Mediterránea con precipitaciones anuales y estivales más bajas (Tabla A1, Anexo 1). Las plántulas en contenedor Super Leach (125 cm<sup>3</sup>) fueron plantadas en base a un diseño de bloques completos al azar (BCA) con 10 réplicas, unidades experimentales de cinco árboles en línea y un marco de plantación de 3×3 m. No existen testigos. Se dispone de mediciones a los tres, cinco y ocho años después de la plantación según el sitio considerado.

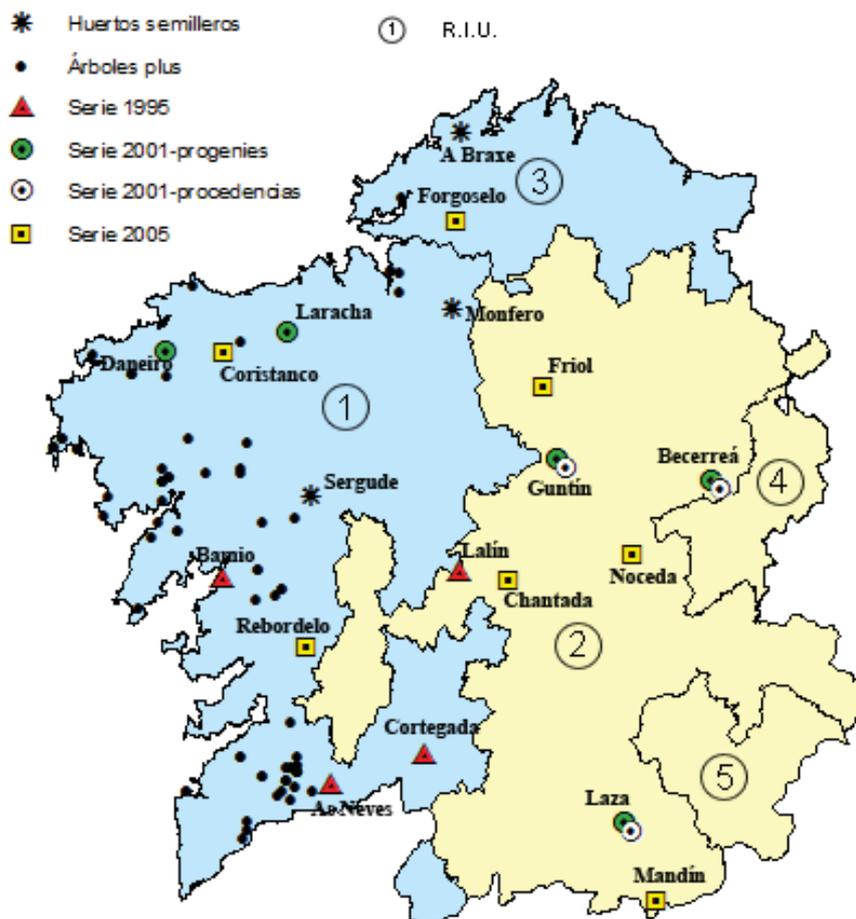
b) Serie de 2001-progenies (Capítulos I, II y III): Ensayo de progenies multiambiente que consta de cinco sitios de ensayo ubicados en la zona costera e interior de Galicia: *Becerreá*, *Daneiro*, *Guntín*, *Laracha* y *Laza*, instalados durante la

primavera del año 2001. El número de familias de polinización abierta representadas en cada sitio es de 111. Además se incluyeron en el diseño seis familias del programa de mejora de Australia Occidental (Western Australia) con diferentes orígenes genéticos. *Daneiro* y *Laracha* se sitúan en la zona costera (RIU 1), mientras que *Becerreá*, *Guntín* y *Laza* están localizadas dentro de las RIUs número 2 y 4 que incluyen la mayor parte de la zona interior de Galicia y constituye una zona de transición hacia el clima más continental y Mediterráneo característico de las áreas interiores de la Península Ibérica, con sequía estival prolongada y amplia oscilación térmica (Tabla A1 y Figura A1, Anexo 1). *Becerreá* es el sitio más frío, mientras que *Guntín* y *Laza* muestran baja precipitación anual y estival, siendo *Laza* la más seca de las dos. Las plántulas en contenedor Super Leach (125 cc) fueron plantadas siguiendo un diseño de bloques completos al azar (BCA) con 25 réplicas (excepto *Daneiro* con 23 réplicas), unidades experimentales de un solo árbol y un marco de plantación de 3×2 m (excepto *Laza*, con marco de 2,5×2 m). Tampoco en esta serie existen testigos. Se dispone de mediciones a los tres y siete años después de la plantación según el sitio considerado.

c) Serie de 2001-procedencias (Capítulos I y II): Ensayo de procedencias multiambiente instalado de forma adyacente a los ensayos de progenies del interior de la serie de 2001: *Becerreá*, *Guntín* y *Laza* (Figura A1, Anexo 1). Se plantaron y midieron de forma conjunta con los ensayos de progenies, por lo que comparten marco, protocolo de plantación y mediciones. Se incluyeron siete procedencias del interior peninsular con potencial para su uso en el interior de Galicia (Tabla A3, Anexo 1). No se incluyeron testigos. Siguen un diseño de bloques completos al azar (BCA) con 10 réplicas y unidades experimentales de cinco árboles en línea.

d) Serie de 2005 (Capítulo III): Ensayo de progenies multiambiente instalado durante la primavera del año 2005 que se compone de siete sitios de ensayo: *Chantada*, *Coristanco*, *Forgoselo*, *Friol*, *Mandín*, *Noceda* y *Rebordelo*. En esta serie están representadas la totalidad de las 116 familias de los huertos (excepto en *Chantada* con 94 familias). Tres de los sitios (*Coristanco*, *Forgoselo* y *Rebordelo*) se sitúan en la zona costera (RIUs 1 y 3), mientras que *Chantada*, *Friol*, *Mandín* y *Noceda* se localizan en la zona interior (Tabla A1 y Figura A1, Anexo 1). *Chantada* es el sitio más frío, mientras que *Noceda* y *Mandín* tienen la mayor influencia Mediterránea. Se empleó también contenedor Super Leach (125 cm<sup>3</sup>) clavado en la era del vivero para evitar el repicado de la raíz principal y la emisión de raíces secundarias que pudieran causar enrollamientos en el fondo del envase. Dada la ausencia de raíces secundarias se

introdujo una semilla de trigo que generase un cepellón facilitando el transplante. El diseño experimental fue de bloques incompletos (BI) resoluble  $\alpha$ -lattice, donde los BI pueden ser agrupados en bloques completos (BC) de tal manera que cada familia aparece representada una vez en cada réplica. Estos ensayos cuentan con 96 bloques (BI) con forma rectangular de 10 familias cada uno agrupados en ocho réplicas, tres plantas contiguas por unidad experimental a un marco de plantación de 3x2 m. Se incluyeron tres testigos comerciales, uno de uso habitual en la costa de Galicia, otro en el interior y el último de origen de Landas (Francia), de uso frecuente cuando se carece de semilla local. Se dispone de mediciones a uno, dos y tres años después de la plantación en todos los sitios.



**Figura A1** Localización de los huertos semilleros, árboles plus y series de ensayo del programa de mejora Galicia-Costa. Los números corresponden a las 'regiones de identificación y uso de los materiales forestales de reproducción' (RIUs).

**Tabla A1** Localización, diseño, características ambientales y calidad de estación para las tres series de ensayos de progenies. Los datos de clima y estación corresponden a los tres primeros años desde la plantación, salvo en los sitios con (\*) y con (+) que corresponden a los siete y ocho primeros años respectivamente.

Código	SERIES DE ENSAYOS														
	1995				2001				2005						
	As Neves <sup>+</sup>	Bamio <sup>+</sup>	Cortegada <sup>+</sup>	Lalín <sup>+</sup>	Beceerrea <sup>*</sup>	Daneiro	Guntín <sup>*</sup>	Laracha	Laza <sup>*</sup>	Coristanco	Chantada	Forgoso	Friol	Mandín	Noceada
ASN	BAM	CRT	LAL	BEC	DAN	GUN	LAR	LAZ	COR	CHA	FOR	FRI	MAN	NOC	REB
1995	1995	1994	1994	2001	2001	2001	2001	2001	2005	2005	2005	2005	2005	2005	2005
3×3	3×3	3×3	3×3	3×2	3×2	3×2	3×2	2×2,5	3×2	3×2	3×2	3×2	3×2	3×2	3×2
8,407°	8,740°	8,114°	7,995°	7,175°	8,918°	7,678°	8,528°	7,492°	8,732°	7,839°	7,989°	7,719°	7,394°	7,448°	8,476°
42,140°	42,627°	42,210°	42,641°	42,837°	43,160°	42,900°	43,202°	42,040°	43,160°	42,619°	43,461°	43,070°	41,860°	42,674°	42,463°
N° fam. <sup>3</sup>	87	101	94	111	111	111	111	111	116	94	116	116	116	116	116
Diseño <sup>4</sup>	BCA	BCA	BCA	BCA	BCA	BCA	BCA	BCA	BI	BI	BI	BI	BI	BI	BI
N° réplicas	10	10	10	25	23	25	25	25	8	8	8	8	8	8	8
N° pl/ue	5	5	5	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3
Altitud (m)	525	300	530	700	210	550	252	770	300	680	550	520	600	550	350
Orientación	E	N	S	S	SEE	O	SO	NE	NE	E	O	NO	SO	SSO	NO
Pte (%)	25	27	5	10	30	3	2	18	0	0	30	3	12	14	7
P <sup>5</sup>	1850	1875	1106	1136	1408	851	1185	706	2050	1216	1321	980	661	561	1518
Pe <sup>6</sup>	131	151	118	107	170	134	134	100	187	120	147	99	102	86	169
IG <sup>7</sup>	36,8	29,9	19,7	38,3	22,3	34,9	26,3	66,5	23,5	47,2	13,4	25,7	67,9	57,9	48,5
T <sup>8</sup>	14,9	14,3	12,6	11,4	8,5	13,4	13,4	13,0	12,2	9,1	10,8	10,3	13,1	12,1	13,6
N° heladas <sup>9</sup>	4	0	13	63	63	39	16	29	9	31	14	19	36	28	2
Tmin <sup>10</sup>	-1,4	0,2	-3,4	-8,0	-7,8	-4,2	-4,2	-4,7	-3	-7,0	-3,3	-4,4	-6,0	-5,0	-0,9
Tmm <sup>11</sup>	4,4	6,6	2,9	0,0	-0,2	4,4	3,8	1,8	3	1,1	2,5	1,5	0,7	1,4	4,3
H3 (cm) <sup>12</sup>			134,2±		109,1±	78,6±	134,1±	87,2±	113,8±	105,1±	78,2±	91,4±	83,4±	89,9±	155,4±
			24,9		18,3	16,5	26,3	15,8	19,1	21,6	19,2	21,4	20,9	20,0	29,3
H8 (cm) <sup>12</sup>			558,1±		294,9±	347,8±		295,0±							
	514,6±	492,1±	440,8±					48,0							
	69,9	66,4	73,9		44,8	52,8									

<sup>1</sup> Año de instalación; <sup>2</sup> Marco de plantación (m); <sup>3</sup> Número de familias incluidas; <sup>4</sup> BCA: Bloques completos al azar; BI: Bloques incompletos; <sup>5</sup> Precipitación anual (mm); <sup>6</sup> Precipitación estival durante los meses de Junio, Julio y Agosto (mm); <sup>7</sup> Índice de Gausson =  $\Sigma(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$  (P: precipitación mensual (mm), T: temperatura media mensual (°C)); <sup>8</sup> Temperatura media anual (°C); <sup>9</sup> Número anual de días de helada (Tmin<0 °C); <sup>10</sup> Temperatura mínima absoluta (°C); <sup>11</sup> Temperatura media de las mínimas del mes más frío (°C); <sup>12</sup> Media global y desviación típica para la altura a los tres u ocho años.

### **10.1.2. Material genético**

#### *10.1.2.1. Progenies del plan de mejora Galicia-Costa (Capítulos I, II y III)*

En el marco del programa de mejora genética de *Pinus pinaster* para Galicia-Costa se preseleccionaron fenotípicamente, a finales de los años 80, 180 árboles superiores en masas de calidad de la región costera de Galicia, de los que finalmente 128 fueron seleccionados por sus buenas características de crecimiento, espesor de corteza, ramosidad y rectitud del fuste. 116 de los 128 árboles fueron clonados con éxito mediante injerto de sustitución de yema terminal y se establecieron en 1991 en el primer huerto semillero clonal del programa situado en Sergude (Figura A1, Anexo 1; 42° 49' N, 8° 28' O), constituyendo la población de mejora del programa. Este huerto consta de 10 ramets de cada clon con un diseño de bloques completos al azar restringido, y fue certificado en 2001 como material de base para la obtención de material forestal de reproducción de la categoría cualificado (BOE nº23, 26-01-2001), comenzando a producir semilla en 1995 y estabilizando su producción alrededor del año 2000.

En 1998 se instaló el segundo huerto semillero en Monfero (Figura A1, Anexo 1; 43° 15' N, 8° 0' O) que constituye una réplica del de Sergude, y fue registrado en 2007 en el Rexistro Galego de Materiais de Base (DOG nº77, 20-04-2007), entrando en producción en los últimos años.

Finalmente en 2008 se instaló un huerto semillero depurado en base a los resultados de la serie de ensayos de progenie de 1995 con 78 de los árboles plus originales de comportamiento superior contrastado. Este huerto situado en A Braxe (Figura A1, Anexo 1; 43° 40' N, 7° 58' O) ha sido incluido en 2009 en el Rexistro Galego de Materiais de Base para la producción de material forestal de reproducción de la categoría controlado (DOG nº32, 16-02-2009).

Las tres series de ensayos de progenie de 1995, 2001 y 2005 utilizadas en este trabajo (Capítulos I, II y III) incluyen familias de medios hermanos de la totalidad o de parte de la población de mejora y fueron obtenidas por polinización abierta en el huerto semillero de Sergude, que por su mayor edad y calidad de estación es el que presenta una mayor y mejor producción (200-250 kg de semilla/año).

Dada la diferente representación familiar en cada uno de los sitios de ensayo de las diferentes series se muestra en la Tabla A2, Anexo 1, el equilibrio conjunto del diseño. Este equilibrio cobra especial importancia en el análisis del Capítulo III donde se realizaron análisis conjuntos de todas las series.

**Tabla A2** Equilibrio del diseño experimental en cuanto a la representación familiar en cada ensayo de progenies ("x": presencia).

Familia	SITIOS DE ENSAYO																Σ <sup>1</sup>
	ASN	BAM	BEC	COR	CRT	DAN	FOR	FRI	GUN	LAL	LAR	LAZ	MAN	NOC	REB	CHA	
1000	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		15
1001	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	15
1002	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1003	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1004	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1005	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	15
1006	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1007	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1009			x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	13
1010			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	14
1011	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1012	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	15
1014	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1016	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1017	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1018	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1019	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		15
1020	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1022	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	14
1023	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		15
1025	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		15
1026			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	14
1027	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1028	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	14
1029	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	15
1030	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1031	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1032	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1033	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1034	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	14
1035	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1036	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	15
1037	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1038			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	14
1040	x	x															2
1042	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		15
1043	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1044	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1045	x	x		x	x		x	x					x	x	x	x	10
1046	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1048	x	x			x				x								4
1049	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	15
1050	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1051	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		15
1052	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1053	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1055	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1056	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1057	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1058			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	14
1059	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1060			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	14
1061				x	x		x	x		x			x	x	x		8
1062	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1063	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	15
1064	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
1066	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
2001			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	14
2002	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16
2003	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	15
2004			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	14
2005			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	14
2007				x	x		x	x					x	x	x	x	8
2008	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	16

Familia	SITIOS DE ENSAYO																$\Sigma^1$
	ASN	BAM	BEC	COR	CRT	DAN	FOR	FRI	GUN	LAL	LAR	LAZ	MAN	NOC	REB	CHA	
2011			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	14
2012	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2013	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15
2015			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		13
2017	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2018	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2019	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2021	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2024			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	14
2025	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	14
2026	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2028	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2029	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2031	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15
2032	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2033	X	X															2
2034	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15
2035	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15
2036	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2037			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	14
2038	X	X															2
2040	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15
2041	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15
2042			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		13
2043			X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X		11
2044			X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	12
2045	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15
2046			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	14
2047	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
2048			X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	12
2050	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	14
2051			X	X	X		X	X		X		X	X	X	X	X	8
2052	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	14
2053	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	14
2054			X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	13
2057				X	X		X	X		X		X	X	X			8
2058			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	14
2059					X				X								2
2060	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15
2061	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15
2062	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15
2063			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	14
2064			X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	12
2066			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	14
2068	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	14
2070			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	14
2072	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		15
2073	X	X															2
2074			X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	12
2075			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	13
2076			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	14
2077			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	13
2078			X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	13
2081	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	14
2082	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X		13
2083			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		13
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	16
AB	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	14
$\Sigma^2$	87	78	111	116	101	111	116	116	111	94	111	111	116	116	116	94	

<sup>1</sup> N° de sitios en los que está presente cada familia; <sup>2</sup> N° familias presentes en cada sitio de ensayo.

### 10.1.2.2. Procedencias Nemoromediterráneas del interior peninsular (Capítulos I y II)

Con el objetivo de encontrar orígenes genéticos alternativos para el interior de Galicia se instaló el ensayo multiambiente de 2001-procedencias dentro de esta región que incluyó siete procedencias del interior peninsular. Las procedencias fueron seleccionadas en base a los crecimientos aceptables y las buenas características de forma del fuste que mostraron previamente en ensayos con un espectro más amplio de la variabilidad total de la especie, por un lado en una localidad de la zona costera de Galicia (Molina 1965), y por otro en un ensayo multilocalidad en el interior peninsular (Alía et al. 2001).

De las siete procedencias representadas en los ensayos, en el presente trabajo se ha prescindido de una de ellas debido a su baja representación en los ensayos. A continuación se muestra la localización y las principales características climáticas de la región de origen de las procedencias utilizadas (Tabla A3 y Figura A2, Anexo 1), así como las principales características ecológicas de las masas que allí vegetan (Alía et al. 1996).



**Figura A2** Localización de las seis regiones de procedencia del interior peninsular evaluadas en tres ensayos en campo en el interior de Galicia.

**Bajo Tiétar:** Región caracterizada por la inexistencia de sequía estival debido a la cercanía del río Tiétar. Vegeta sobre suelos ácidos y arenosos. Población con caracteres

intermedios entre los de las masas de Sierra de Gredos y Portugal. Posee buenos crecimientos pero fustes de baja calidad, son característicos los fustes revirados de forma helicoidal.

**Sierra de Gredos:** Vegeta sobre suelos arenosos. Posee un comportamiento cercano a las procedencias más Atlánticas con crecimiento rápido en altura y algo más lento con respecto al diámetro, copa pequeña y espesor de corteza medio. En ensayos de procedencias ha demostrado tendencia al policiclismo, buena calidad de fuste y buen crecimiento.

**Montaña de Soria-Burgos:** Región con precipitación anual no muy elevada pero sin sequía estival. Vegeta sobre suelos de conglomerados, cuarcitas y arenas silíceas, con textura arenosa o franca y muy permeables. Representante típico de las masas de montaña, posee buenas formas con troncos rectos y esbeltos, copas pequeñas y corteza relativamente gruesa. En ensayos de procedencias presenta un crecimiento de tipo medio que se mantiene incluso en sitios pobres.

**Serranía de Cuenca:** Es uno de los núcleos fundamentales de la especie ya que fue el refugio glacial septentrional de la misma (Salvador et al. 2000). Crece sobre gran variedad de litologías, desde substrato silíceo a calizo, desde textura arenosa a arcillosa y desde pH ácido a básico. Comprende una gran diversidad poblacional, siendo el origen de Boniches el que alcanza los mejores crecimientos en los ensayos de procedencias con clima más benigno. Posee un crecimiento medio-alto, algo mejor en diámetro. Las características de forma del fuste son intermedias.

**Tabla A3** Principales características geográficas y climáticas en el origen de las procedencias estudiadas.

	Bajo Tiétar	Sierra de Gredos	Montaña de Soria-Burgos	Serranía de Cuenca	Albarracín	Sierra Segura-Alcaraz
Longitud (W)	5° 23'-5° 53'	4° 17'-5° 10'	2° 27'-3° 27'	0° 53'-2° 25'	1° 12'-1° 51'	1° 57'-3° 00'
Latitud (N)	39°50'-40°05'	40°07'-40°27'	41°43'-41°56'	39°25'-40°37'	40°03'-40°25'	37°46'-38°46'
Altitud (m)	400	600-1400	800-1200	800-1200	1000-1400	800-1400
Precipitación anual (mm)	1060	1398	686	684	878	787
Precipitación estival (mm)	70	83	105	101	155	65
Temperatura media anual (°C)	14,4	13,4	11,3	12,3	9,6	13,7
Media de las T <sup>a</sup> mínimas (°C) <sup>1</sup>	1,5	-0,2	-2,5	-1,1	-4,0	2,4
Oscilación térmica (°C) <sup>2</sup>	13,2	11,6	11,2	13,1	12,1	11,7

<sup>1</sup> Media de las mínimas diarias del mes más frío (°C).

<sup>2</sup> Media anual de la oscilación diaria (°C).

**Albarracín:** Región caracterizada por baja precipitaciones y temperaturas. Vegeta sobre suelos calcáreos poco evolucionados y también silíceos, con pH neutro y texturas francas o franco-arenosas.

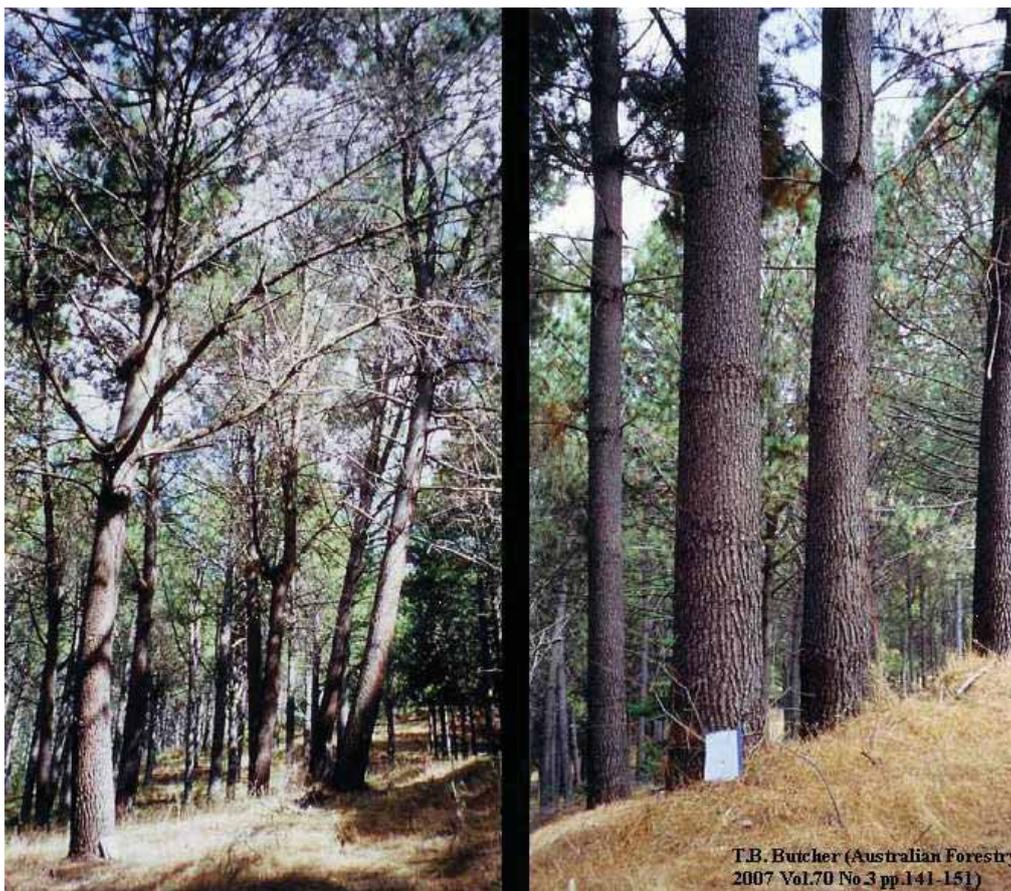
**Sierra de Segura-Alcaraz:** Vegeta sobre suelos de areniscas, margas y areniscas mesozoicas, con textura limoso-arcillosa o franca bastante limoso-arcillosa, pH moderado o fuertemente básico. Posee gran tolerancia a la sequía, gran calidad de sus fustes y crecimiento más lento que el de las poblaciones de las cordilleras ibéricas. Existe también una gran variabilidad dentro de la procedencia, destacando el origen de Cazorla caracterizado por árboles derechos, tronco sin ramas, no muy altos, corteza delgada, copa grande y muy ramificada.

#### *10.1.2.3. Familias del programa de mejora de Australia Occidental (Capítulos I y II)*

Desde 1957 se viene desarrollando en el estado de Australia Occidental un programa de mejora a largo plazo para *Pinus pinaster* a partir de la procedencia portuguesa de Leiría con excelentes resultados (Figura A3, Anexo 1). En un inicio, el objetivo era la producción de madera en suelos marginales de la región suroeste de este estado, mientras que en los últimos años el objetivo se ha centrado en resolver los problemas de salinidad en terrenos deforestados de bajas precipitaciones (400-600 mm) (Figura A4, Anexo 1), por lo que la resistencia a la sequía pronunciada se ha convertido en un carácter prioritario de máxima importancia.

La población base de mejora (G0) de este programa consiste en 304 individuos que fueron seleccionados en Leiría (Portugal) (85), dentro de la raza local de Australia Occidental con origen también en Leiría (196), en Sudáfrica (20) y dentro de la raza local del estado de Australia Meridional (3). La instalación de ensayos de progenies a partir de polinizaciones abiertas y controladas de este material ha permitido la selección de una segunda generación de mejora, y la instalación de huertos semilleros clonales de segunda generación.

En el presente estudio se han utilizado seis lotes de semilla de este programa de mejora, representados en la serie de ensayo 2001-progenies, todos ellos procedentes de polinización abierta en el huerto semillero clonal de segunda generación de Manjimup (34° 14' S, 116° 8' E) (Figura A4, Anexo 1). Los genotipos parentales de los que se recogieron estos lotes, y que fueron seleccionados en los ensayos de progenies por su comportamiento superior, proceden en cinco de los casos de polinizaciones controladas y en un caso de polinización abierta entre parentales de la población base (G0).



**Figura A3** Rodales demostrativos instalados en el Arboreto de Nannup (Australia Occidental) sometidos a idénticos tratamientos selvícolas. A la izquierda rodal de 37 años de edad de material no mejorado, a la derecha rodal de 34 años de edad de material mejorado procedente de los huertos semilleros de primera generación del programa de mejora de Australia Occidental (Foto tomada de Butcher, 2007).

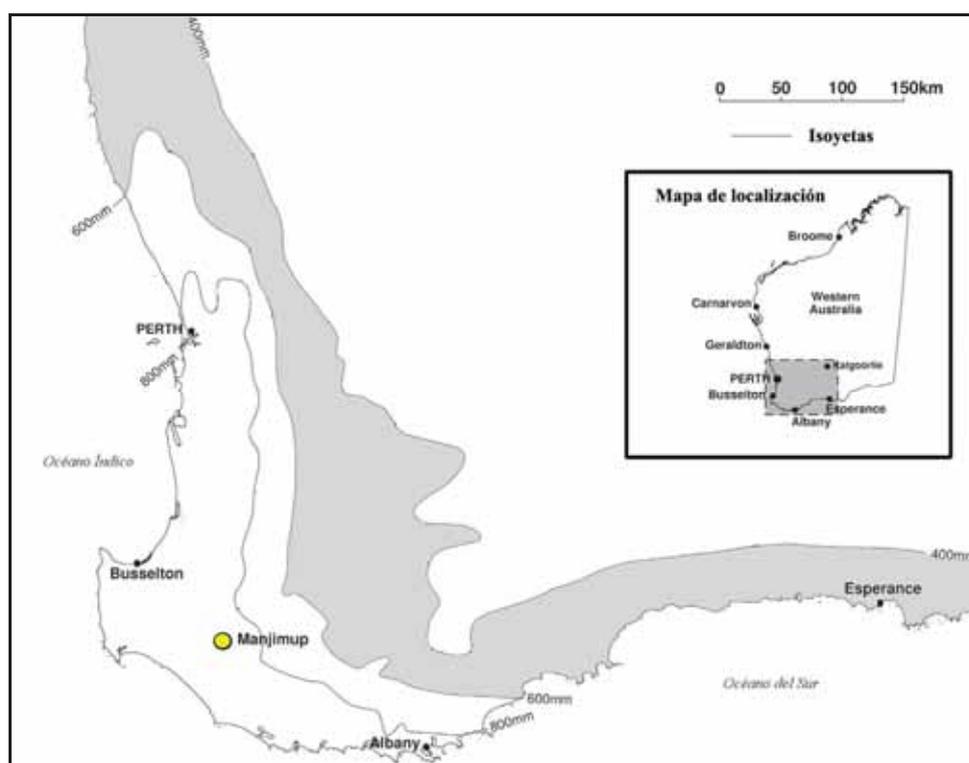
Los seis lotes de WA ensayados en el interior de Galicia fueron los siguientes:

- **WA1:** lote recogido sobre un clon procedente de polinización controlada entre un parental de la raza local de Australia Occidental y otro de la raza local de Australia Meridional que fue seleccionado por su vigor.
- **WA2:** lote recogido sobre un clon procedente de polinización controlada entre un parental Portugués y otro de la raza local de Australia Occidental que fue seleccionado por la buena forma del fuste y el reducido tamaño de las ramas.
- **WA3:** lote recogido sobre un clon procedente de polinización controlada entre dos parentales de la raza local de Australia Occidental y que fue seleccionado por la buena forma del fuste y el reducido tamaño de las ramas.
- **WA4:** lote recogido sobre un clon procedente de polinización controlada entre dos parentales de la raza local de Australia Occidental y que fue seleccionado por su

resistencia a la sequía, alta capacidad de floración, buen crecimiento y fuerte dominancia apical.

- **WA5:** lote recogido sobre un clon procedente de polinización abierta de un parental Portugués.

- **WA6:** lote formado por una mezcla de semillas recogidas en 11 clones procedentes todos ellos de polinización controlada y que se puede considerar como el rendimiento promedio del huerto semillero de Manjimup.

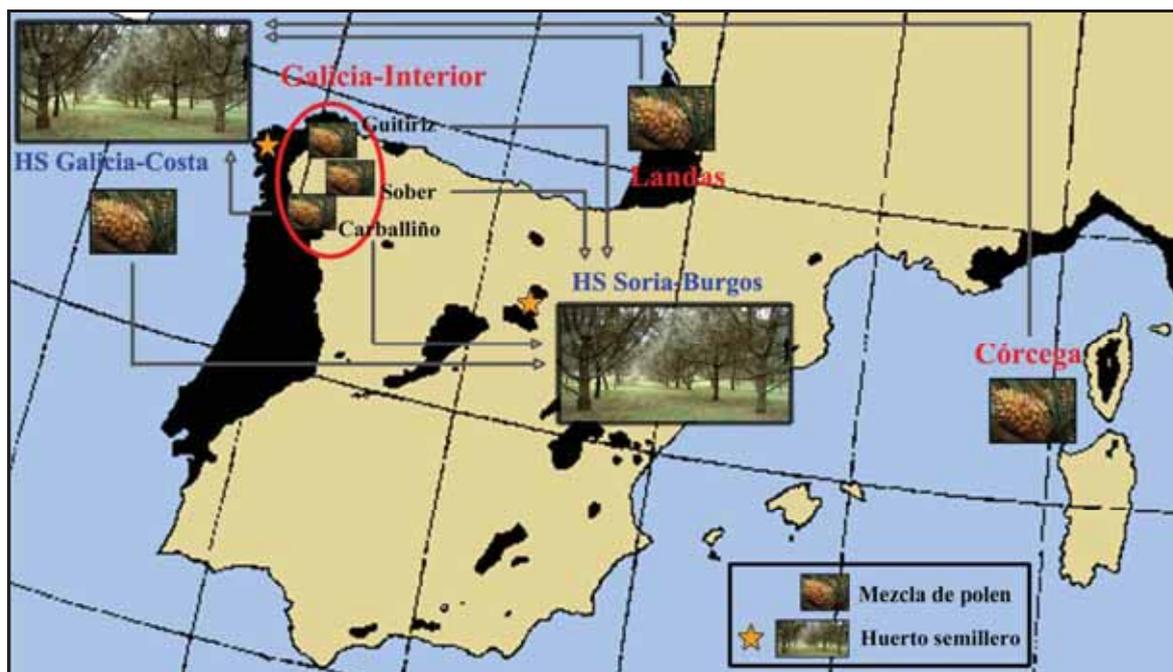


**Figura A4** Actual zona de plantación de *P. pinaster* (área sombreada), principales entidades de población y localización del huerto semillero de Manjimup en Australia Occidental.

#### 10.1.2.4. Híbridos interprocedencia (Capítulo IV)

La obtención de variedades híbridas sintéticas interprocedencia es una estrategia de mejora utilizada con éxito en numerosos programas para combinar características deseables de los diferentes orígenes. Con este fin se realizaron en el año 2003 una serie de polinizaciones controladas en las que se utilizaron procedencias Atlánticas y una selección de procedencias con mayor tendencia a la Mediterraneidad. La selección de las procedencias se realizó en base a los resultados obtenidos en un ensayo de procedencias en la zona Galicia-Costa (Molina 1965) y fueron las siguientes:

- **Galicia-Costa:** Se utilizaron cinco parentales de GC seleccionados en función de los valores de mejora estimados a partir de los ensayos de progenie establecidos en la región para las variables de crecimiento, rectitud y comportamiento estable.
- **Galicia -Interior:** en tres de los rodales selectos declarados para esta región de procedencia localizados en Carballiño (Ourense, 42° 25' 56" N, 8° 4' 32" O), Guitiriz (Lugo, 43° 11' 2" N, 7° 53' 36" O) y Sober (Lugo, 42° 27' 55" N, 7° 34' 56") se realizó una selección fenotípica de árboles superiores, seleccionándose los 5 mejores individuos de 15 candidatos preseleccionados en cada rodal. La separación mínima entre los individuos seleccionados fue de 400 m.
- **Landas:** procedencia seleccionada por su alto crecimiento. Se seleccionaron cinco árboles en una plantación de esta procedencia situada en La Garganta (Ciudad Real, 38° 28' 49" N, 4° 26' 55" O).
- **Córcega:** procedencia seleccionada por la rectitud del fuste. Se utilizó una mezcla de polen de una selección de cinco árboles en un ensayo de procedencias plantado en 1967 y localizado en Espinoso del Rey (Toledo, 39° 36' N, 4° 49' O).
- **Montaña Soria-Burgos:** procedencia seleccionada por buenos crecimientos y estabilidad del comportamiento. Se seleccionaron cinco genotipos en un huerto semillero clonal de primera generación de esta procedencia situado en Valsaín (Segovia, 40° 52' 5" N, 3° 59' 56" O).



**Figura A5** Esquema de las polinizaciones controladas para la obtención de los híbridos interprocedencia. Los huertos semilleros (HS) se simbolizan con una estrella amarilla. Las mezclas de polen provienen de una selección de cinco genotipos seleccionados en cada una de las poblaciones. Las flechas indican el origen del polen y el lugar de las polinizaciones controladas.

Las polinizaciones controladas fueron realizadas en los huertos semilleros de Sergude (Galicia-Costa) y Valsaín (Montaña Soria-Burgos). Los cinco clones de Sergude fueron polinizados con mezclas de polen procedentes de los cinco árboles seleccionados en Garganta (Lanzas), Córcega y Carballiño (Galicia-Interior) (Figura A5 y Tabla A4, Anexo 1). Cinco clones de Valsaín fueron polinizados con mezclas de polen de los cinco clones seleccionados en Sergude, y de los cinco árboles seleccionados en Carballiño, Guitiriz y Sober (Galicia-Interior) (Figura A5 y Tabla A4, Anexo 1).

Debido al escaso número de semillas obtenidas en las polinizaciones controladas fue necesario poner a punto un sistema de multiplicación vegetativa para amplificar el escaso material obtenido. Para ello se sembró el material híbrido junto con material de polinización abierta de las procedencias Galicia-Costa, Carballiño, Guitiriz y Sober (Galicia-Interior) y Montaña Soria-Burgos. La recogida de este material de polinización abierta se realizó en los mismos clones de los huertos semilleros de Sergude y Valsaín que se utilizaron como madres en las polinizaciones controladas, y de los árboles seleccionados en los rodales selectos de Galicia-Interior. Una vez sembrado el material y tras tres meses de crecimiento en invernadero, se realizó un estaquillado en cascada que permitió cubrir las necesidades de planta.

**Tabla A4** Poblaciones híbridas interprocedencia obtenidas mediante polinización controlada y controles obtenidos por polinización abierta de las procedencias que participaron en los cruzamientos y que fueron evaluadas en ensayos en campo y bajo condiciones controladas de sequía (Capítulo IV).

<b>COD</b>	<b>POBLACIÓN</b>	<b>MADRE</b>	<b>PADRE</b>
GC	Galicia-Costa	Galicia-Costa (5 clones Sergude)	Polinización abierta en Sergude
GC×C	Galicia-Costa × Córcega	“	Mezcla de polen 5 genotipos de Córcega
GC×L	Galicia-Costa × Landas	“	Mezcla de polen 5 genotipos de Landas
GC×IN1	Galicia-Costa × Carballiño	“	Mezcla de polen 5 genotipos de Carballiño
SB	Soria-Burgos	Soria-Burgos (5 clones Valsaín)	Polinización abierta en Valsaín
SB×GC	Soria-Burgos × Galicia-Costa	“	Mezcla de polen 5 clones de Sergude
SB×IN1	Soria-Burgos × Carballiño	“	Mezcla de polen 5 genotipos de Carballiño
SB×IN2	Soria-Burgos × Guitiriz	“	Mezcla de polen 5 genotipos de Guitiriz
SB×IN3	Soria-Burgos × Sober	“	Mezcla de polen 5 genotipos de Sober
IN1	Galicia-Interior Carballiño	5 genotipos de Carballiño	Polinización abierta en Carballiño
IN2	Galicia-Interior Guitiriz	5 genotipos de Guitiriz	Polinización abierta en Guitiriz
IN3	Galicia-Interior Sober	5 genotipos de Sober	Polinización abierta en Sober

Para evaluar la versatilidad de estas poblaciones híbridas en el interior de Galicia se realizaron tres aproximaciones experimentales:

a) Establecimiento de un ensayo en condiciones controladas con distintos regímenes de disponibilidad de agua (Capítulo IV). Se utilizaron las siete poblaciones de material híbrido y cinco poblaciones control, con tres genotipos madre comunes para aquellas poblaciones que compartían madre, dos tratamientos de sequía, cuatro réplicas y una planta por unidad experimental (Tabla A4, Anexo 1).

b) Ensayo en condiciones controladas de resistencia al frío. Se utilizó el mismo material que en el ensayo anterior. Lamentablemente, problemas técnicos en las cámaras de frío provocaron la pérdida completa del material e imposibilitó obtener resultados analizables. Esta sección no se incluye en la presente tesis doctoral.

c) Instalación en campo de tres ensayos clonales con el material híbrido a finales de 2008, que permitirá la evaluación de éste a largo plazo en condiciones reales de uso. Dos se instalaron en la zona interior, de manera adyacente a los ensayos de progenies de Mandín y Noceda (Figura A1, Anexo 1), y el tercero en la costa (Rianxo, Pontevedra).

En cada uno se representaron también las siete poblaciones de material híbrido y las cinco poblaciones control, 4-5 familias por población, una planta por unidad experimental y 15 réplicas. Los mismos clones instalados en estos ensayos se han representado en un banco clonal instalado en el Centro de Investigaciones Forestales de Lourizán para su conservación. Debido a la corta edad de estos ensayos de campo, no se han utilizado en el presente trabajo.



## **FICHAS DE LAS PARCELAS DE ENSAYO**

---

# AS NEVES (ASN)

## Localización

**Provincia:** Pontevedra

**Ayuntamiento:** As Neves

**Parroquia:** Taboexa

**Coordenadas geográficas:** 42° 08' 22" N – 08° 24' 25" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 549000 X – 4665500 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 1995

**Año de plantación:** Noviembre de 1995

**Pendiente:** 25 %                      **Exposición:** E

**Superficie:** 4,3 ha                      **Altitud:** 525 m                      **RIU:** 1

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 82 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** No existen

## Diseño experimental

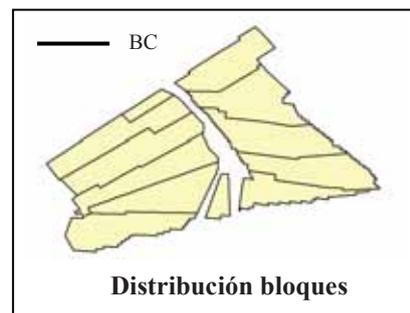
**Tipo:** Bloques completos al azar

**Nº de plantas:** 4.100                      **Nº de familias:** 82

**Nº de réplicas:** 10                      **Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 3×3 m

**Unidad experimental:** 5 plantas en línea



## Mediciones

**Año 2003:** Altura (H8), Diámetro a 1,3 m (D8), Rectitud (REC8), Bifurcación (BIF8), Inclinación (INC8), Nº ramas en el verticilo inferior (NR8), Diámetro de la rama más gruesa en el verticilo inferior (DR8), Nº de verticilos (VER8), Ángulo de inserción de las ramas (ANG8).

## Características climáticas (8 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 1850 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 131 mm

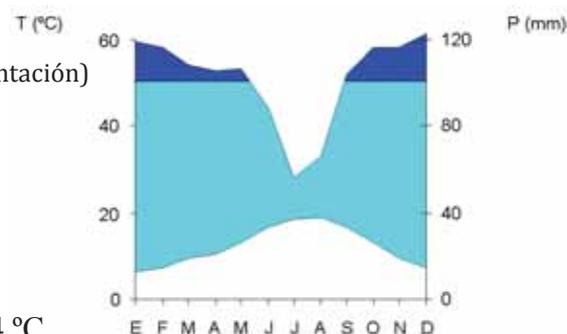
**Índice de Gaussen**  $\sum(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ : 36,8

**Temperatura media anual:** 14,9 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 4

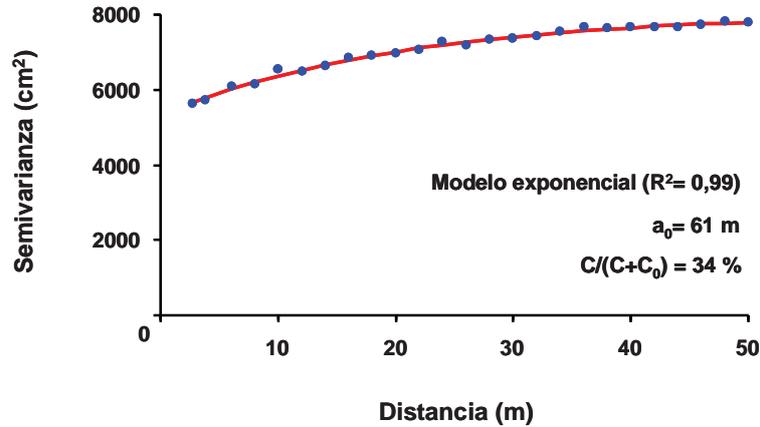
**Temperatura mínima absoluta:** -1,4 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 4,4 °C

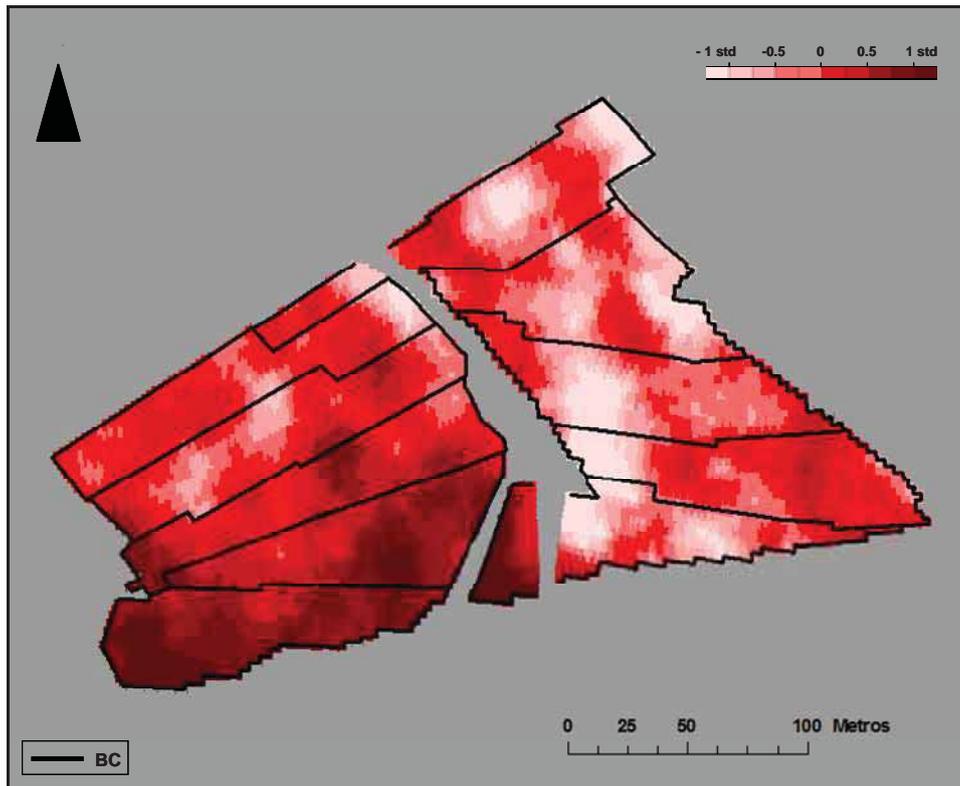


Climodiagrama de Walter-Lieth

## Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 8 años (H8)



**Figura A6** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A7** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de  $0,25$  STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# BAMIO (BAM)

## Localización

**Provincia:** Pontevedra

**Ayuntamiento:** Vilagarcía

**Parroquia:** Bamio

**Coordenadas geográficas:** 42° 37' 34" N – 08° 44' 25" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 521300 X – 4719400 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 1995

**Año de plantación:** Noviembre de 1995

**Pendiente:** 27 %                      **Exposición:** N

**Superficie:** 3,8 ha                      **Altitud:** 300 m                      **RIU:** 1

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 73 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** No existen

## Diseño experimental

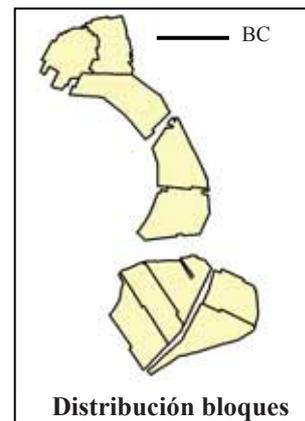
**Tipo:** Bloques completos al azar

**Nº de plantas:** 3.650                      **Nº de familias:** 73

**Nº de réplicas:** 10                      **Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 3×3 m

**Unidad experimental:** 5 plantas en línea



## Mediciones

**Año 2003:** Altura (H8), Diámetro a 1,3 m (D8), Rectitud (REC8), Bifurcación (BIF8), Inclinación (INC8), Nº ramas en el verticilo inferior (NR8), Diámetro de la rama más gruesa en el verticilo inferior (DR8), Nº de verticilos (VER8), Ángulo de inserción de las ramas (ANG8).

## Características climáticas (8 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 1875 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 151 mm

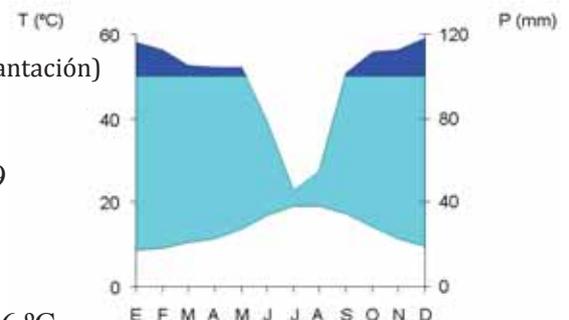
**Índice de Gaussen**  $[\Sigma(2T-P)]$  para cada mes donde  $2T > P$ : 29,9

**Temperatura media anual:** 14,3 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 0

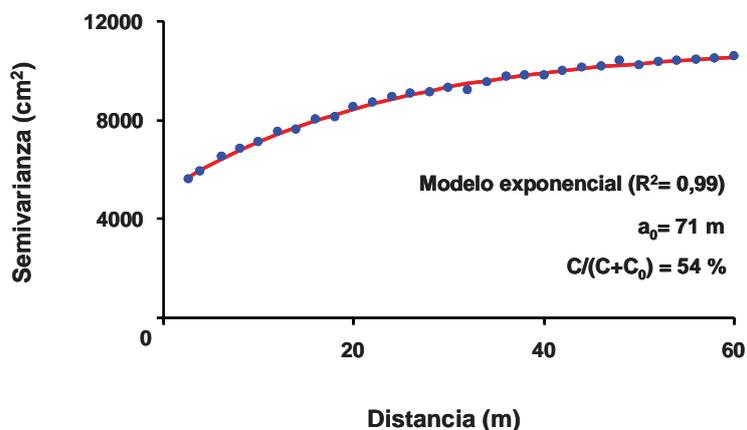
**Temperatura mínima absoluta:** 0,2 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 6,6 °C

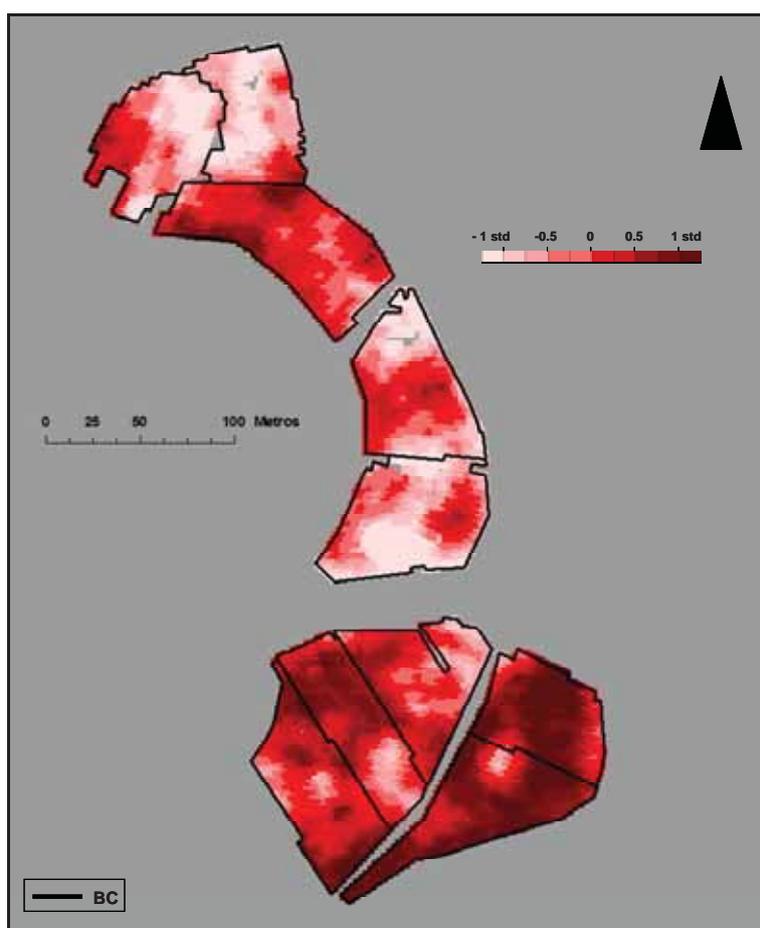


Climodiagrama de Walter-Lieth

## Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 8 años (H8)



**Figura A8** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A9** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de  $0,25$  STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# CORTEGADA (CRT)

## Localización

**Provincia:** Ourense

**Ayuntamiento:** Cortegada

**Parroquia:** Refoxos

**Coordenadas geográficas:** 42° 12' 34" N – 08° 06' 52" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 573100 X – 4673500 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 1995

**Año de plantación:** Noviembre de 1994

**Pendiente:** 5 %

**Exposición:** S

**Superficie:** 4,8 ha

**Altitud:** 530 m

**RIU:** 1

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 95 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** No existen

## Diseño experimental

**Tipo:** Bloques completos al azar

**Nº de plantas:** 4.750

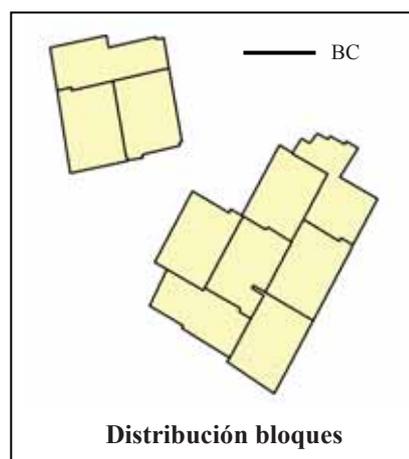
**Nº de familias:** 95

**Nº de réplicas:** 10

**Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 3×3 m

**Unidad experimental:** 5 plantas en línea



## Mediciones

**Año 1997:** Altura (H3). **Año 1999:** Altura (H5). **Año 2002:** Altura (H8), Diámetro a 1,3 m (D8), Rectitud (REC8), Bifurcación (BIF8), Inclinación (INC8), Nº ramas en el verticilo inferior (NR8), Diámetro de la rama más gruesa en el verticilo inferior (DR8), Nº de verticilos (VER8), Ángulo de inserción de las ramas (ANG8).

## Características climáticas (8 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 1106 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 118 mm

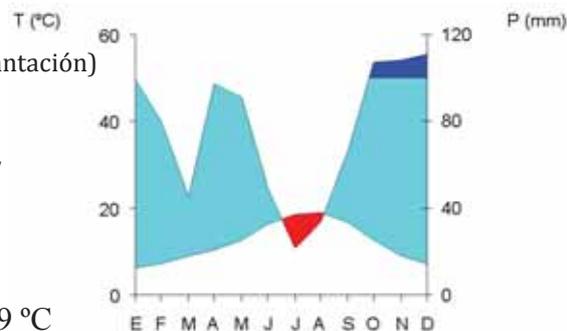
**Índice de Gaussen**  $[\Sigma(2T-P)]$  para cada mes donde  $2T > P$ : 19,7

**Temperatura media anual:** 12,6 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 13

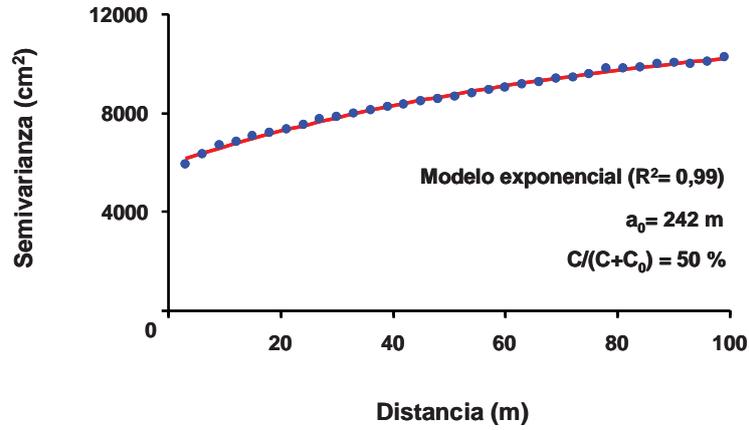
**Temperatura mínima absoluta:** -3,4 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 2,9 °C

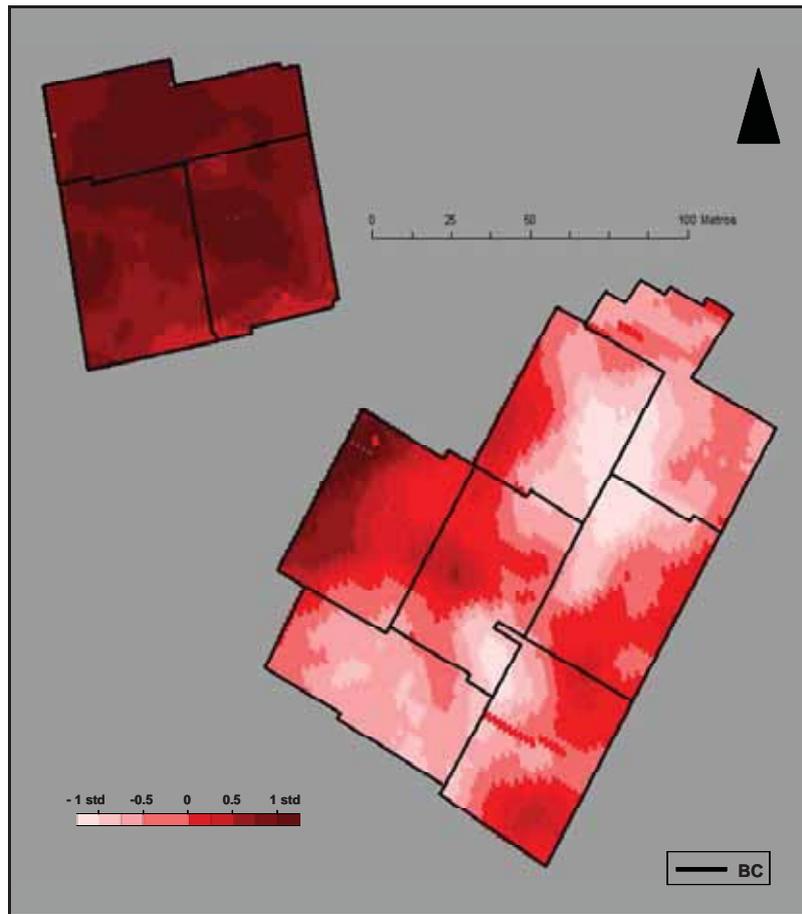


Climodiagrama de Walter-Lieth

**Geoestadísticas del crecimiento:** Para la altura a los 8 años (H8)



**Figura A10** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A11** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de  $0,25$  STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# LALÍN (LAL)

## Localización

**Provincia:** Pontevedra

**Ayuntamiento:** Rodeiro

**Parroquia:** Castro de cabras

**Coordenadas geográficas:** 42° 38' 24" N – 07° 59' 42" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 582400 X – 4721400 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 1995

**Año de plantación:** Noviembre de 1994

**Pendiente:** 10 %

**Exposición:** S

**Superficie:** 4,5 ha

**Altitud:** 700 m

**RIU:** 2

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 93 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** No existen

## Diseño experimental

**Tipo:** Bloques completos al azar

**Nº de plantas:** 4.650

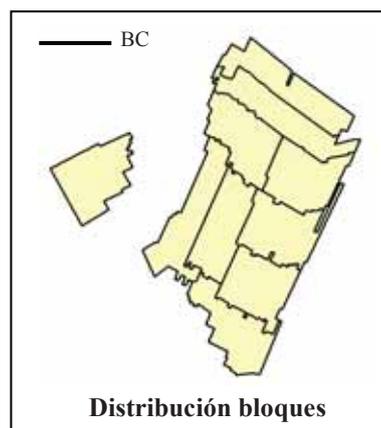
**Nº de familias:** 93

**Nº de réplicas:** 10

**Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 3×3 m

**Unidad experimental:** 5 plantas en línea



## Mediciones

**Año 1999:** Altura (H5). **Año 2002:** Altura (H8), Diámetro a 1,3 m (D8), Rectitud (REC8), Bifurcación (BIF8), Inclinación (INC8), Nº ramas en el verticilo inferior (NR8), Diámetro de la rama más gruesa en el verticilo inferior (DR8), Nº de verticilos (VER8), Ángulo de inserción de las ramas (ANG8).

## Características climáticas (8 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 1136 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 107 mm

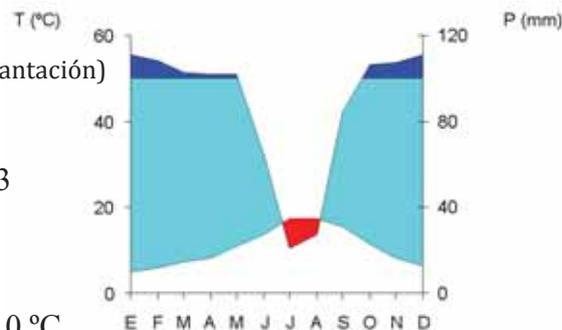
**Índice de Gaussen**  $\Sigma(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ : 38,3

**Temperatura media anual:** 11,4 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 63

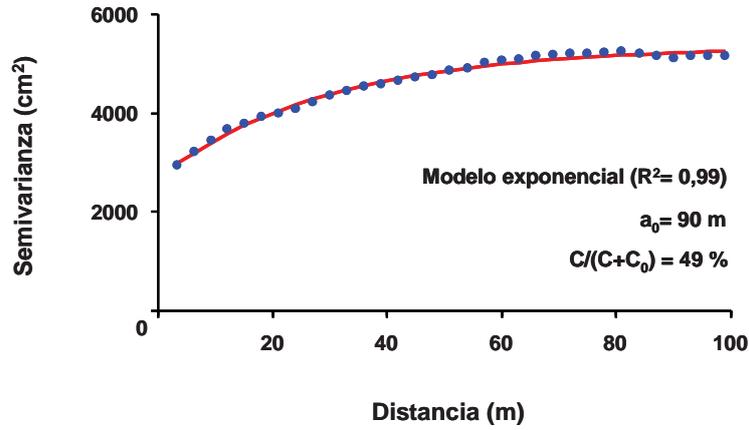
**Temperatura mínima absoluta:** -8,0 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 0,0 °C



Climodiagrama de Walter-Lieth

**Geoestadísticas del crecimiento:** Para la altura a los 8 años (H8)



**Figura A12** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A13** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de  $0,25$  STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

## BECERREÁ (BEC)

### Localización

**Provincia:** Lugo

**Ayuntamiento:** Becerreá

**Parroquia:** Vilouta

**Coordenadas geográficas:** 42° 27' 46" N – 08° 28' 34" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 543080 X – 4701364 Y



### Datos generales

**Serie de ensayo:** 2001

**Año de plantación:** Junio de 2001

**Pendiente:** 30 %

**Exposición:** S

**Superficie:** 1,8 ha

**Altitud:** 900 m

**RIU:** 4

### Material genético testado

#### Ensayo 1

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo **Origen:** Galicia-costa

**Genotipos:** 111 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** 6 familias del programa de mejora de Australia Occidental (WA)

#### Ensayo 2

**Tipo:** Procedencias **Origen:** Interior Peninsular **Testigos:** No existen

**Genotipos:** 7 procedencias: Bajo Tiétar, Sª de Gredos, Mtna. Soria-Burgos, Sª de Cuenca, Albarracín, Sª Segura-Alcaraz y Sª de Gata-Hurdes

### Diseño experimental

#### Ensayo 1

**Tipo:** Bloques completos al azar

**Nº de plantas:** 2.925

**Nº de familias:** 111

**Nº de réplicas:** 25

**Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 1 planta

#### Ensayo 2

**Tipo:** Bloques completos al azar **Nº de plantas:** 305

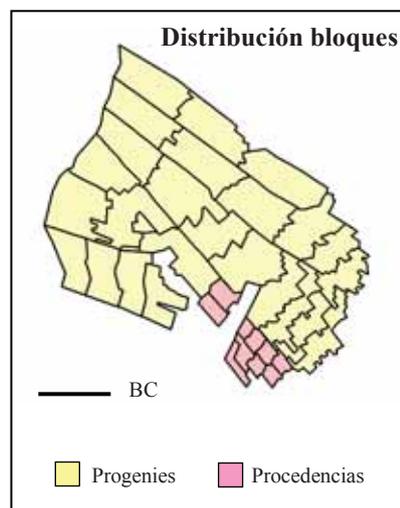
**Nº de procedencias:** 7

**Nº de réplicas:** 10

**Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 5 plantas en línea.

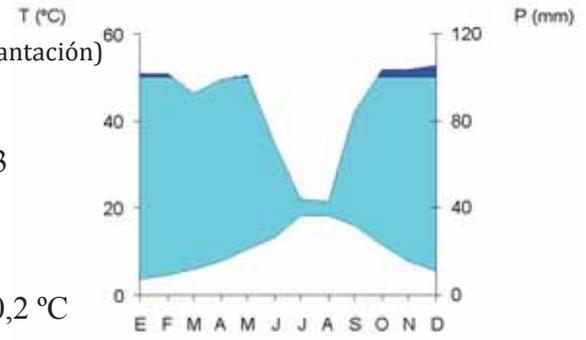


### Mediciones

**Año 2004:** Altura (H3), Rectitud (REC3), Bifurcación (BIF3), Inclinación (INC3), Nº de verticilos (VER3). **Año 2008:** Altura (H7), Diámetro a 1,3 m (D7), Rectitud (REC7), Bifurcación (BIF7), Inclinación (INC7), Nº de verticilos (VER7).

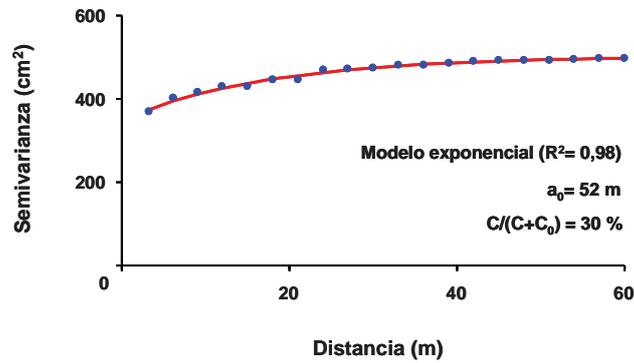
**Características climáticas** (7 primeros años tras plantación)

- Precipitación anual: 1408 mm
- Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto): 170 mm
- Índice de Gaussen [ $\Sigma(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ ]: 22,3
- Temperatura media anual: 8,5 °C
- Número anual de días de helada ( $T_{min} < 0$  °C): 63
- Temperatura mínima absoluta: -7,8 °C
- Temperatura media de las mínimas del mes más frío: -0,2 °C

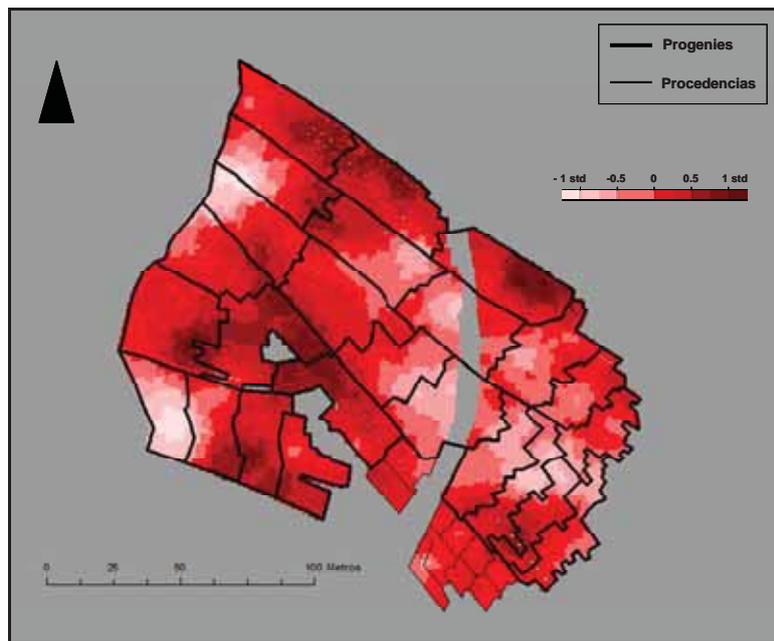


Climodiagrama de Walter-Lieth

**Geoestadísticas del crecimiento:** Para la altura a los 3 años (H3)



**Figura A14** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A15** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de 0,25 STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# DANEIRO (DAN)

## Localización

**Provincia:** A Coruña

**Ayuntamiento:** Zas

**Parroquia:** Anós

**Coordenadas geográficas:** 43° 09' 35" N – 8° 55' 06" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 506625 X – 4778630 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 2001

**Año de plantación:** Marzo de 2001

**Pendiente:** 0 %

**Exposición:** SEE

**Superficie:** 1,8 ha

**Altitud:** 210 m

**RIU:** 1

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 111 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** 6 familias del programa de mejora de Western Australia (WA)

## Diseño experimental

**Tipo:** Bloques completos al azar

**Nº de plantas:** 2.691

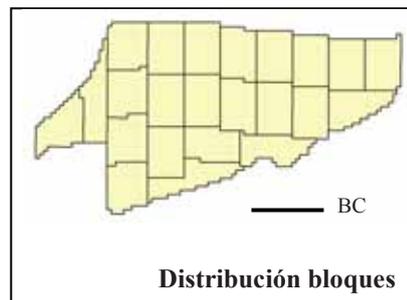
**Nº de familias:** 111

**Nº de réplicas:** 23

**Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 1 planta



## Mediciones

**Año 2003:** Altura (H3), Rectitud (REC3), Bifurcación (BIF3), Inclinación (INC3), Nº de verticilos (VER3).

## Características climáticas (3 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 1164 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 134 mm

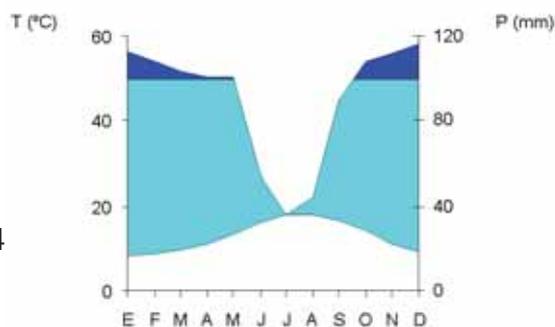
**Índice de Gaussen**  $[\Sigma(2T-P)]$  para cada mes donde  $2T > P$ : 26,3

**Temperatura media anual:** 13,4 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 16

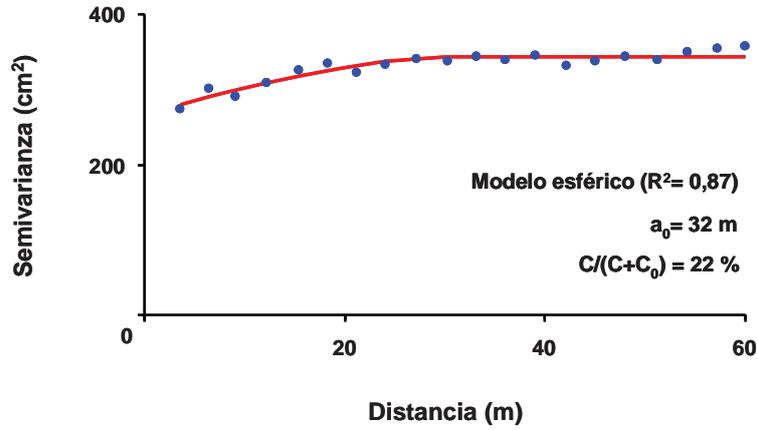
**Temperatura mínima absoluta:** -4,2 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 4,4

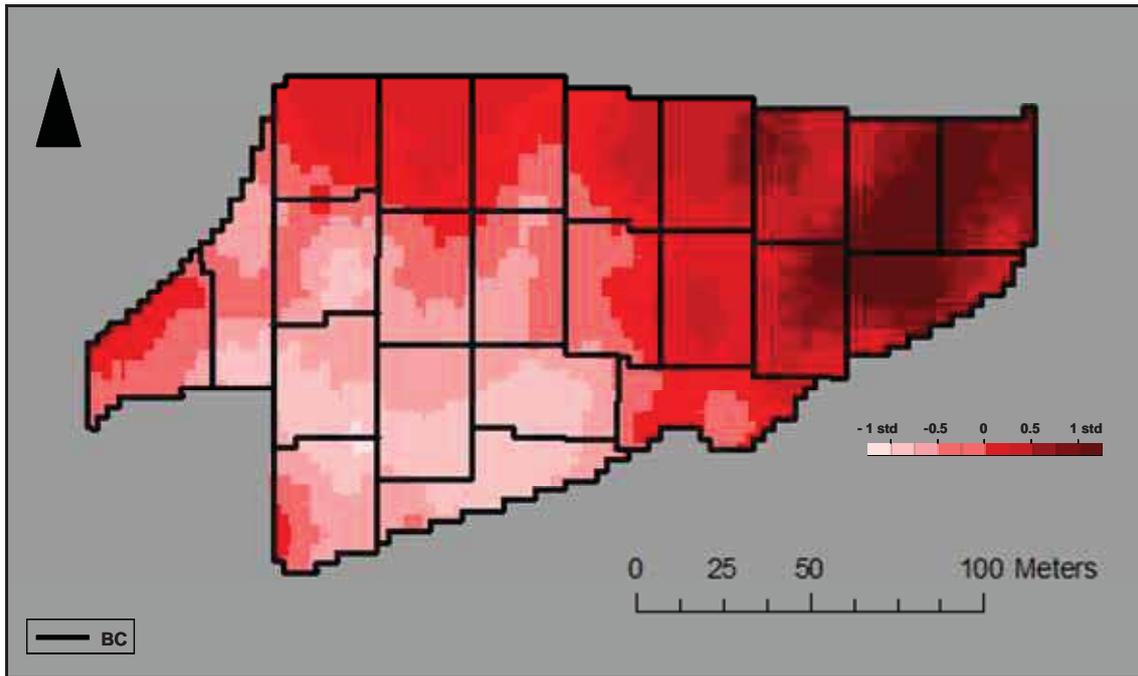


Climodiagrama de Walter-Lieth

### Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 3 años (H3)



**Figura A16** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A17** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de  $0,25$  STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# GUNTÍN (GUN)

## Localización

**Provincia:** Lugo

**Ayuntamiento:** Guntín

**Parroquia:** Guntín

**Coordenadas geográficas:** 42° 54' 02" N – 07° 40' 42" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 607500 X – 4750600 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 2001

**Año de plantación:** Marzo de 2001

**Pendiente:** 3 %

**Exposición:** O

**Superficie:** 1,8 ha

**Altitud:** 550 m

**RIU:** 2

## Material genético testado

### Ensayo 1

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo **Origen:** Galicia-costa

**Genotipos:** 111 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** 6 familias del programa de mejora de Australia Occidental (WA)

### Ensayo 2

**Tipo:** Procedencias **Origen:** Interior Peninsular **Testigos:** No existen

**Genotipos:** 7 procedencias: Bajo Tiétar, Sª de Gredos, Mtna. Soria-Burgos, Sª de Cuenca, Albarracín, Sª Segura-Alcaraz y Sª de Gata-Hurdes

## Diseño experimental

### Ensayo 1

**Tipo:** Bloques completos al azar

**Nº de plantas:** 2.881

**Nº de familias:** 111

**Nº de réplicas:** 25

**Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 1 planta

### Ensayo 2

**Tipo:** Bloques completos al azar **Nº de plantas:** 305

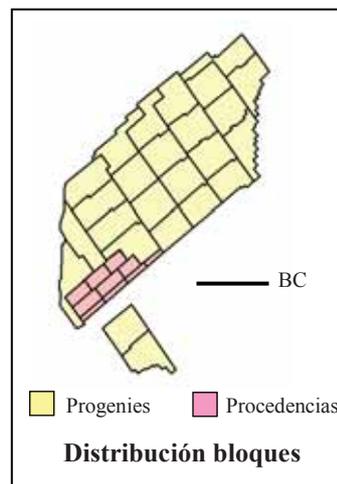
**Nº de procedencias:** 7

**Nº de réplicas:** 10

**Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 5 plantas en línea.



## Mediciones

**Año 2003:** Altura (H3), Rectitud (REC3), Bifurcación (BIF3), Inclinación (INC3), Nº de verticilos (VER3). **Año 2008:** Altura (H7), Diámetro a 1,3 m (D7), Rectitud (REC7), Bifurcación (BIF7), Inclinación (INC7), Nº de verticilos (VER7).

**Características climáticas** (7 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 851 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 110 mm

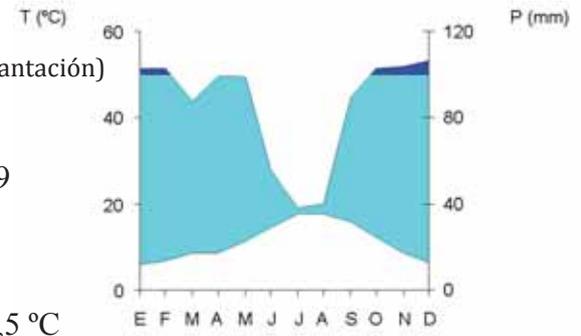
**Índice de Gaussen**  $[\Sigma(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ ]: 34,9

**Temperatura media anual:** 11,7 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 39

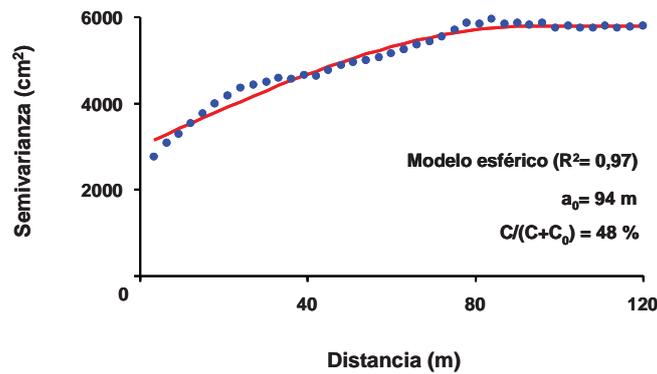
**Temperatura mínima absoluta:** -7,1 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 0,5 °C

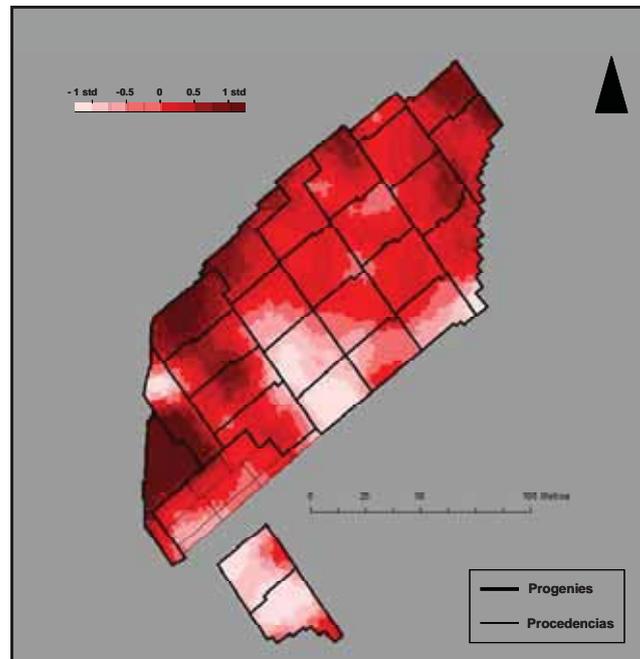


Climodiagrama de Walter-Lieth

**Geoestadísticas del crecimiento:** Para la altura a los 7 años (H7)



**Figura A18** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A19** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de 0,25 STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# LARACHA (LAR)

## Localización

**Provincia:** A Coruña

**Ayuntamiento:** Laracha

**Parroquia:** Montemaior

**Coordenadas geográficas:** 43° 12' 09" N – 08° 31' 47" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 538200 X – 4783500 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 2001

**Año de plantación:** Enero de 2001

**Pendiente:** 2 %

**Exposición:** SO

**Superficie:** 1,8 ha

**Altitud:** 252 m

**RIU:** 1

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 111 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** 6 familias del programa de mejora de Western Australia (WA)

## Diseño experimental

**Tipo:** Bloques completos al azar

**Nº de plantas:** 2.925

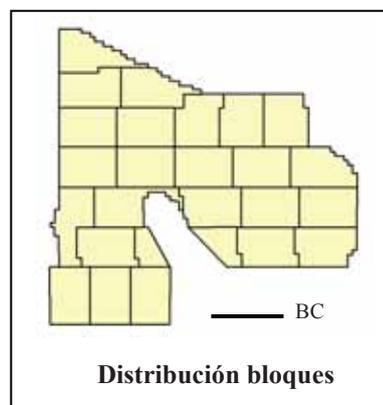
**Nº de familias:** 111

**Nº de réplicas:** 25

**Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 1 planta



## Mediciones

**Año 2003:** Altura (H3), Rectitud (REC3), Bifurcación (BIF3), Inclinación (INC3), Nº de verticilos (VER3).

## Características climáticas (3 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 1185 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 134 mm

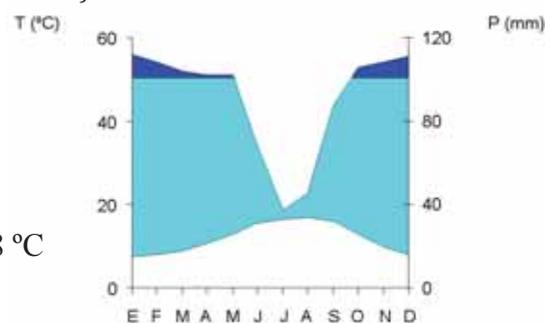
**Índice de Gaussen**  $[\Sigma(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ ]: 26,3

**Temperatura media anual:** 13,4 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 16

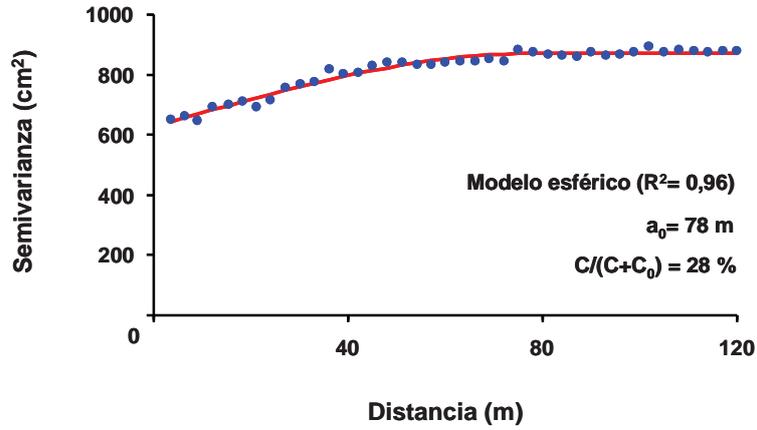
**Temperatura mínima absoluta:** -4,2 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 3,8 °C

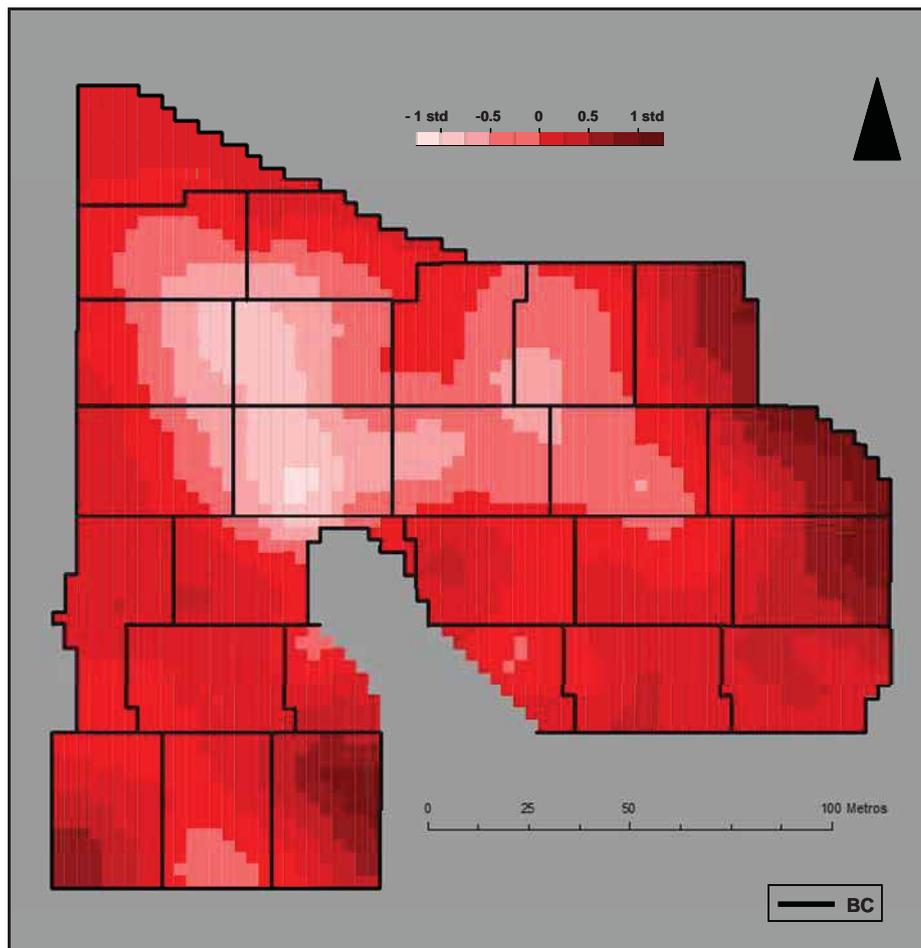


Climodiagrama de Walter-Lieth

### Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 3 años (H3)



**Figura A20** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A21** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de  $0,25$  STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# LAZA (LAZ)

## Localización

**Provincia:** Ourense

**Ayuntamiento:** Laza

**Parroquia:** Laza

**Coordenadas geográficas:** 42° 02' 24" N – 07° 29' 32" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 624800 X – 4655400 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 2001

**Año de plantación:** Febrero de 2001

**Pendiente:** 18 %

**Exposición:** NE

**Superficie:** 1,5 ha

**Altitud:** 770 m

**RIU:** 2

## Material genético testado

### Ensayo 1

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo **Origen:** Galicia-costa

**Genotipos:** 111 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** 6 familias del programa de mejora de Australia Occidental (WA)

### Ensayo 2

**Tipo:** Procedencias **Origen:** Interior Peninsular **Testigos:** No existen

**Genotipos:** 7 procedencias: Bajo Tiétar, Sª de Gredos, Mtna. Soria-Burgos, Sª de Cuenca, Albarracín, Sª Segura-Alcaraz y Sª de Gata-Hurdes

## Diseño experimental

### Ensayo 1

**Tipo:** Bloques completos al azar

**Nº de plantas:** 2.875

**Nº de familias:** 111

**Nº de réplicas:** 25

**Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 2×2,5 m

**Unidad experimental:** 1 planta

### Ensayo 2

**Tipo:** Bloques completos al azar **Nº de plantas:** 305

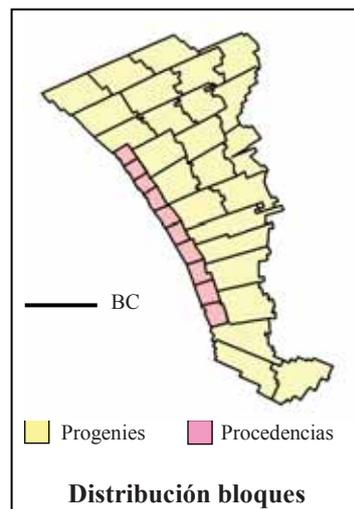
**Nº de procedencias:** 7

**Nº de réplicas:** 10

**Nº de bloques:** -

**Marco de plantación:** 2×2,5 m

**Unidad experimental:** 5 plantas en línea.



## Mediciones

**Año 2003:** Altura (H3), Rectitud (REC3), Bifurcación (BIF3), Inclinación (INC3), Nº de verticilos (VER3). **Año 2008:** Altura (H7), Diámetro a 1,3 m (D7), Rectitud (REC7), Bifurcación (BIF7), Inclinación (INC7), Nº de verticilos (VER7).

### Características climáticas (7 primeros años tras plantación)

Precipitación anual: 706 mm

Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto): 100 mm

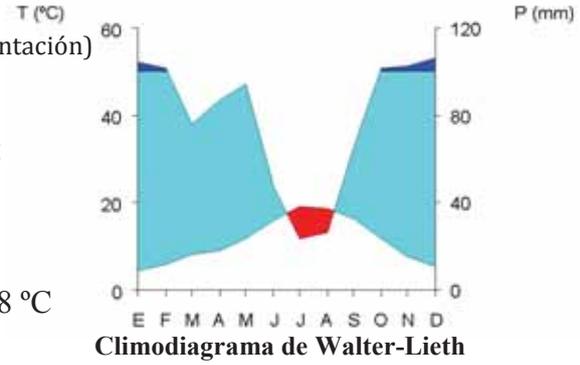
Índice de Gaussen [ $\Sigma(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ ]: 66,5

Temperatura media anual: 13,0 °C

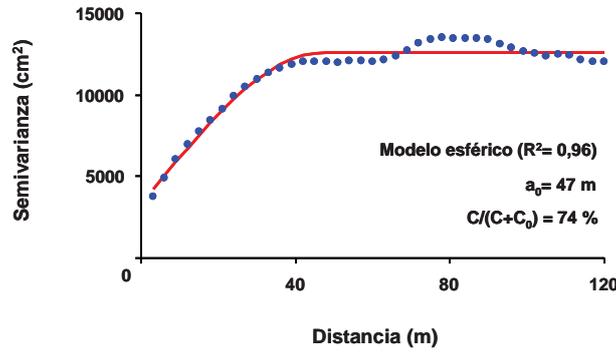
Número anual de días de helada ( $T_{min} < 0$  °C): 29

Temperatura mínima absoluta: -4,7 °C

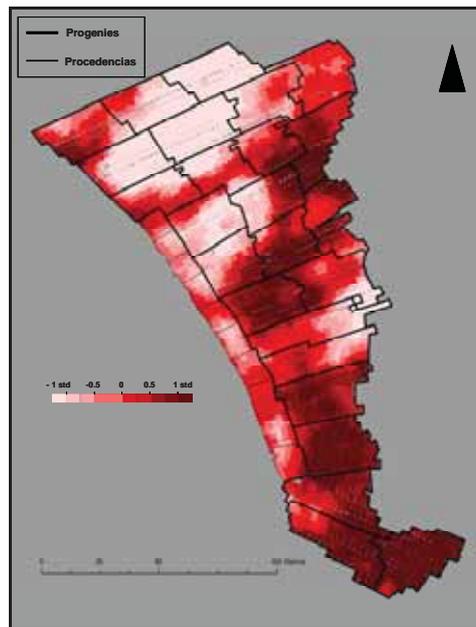
Temperatura media de las mínimas del mes más frío: 1,8 °C



### Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 7 años (H7)



**Figura A22** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A23** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de 0,25 STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# CORISTANCO (COR)

## Localización

**Provincia:** A Coruña

**Ayuntamiento:** Coristanco

**Parroquia:** Seavia

**Coordenadas geográficas:** 43° 09' 33" N – 08° 43' 55" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 521800 X – 4778615 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 2005

**Año de plantación:** Marzo de 2005

**Pendiente:** 0 %

**Exposición:** NE

**Superficie:** 1,8 ha

**Altitud:** 300 m

**RIU:** 1

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 116 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** comerciales: Galicia-costa, Galicia-interior y Landas (Francia)

## Diseño experimental

**Tipo:** Bloques incompletos resolubles

**Nº de plantas:** 2.856

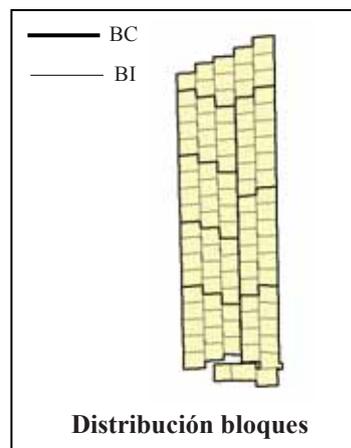
**Nº de familias:** 116

**Nº de réplicas:** 8

**Nº de bloques:** 96

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 3 plantas en línea



## Mediciones

**Año 2006:** Altura (H1)

**Año 2007:** Altura (H2)

**Año 2008:** Altura (H3)

## Características climáticas (3 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 2050 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 187 mm

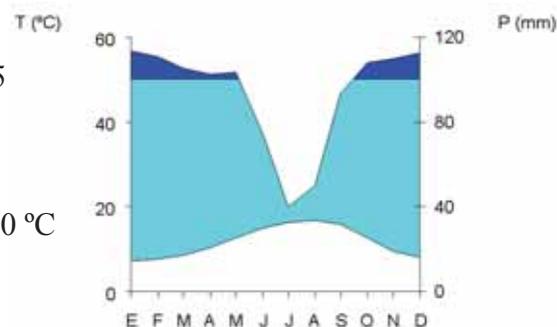
**Índice de Gaussen**  $[\Sigma(2T-P)]$  para cada mes donde  $2T > P$ : 23,5

**Temperatura media anual:** 12,2 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 9

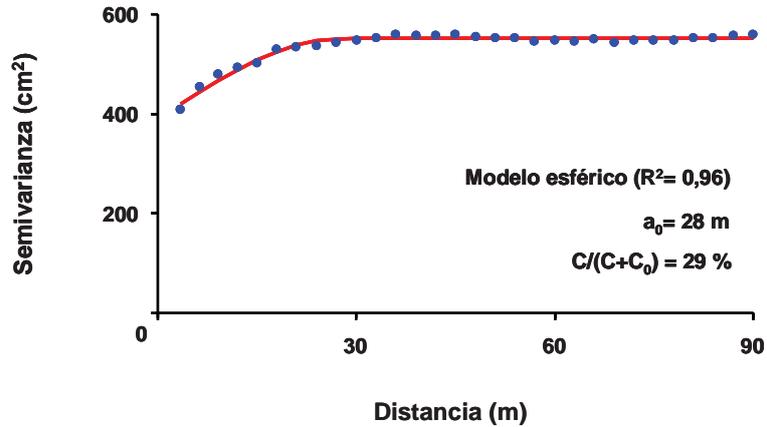
**Temperatura mínima absoluta:** -3,0 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 3,0 °C

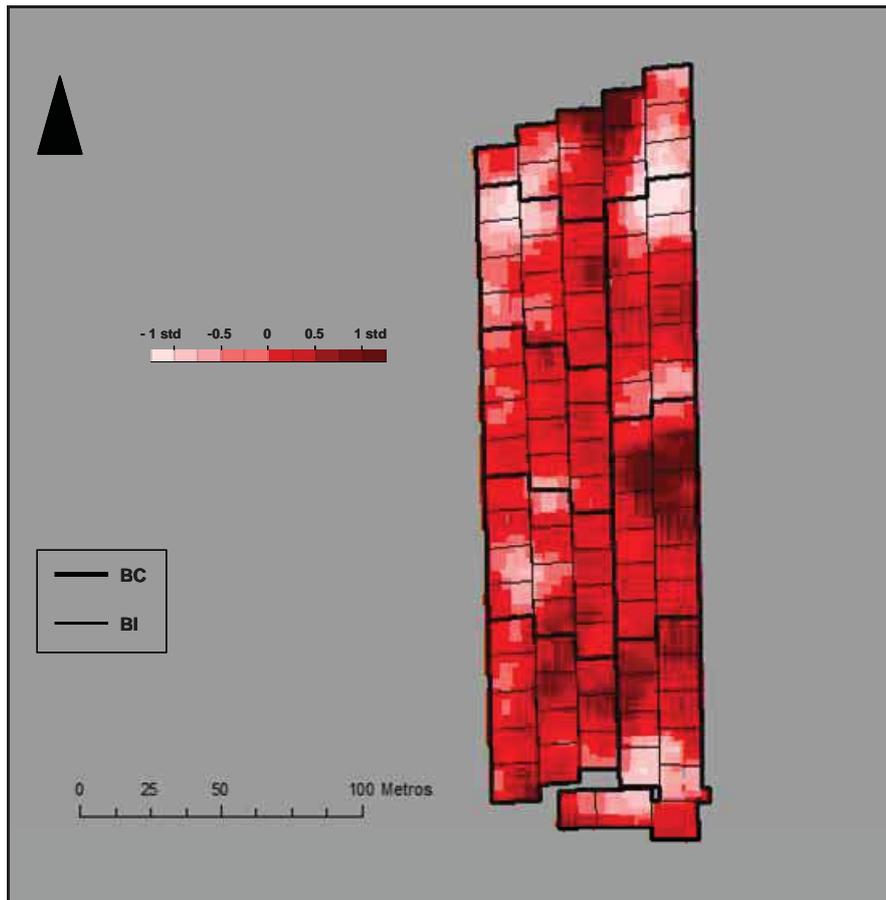


Climodiagrama de Walter-Lieth

### Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 3 años (H3)



**Figura A24** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A25** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de  $0,25$  STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# CHANTADA (CHA)

## Localización

Provincia: Lugo

Ayuntamiento: Chantada

Parroquia: A Laxe

Coordenadas geográficas: 42° 37' 05" N – 07° 50' 21" O

Coordenadas UTM (huso 29): 595197 X – 4719130 Y



## Datos generales

Serie de ensayo: 2005

Año de plantación: Abril de 2005

Pendiente: 0 %

Exposición: E

Superficie: 1,4 ha

Altitud: 680 m

RIU: 2

## Material genético testado

Tipo: Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

Genotipos: 94 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

Origen: Galicia-costa

Nivel del huerto semillero: 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

Testigos: comerciales: Galicia-costa, Galicia-interior y Landas (Francia)

## Diseño experimental

Tipo: Bloques incompletos resolubles

Nº de plantas: 2.328

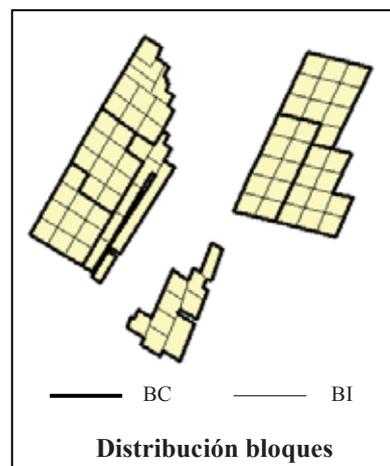
Nº de familias: 94

Nº de réplicas: 8

Nº de bloques: 80

Marco de plantación: 3×2 m

Unidad experimental: 3 plantas en línea



## Mediciones

Año 2006: Altura (H1)

Año 2007: Altura (H2)

Año 2008: Altura (H3)

## Características climáticas (3 primeros años tras plantación)

Precipitación anual: 1216 mm

Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto): 120 mm

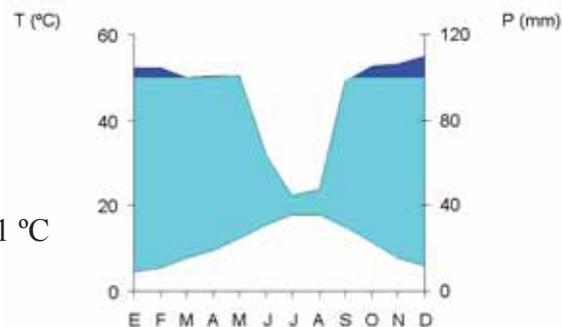
Índice de Gaussen  $\sum(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ : 47,2

Temperatura media anual: 9,1 °C

Número anual de días de helada ( $T_{min} < 0$  °C): 31

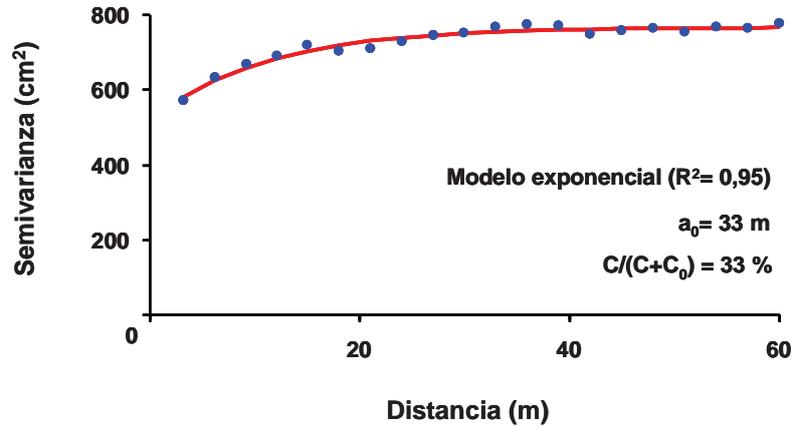
Temperatura mínima absoluta: -7,0 °C

Temperatura media de las mínimas del mes más frío: 1,1 °C

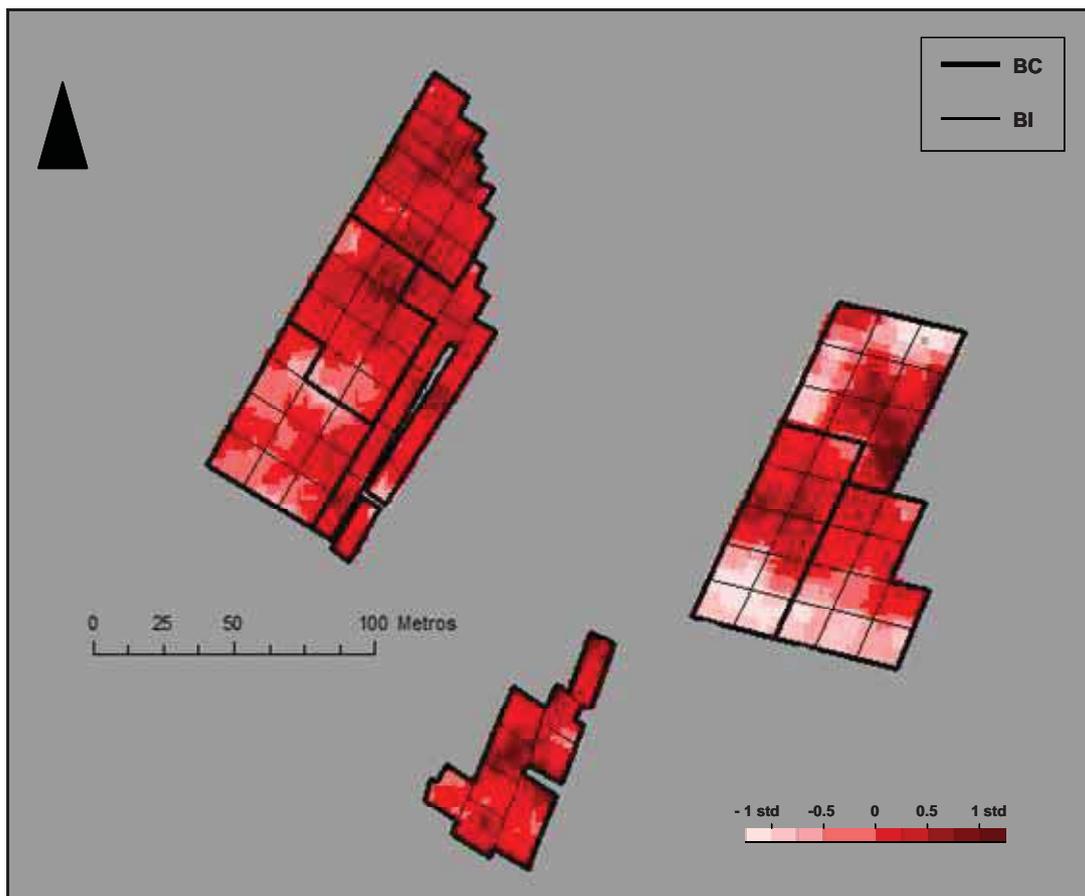


Climodiagrama de Walter-Lieth

### Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 3 años (H3)



**Figura A26** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A27** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25 \text{ STD}$  (color claro) y  $>+1,25 \text{ STD}$  (color oscuro), con intervalos de  $0,25 \text{ STD}$ , donde STD es la desviación típica de la variable original.

# FORGOSELO (FOR)

## Localización

**Provincia:** A Coruña

**Ayuntamiento:** A Capela

**Parroquia:** Caaveiro

**Coordenadas geográficas:** 43° 27' 35" N – 7° 59' 20" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 581792 X – 4812469 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 2005

**Año de plantación:** Abril de 2005

**Pendiente:** 30 %

**Exposición:** O

**Superficie:** 1,8 ha

**Altitud:** 550 m

**RIU:** 3

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 116 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** comerciales: Galicia-costa, Galicia-interior y Landas (Francia)

## Diseño experimental

**Tipo:** Bloques incompletos resolubles

**Nº de plantas:** 2.856

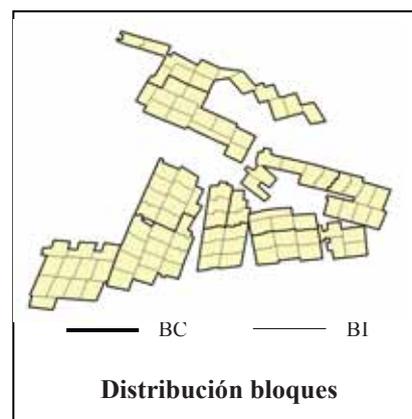
**Nº de familias:** 116

**Nº de réplicas:** 8

**Nº de bloques:** 96

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 3 plantas en línea



## Mediciones

**Año 2006:** Altura (H1)

**Año 2007:** Altura (H2)

**Año 2008:** Altura (H3)

## Características climáticas (3 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 1321 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 147 mm

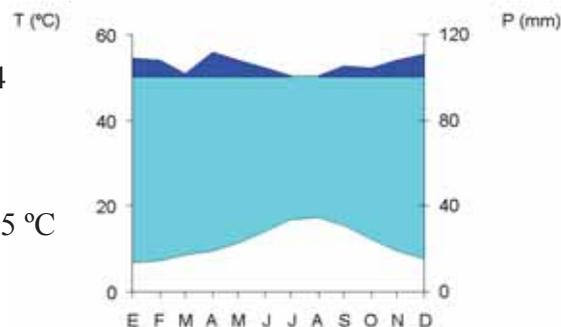
**Índice de Gaussen**  $[\Sigma(2T-P)]$  para cada mes donde  $2T > P$ : 13,4

**Temperatura media anual:** 10,8 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 14

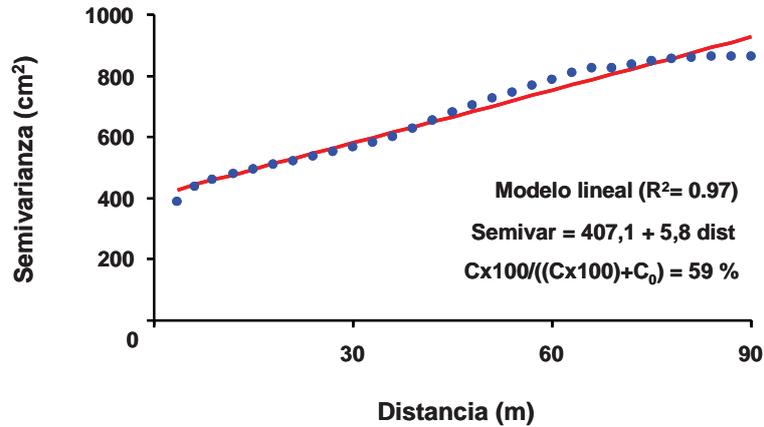
**Temperatura mínima absoluta:** -3,3 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 2,5 °C

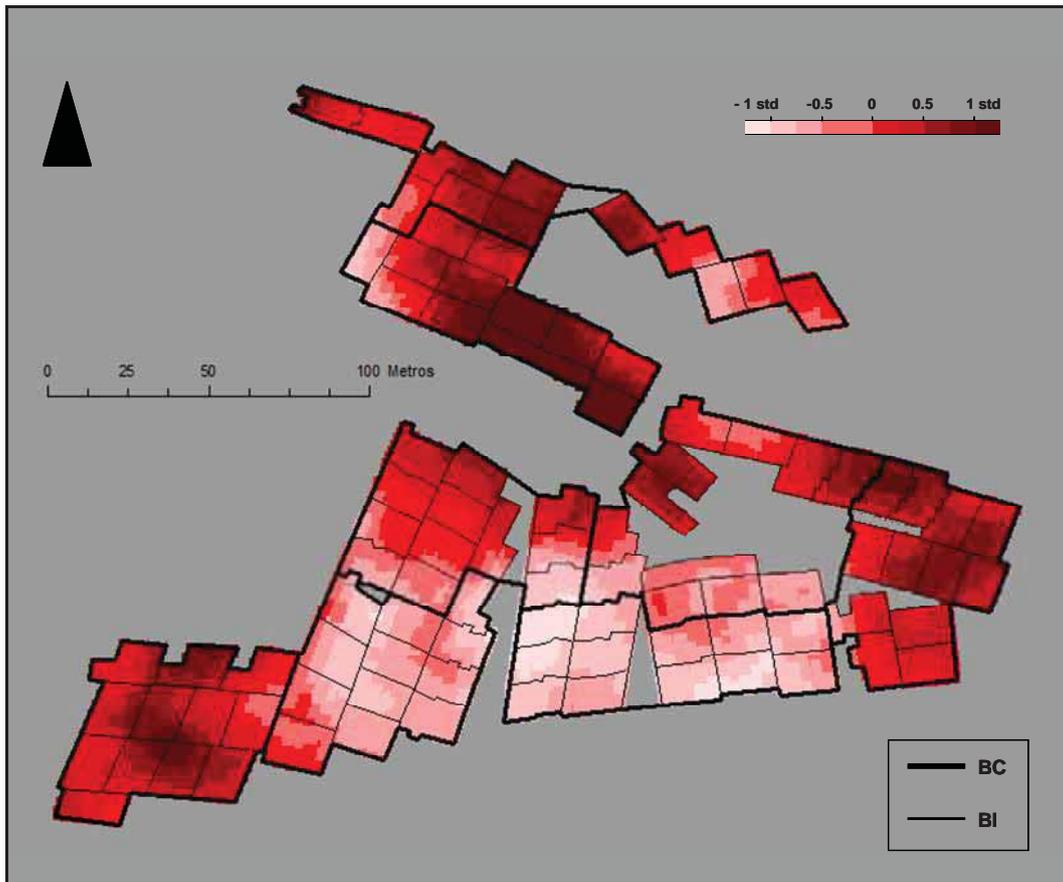


Climodiagrama de Walter-Lieth

### Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 3 años (H3)



**Figura A28** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ), la ecuación del modelo teórico y la Intensidad del patrón espacial:  $Cx100/((Cx100)+C_0)$ , que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial para una distancia de 100 m.



**Figura A29** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25 \text{ STD}$  (color claro) y  $>+1,25 \text{ STD}$  (color oscuro), con intervalos de  $0,25 \text{ STD}$ , donde STD es la desviación típica de la variable original.

# FRIOL (FRI)

## Localización

**Provincia:** Lugo

**Ayuntamiento:** Friol

**Parroquia:** Ousá

**Coordenadas geográficas:** 43° 04' 10" N – 07° 43' 07" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 604323 X – 4769425 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 2005

**Año de plantación:** Abril de 2005

**Pendiente:** 3 %

**Exposición:** NO

**Superficie:** 1,8 ha

**Altitud:** 520 m

**RIU:** 2

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 116 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** comerciales: Galicia-costa, Galicia-interior y Landas (Francia)

## Diseño experimental

**Tipo:** Bloques incompletos resolubles

**Nº de plantas:** 2.856

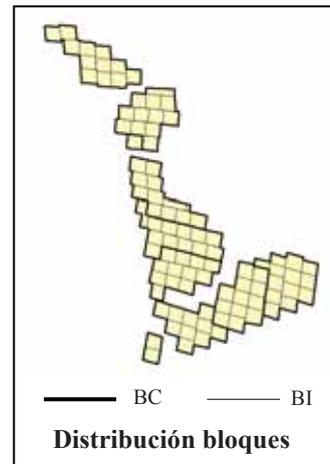
**Nº de familias:** 116

**Nº de réplicas:** 8

**Nº de bloques:** 96

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 3 plantas en línea



## Mediciones

**Año 2006:** Altura (H1)

**Año 2007:** Altura (H2)

**Año 2008:** Altura (H3)

## Características climáticas (3 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 980 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 99 mm

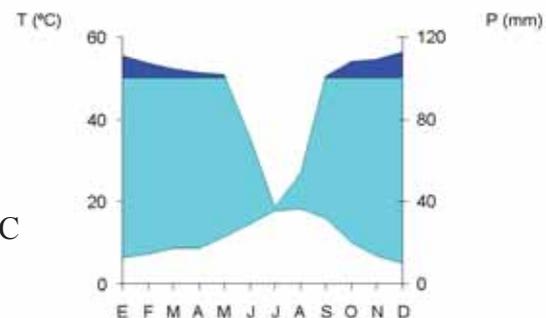
**Índice de Gaussen**  $[\sum(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ ]: 25,7

**Temperatura media anual:** 10,3 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 19

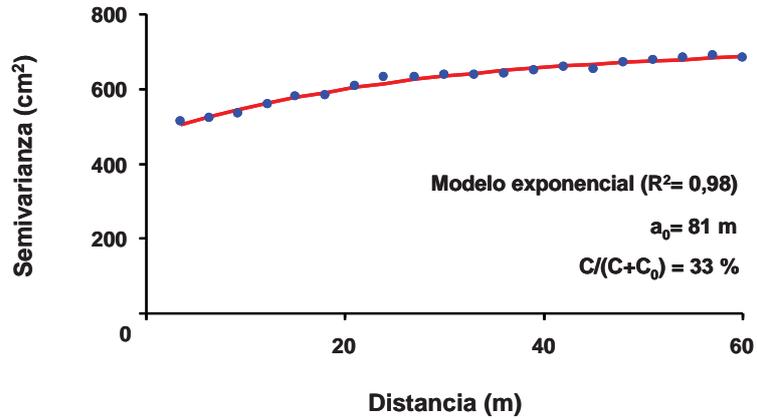
**Temperatura mínima absoluta:** -4,4 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 1,5 °C

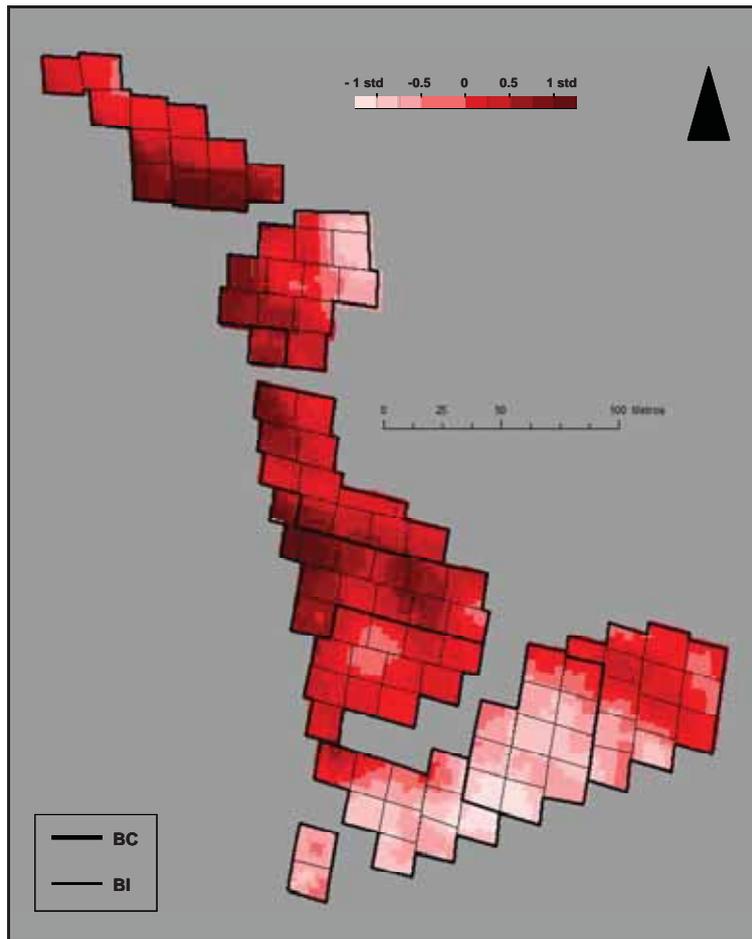


Climodiagrama de Walter-Lieth

### Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 3 años (H3)



**Figura A30** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A31** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de  $0,25$  STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# MANDÍN (MAN)

## Localización

**Provincia:** Ourense

**Ayuntamiento:** Verín

**Parroquia:** Mandín

**Coordenadas geográficas:** 41° 51' 34" N – 07° 23' 41" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 633250 X – 4635500 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 2005

**Año de plantación:** Marzo de 2005

**Pendiente:** 12 %

**Exposición:** SO

**Superficie:** 1,8 ha

**Altitud:** 600 m

**RIU:** 2

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 116 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** comerciales: Galicia-costa, Galicia-interior y Landas (Francia)

## Diseño experimental

**Tipo:** Bloques incompletos resolubles

**Nº de plantas:** 2.856

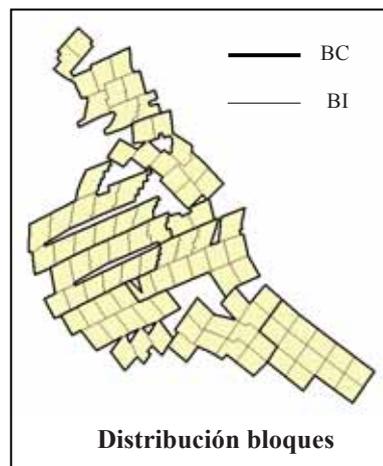
**Nº de familias:** 116

**Nº de réplicas:** 8

**Nº de bloques:** 96

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 3 plantas en línea



## Mediciones

**Año 2006:** Altura (H1)

**Año 2007:** Altura (H2)

**Año 2008:** Altura (H3)

## Características climáticas (3 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 661 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 102 mm

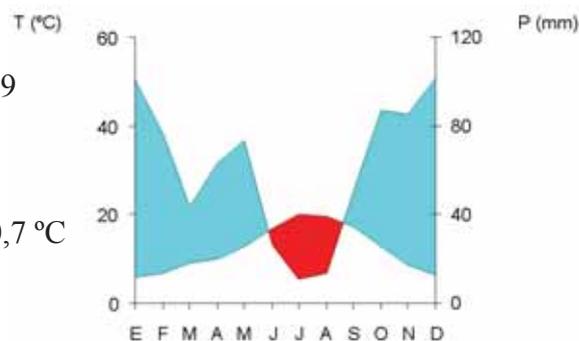
**Índice de Gaussen** [ $\Sigma(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ ]: 67,9

**Temperatura media anual:** 13,1 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 36

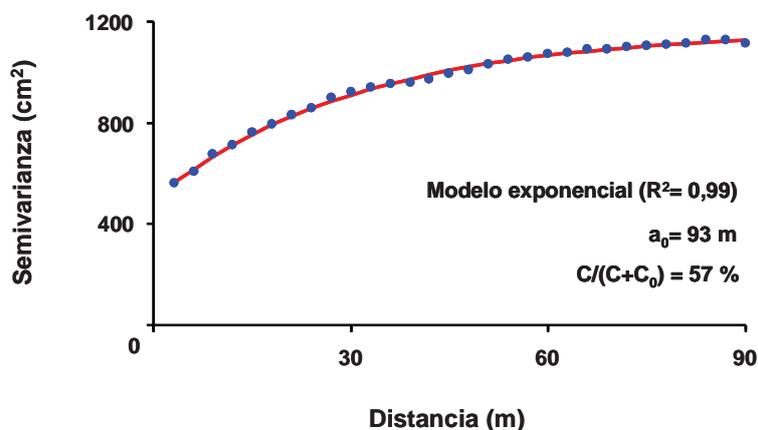
**Temperatura mínima absoluta:** -6,0 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 0,7 °C

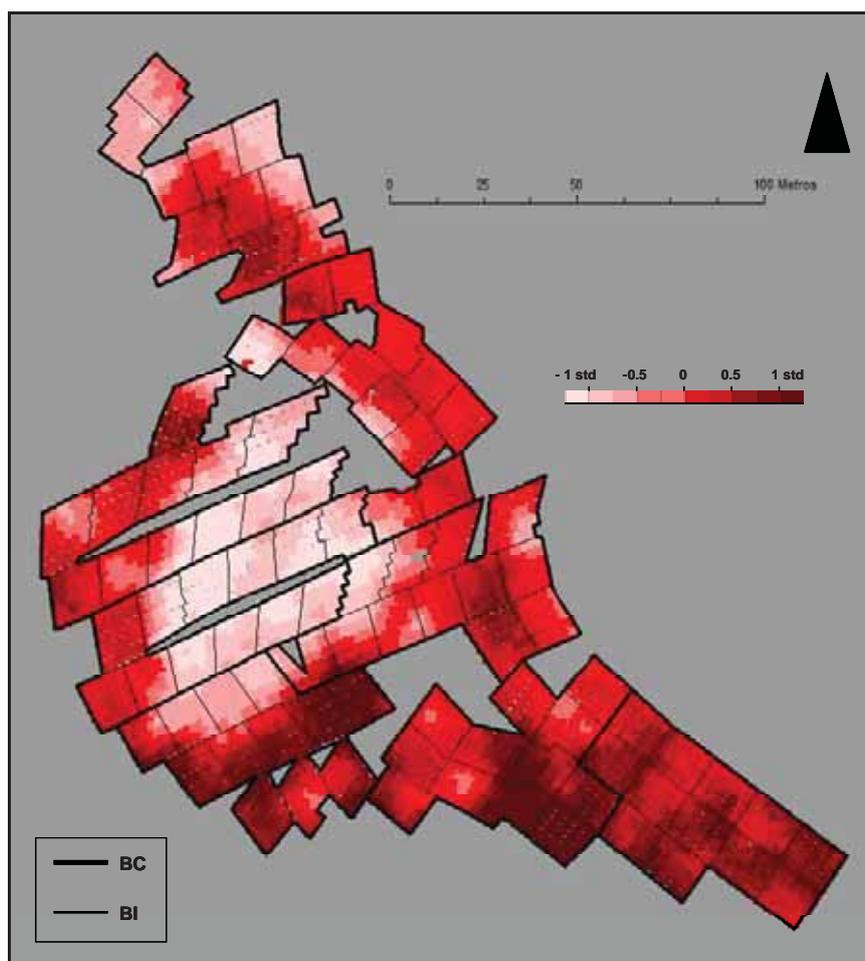


Climodiagrama de Walter-Lieth

### Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 3 años (H3)



**Figura A32** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A33** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de  $0,25$  STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# NOCEDA (NOC)

## Localización

**Provincia:** Lugo

**Ayuntamiento:** O Incio

**Parroquia:** Noceda

**Coordenadas geográficas:** 42° 40' 24" N – 07° 26' 52" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 627200 X – 4725800 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 2005

**Año de plantación:** Mayo de 2005

**Pendiente:** 14 %

**Exposición:** SSO

**Superficie:** 1,8 ha

**Altitud:** 550 m

**RIU:** 2

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 116 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** comerciales: Galicia-costa, Galicia-interior y Landas (Francia)

## Diseño experimental

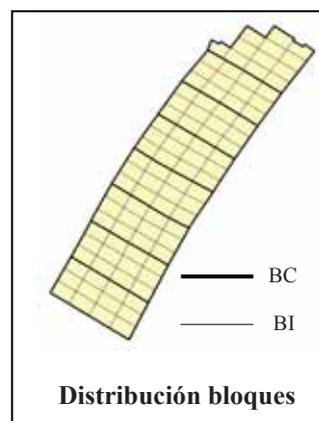
**Tipo:** Bloques incompletos resolubles

**Nº de plantas:** 2.856      **Nº de familias:** 116

**Nº de réplicas:** 8      **Nº de bloques:** 96

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 3 plantas en línea



## Mediciones

**Año 2006:** Altura (H1)

**Año 2007:** Altura (H2)

**Año 2008:** Altura (H3)

## Características climáticas (3 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 561 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 102 mm

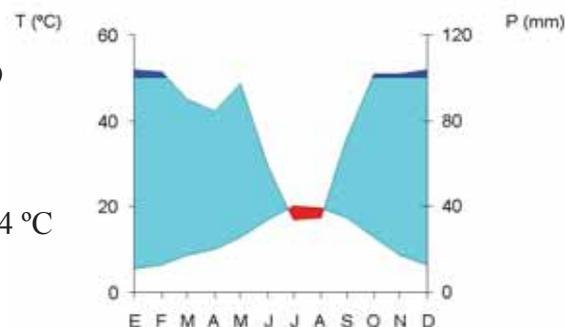
**Índice de Gausson**  $\Sigma(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ : 57,9

**Temperatura media anual:** 12,1 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 28

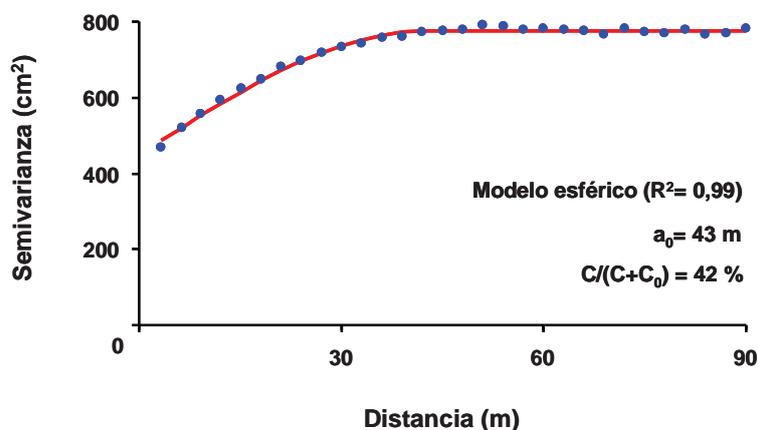
**Temperatura mínima absoluta:** -5,0 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 1,4 °C



Climodiagrama de Walter-Lieth

### Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 3 años (H3)



**Figura A34** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ) y los parámetros del modelo ajustado, donde  $a_0$  es el Rango, o distancia a partir de la cual los datos son espacialmente independientes, y  $C/(C+C_0)$  es la Intensidad del patrón espacial que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial.



**Figura A35** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25$  STD (color claro) y  $>+1,25$  STD (color oscuro), con intervalos de  $0,25$  STD, donde STD es la desviación típica de la variable original.

# REBORDELO (REB)

## Localización

**Provincia:** Pontevedra

**Ayuntamiento:** Cotobade

**Parroquia:** Rebordelo

**Coordenadas geográficas:** 42° 27' 46" N – 8° 28' 34" O

**Coordenadas UTM (huso 29):** 543080 X – 4701364 Y



## Datos generales

**Serie de ensayo:** 2005

**Año de plantación:** Marzo de 2005

**Pendiente:** 7 %

**Exposición:** NO

**Superficie:** 1,8 ha

**Altitud:** 350 m

**RIU:** 1

## Material genético testado

**Tipo:** Progenies de árboles superiores seleccionados en campo

**Genotipos:** 116 familias de medios hermanos del Huerto Semillero de Sergude

**Origen:** Galicia-costa

**Nivel del huerto semillero:** 1ª generación del programa de mejora Galicia-costa

**Testigos:** comerciales: Galicia-costa, Galicia-interior y Landas (Francia)

## Diseño experimental

**Tipo:** Bloques incompletos resolubles

**Nº de plantas:** 2.856

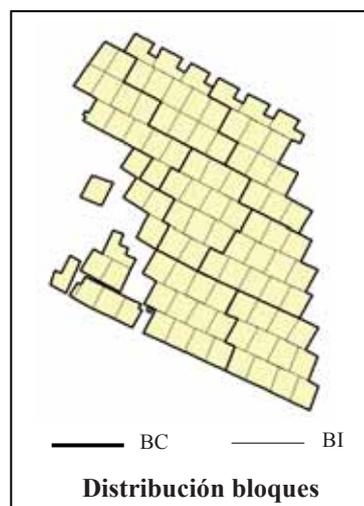
**Nº de familias:** 116

**Nº de réplicas:** 8

**Nº de bloques:** 96

**Marco de plantación:** 3×2 m

**Unidad experimental:** 3 plantas en línea



## Mediciones

**Año 2006:** Altura (H1)

**Año 2007:** Altura (H2)

**Año 2008:** Altura (H3)

## Características climáticas (3 primeros años tras plantación)

**Precipitación anual:** 1518 mm

**Precipitación estival (Junio, Julio, Agosto):** 169 mm

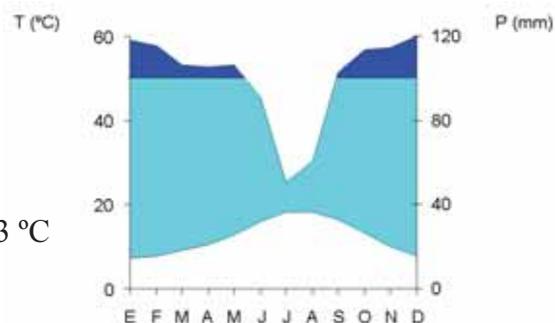
**Índice de Gaussen**  $\sum(2T-P)$  para cada mes donde  $2T > P$ : 48,5

**Temperatura media anual:** 13,6 °C

**Número anual de días de helada** ( $T_{min} < 0$  °C): 2

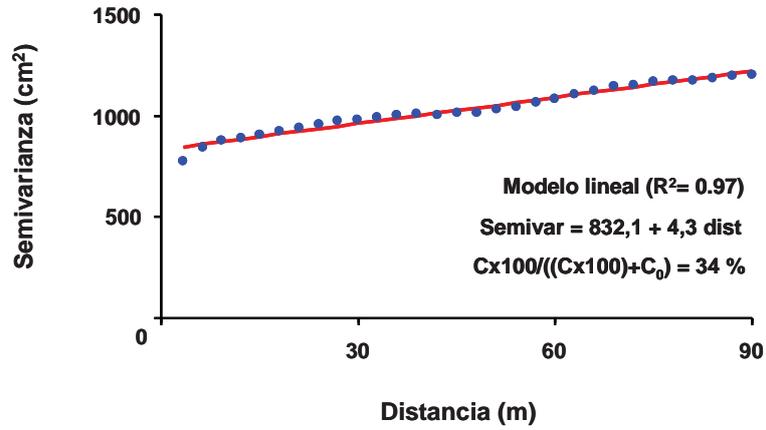
**Temperatura mínima absoluta:** -0,9 °C

**Temperatura media de las mínimas del mes más frío:** 4,3 °C

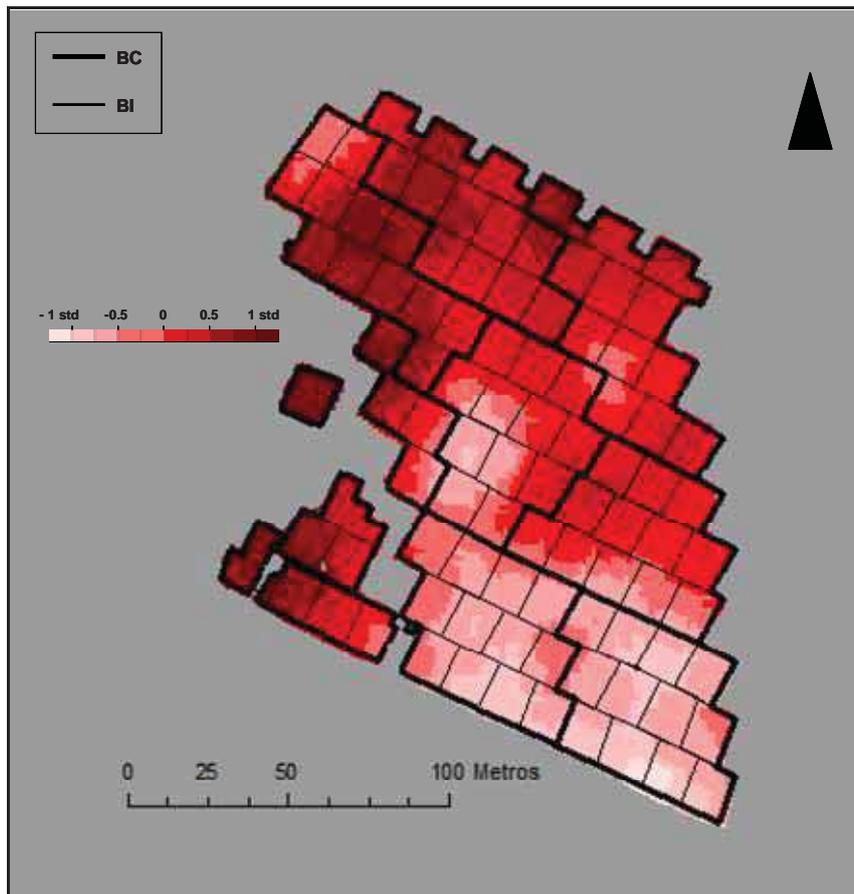


Climodiagrama de Walter-Lieth

### Geoestadísticas del crecimiento: Para la altura a los 3 años (H3)



**Figura A36** Semivariograma empírico (puntos) y semivariograma teórico ajustado (línea continua) para los residuos de la variable tras eliminar los efectos familiares. Se incluye la bondad de ajuste ( $R^2$ ), la ecuación del modelo teórico y la Intensidad del patrón espacial:  $Cx100/((Cx100)+C_0)$ , que representa el porcentaje de variación explicada por la dependencia espacial para una distancia de 100 m.



**Figura A37** Modelización de la variación espacial de los residuos de la variable mediante kriging iterativo. Los valores oscilan entre  $<-1,25 \text{ STD}$  (color claro) y  $>+1,25 \text{ STD}$  (color oscuro), con intervalos de  $0,25 \text{ STD}$ , donde STD es la desviación típica de la variable original.



## **10.2. ANEXO 2: PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS**

---

## 10.2. ANEXO 2. Procedimientos estadísticos

Aunque sabemos que un hijo se parece a sus padres, el grado de semejanza no siempre es el mismo debido a los complejos mecanismos hereditarios y a que los genes se expresan en un ambiente con el cual interaccionan, produciendo resultados que se desvían de lo esperado. Debido a esta falta de certeza los genetistas han utilizado la estadística como herramienta desde el comienzo de esta ciencia, tanto es así que las leyes de Mendel sólo pueden verificarse desde un punto de vista estadístico a través de la observación de la descendencia. La genética cuantitativa junto con la estadística y la genética Mendeliana han proporcionado el marco científico para la mayor parte de la mejora genética vegetal moderna, y ya que estas disciplinas se desarrollaron más o menos simultáneamente, es difícil separarlas o imaginar el estado actual de la mejora vegetal sin la contribución tanto de la genética cuantitativa como de la estadística.

El componente genético del mérito no puede ser observado directamente y tiene que inferirse a partir de las observaciones realizadas en los candidatos objeto de selección o en sus parientes. La selección de los parentales más aptos para producir una descendencia beneficiosa se convierte de este modo en un problema estadístico con tres componentes fundamentales: i) determinar si las características que forman parte de la función de mérito tienen una base genética; ii) obtener métodos razonablemente precisos para inferir el mérito (“evaluación genética”), y iii) decidir qué hacer con los individuos que tengan las mejores evaluaciones. El primer problema se conoce comúnmente como “estimación de los parámetros genéticos”, el segundo problema se conoce como “estimación (predicción) de los valores de mejora”, y es conceptualmente inseparable del primero. A estos problemas hay que añadir que las bases de datos en mejora genética pueden ser muy grandes (por ejemplo, millones de registros), con datos multivariados (es posible que sea necesario modelizar simultáneamente varias características), a veces de distribución gaussiana, o definitivamente no normal en otros, como es el caso de los caracteres discretos. Además la estructura de los datos puede ser extremadamente desequilibrada, y frecuentemente exhibe patrones no aleatorios de datos ausentes.

No es de extrañar por tanto que la estadística haya sido tan importante para la mejora genética, en cuyo marco se han realizado notables esfuerzos para desarrollar metodologías robustas que han sido generalizadas al resto de disciplinas científicas, observándose una

continua evolución en el desarrollo y aplicación de estos métodos reforzada por la aparición de ordenadores con cada vez mayor capacidad de computación.

Por todo lo dicho anteriormente en este trabajo se ha prestado especial atención a los procedimientos estadísticos, empleando aquellos más novedosos y que aportan mayor robustez a la inferencia y mayor verosimilitud a los resultados, utilizando para ello en la mayor parte de los casos el paquete estadístico SAS/STAT (SAS-Institute 1999).

### ***10.2.1. Procedimientos estadísticos de carácter general***

De manera generalizada se han utilizado en los distintos capítulos de esta Tesis las siguientes técnicas estadísticas de uso cada vez más común y que en un futuro cercano sustituirán definitivamente o complementarán a las técnicas más clásicas.

#### *10.2.1.1. Predicción de los componentes de la varianza mediante procedimientos de máxima verosimilitud*

La predicción de los componentes de la varianza se ha realizado tradicionalmente mediante análisis minimocuadráticos por resolución de las ecuaciones que relacionan la varianza calculada con su valor esperado. Sin embargo estos procedimientos clásicos requieren diseños equilibrados y padres muestreados al azar dentro de la población, además de no ser capaces de aprovechar toda la información disponible sobre las relaciones de parentesco o las relaciones entre distintos ambientes o caracteres en un programa de mejora. Para solventar estas limitaciones se desarrollaron los procedimientos estadísticos de máxima verosimilitud (ML) que permiten utilizar toda la información genealógica disponible, no precisan de diseños equilibrados y tienen en cuenta el efecto de la selección de los padres. Ya que estas técnicas presentaban a su vez sus propias limitaciones, se desarrollaron posteriormente los procedimientos de máxima verosimilitud restringida (REML) que ajustan las observaciones a partir de las estimaciones de los efectos fijos.

#### *10.2.1.2. Implementación de los modelos genéticos mediante modelos mixtos*

Con el objeto de obtener una predicción optimizada de los valores de mejora se han realizado notables esfuerzos metodológicos en el marco de la mejora genética que culminaron en la década de 1950 con el desarrollo de la teoría de modelos mixtos formulada por Henderson (Henderson et al. 1959), que permitió combinar efectos fijos y aleatorios en único modelo. Esta teoría que fue luego presentada de forma matricial por Searle (1968) desarrolla ecuaciones basadas en modelos mixtos para la obtención de los BLUPs (*Best Linear*

*Unbiased Predictor*” – mejor predictor lineal insesgado), que son predictores óptimos de los valores de mejora, y que son válidos de manera general para la predicción de cualesquiera que sean los efectos aleatorios. La teoría se vio mejorada posteriormente con la aplicación de los métodos de máxima verosimilitud restringida para la resolución de estas ecuaciones. El marco teórico de los modelos mixtos desarrollado en base al álgebra matricial permite además definir diferentes estructuras de la matriz de varianzas-covarianzas y aplicar distintos test estadísticos al margen de la tradicional estadística paramétrica.

#### *10.2.1.3. Ajuste espacial para eliminar la autocorrelación de los residuos*

El procedimiento estadístico del análisis de varianza (ANOVA), ampliamente utilizado en el estudio de ensayos agronómicos así como en la mayor parte de disciplinas científicas, requiere que los datos a analizar cumplan una serie de requisitos tales como la normalidad en la distribución, homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) e independencia de las observaciones. Mientras que los dos primeros requisitos suelen ser comprobados de manera regular y rutinaria, y cuando se incumplen, pueden ser solventados mediante artificios matemáticos, la violación del requisito de independencia raramente es testada, confiando en muchos casos ciegamente en que la aleatorización sea suficiente para su cumplimiento.

La independencia de las observaciones puede verse condicionada cuando los datos presentan una estructura espacial no aleatoria a mayor o menor escala, es decir, cuando existe heterogeneidad espacial. De esta manera, cuando se analizan variables de ensayos genéticos en campo debe prestarse especial atención a la posible autocorrelación espacial de los datos, cuya presencia podría violar el requisito de independencia e invalidar los resultados del análisis (Dutilleul 1993). Diversos autores han demostrado que aplicar el análisis de varianza cuando existe heterogeneidad espacial sin realizar ningún tipo de ajuste deriva en un cálculo erróneo del nivel de significación de los efectos del modelo, de la proporción de varianza explicada por cada factor, y/o de la estimación de los efectos del modelo (ver Zas 2008, para una discusión detallada sobre este tema).

Como repuesta a la presencia de heterogeneidad espacial, y ya desde el comienzo de la aplicación del ANOVA, surge la necesidad de establecer los ensayos en base a un diseño experimental, como el de bloques completos al azar (BCA) o el de bloques incompletos (BI). Sin embargo la aplicación de este tipo de diseños a ensayos genéticos forestales plantea cierta problemática debido al gran tamaño de estos ensayos derivado del gran número de entradas genéticas a testar (100-200 o más) y de la superficie relativamente grande ocupada por cada árbol (4- 25 m<sup>2</sup>) (Fu et al. 1998). Si a esto añadimos que los ensayos se instalan habitualmente

en terrenos forestales, abruptos e irregulares, la heterogeneidad espacial está asegurada. Otro inconveniente que reduce la eficiencia de estos diseños es la dificultad de distribuir los bloques en el terreno adaptándose al patrón real de heterogeneidad espacial, ya que normalmente la instalación de la parcela se realiza contando con poca información acerca de este patrón. A esto hay que añadir que los bloques terminan de manera brusca en los límites que los separan de otros bloques, mientras que la variación ambiental a pequeña escala tiende a ser continua y suave (Dutilleul 1993; Legendre 1993). Los bloques, por tanto, resultan con frecuencia demasiado grandes y heterogéneos, incumpléndose la premisa fundamental del diseño, la homogeneidad de los bloques.

En las últimas décadas han aparecido diversas técnicas basadas en la estadística espacial que tratan de estudiar la variabilidad ambiental y su patrón espacial. Debido a la falta de eficacia de los diseños experimentales, diversos autores han procurado aplicar estas técnicas en la evaluación de ensayos genéticos en campo, tanto de tipo agronómico como forestal (e.g. Qiao et al. 2000; Hong et al. 2005; Dutkowski et al. 2006; Zas 2006). De entre las diferentes técnicas aparecidas, cabe destacar aquellas basadas en la geoestadística, que mediante variogramas e interpolación kriging, eliminan la autocorrelación espacial de la variable (Hamann et al. 2002; Zas 2006; Zas et al. 2007).

La eliminación de la autocorrelación espacial de la variable mediante estas técnicas permite además realizar inferencias y comparar ensayos instalados en base a diferentes diseños experimentales. Esto es muy útil a la hora de aprovechar toda la información disponible de la red de ensayos de un programa de mejora.

### **10.2.2. Procedimientos estadísticos específicos y códigos SAS**

A continuación se exponen procedimientos estadísticos concretos y los códigos para ejecutarlos en el paquete estadístico SAS/STAT que han sido utilizados en alguna o varias partes de esta Tesis.

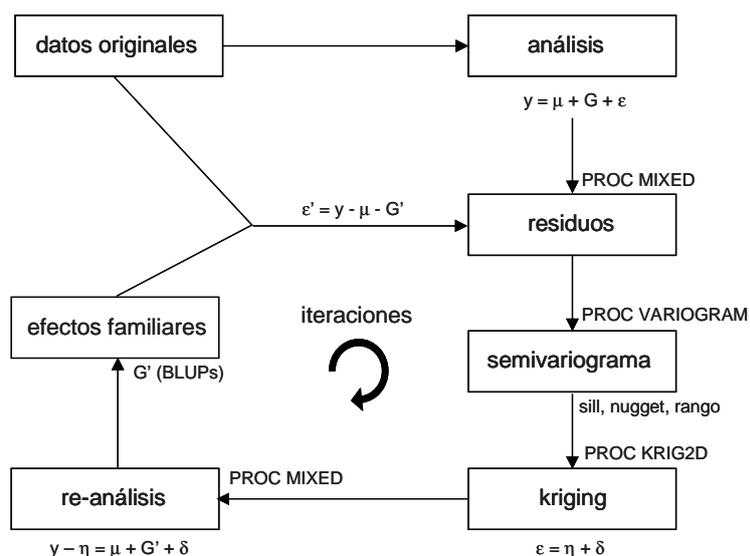
#### *10.2.2.1. Análisis espacial iterativo (Iterative Spatial Analysis: ISA)*

Para eliminar la autocorrelación espacial de los datos se ha procedido a la corrección espacial de todas las variables procedentes de los ensayos genéticos en campo (Capítulos I, II y III), empleando el método propuesto por Zas (2006) denominado ‘análisis espacial iterativo’ (ISA, “*Iterative Spatial Análisis*”) basado en técnicas de geoestadística como la semivariografía y la interpolación kriging. Fue necesario contar con datos espacialmente explícitos, al igual que

para cualquier técnica de análisis espacial, por lo que se calcularon las coordenadas de cada una de las plantas de los ensayos genéticos utilizando una estación total.

Con este método se realiza en primer lugar un análisis de varianza de una vía, en el que aparece como único factor la familia, para obtener los BLUPs de los efectos familiares con el procedimiento MIXED en SAS (SAS-Institute 1999). A la variable original se le sustrae la media global y los efectos familiares obtenidos, dando como resultado unos residuos que utilizaremos para modelizar la estructura espacial de los datos. Esta modelización se realiza mediante la construcción del semivariograma empírico empleando el procedimiento VARIOGRAM en SAS (SAS-Institute 1999), que representa gráficamente la semivarianza entre árboles en función de la distancia que los separa. Utilizando el procedimiento de regresión no lineal NLIN en SAS (SAS-Institute 1999) se ajusta un semivariograma teórico a la nube de puntos del semivariograma empírico, buscando un modelo que maximice el coeficiente de regresión al mismo tiempo que aporte un adecuado significado biológico. De este procedimiento se obtienen los parámetros del modelo, siendo los de tipo lineal, exponencial, esférico o gaussiano los que mejor se ajustan a los patrones espaciales habitualmente identificados. En base a estos parámetros se realiza la interpolación kriging en dos dimensiones con el procedimiento KRIG2D en SAS (SAS-Institute 1999), que segrega la variación del error espacialmente dependiente de aquella que es independiente de la posición. La estimación kriging en cada punto se puede interpretar como el efecto de la posición en la variable analizada.

Los valores kriging para la localización individual de cada árbol se emplean para corregir los valores de la variable original, obteniéndose una nueva variable corregida que es espacialmente independiente. Esta variable corregida se vuelve a analizar mediante un análisis de varianza de una vía, como el empleado en el primer paso de este proceso, obteniéndose una nueva estimación de los efectos familiares. A partir de esta nueva estimación se obtienen unos nuevos residuos que se vuelven a modelizar mediante semivariogramas y kriging, dando como resultado una nueva estimación kriging con la que corregir la variable original. El proceso se repite de manera iterativa hasta la convergencia de la estimación de los BLUPs de los efectos familiares, o dicho de forma equivalente, hasta que el ranking familiar permanezca estable. En la Figura A38, Anexo 2, se muestra un esquema del proceso, del que además puede consultarse una explicación más detallada en Zas (2006).



**Figura A38** Esquema del análisis espacial iterativo (ISA). Se determina en primer lugar la estructura espacial de los residuos tras eliminar los efectos familiares ( $\epsilon$ ) mediante el uso de semivariogramas. Se ajusta después el semivariograma teórico obteniendo sus parámetros: *sill*, *nugget* y *rango*, que se usan para descomponer los residuos mediante la interpolación kriging en una parte espacialmente dependiente ( $\eta$ ) y otra correspondiente al error aleatorio ( $\delta$ ). Se re-analizan entonces los valores originales ajustados en base a la estructura espacial detectada ( $y-\eta$ ), y se obtiene una nueva predicción de los efectos familiares (BLUPs) con los que se generan unos nuevos residuos ( $\epsilon'$ ) de los datos originales. Se repite el proceso iterativamente hasta la convergencia de la predicción de los BLUPs de los efectos familiares. Figura tomada de Zas (2006).

A continuación se muestra el código adaptado de Zas (2006) para ejecutar este procedimiento en el paquete estadístico SAS/STAT:

```
/* Iterative Spatial Analysis (ISA). Método descrito en Zas, R. 2006. Tree Genetic & Genomics 2: 177-186. */
```

```
/* La tabla de datos denominada 'DATOS' incluirá el genotipo (familia) de cada planta ('g'), los valores de la variable a corregir y las coordenadas de cada planta en metros ('x' e 'y'). Eliminar datos ausentes */
```

```
data <DATOS>;
set analisis;
variable= 'NOMBRE DE LA VARIABLE A CORREGIR';
x=int(x*100);y=int(y*100);/* Convierte las coordenadas en números enteros y sus unidades de metros a centímetros */
run;
/* Calcula la media global de la variable */
proc means data=analisis noprint;
var variable;
output out=mean mean=mean;
run;
/* Guarda el dato de la media global en la macrovariable 'mean' */
data mean; set mean; call symput('mean',mean);run;
/* Crea la tabla vacía 'parameters' que se irá completando durante el proceso iterativo */
data parameters;run;
/* Análisis de varianza preliminar para la obtención de los efectos aleatorios de la familia (BLUPs) */
```

```

%let i=1;
ods listing close;
ods output Covparms=random&i solutionR=BLUP&i;
proc mixed data= analisis covtest;
  class g;
  model variable= ;
  random g/solution;
run;quit;
proc sort data= analisis; by g;
proc sort data=blup&i; by g;
/* Obtiene los residuos preliminares sustrayendo a la variable original los
efectos familiares y la media global */
data resid; merge analisis blup&i (keep=estimate g
rename=(estimate=blup&i)); by g;
resid&i=variable-blup&i-&mean;
run;
ods listing;

/* Definición del macro ISA con un único argumento, el número de
iteraciones 'Nsteps' */
%macro step(Nsteps);

%inicio: /* Comienzo del bucle */

/* Calcula el semivariograma residual empírico */
proc variogram data=resid outv=variogram;
compute lagdistance=300 maxlags=30;
          /* lagdistance = intervalo de distancias (cm)
          utilizado en la construcción del semivariograma.
          maxlags = numero de puntos que definen el
          semivariograma. Hay que ajustar el producto
          'lagdistance x maxlags' a la mitad de la longitud
          mayor de la parcela o a aquella distancia a la que
          observemos un patrón nítido y con significado
          biológico (en cm) */

  coordinates xc=x yc=y;
  var resid&i;
run;
/* Representa gráficamente el semivariograma residual empírico */
proc gplot data=variogram;
plot variog*distance;
symbol1 i=none l=1 c=blue v=dot ;
symbol2 i=join l=1 c=red v=square ;
symbol3 i=join l=1 c=green v=star ;
symbol4 i=join l=1 c=black v=triangle ;
run;quit;
/* Ajusta el semivariograma teórico mediante el procedimiento de regresión
no lineal */
ods listing close;
ods output anova=NLINanova&i Estsummary=NLINsummary&i
parameterestimates=NLINparameter;
proc NLIN data=variogram (Where=(Lag>0)) outest=STAT;
          /* Valores de inicio para el cálculo iterativo de los
          parámetros del semivariograma teórico ajustado. Para
          reducir el tiempo de cálculo definiremos estos valores en
          función de la representación gráfica del semivariograma
          empírico */
parms C0=10 /* Sill */
      Cn=60 /* Nugget */
      a0= 1000; /* Rango */

```

```

        /* Modelos de ajuste. Utilizaremos únicamente el modelo
        que muestre el mejor ajuste */
model variog=cn+(c0)*(1-exp(-distance/a0));          /* Exponencial */
model variog=cn+(c0)*(1-exp(-distance**2/a0**2));    /* Gaussiano */
model variog=cn+c0*distance;                        /* Lineal */
if distance>=a0 then model variog=cn+c0; else model
variog=cn+(c0)*(3/2*distance/a0-1/2*(distance/a0)**3); /* Esférico */
output out=estimated residual=res predicted=exp;
run;quit;
/* Regresión entre los valores predichos y los observados del procedimiento
de regresión no lineal */
ods listing;
ods listing close;
ods output Fitstatistics=NLINREG&i;
proc reg data=estimated;
model exp=variog;
run;
/* Almacena los parámetros del semivariograma teórico */
ods listing;
proc transpose data=NLINParameter out=parameter;
  id parameter;
  var estimate;
run;

data parameter; set parameter; step="&i";run;
data parameters;set parameters parameter;run;

/* Calcula los puntos del semivariograma teórico */
data variogram; set variogram;_Name_='Estimate';run;
data variogram2; merge variogram parameter;by _name_;

        /* Utilizar el mismo modelo aplicado
        en la regresión no lineal */
/* Exponencial */: vari=cn+(c0)*(1-exp(-distance/a0)); type='Exponential';
output;
/* Gaussiano */: vari=cn+(c0)*(1-exp(-distance**2/a0**2));
type='Gaussian';output;
/* Lineal */: vari=cn+c0*distance;type='Power';output; /*
Esférico */: if distance<a0 then vari=cn+(c0)*(3/2*distance/a0-1/2 *
(distance/a0)**3); else vari=cn+c0; type='Spherical'; output;

vari=variog; type = 'regular'; output;
run;
/* Representa gráficamente de forma conjunta los semivariogramas residuales
empírico y teórico */
proc gplot data=variogram2 (where=(lag>0));
  plot vari*distance=type;
  symbol2 l=1 c=blue i=none v=dot;
  symbol1 i=join l=1 c=red v=none;
  symbol3 i=join l=1 c=green v=star;
  symbol4 i=join l=1 c=black v=triangle;
run;quit;

data variog&i; set variogram2;keep TYPE LAG COUNT DISTANCE VARI;run;

/* Prepara la malla sobre la que aplicar el kriging. La malla es una
pequeña traslación de la tabla original para que el procedimiento kriging
no asuma como verdadero el valor original de la variable en la posición de
cada planta, sino que la re-estime mediante interpolación */
data malla; set resid; x=x+1;y=y+1; keep x y; run;
/* Genera macrovariables con los parámetros del semivariograma teórico */

```

```

data _null_; set parameter;
  call symput('nugget',cn);
  call symput('scale',c0);
  call symput('range',a0);
run;
/* Interpolación kriging */
proc krige2D data=resid outest=kriging;
  predict r=9000 var=resid&i max=600;
          /* LOCAL KRIGING: r= radio de acción considerado en la
          interpolación (utilizar 'lagdistance x maxlags' del
          ajuste del semivariograma empírico). max= n° de puntos
          más próximos considerados en la interpolación. Estos
          parámetros se ajustarán en función del tiempo que demande
          el cálculo y las dimensiones de la parcela */
  model scale=&scale range=&range /* &range=1 en el modelo 'lineal' */
nugget=&nugget form='Exponential o Spherical o Power o Gaussian';
  coordinates xc=x yc=y;
  grid gdata=malla xc=x yc=y;
run;

/* Corrige la variable original restando la estimación kriging */
data krig&i; set kriging; x=gxc-1; y=gyc-1; /* Deshace la traslación
de la malla */

rename estimate=krig&i; keep estimate x y ;run;
proc sort; by x y;
proc sort data=resid; by x y;
data resid; merge resid krig&i; by x y;
  Vcorr=variable-krig&i;
run;

%let j=%eval(&i+1);
%put estamos en el paso &i &j;

/* Reanaliza la variable corregida para obtener unos nuevos efectos
familiares (BLUPs)*/
ods listing close;
ods output Covparms=random&j solutionR=blup&j;
proc mixed data=resid covtest;
  class g ;
  model vcorr =;
  random g /solution;
run;quit;
/* Obtiene unos nuevos residuos sustrayendo a la variable original los
nuevos efectos familiares y la media global */
ods listing;
proc sort data=resid; by g;
proc sort data=blup&j; by g;
data resid; merge resid blup&j (keep=g estimate rename=(estimate=blup&j));
by g;
resid&j=variable-blup&j-&mean;
temp=resid1-resid2;
run;

/* Renombra las tablas y les añade el número de iteración */
data random&j; set random&j; step=&j;run;
data nlinanova&i;set nlinanova&i; step=&i;run;
data nlinreg&i; set nlinreg&i; step=&i;run;

/* Reinicia el bucle del proceso iterativo o lo termina si se han alcanzado
el número de iteraciones 'Nsteps' determinadas */
%let i=&j;

```

```
%if &i<&Nsteps %then %goto inicio;
%mend;
%step(6) /* Determina el número de iteraciones. Ajustar hasta conseguir la
estabilidad de los BLUPs según el tiempo que demande el cálculo */
```

#### 10.2.2.2. Análisis basados en la verosimilitud para explorar e interpretar la interacción G×E

La utilización de modelos mixtos en los análisis de varianza y la disponibilidad de métodos de estimación basados en la verosimilitud como el REML incluido en el procedimiento MIXED de SAS (SAS-Institute 1999), permite especificar y testar diferentes estructuras de covarianzas genéticas y del error necesarias para caracterizar la interacción genotipo × ambiente (G×E). La potencia y flexibilidad de los análisis basados en la verosimilitud permite: a) el desarrollo de test robustos sobre las diferentes causas de la interacción y b) restringir las varianzas y covarianzas genéticas estimadas dentro del rango de valores aceptable. Comparando la verosimilitud de diferentes modelos a los que se aplican distintas restricciones en la estructura de covarianza genética y/o residual (modelo reducido) frente a un modelo sin restricciones (modelo saturado), podemos testar diferentes hipótesis acerca del origen y las causas de la interacción. De los análisis REML del PROC MIXED se deriva el parámetro denominado ‘logaritmo de verosimilitud restringida’ (RLL), que define la bondad de ajuste de cada modelo. Bajo la hipótesis nula de que el modelo sin restricciones no es diferentes del modelo reducido, el ‘ratio del logaritmo de verosimilitud’  $LLR = -2 (RLL_{\text{modelo reducido}} - RLL_{\text{modelo saturado}})$  sigue una distribución aproximada chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con tantos grados de libertad como la diferencia existente entre el número de parámetros a estimar entre el modelo sin restricciones y el reducido (Fry 2004).

En base a este método se han adaptado los programas SAS de Yang (2002) a nuestro diseño experimental, utilizando modelos mixtos con el sitio como factor fijo (S) y la familia (G), el bloque (B) y la interacción genotipo × sitio (G×S) como factores al azar. Ya que la existencia de varianzas residuales heterogéneas entre sitios fue significativa, todos los modelos fueron implementados con heterogeneidad de varianzas residuales con la opción GROUP en la sentencia REPEATED. Para evitar valores fuera de rango de las correlaciones familiares (>1 o <-1) se incluyeron las opciones UPPERB y LOWERB en la sentencia PARMs. Para la estimación de la estructura de covarianza familiar (varianzas y covarianzas a través de sitios) se utilizaron las opciones SUBJECT y TYPE en la sentencia RANDOM. Las restricciones fueron especificadas mediante la elección adecuada de los modelos de covarianza predefinidos en la opción TYPE de la misma sentencia RANDOM, y fijando parámetros de

covarianza específicos con la opción HOLD de la sentencia PARMS. Además para facilitar la convergencia del modelo y acelerar el cálculo se especificaron valores de inicio obtenidos de un análisis de varianza convencional con todos los sitios y de cada sitio por separado.

A continuación se muestra los códigos SAS empleados en los Capítulos II y III de este trabajo para el modelo sin restricciones, y para cada uno de los modelos necesarios para probar diferentes hipótesis mediante el test del ratio del logaritmo de verosimilitud mencionado (ver Tabla 4.1). Sirva como ejemplo un caso con tres sitios de ensayo.

*/\* Códigos adaptados de Yang, R-C. 2002. Crop Sci. 42: 1434-1440. \*/*

*/\* Para todos los modelos la tabla de datos denominada 'DATOS' incluirá el genotipo (familia) de cada planta ('g'), el sitio de ensayo ('s'), el bloque ('b') y los valores de la variable a corregir \*/*

#### H0. Modelo saturado (sin restricciones)

```
proc mixed data='DATOS' covtest;
  class s g b;
  model 'VARIABLE'=s;
  random s/subject=g type=UNR; /* UNR: Permite varianzas (familiares para
  cada sitio) y covarianzas (familiares entre sitios) distintas. Además la R
  de UNR indica que los parámetros iniciales y los valores que saca en el
  output son las correlaciones y no las covarianzas */
  random b;
  repeated /group=s; /* Permite varianzas residuales
  heterogéneas entre sitios */
  parms VG1, VG2, VG3, 0.5, 0.5, 0.5, VR1, VR2, VR3 /* Parámetros iniciales*/
  / upperb=.,.,.,., 0.99999, 0.99999, 0.99999, .,.,.,.
  /* Limita las correlaciones a ser menor que 1 */
  lowerb=.,.,.,., -0.99999, -0.99999, -0.99999, .,.,.,.;
  /* Limita las correlaciones a ser mayor que -1 */
  ods output Covparms = 'tabla de varianzas y covarianzas' fitstatistics =
  'tabla de estadísticos de bondad de ajuste';
run;
```

, donde 'VGn' es la varianza familiar del análisis convencional en el sitio 'n' y 'VRn' es la varianza residual del análisis convencional en el sitio 'n'.

#### H1. Test de hipótesis para la existencia de interacción genotipo × ambiente

```
proc mixed data='DATOS' covtest;
  class s g b;
  model 'VARIABLE'=s;
  random s/subject=g type=CS; /* CS: obliga a varianzas familiares iguales
  entre sitios y a una correlación entre sitios igual para todos los pares
  de sitios */
  random b;
  repeated /group=s; /* Permite varianzas residuales
  heterogéneas entre sitios */
  parms 0, VG, VR1, VR2, VR3 /* Parámetros iniciales */
  / upperb=.,.,.,.,.
  /* Limita las correlaciones a ser menor que 1 */
```

```

lowerb=.,.,.,.,.,.
/* Limita las correlaciones a ser mayor que -1 */
hold=1; /* Fuerza a que el parámetro n°1 no sea estimado, sino que
tome como predefinido el valor inicial que le dimos en la sentencia PARMS,
es decir, VGxE=0 */
ods output Covparms = 'tabla de varianzas y covarianzas' fitstatistics =
'tabla de estadísticos de bondad de ajuste';
run;

```

, donde 'VG' es la varianza familiar del análisis convencional conjunto y 'VRn' es la varianza residual del análisis convencional en el sitio 'n'.

## H2. Test de hipótesis para la homogeneidad de varianzas familiares a través de sitios

(para testar esta hipótesis se compara este modelo con el H4 y no con el saturado)

```

proc mixed data='DATOS' covtest;
class s g b;
model 'VARIABLE'=s;
random s/subject=g type=CS; /* CS: obliga a varianzas familiares iguales
entre sitios y a una correlación entre sitios igual para todos los pares de
sitios */
random b;
repeated /group=s; /* Permite varianzas residuales
heterogéneas entre sitios */
parms VGE, VG, VR1, VR2, VR3 /* Parámetros iniciales */
/ upperb=.,.,.,.,.,.
/* Limita las correlaciones a ser menor que 1 */
lowerb=.,.,.,.,.,. ;
/* Limita las correlaciones a ser mayor que -1 */
ods output Covparms = 'tabla varianzas y covarianzas' fitstatistics =
'tabla estadísticos de bondad de ajuste';
run;

```

, donde 'VGE' y 'VG' son las varianzas de la interacción G×E y familiar respectivamente del análisis convencional conjunto y 'VRn' es la varianza residual del análisis convencional en el sitio 'n'.

## H3. Test de hipótesis para correlaciones familiares perfectas (=1) entre pares de sitios o Test para interacción con cambios de ranking (COI)

```

proc mixed data='DATOS' covtest;
class s g b;
model 'VARIABLE'=s;
random s/subject=g type=CHS; /* La estructura CHS permite varianzas
familiares diferentes entre sitios pero modeliza una única correlación
genética entre todos los pares de sitios */
random b;
repeated /group=s; /* Permite varianzas residuales
heterogéneas entre sitios */
parms VG1, VG2, VG3, 0.9999, VR1, VR2, VR3 /* Parámetros iniciales */
/ upperb=.,.,.,.,.,.0.9999,.,.,.,.
/* Limita las correlaciones a ser menor que 1 */
lowerb=.,.,.,.,.,.-0.9999,.,.,.,.
/* Limita las correlaciones a ser mayor que -1 */

```

```

hold=4; /* Fuerza a que el parámetro n°4 no sea estimado, sino que
tome como predefinido el valor inicial que le dimos en la sentencia PARMS,
es decir, correlaciones entre todos los pares de sitios = 0.9999 = 1 */
ods output Covparms = 'tabla varianzas y covarianzas' fitstatistics =
'tabla estadísticos de bondad de ajuste';
run;

```

, donde 'VGn' es la varianza familiar del análisis convencional en el sitio 'n' y 'VRn' es la varianza residual del análisis convencional en el sitio 'n'.

#### H4. Test de hipótesis para homogeneidad de las correlaciones familiares entre pares de sitios

```

proc mixed data='DATOS' covtest;
class s g b;
model 'VARIABLE'=s;
random s/subject=g type=CHS; /* La estructura CHS permite varianzas
familiares diferentes entre sitios pero modeliza una única correlación
genética para todos los pares de sitios */
random b;
repeated /group=s; /* Permite varianzas residuales
heterogéneas entre sitios */
parms VG1,VG2,VG3,0.5,VR1,VR2,VR3 /* Parámetros iniciales */
/ upperb=.....,0.99999,.....
/* Limita las correlaciones a ser menor que 1 */
lowerb=.....,-0.99999,..... ;
/* Limita las correlaciones a ser mayor que -1 */
ods output Covparms = 'tabla varianzas y covarianzas' fitstatistics =
'tabla estadísticos de bondad de ajuste';
run;

```

, donde 'VGn' es la varianza familiar del análisis convencional en el sitio 'n' y 'VRn' es la varianza residual del análisis convencional en el sitio 'n'.

#### H5. Test de hipótesis para correlaciones familiares perfectas (=1) entre sitios pertenecientes a la misma zona o Test para interacción con cambios de ranking (COI) dentro de zonas (sitios 1 y 2 pertenecientes a la misma zona)

```

proc mixed data='DATOS' covtest;
class s g b;
model 'VARIABLE'=s;
random s/subject=g type=UNR; /* UNR: Permite varianzas (familiares para
cada sitio) y covarianzas (familiares entre sitios) distintas. Además la R
de UNR indica que los parámetros iniciales y los valores que saca en el
output son las correlaciones y no las covarianzas */
random b;
repeated /group=s; /* Permite varianzas residuales
heterogéneas entre sitios */
parms VG1,VG2,VG3,0.9999,0.5,0.5,VR1,VR2,VR3 /* Parámetros iniciales*
/ upperb=.....,0.99999,0.99999,0.99999,.....
/* Limita las correlaciones a ser menor que 1 */
lowerb=.....,-0.99999,-0.99999,-0.99999,..... ;
/* Limita las correlaciones a ser mayor que -1 */
hold=4; /* Fuerza a que el parámetro n°4 no sea estimado, sino que
tome como predefinido el valor inicial que le dimos en la sentencia PARMS,
es decir, correlación entre los sitios 1 y 2 = 0.9999 = 1 */

```

```
ods output Covparms = 'tabla varianzas y covarianzas' fitstatistics =
'tabla estadísticos de bondad de ajuste';
run;
```

, donde 'VGn' es la varianza familiar del análisis convencional en el sitio 'n' y 'VRn' es la varianza residual del análisis convencional en el sitio 'n'.

### 10.2.2.3. Otros modelos mixtos para explorar la interacción $G \times E$

#### 10.2.2.3.1 Modelo de la varianza de la estabilidad de Shukla

Se define la estabilidad genotípica desde el punto de vista agronómico como la uniformidad de comportamiento de un genotipo en un conjunto heterogéneo de ambientes. Son muchos los modelos utilizados para medir la estabilidad genotípica: varianza de la estabilidad de Shukla (Shukla 1972), regresión de Finlay-Wilkinson (Finlay y Wilkinson 1963), regresión de Eberhart-Russel (Eberhart y Russel 1966), varianza ambiental, etc, que suponen una extensión del modelo de partida en genética cuantitativa (modelo simple de doble entrada):

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_j + (G \times S)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde  $Y_{ijk}$  es el comportamiento del  $i$ -ésimo genotipo en el  $j$ -ésimo sitio,  $\mu$  es la media global,  $G_i$  es el efecto principal del genotipo  $i$ ,  $S_j$  es el efecto principal del sitio  $j$ ,  $G \times S_{ij}$  es la interacción entre el genotipo  $i$  y el sitio  $j$  y  $\varepsilon_{ijk}$  es el término aleatorio del error.

Los modelos de estabilidad se pueden implementar en el marco de los modelos mixtos donde los sitios se definen como factores aleatorios y los genotipos como fijos, con la ventaja de usar el método REML (máxima verosimilitud restringida) para la estimación de los parámetros del modelo.

El modelo de Shukla difiere del modelo simple de doble entrada en que el factor aleatorio de la interacción  $(G \times S)_{ij}$  requiere de una predicción de la varianza independiente para cada uno de los genotipos, es decir  $\sigma^2_{GS(i)}$ . La varianza de la interacción propia de cada genotipo se define como su estabilidad genotípica, que para valores altos se interpreta como inestabilidad y para valores bajos como estabilidad.

A continuación se muestra el código SAS adaptado de Piepho (1999) y empleado en el Capítulo III de este trabajo. No se incluye el efecto del bloque por tratarse de medias familiares en cada sitio.

```
/* Código adaptado de Piepho, H-P. 1999. Agron. J. 91: 154-160. */
```

```
/* La tabla de datos denominada 'DATOS' incluirá el genotipo (familia) de cada planta ('g'), el sitio de ensayo ('s') y los valores de la variable a analizar */
```

```
proc mixed data='DATOS' covtest scoring=5 method=ML NOCLPRINT lognote;
  class s g;
  model 'VARIABLE'= g/ ddfm=bw;
  random int/sub= s;
  repeated g/sub= s type=UN(1);
  ods output Covparms = 'tabla varianzas y covarianzas' fitstatistics =
'tabla estadísticos de bondad de ajuste';
run;
```

Otra forma alternativa que permite el uso de parámetros de inicio para acelerar los cálculos y evitar problemas de convergencia:

```
proc mixed data='DATOS' covtest scoring=5 method=ML NOCLPRINT lognote;
  class s g;
  model 'VARIABLE'= g/ ddfm=bw;
  random int/sub= s;
  random g/sub= s group=g;
  parms 'parámetros de inicio';
  ods output Covparms = 'tabla varianzas y covarianzas' fitstatistics =
'tabla estadísticos de bondad de ajuste';
run;
```

#### 10.2.2.3.2 Modelos de regresión factorial

La regresión factorial permite incorporar directamente variables ambientales explícitas en modelos lineales para explorar las causas de la interacción G×E. A esta clase de modelos pertenecen aquellos que explican la interacción en base a sensibilidades genotípicas frente a cambios en las variables ambientales. En estos modelos además del efecto fijo del sitio y el aleatorio de la familia, se introducen secuencialmente distintos parámetros ambientales como covariables fijas, sustituyendo la interacción G×E por la interacción aleatoria con esta covariable. Las soluciones del efecto aleatorio de la interacción G×E (BLUPs) representan las pendientes de las respuestas lineales de cada genotipo a la variable ambiental en cuestión. Desde el punto de vista biológico, los modelos de regresión factorial nos informan de cuál es el parámetro ambiental que produce comportamientos más diferenciados entre los genotipos.

En el Capítulo III se utilizó un modelo de regresión factorial como el especificado incluyendo diversas variables climáticas, que fue implementado mediante el procedimiento MIXED de SAS (SAS-Institute 1999) del que se muestra su código:

```
/* Código adaptado de Romagosa I. et al. 2008. Interacción genotipo por ambiente. En: Ávila CM, Atienza SG, Moreno MT, Cubero JI (eds) La
```

adaptación al ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal. Junta de Andalucía, pp 109-135\*/

```
/* La tabla de datos denominada 'DATOS' incluirá el genotipo (familia) de
cada planta ('g'), el sitio de ensayo ('s'), los valores de la covariable
ambiental en cada sitio y los valores de la variable a corregir */
```

```
proc mixed data='DATOS' covtest;
  class g s;
  model 'VARIABLE'= covariable s/ HTYPE=1;
  random g*g*covariable/solution;
  ods output Covparms = 'tabla varianzas y covarianzas' tests1 = 'tabla
de efectos fijos' solutionR = 'tabla de BLUPs';
run;
```

### 10.2.2.3.3 Modelo para determinar la agrupación óptima de ambientes que reduzca el peso de la interacción G×E

La identificación de agrupaciones ambientales tales que maximicen la interacción entre grupos y minimicen la interacción dentro de cada uno, es una estrategia adecuada para determinar el patrón y reducir el efecto de la interacción G×E. Mediante el siguiente modelo reducido del modelo simple de doble entrada que agrupa ambientes, se puede diferenciar el comportamiento de los genotipos entre y dentro de grupos de ambientes:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + SS_j + S_k(SS_j) + G \times SS_{ij} + G \times S(SS)_{ik(j)} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde  $Y_{ijkl}$  es el valor de la variable dependiente,  $\mu$  es la media global,  $G_i$  es el efecto aleatorio de la familia  $i$ ,  $SS_j$  es el efecto fijo del grupo de sitios  $j$ ,  $S_k(SS_j)$  es el efecto fijo del sitio  $k$  dentro del grupo de sitios  $j$ ,  $G \times SS_{ij}$  es la interacción aleatoria entre la familia  $i$  y el grupo de sitios  $j$ ,  $G \times S(SS)_{ik(j)}$  es la interacción aleatoria entre la familia  $i$  y el sitio  $k$  dentro del grupo de sitios  $j$ , y  $\varepsilon_{ijkl}$  es el término aleatorio del error.

Si se aplica este modelo a diferentes agrupaciones de ambientes, la agrupación óptima sería aquella que minimice el ratio de la varianza de la interacción dentro de grupos ( $\sigma^2_{G \times S}$ ) frente a la varianza de la interacción entre grupos ( $\sigma^2_{G \times SS}$ ).

Para aplicar esta metodología en el Capítulo III se implementó el modelo anterior mediante el procedimiento MIXED de SAS (SAS-Institute 1999) del que se muestra su código:

```
/* La tabla de datos denominada 'DATOS' incluirá el genotipo (familia) de
cada planta ('g'), el grupo de sitios de ensayo ('ss'), el sitio de ensayo
('s') y los valores de la variable a corregir */
```

```
proc mixed data='DATOS' covtest;
```

```
class s ss g;  
model 'VARIABLE'= ss s(ss);  
random g g*ss g*s(ss);  
ods output Covparms = 'tabla varianzas y covarianzas';  
run;
```

**10.3. ANEXO 3: PUBLICACIONES  
CIENTÍFICAS RELEVANTES**

---



## **PUBLICACIÓN -1-**

**Raúl de la Mata**, Rafael Zas (2010) Performance of maritime pine Spanish Mediterranean provenances at young ages in a transitional region between Atlantic and Mediterranean climates in NW Spain. *Silvae Genetica* 59 (1):8-17



# Performance of Maritime Pine Spanish Mediterranean Provenances at Young Ages in a Transitional Region Between Atlantic and Mediterranean Climates in NW Spain

By R. DE LA MATA<sup>1,\*</sup> and R. ZAS<sup>2</sup>

(Received 23<sup>th</sup> February 2009)

## Abstract

Maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) occurs naturally in a wide variety of sites around SW Europe, from typical Mediterranean climates to areas in Northern Spain and France with a strong oceanic influence. Within its distribution range populations are strongly differentiated, showing local adaptations to environmental conditions that have been widely documented in different provenance trials both in the Atlantic region and in the Mediterranean area. In the present paper, we analyzed the performance of six Mediterranean provenances in three sites in the interior of Galicia (NW Spain), a transitional region between Atlantic and Mediterranean climates where few catalogued materials are available for reforestation. Seven year after planting, provenances coming from the mildest climates grew faster but showed inferior stem form. The provenance x site interaction was weak, although some significant provenance rank changes were observed in the driest site. Among the tested provenances, Serranía de Cuenca showed good early growth in all sites and acceptable stem form, being thus a potential recommended material for using in the area. The Albarracín origin showed also good results, with excellent stem form and acceptable growth, especially in the driest site. A combined spatial analysis allowed us to compare the tested provenances with improved materials from Coastal Galicia (NW Spain) and Western Australia planted in adjacent progeny trials. Although the differences were small, the Atlantic material of both breeding programs performed slightly better than the Mediterranean provenances, and represents another alternative material for use in reforestation in this transitional climate region.

**Key words:** *Pinus pinaster*, provenance trial, spatial analysis, seed origin, genetic resources.

## 1. Introduction

*Pinus pinaster* Ait. occurs naturally in SW Europe and NW Africa. Inside of its distribution area (approximately 4 million hectares) it occurs in a wide variety of sites, where three main groups can be distinguished: an east group including western Africa, eastern Africa, northern Italy, Corsica and Sardinia, a second group formed by the populations from eastern, central and western of the Iberian Peninsula, including the Portugal populations,

and a third group including the populations from northern Spain and France (BUCCI *et al.*, 2007). Maritime pine has great economic importance all around its distribution area, and has been introduced out of its natural region for production purposes in countries such as New Zealand, Australia and South Africa.

*P. pinaster* is the most important forest productive species in Galicia (NW Spain), both in the coastal area with a typical Atlantic climate (annual precipitation = 1500–2500 mm, annual temperature oscillation = 10–11°C), and in the interior area with prolonged summer drought and wide thermal oscillation (annual precipitation = 600–1200 mm, annual temperature oscillation = 13–14°C) which constitutes a transition region to the more continental and Mediterranean typical climate of the central areas of the Iberian Peninsula. The climate in all the area is likely to become more similar to the one in central Spain in the near future. The predictions of local climate models in the area show an average annual temperature increase with more extremes of heat in the summer, fewer extremes of cold in the winter, and important changes in the distribution of rain over the course of the year (PÉREZ-MUÑOZURI *et al.*, 2009).

According to the actual climatic differences between the coastal and the interior areas, two different provenance regions are recognized within Galicia, the northwest coastal (1a) and the northwest interior (1b) (ALÍA *et al.*, 1996). The first one shows excellent growth traits and branch characteristics, and reasonable stem form, but in the inner region, the stands have clearly worse quality in relation to growth, stem form and branch habits (ALÍA *et al.*, 1996). A breeding program was initiated in the coastal region in the 80's based on the high performance of the existing stands and nowadays there are three clonal seed orchards that supply genetically improved seeds for reforestation. However, the catalogued forest reproduction material approved for the inner region is limited to just three single selected stands, clearly insufficient to satisfy the plantation rate in this area. Most of the plantations are, thus, performed with seeds from other provenances of unknown behaviour in this region. Similarly, almost all the adult woodlands in the inner area of Galicia derived from plantations realized during the second half of the twentieth century with foreign seeds of unknown origin and dubious adaptation. Because of this poor performance, developing individual phenotypic selections within these stands is difficult, hampering the development of a breeding program for this region similar to the program in the coastal area.

<sup>1</sup>) Centro de Investigación Forestal de Lourizán. Apdo. 127, 36080 Pontevedra, Spain.

<sup>2</sup>) Misión Biológica de Galicia. CSIC. Apdo. 28, 36080. Pontevedra, Spain.

\*) To whom correspondence should be addressed. Current address: Misión Biológica de Galicia. CSIC. Apdo. 28, 36080. Pontevedra, Spain. Phone: +34 986 854800. E-Mail: [rmata.cifal@siam-cma.org](mailto:rmata.cifal@siam-cma.org).

Multiple wide-range studies using different molecular markers revealed that maritime pine populations show a high geographic structuration of the intraspecific genetic variation (BUCCI *et al.*, 2007; BURBAN and PETIT, 2003; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2002). Populations are isolated, and frequently show strong adaptations to local environmental conditions, like specific substrates, rainfall regimes, elevation range, occurrence of fire, or frost frequency (FERNANDES and RIGOLOT, 2007; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2004; TAPIAS *et al.*, 2004). Water stress and cold hardiness are probably some of the main factors driving population divergence (CHAMBEL *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2002; GUYON and KREMER, 1982). Differentiation among provenances has also been widely documented for many quantitative traits in different provenance trials both in the Atlantic region (CORREIA *et al.*, 2004; DANJON, 1994a; MOLINA, 1965) and in the Mediterranean area (ALÍA *et al.*, 1995; HARFOUCHE *et al.*, 1995; MATZIRIS, 1982).

In one provenance trial established in the coastal area of Galicia under a typical Atlantic climate, the Atlantic provenances were superior in height growth and branch characteristics, the local provenance being the best one (MOLINA, 1965). On the other hand, in a multi-location provenance trial established in five locations with different site indexes and climatic conditions in central Spain, the Atlantic provenances showed high growth only in the mildest sites, but showed bad adaptation when the drought period was long, while the Spanish medium mountain provenances developed well in all sites (ALÍA *et al.*, 1995; ALÍA and MORO, 1996; ALÍA *et al.*, 2001).

Despite the data from these trials, we lack information about the performance of *P. pinaster* provenances in the transitional region objective of the present study. Thus, we analyzed the performance of six selected provenances of *P. pinaster* from the Mediterranean area of the Iberian Peninsula planted across three sites in the interior area of Galicia, three and seven years after planting to evaluate the feasibility to use this material in this region.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Genetic material and test sites

Three provenance trials were planted in the inland area of Galicia (NW Spain) in March 2001 (Guntín and Laza) and June 2001 (Becerreá) (Table 1). The three sites were located within the Region of Identification and Utilization (RIU) of forest reproductive material number 2, which takes up most of the inland area of Galicia (GARCÍA *et al.*, 2001).

The climate in the inland region clearly differs from the coastal area, showing a notorious continental influence, with greater annual and daily temperature oscillation, and lower annual and, specially, summer precipitation. Becerreá is the coldest and highest among the three sites, winter snow being frequent. During the study period, minimum temperatures in this site dropped below zero around 50 days per year (Table 1), with snowfall episodes every year. Guntín and Laza show a marked Mediterranean influence, with lower annual and summer precipitation. The strongest sum-

Table 1. – Location and main climatic features of the *Pinus pinaster* provenance trials from planting to assessment date (2001–2007 period).

	Becerreá	Guntín	Laza
Longitude (W)	7° 10' 32"	7° 40' 42"	7° 29' 32"
Latitude (N)	42° 50' 16"	42° 54' 02"	42° 02' 24"
Altitude (m)	900	550	770
Aspect	S	W	NE
Slope (%)	30	3	18
Climate characteristics (period 2001-2007)			
Annual precipitation (mm)	1026	842	685
Summer precipitation (mm) <sup>1</sup>	115	99	69
Range of summer precipitation (mm)	65-177	72-186	19-105
Gausson Index <sup>2</sup>	8	34	70
Annual mean temperature (°C)	10.4	11.7	11.9
Annual temperature oscillation (°C) <sup>3</sup>	13.1	13.3	13.7
Number of frost days (Tmin < 0 °C) per year	58	38	29
Absolute minimum temperature (°C)	-7.2	-7.1	-4.8

<sup>1</sup> Rain fallen during the months of June, July and August.

<sup>2</sup> Gausson =  $\Sigma(2T-P)$  for each month where  $2T > P$  (P: monthly precipitation (mm), T: monthly mean temperature (°C)).

<sup>3</sup> Difference between the mean temperature of the warmest month and the mean temperature of the coldest month.

mer drought occurs in Laza where a severe dry period occurred in the summer of 2005 (Table 1).

All the three trials follow a randomized complete block design with 10 replications and 5 tree-row-plots. Spacing was 3 x 2 m in Guntín and Becerreá, and 2.5 x 2 m in Laza, which is the typical spacing for *P. pinaster* plantations in this region.

Six Spanish provenances of the Mediterranean area, selected on the basis of the good characteristics for timber production of their natural stands and their performance in previous provenance trials (ALÍA *et al.*, 2001; MOLINA, 1965) were tested in each site. The details of the climate characteristics of each provenance origin are shown in Table 2.

Each provenance trial was planted adjoin to a progeny trial with 111 first-generation half-sib families of the Coastal-Galician (CG) breeding program and 6 families of the breeding program developed in Western Australia (WA) upon crosses from plus trees selected within the Leiría provenance. These progeny trials follow a randomized complete block design with 25 replications of one tree-plots. Seedlings of these progeny trials were cultivated together with the provenances following the same nursery protocols. Both the provenance and the progeny trials were planted at the same time, with the same spacing and soil preparation, and were measured at the same dates. These progeny trials were extensively studied in a companion paper (DE LA MATA and ZAS, under revision).

Seedlings from both the provenance and the progeny trials were cultivated in relatively small containers (Superleach 125 cm<sup>3</sup>) over a long period (9 months for Guntín and Laza, and 12 months for Becerreá), which may have entailed root deformations and poor stability of the seedlings after planting, as has been observed previously in other maritime pine plantations in the area (ZAS *et al.*, 2004).

## 2.2. Assessments

All the trees of each site were assessed for growth, stem form and branch characteristics three and seven years after planting, except those dead or badly suppressed. Ideally, to ensure a good correlation with performance at rotation age, assessment and selection

within forest genetic trials should be delayed until at least half of the rotation age (FRANKLIN, 1979). Rotation age for Maritime pine in this region is around 30–35 years, but previous studies analyzing age-age correlations in this species revealed that selection can be reasonably effective when trees are about 8–12 years old (KREMER, 1992, DANJON, 1994b). For instance, in one of the longest provenance studies with *P. pinaster*, DANJON (1994a) found general stability of the provenance rankings between ages 10 and 36. Assessments at age 7 can be thus considered to reflect reasonably well provenance adaptation to local environmental conditions. Nevertheless, results presented here should be considered as preliminary results that should be confirmed with further assessments at older ages. Growth traits included total height (H) measured with a pole in centimetres, and diameter at breast height (D) measured with a calliper in millimetres (only at age 7). Stem form and branch traits were assessed following GALERA *et al.* (1997). Stem form of each tree was evaluated by a straightness score (STR: 1 = straight to 6 = very crooked) and a stem leaning score (LEN: 1 = vertical to 4 = severe lean). The branching habit was assessed by the number of whorls (WH). A small forest road was constructed trough the Becerreá trial in 2005, affecting several trees of the trial. Only the three year-old assessment was thus available in this site.

## 2.3. Correcting the spatial dependence

Traits that showed non-random spatial structure were adjusted for spatial autocorrelation prior to the statistical analyses. Spatial adjustments were carried out using the Iterative Spatial Analysis (ISA) method (ZAS, 2006), which aims to correct the within block spatial heterogeneity not accounted for by the block design. The ISA method is based on prospecting the spatial structure of the dependent variable in each site by constructing the empirical semivariogram for the residuals adjusted for main effects with the SAS VARIOGRAM procedure (SAS-INSTITUTE, 1999), and fitting a theoretical semivariogram model with the SAS NLIN procedure (SAS-INSTITUTE, 1999). The spatial variation of the dependent variable is then modelled by the kriging method based on the theoretical model of the semivariogram and using the SAS KRIG2D procedure (SAS-INSTITUTE, 1999).

Table 2. – Main geographic and climatic features at the origin of the studied provenances.

	Bajo Tiétar	Sierra de Gredos	Montaña de Soria-Burgos	Serranía de Cuenca	Albarracín	Sierra Segura-Alcaraz
Longitude (W)	5° 23'-5° 53'	4° 17'-5° 10'	2° 27'-3° 27'	0° 53'-2° 25'	1° 12'-1° 51'	1° 57'-3° 00'
Latitude (N)	39°50'-40°05'	40°07'-40°27'	41°43'-41°56'	39°25'-40°37'	40°03'-40°25'	37°46'-38°46'
Altitude (m)	400	600-1400	800-1200	800-1200	1000-1400	800-1400
Annual precipitation (mm)	1060	1398	686	684	878	787
Summer precipitation (mm)	70	83	105	101	155	65
Annual mean temperature (°C)	14.4	13.4	11.3	12.3	9.6	13.7
Mean of min temperatures (°C) <sup>1</sup>	1.5	-0.2	-2.5	-1.1	-4	2.4
Thermal oscillation (°C) <sup>2</sup>	13.2	11.6	11.2	13.1	12.1	11.7

<sup>1</sup> Mean of daily minimum of the month of lowest average (°C).

<sup>2</sup> Thermal oscillation (°C): Annual mean of the diary oscillation.

Then, the original variable is adjusted for its spatial autocorrelation, subtracting the kriging estimate in each position. The new corrected variable is then reanalyzed and new estimates of the main effects are obtained, and used to generate new residuals. The process was repeated iteratively, until convergence of the main effect estimates (usually 5 steps are enough). A detailed description of the method can be consulted in ZAS (2006).

In each site, the spatial adjustments were carried out simultaneously for the provenance trial and the neighbouring progeny trial, assuming both the provenances and the families as a single main factor to obtain the residuals that were spatially modelled.

#### 2.4. Statistical analyses

All analyses were based on plot means data. A joint analysis of the three sites together was carried out for each trait using the following mixed model:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + P_j + BC_k(S_i) + SxP_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$  is the value of the plot  $ijk$ ,  $\mu$  is the overall mean,  $S_i$  is the fixed effect of site  $i$ ,  $P_j$  is the fixed effect of the provenance  $j$ ,  $BC_k(S_i)$  is the random effect of the block  $k$  within site  $i$ ,  $SxP_{ij}$  is the fixed interaction between the site  $i$  and the provenance  $j$ , and  $\varepsilon_{ijk}$  is the random error term. Provenance was considered a fixed factor because inference was limited to the six provenances tested. To analyse these mixed models the SAS MIXED procedure was used. Pairwise statistical comparisons of provenance means was conducted using the DIFF option of the LSMEANS statement of the MIXED procedure, which performs t-tests for the statistical significance of the difference between the least square means of all possible provenance means (SAS-INSTITUTE, 1999).

The performance of the tested provenances was also compared with the material tested in the adjacent progeny trials. Despite that the provenance and the progeny trials were two independent neighbouring trials, comparisons between them were reliable because the common spatial adjustments accounted for the eventual

local microenvironmental differences between both trials. Within each site, we compared the performance of the best of the six provenances, the best of the six WA families, and the mean performance of the best 18 out of the 111 CG families included within each progeny trial (i.e., applying a 1:6 selection intensity within each group). We tested for statistical differences between the different genetic groups by constructing the confidence intervals at 95% for the mean of each group. Non overlapping confidence intervals were interpreted as significance differences.

### 3. Results

Residuals after subtracting family effects revealed pronounced non-random spatial structures for the growth traits and the number of whorls in the three test sites. Stem form traits revealed random spatial structures with the exception of the Becerreá trial where STR and LEN revealed slight spatial autocorrelation. The spatial structure for most of the traits was well represented by a spherical theoretical semivariogram ( $r^2 > 0.85$ ,  $p < 0.001$ ). Patch sizes ranged between 34 and 112 m. The percentage of total residual variation explained by the spatial pattern varied from 10.6% for WH in Becerreá at age 3 to 73.2% for H in Laza at age 7. Height at age 7 was the trait that showed the largest intensities of spatial dependence.

The block structure of the experimental design absorbed part of the within site environmental variation, as revealed by significant among-block variances in all sites in the unadjusted analyses. However, the block variance was clearly lower than the percentage of variation explained by the spatial pattern, indicating that the block designs were not enough for absorbing all the spatial variation (data not shown). After the spatial adjustments the block variance became zero, and the residual variation decreased significantly in all cases. Additionally, the F ratio for testing the provenance effects substantially increased after the spatial adjustments. For some traits, such H and NW at age 7, significant differences between provenances were only detected after the spatial corrections.

Table 3. – Results of the mixed model for the analysis of different traits in three *P. pinaster* provenance trials in inner Galicia (NW Spain). F-ratios and significance levels<sup>1</sup> are presented.

AGE	TRAITS	SITE (S)	PROVENANCE (P)	S x P
3 years	Height	261.41 ***	8.75 ***	1.87 *
	N Whorls	55.40 ***	9.71 ***	1.50
	Leaning	95.63 ***	2.80 *	2.59 **
	Straightness	11.20 ***	3.80 **	1.29
7 years	Height	61.07 ***	2.55 *	1.68
	Diameter	36.87 ***	1.29	0.77
	N Whorls	0.00	2.61 *	0.78
	Leaning	5.36 *	12.86 ***	1.78
	Straightness	17.35 ***	3.47 **	1.05

<sup>1</sup> Significance levels: \*\*\* =  $P < 0.001$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \* =  $P < 0.05$ .

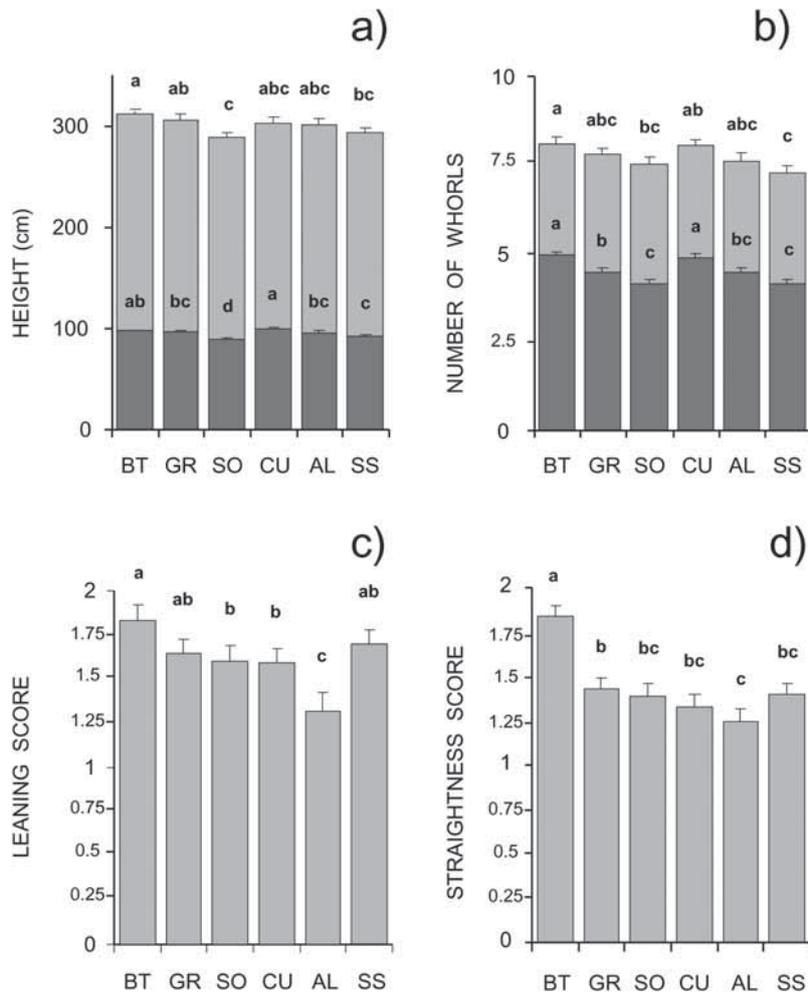


Figure 1. – Performance of 6 *P. pinaster* provenances for different traits across 3 provenance trials in inner Galicia (NW Spain). Provenances with the same letter are not significantly ( $p < 0.05$ ) different (t-test for differences between least square means). Dark gray bars denote traits assessed at age 3 and light gray bars denote traits assessed at age 7. Provenance codes: BT = Bajo Tietar, GR = Sierra de Gredos, SO = Montaña de Soria-Burgos, CU = Serranía de Cuenca, AL = Albarracín, SS = Sierra de Segura-Alcaraz. Straightness score varied from 1 (straight) to 6 (crooked), and leaning score varied from 1 (vertical) to 4 (leaned).

Differences among sites were significant ( $p < 0.05$ ) for all traits at age 3, and for H, D, LEN and STR at age 7 (Table 3). After spatial adjustments, the provenance effect was significant ( $p < 0.05$ ) for height growth and for all the stem form traits at both ages (Table 3). Regarding height growth at age 3, Bajo Tietar (BT) and Serranía de Cuenca (CU) showed the best performance, whereas Sierra de Segura-Alcaraz (SS) and Montaña de Soria-Burgos (SO) were the worst (Figure 1a). For height growth at age 7, Bajo Tietar maintained the largest growth, Sierra de Gredos (GR) being the second one. Serranía de Cuenca lost some positions at age 7 with respect to age 3. Sierra de Segura-Alcaraz and Montaña de Soria-Burgos continued showing the worst growth.

Bajo Tietar and Serranía de Cuenca, the two provenances that grew faster, had the highest values for the number of whorls, indicating strong polycyclism. On the

other hand, Sierra de Segura-Alcaraz and Montaña de Soria-Burgos showed the lower number of whorls, weak polycyclism, and poor growth (Figure 1b).

The best provenance for stem form traits was Albarracín (AL), and the worst ones Bajo Tietar and Sierra de Gredos, which however were among the provenances with best growth (Figure 1).

The provenance  $\times$  site interaction was significant only for height growth and stem leaning at age 3 (Table 3). The reaction norms for these two traits across the three sites are shown in Figure 2. The ranking of the six provenances regarding height growth was very similar in Becerreá and Guntín, but showed large changes in Laza. Sierra de Gredos grew well in this site but not as well in Guntín and Becerreá, whereas Sierra de Segura-Alcaraz and Bajo Tietar were the worst provenances in Laza but they performed relatively well in Guntín and Becerreá. In the case of stem leaning, the interaction is

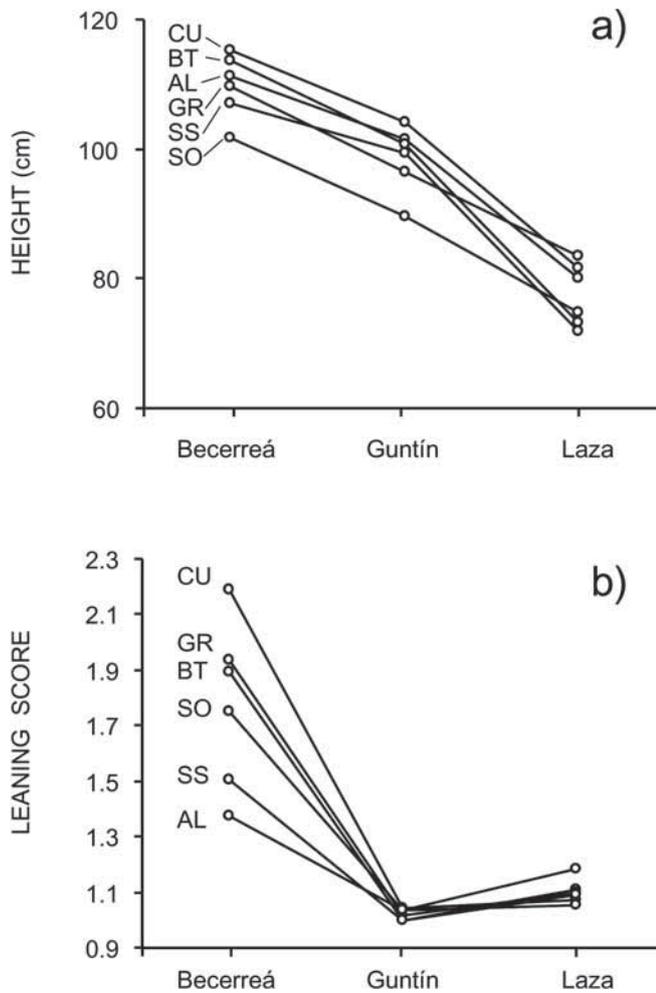


Figure 2. – Reaction norms of 6 *P. pinaster* provenances across three test sites in inner Galicia (NW Spain) for height growth (a) and stem leaning (b) at age 3. Provenance codes: BT = Bajo Tietar, GR = Sierra de Gredos, SO = Montaña de Soria-Burgos, CU = Serranía de Cuenca, AL = Albarracín, SS = Sierra de Segura-Alcaraz. Leaning score varied from 1 (vertical) to 4 (leaned).

likely to be due to a scale effect derived from the large phenotypic variation observed in the Becerreá trial for this trait (Fig. 2b). The interaction was not significant at age 7 for any trait.

Differences among provenances and the CG and WA families of the neighbouring progeny trials were small for all traits and sites, but the WA material and the half-sib CG families tend to have, in average, always higher growth, better stem form, and lower number of whorls than the mean performance of the six provenances in the three sites (data not shown). In addition, the material of WA performs slightly better than the half-sib CG families (see DE LA MATA and ZAS, under revision, for details). These results are maintained when comparisons are restricted to the best provenance, the best WA family and the 18 best CG families, i.e., applying a single trait selection of 1:6 intensity (Figure 3). The best families from either WA or CG grew significantly better in Laza and Guntín, whereas no significant differences were detected in Becerreá. Although the best WA and

CG families tend to have fewer whorls and better stem form than the best provenance in the three sites, differences among them were not significant, except for LEN in Laza.

## 4. Discussion

### 4.1. Spatial autocorrelation

The results indicated a strong spatial autocorrelation for all the growth variables with patchy structures and relatively large patch sizes. The block structure of the experimental designs was not enough to account for this spatial heterogeneity, and blocks were internally heterogeneous, violating the main assumption of the block designs. Conventionally analysis of this spatially autocorrelated data may give erroneous results, and adjustments for microenvironmental variation become essential (DUTKOWSKI *et al.*, 2006; ZAS, 2006). As observed in other studies, the spatial adjustment removed block effects and strongly reduced residual variation, favouring the detection of significance differences among provenances. Indeed, for some traits, significant differences among provenances were only detected after the spatial analysis.

Another important feature of the spatial analysis we used is that it allowed us to compare the genetic material included in the two adjacent but independent trials within each site. Using conventional approaches, comparisons between these trials may be confounded with microsite environmental effects, which can not be absorbed by the two independent experimental designs. However, using the iterative spatial analysis (ISA) method (ZAS, 2006) we were able to account simultaneously for the spatial heterogeneity of both trials, allowing us the comparison among the genetic materials of both trials (see later).

### 4.2. Provenance performance

Superiority of local provenance in height growth and survival at age 18 found by MOLINA (1965) in a provenance trial established in the coastal area of Galicia was found by other authors too (CORREIA *et al.*, 2004; DANJON, 1994a), suggesting that a great part of genotypic variability in *P. pinaster* is a result of local adaptations to environmental conditions through natural selection. Accordingly, in the provenance trial installed in central Spain (ALÍA *et al.*, 1995; ALÍA *et al.*, 2001) assessed at age 19 and 32, the Atlantic provenances showed bad adaptation when the drought period was long, and were clearly surpassed by other Mediterranean provenances. The Spanish medium mountain provenances (Sierra de Gredos, Montaña de Soria-Burgos and Serranía de Cuenca) developed well in all sites of this trial, showing the feasibility of their use in the interior areas of Spain (ALÍA and MORO, 1996). The results presented here indicate that, in this transitional region between Atlantic and Mediterranean climates, the provenances from origins with a high Atlantic influence (Sierra de Gredos and Bajo Tietar) were the ones that grew faster, and thus were apparently the best adapted to the local environmental conditions of this region. Specifically, the good performance in height

growth of Sierra de Gredos, an origin with a strong Atlantic influence and high precipitations (*Table 2*), coincides with MOLINA (1965) and with the good height and diameter growth in the Mediterranean region of Spain (ALÍA *et al.*, 1995; ALÍA and MORO, 1996; ALÍA *et al.*, 2001), suggesting a high phenotypic plasticity and versatility for using this provenance across a wide range of climatic variation. Bajo Tietar provenance was the best in height growth, but the worst regarding stem form. This agrees with the typical characteristics of the stands in this origin (ALÍA *et al.*, 1996) showing, as in the case of Sierra de Gredos, an intermediate behaviour between Atlantic and Mediterranean provenances, but with poor stem form and spiraled stems. Serranía de Cuenca also performed well in height growth, and showed acceptable stem form, as the natural stands in the origins do (ALÍA *et al.*, 1996). It is important to remark here that this is one of the most variable seed sources, perhaps because of its large size and heterogeneous environments, and because this area was one of the most important glacial refuges in southern Europe, from where the species spread (CARRIÓN *et al.*, 2003; SALVADOR *et al.*, 2000). Within this large provenance region, the Boniches source was among the best in height growth in the Spanish provenance trials (ALÍA *et al.*, 1995; ALÍA *et al.*, 2001). The remainder tested provenances, Montaña Soria-Burgos, Sierra de Segura Alcaraz, and Albarracín, showed poor growth but were among the best regarding stem form traits. In other provenances trials these origins showed intermediate performance both in growth and in stem form quality.

In the provenance trial established in central Spain, the best form was presented by mountain's provenances such as Moroccan, Corsican, Sierra de Gredos and some origins of Serranía de Cuenca, which agrees with the results from other provenance trials in Portugal assessed at age 8 (CORREIA *et al.*, 2004), France at age 36 (DANJON, 1994a), Greece at age 9 (MATZIRIS, 1982) and coastal Galicia at age 18 (MOLINA, 1965), suggesting that this kind of traits are less affected by environmental conditions. In agreement with these results, Sierra de Cuenca showed acceptable stem form in our trial series, as Montaña de Soria-Burgos did, which also showed excellent stem form in the coast of Galicia (MOLINA, 1965). However, contrary to previous results (ALÍA *et al.*, 1995; ALÍA and MORO, 1996; ALÍA *et al.*, 2001), Sierra de Gredos did not show good stem form in our trials, whereas Albarracín showed clearly the best stem characteristics although in other provenance trials this origin showed intermediate stem form qualities. These contradictory results may arise because seedlings in our trial series were cultivated in nursery in relatively small containers over a long period, favouring root deformations and poor anchorage after planting. Stability problems of containerized seedlings, resulting in stem leaning and strong stem curvatures have been reported before (LARIO and OCAÑA, 2004), and may alter comparisons among different genetic entries (CLIMENT *et al.*, 2008). It should be noted that those provenances with better height growth are those with the worst stem form. This negative correlation between growth and stem form has been commonly observed in other prove-

nance and progeny trials (AGUIAR *et al.*, 2003; CORREIA *et al.*, 2004; DANJON, 1994a; MATZIRIS, 1982; MOLINA, 1965), and it could be amplified in our provenance trial because those provenances that grow faster are likely to have larger root systems within the small containers and thus more rooting problems and worse stem form in the field.

#### 4.3. Provenance x Site interaction

In disagreement with the results obtained in central Spain (ALÍA *et al.*, 1997; CHAMBEL, 2006) the provenance x site interaction was weak, probably because the number of provenances tested and the number of test sites was much lower. With respect to height growth, Guntín and Becerreá sites behave in a similar way, whereas provenances in Laza performed relatively differently, showing the larger ranking changes (*Fig. 2*). From a climatic point of view, the most important difference among the test sites that could explain this pattern is the summer drought, reduced in Becerreá and Guntín, and pronounced in Laza (*Table 2*). This result is suggesting that summer drought is one of the most important factors driving maritime pine differentiation (DANJON, 1994a), and differences in local adaptations to this limiting factor among populations are expressed differentially in each test site, depending on the drought intensity.

In the case of stem leaning, the provenance x site interaction probably arises from a scale effect due to very large variation in Becerreá in relation to the other two sites (*Fig. 2*), probably as the result of the strong slope of this test site, the high frequency of snow storms, and the root problems mentioned earlier, which are supposed to be stronger in this site because it was planted three months after the others. The interaction was not significant at age 7, probably because only two sites were analyzed at this age, and because of a reduction of interaction with time, as observed by other authors (ALÍA *et al.*, 1997).

#### 4.4. Comparison with the improved coastal material

When we compare the tested provenances with the CG and WA improved material tested in the adjacent progeny trials, we can see that both improved materials had slightly better performances than the Mediterranean provenances, although the differences were minimal (*Fig. 3*). Nevertheless, the improved materials showed reasonably good adaptation to the interior of Galicia, reflecting the genetic gain due to selection in the respective breeding programs. These results suggest the versatility of the materials from these breeding programs to be used in different climatic regions, taking advantage of the added genetic gain obtained in the advance of the selection processes (DE LA MATA and ZAS, under revision). Considering these results, extending the deployment zone of the coastal maritime pine to inner areas where summer drought and/or winter cold is harder seems to be possible.

#### 4.5. Practical implications

Two weak spots are behind the results of the present paper. First, although age 7 is a reasonable age for selection purposes in this fast growing pine species (see

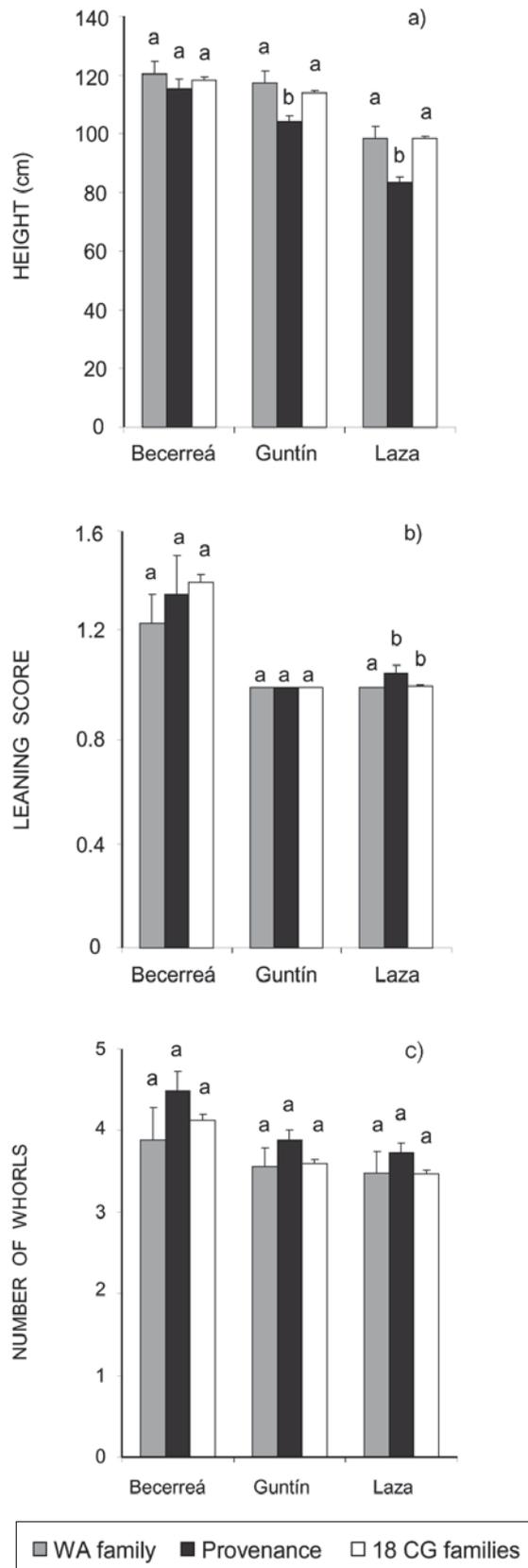


Figure 3. – Performance of the best *P. pinaster* provenance (Black bars), the best Western Australia (WA, gray bars) family and the mean performance of the best 18 Coastal-Galicia families (CG, white bars) in three test sites in inner Galicia (NW Spain), for three representative traits at age 3. Leaning score varied from 1 (vertical) to 4 (leaned). Within each site, different letters denote non overlapping confidence intervals ( $\alpha = 0.05$ ) for the means.

Material and Methods), 7 years in the field is probably a too short period to reflect provenance adaptation to local climate conditions. Future extreme climate episodes such as severe droughts or extreme low temperatures in winter or spring may alter the observed provenance ranking. Thus, the results and practical recommendations offered here should be managed with care and should be confirmed with further assessments at older ages. Second, the expected climate change in the area may also alter the relative performance of the studied provenances. Local climate models predict an increase in temperatures, especially in summer, and important changes in the distribution of precipitation over the year, with a progressive evolution towards more Mediterranean conditions (PÉREZ-MUÑOZ *et al.*, 2009). Depending on how these predictions are fulfilled, the results and recommendations presented here would be more or less valid. Nevertheless, in the worse scenario, the Atlantic climate in the Coastal area would become more similar to the actual climate in interior Galicia, so the results presented here would be especially relevant to understand how the studied materials would respond to climate change in coastal areas.

Despite the limitations commented above, the results presented here offer valuable information to identify suitable reproductive forest material to be used in the interior of Galicia. As a final practical recommendation, Sierra de Cuenca is the provenance with better performance in all sites, with high height growth and relatively good stem form, being thus, a recommended material for using in the interior area of Galicia. However, this provenance is very variable (ALÍA *et al.*, 1996), and different stands within the region could give very different results (F.J. Lario, personal communication). Albarracín showed also good results, being the best in stem form and showing acceptable growth in the three sites. Being a provenance well adapted to summer drought (ALÍA *et al.*, 1996), it can be recommended for using in the driest areas of interior Galicia.

Importing seeds from the recommended provenance regions according to the results obtained in the present work represents a clear alternative to supply forest reproductive material for use in afforestation in the interior of Galicia. However, the use of improved material from the CG and WA breeding programs should probably be preferred. To exploit the genetic gains of these programs in the inner area of Galicia, different selection strategies can be considered, among which we stick out the conversion of the progeny trials in breeding seedling orchards, or the selection within the family trials of a new breeding population from which new clonal seed orchards can be established.

## 5. Acknowledgements

This study was supported, during the last years, by the INIA projects RTA05-173 and RTA07-100. The series of trials was established under the supervision of GUILLERMO VEGA and JOSEFA FERNÁNDEZ-LÓPEZ. We thank ANA HERNÁNDEZ for her helpful participation in data processing and field assessments, Dr. ESTHER MERLO for stimulating discussion on the results, PABLO

XESTEIRA for helping in trial maintenance, and RICARDO FERRADÁS, RAQUEL JARES, MANUEL CERVIÑO, EMILIO PÉREZ, XOAQUÍN MOREIRA and PATRICIA MARTÍNS for field assessments. We greatly acknowledge comments by Dr. LUIS SAMPEDRO and two anonymous referees that clearly helped to improve the quality of the paper. We also thank BENITO SANTOS for reviewing the language.

## 6. References

- AGUIAR, A., M. H. ALMEIDA and N. BORRALHO (2003): Genetic control of growth, wood density and stem characteristics of *Pinus pinaster* in Portugal. *Silva Lusitana* **11**: 131–139.
- ALÍA, R., L. GIL and J. A. PARDOS (1995): Performance of 43 *Pinus pinaster* Ait. provenances on 5 locations in central Spain. *Silvae Genet* **44**: 75–81.
- ALÍA, R., S. MARTIN, J. DE MIGUEL, R. GALERA, D. AGÚNDEZ, J. GORDO, G. CATALÁN and L. GIL (1996): Las regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Ait. OA de Parques Nacionales. DGCONA, Madrid, 75 p.
- ALÍA, R. and J. MORO (1996): Comportamiento de procedencias de *Pinus pinaster* Ait. en el centro de España. *Invest Agr. Sist Rec For* **5**: 57–75.
- ALÍA, R., J. MORO and J.-B. DENIS (2001): Ensayos de procedencias de *Pinus pinaster* en el centro de España: resultados a la edad de 32 años. *Invest Agr. Sist Rec For* **10**: 333–354.
- ALÍA, R., J. MORO and J. B. DENIS (1997): Performance of *Pinus pinaster* provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. *Can J For Res* **27**: 1548–1559.
- BUCCI, G., S. C. GONZALEZ MARTINEZ, G. LE PROVOST, C. PLOMION, M. M. RIBEIRO, F. SEBASTIANI, R. ALIA and G. G. VENDRAMIN (2007): Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Mol Ecol* **16**: 2137–2153.
- BURBAN, C. and R. J. PETTIT (2003): Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Mol Ecol* **12**: 1487–1495.
- CARRIÓN, J. S., E. I. YLL, M. J. WALKER, A. J. LEGAZ, C. CHAIN and A. LOPEZ (2003): Glacial refugia of temperate, Mediterranean and Ibero-North African flora in south-eastern Spain: new evidence from cave pollen at two Neanderthal man sites. *Glob Ecol Biogeogr* **12**: 119–129.
- CLIMENT, J., J. ALONSO and L. GIL (2008): Root restriction hindered early allometric differentiation between seedlings of two provenances of Canary Island Pine. *Silvae Genet* **57**: 187–193.
- CORREIA, I., H. ALMEIDA and A. AGUIAR (2004): Variabilidade do crescimento e da forma de proveniências de *Pinus pinaster* Aiton aos 8 anos, na Mata nacional do Escarpim. *Silva Lusitana* **12**: 151–182.
- CHAMBEL, M. R. (2006): Variabilidad adaptativa y plasticidad fenotípica en procedencias de pinos ibéricos. Thesis. Dpto. de Silvopascicultura. Universidad Politécnica de Madrid, 118 p.
- CHAMBEL, M. R., J. CLIMENT and R. ALÍA (2007): Divergence among species and populations of Mediterranean pines in biomass allocation of seedlings grown under two watering regimes. *Ann For Sci* **64**: 87–97.
- DANJON, F. (1994a): Stand features and height growth in a 36-year-old maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenance test. *Silvae Genet* **43**: 52–62.
- DANJON, F. (1994b): Heritabilities and genetic correlations for estimated growth curve parameters in Maritime pine. *Theor Appl Genet* **89**: 911–921.
- DE LA MATA, R. and R. ZAS (under revision): Transferring Atlantic maritime pine improved material to regions with marked Mediterranean influence in inland NW Spain. A likelihood-based approach on spatially adjusted field data. Submitted.
- DUTKOWSKI, G. W., J. COSTA-SILVA, A. R. GILMOUR and G. A. LOPEZ (2002): Spatial analysis methods for forest genetic trials. *Can. J. For Res.* **32**: 2201–2214.
- FERNANDES, P. M. and E. RIGOLOT (2007): The fire ecology and management of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *For Ecol Manage* **241**: 1–13.
- FRANKLIN, E. C. (1979): Model rating levels of genetic variance to stand development of four North American conifers. *Silvae Genet* **25**: 207–212.
- GALERA, R., S. MARTIN, R. ALÍA, J. GORDO, A. M. AGUADO and E. NOTIVOL (1997): Manual de selección de masas productoras de semillas. Evaluación de caracteres. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. INIA, Madrid, 92 p.
- GARCÍA, J. M., J. DE-MIGUEL, R. ALÍA and S. IGLESIAS (2001): Regiones de Identificación y Utilización de material forestal de reproducción. Ministerio de Medio Ambiente. Serie Cartográfica, Madrid, 293 p.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C., R. ALÍA and L. GIL (2002): Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity* **89**: 199–206.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C., S. MARIETTE, M. M. RIBEIRO, C. BURBAN, A. RAFFIN, M. R. CHAMBEL, C. A. M. RIBEIRO, A. AGUIAR, C. PLOMION, R. ALIA, L. GIL, G. G. VENDRAMIN, A. KREMER and M. P. REVIRON (2004): Genetic resources in maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton): molecular and quantitative measures of genetic variation and differentiation among maternal lineages. *For Ecol Manage* **197**: 103–115.
- GUYON, J. P. and A. KREMER (1982): Phenotypic stability of height growth, daily changes in sap pressure and transpiration in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Can J For Res* **12**: 936–946.
- HARFOUCHE, A., P. BARADAT and C. E. DUREL (1995): Variabilité intraspécifique chez le pin maritime (*Pinus pinaster*) dans le sud-est de la France. I. Variabilité des populations autochtones et des populations de l'ensemble de l'aire de l'espèce. *Ann Sci For* **52**: 307–328.
- KREMER, A. (1992): Predictions of age-age correlations of total height based on serial correlations between height increments in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theor Appl Genet* **85**: 152–158.
- LARIO, F. J. and L. OCAÑA (2004): Base mecánica de la inestabilidad de *Pinus pinaster* Ait. en las plantaciones juveniles de climas atlánticos. *Cuad Soc Esp Cienc For* **17**: 175–180.
- MATZIRIS, D. I. (1982): Variation on growth and quality characters in *Pinus pinaster* provenances grown at seven sites in Greece. *Silvae Genet* **31**: 168–173.
- MOLINA, F. (1965): Comportamiento racial del *Pinus pinaster* en el noroeste de España. *An IFIE* **2**: 221–238.
- PÉREZ-MUNUZURI, V., M. FERNÁNDEZ-CAÑAMERO and J. L. GÓMEZ-GESTEIRA (2009): The evidence for and impact of climate change in Galicia. Xunta de Galicia. Consellería de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible. URL: [www.meteogalicia.es](http://www.meteogalicia.es), Santiago, 24 p.

- SALVADOR, L., R. ALIA, D. AGUNDEZ and L. GIL (2000): Genetic variation and migration pathways of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) in the Iberian Peninsula. *Theor Appl Genet* **100**: 89–95.
- SAS-INSTITUTE (1999): SAS/STAT User's guide, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, 3848 p.
- TAPIAS, R., J. CLIMENT, J. A. PARDOS and L. GIL (2004): Life histories of Mediterranean pines. *Plant Ecol* **171**: 53–68.
- ZAS, R., E. MERLO and J. FERNÁNDEZ-LÓPEZ (2004): Juvenile – mature genetic correlation in *Pinus pinaster* Ait. under different nutrient x water regimes. *Silvae Genet* **53**: 124–129.
- ZAS, R. (2006): Iterative kriging for removing spatial auto-correlation in analysis of forest genetic trials. *Tree Genet Genom* **2**: 177–186.

## Clonal Variation and Genotype by Environment Interactions in Growth and Wood Density in *Eucalyptus camaldulensis* at Three Contrasting Sites in Vietnam

By N. D. KIEN<sup>1,2,\*</sup>, G. JANSSON<sup>1,3</sup>, C. HARWOOD<sup>4</sup> and C. ALMQVIST<sup>3</sup>

(Received 6<sup>th</sup> July 2009)

### Abstract

A total of 172 clones of *Eucalyptus camaldulensis* were tested in three clonal tests in northern, north-central and southern Vietnam, with 32 of them planted across all three sites. At age 3–5 years, the clonal repeatabilities were 0.18–0.42 for growth traits, 0.71–0.78 for wood basic density and 0.56–0.66 for pilodyn penetration. Genotypic correlations between growth and density at the three sites were from –0.24 to 0.17, and did not differ significantly from zero. Genotypic correlations between sites were 0.32–0.56 for growth traits at age 3 years, and 0.72–0.88 for density and pilodyn penetration. Selection gains for breast height diameter at individual sites at a selection proportion of 5% were 22–32%, with minor effects on density. Selection for diameter at one site gave indirect responses in diameter at the other two sites that were only 40–60% of the gains obtainable from direct selection at those sites. This study shows that fast-growing *E. camaldulensis* clones can be selected in Vietnam with only minor effects on density. Selection for growth should be regionally based to maximize selection gain whereas clonal rankings for density will change little across regions.

**Key words:** clonal repeatability, correlated response, *Eucalyptus camaldulensis*, genotype by environment interaction, selection gain.

<sup>1</sup> Department of Plant Biology and Forest Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7080, SE-750 07 Uppsala, Sweden.

<sup>2</sup> Research Centre for Forest Tree Improvement, Forest Science Institute of Vietnam, Dong Ngac, Tu Liem, Ha Noi, Vietnam.

<sup>3</sup> Skogforsk (The Forestry Research Institute of Sweden), Uppsala Science Park, SE-751 83 Uppsala, Sweden.

<sup>4</sup> CSIRO Sustainable Ecosystems, Private Bag 12, Hobart 7001, Tasmania, Australia.

\* Corresponding author: Telephone +84 4 38389813, Fax +84 4 38362280. E-Mail: [Nguyen.Duc.Kien@fsiv.org.vn](mailto:Nguyen.Duc.Kien@fsiv.org.vn)

### Introduction

*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh is the most widely distributed eucalypt species, occurring primarily in riverine environments through most of the drier regions of Australia. The species displays major provenance variation (ELDRIDGE *et al.*, 1993). Recent taxonomic studies (BROOKER and KLEINIG, 2004; McDONALD *et al.*, 2009) identified several sub-species, distinguished by their differing leaf, bud and fruit morphology, with distributions that are usually geographically distinct, but overlap in some areas. In a recent study of population genetics using molecular markers, this sub-specific variation was shown to align closely with genetic differentiation (BUTCHER *et al.*, 2009). Physiological studies have revealed that provenances of *E. camaldulensis* differ in their mechanisms for adapting to drought conditions and in their water-use efficiency, and this has been related to the differing environmental conditions in their regions of origin (GIBSON *et al.*, 1994, 1995).

Provenances occurring in northern Australia have proved adaptable to a wide range of sub-humid tropical climates and *E. camaldulensis* has emerged as one of the most widely used plantation species in the seasonally dry tropics of many countries (MIDGLEY *et al.*, 1989; ELDRIDGE *et al.*, 1993) including India, Thailand and Vietnam, mainly for pulpwood, poles and less often small sawlogs, with rotation times from 4 to 10 years.

*Eucalyptus camaldulensis* was introduced into Vietnam in the 1930s (KHA *et al.*, 2003) and has become an important planting species both for large scale plantations and for small plantings on farms, along canals and roadsides. The total areas of eucalypt plantations in Vietnam was estimated to be 348,000 ha in 2001 (MARD, 2002), with *E. camaldulensis* and *E. urophylla*

## **PUBLICACIÓN -2-**

**Raúl de la Mata**, Rafael Zas (2010) Transferring Atlantic maritime pine improved material to a region with marked Mediterranean influence in inland NW Spain: a likelihood-base approach on spatially adjusted field data. *European Journal of Forest Research* 129 (4):645-658



# Transferring Atlantic maritime pine improved material to a region with marked Mediterranean influence in inland NW Spain: a likelihood-based approach on spatially adjusted field data

Raúl de la Mata · Rafael Zas

Received: 23 February 2009 / Revised: 20 January 2010 / Accepted: 5 February 2010 / Published online: 27 February 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** The inland region of Galicia (NW Spain) marks the boundary between the Atlantic climate of the coastal area and the typical Mediterranean climate of central Spain. Compared to the Atlantic coast, climate in this area has a pronounced summer drought, lower annual precipitation, and higher annual thermal oscillation. Despite the high productivity and ecological importance of maritime pine in inland Galicia, local forest reproductive material (FRM) of high genetic quality is not available for this area. Seed sources originating elsewhere and of unknown adaptation to this area are commonly used for reforestation. With the aim of finding new sources of FRM for this region and exploiting the genetic gains of existing breeding programmes, we analysed the performance in field conditions of improved families of the Coastal Galicia (CG) and Western Australia (WA) breeding programmes. Growth, stem characteristics and branch habit were evaluated in five progeny trials established following a coastal-to-inland gradient. Likelihood-based analyses were used to estimate genetic correlations between environments and to test

statistically for causes and patterns of genotype  $\times$  environment interaction. Because of the strong non-random spatial structures and heterogeneity of residual variances, the analyses were carried out using heterogeneous residual variance mixed models on spatially adjusted data. The results indicated that there is not sufficient evidence to subdivide Galicia into the two current deployment areas. Interaction patterns do not reveal significant differences between zones, and crossover interactions for height growth are present both between and within areas. On the inland sites, the Atlantic improved materials clearly outperformed unimproved seedlots tested in adjacent provenance trials, suggesting the feasibility of using both the CG and WA breeding materials as sources of FRM for reforestation in inland Galicia. Of the two, the WA material showed excellent results for all traits. The inclusion of this material into the Galician maritime pine breeding population should be strongly considered.

**Keywords** *Pinus pinaster* · Progeny trial · Iterative spatial analysis · Genotype  $\times$  environment interaction · Spatial autocorrelation · REML estimation · Genetic correlation · Variance–covariance matrix · Heterogeneous variance models

Communicated by C. Ammer.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10342-010-0365-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. de la Mata (✉)  
Centro de Investigación Forestal de Lourizán, Apdo. 127,  
36080 Pontevedra, Spain  
e-mail: rmata.cifal@siam-cma.org

**Present Address:**  
R. de la Mata · R. Zas  
Misión Biológica de Galicia, CSIC, Apdo. 28,  
36080 Pontevedra, Spain  
e-mail: rzas@mbg.cesga.es

## Introduction

Maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) is one of the most important forestry species in Galicia (NW Spain) where nearly 400,000 ha of pure and mixed stands are present (27% of the wooded area in Galicia), producing up to  $2 \cdot 10^6$  m<sup>3</sup> of round-wood per year (Sanz et al. 2006). Galicia is located in the extreme North West of Spain and is typically characterized by an Atlantic climate, although

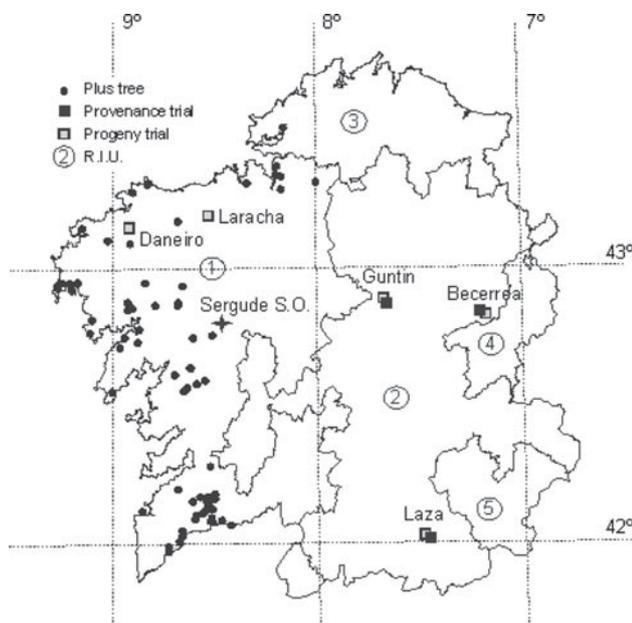
two main climatic regions can be distinguished. The coastal region (up to 600 m above sea level) has high annual rainfall (1,500–2,500 mm) and short annual thermal oscillation (10–11°C), corresponding with regions of identification and utilization (RIUs) of forest reproductive material number one and three (Fig. 1; García et al. 2001). The inland region of Galicia (corresponding with RIU number two, Fig. 1) is a boundary area where the Atlantic climate of the coastal area meets with the typical Mediterranean climate of Central Spain. Climate in this area has a pronounced summer drought (summer precipitation of 60–100 mm), lower annual precipitation (600–1,200 mm), and higher annual thermal oscillation (13–14°C) owing to the greater continental influence. Maritime pine is abundant and has large productive relevance in both areas. Previous studies have identified important differences in terms of growth patterns and genetic structure between both regions (Alía et al. 1996; Álvarez-Gonzalez et al. 2005).

A genetic improvement programme of *P. pinaster* in the coastal area of Galicia was initiated in 1985. It has included phenotypic mass selection in wild stands and use of this material for seed production in clonal seed orchards. The breeding objectives were focused mainly on improving growth traits, stem form, and branch quality (Zas and Merlo 2008). By contrast, in the inland area, although the annual rate of plantation is also high, local reproductive

material of good quality is not available. Foresters need to introduce material from other Spanish provenances, often with questionable adaptation to this area, and typically showing low growth rates and being of poor quality stem form. Looking for alternative material that performs well in the inland region has become a primary objective in order to provide immediate seed sources suitable for planting in this area.

The coastal region breeding programme has been progressing in recent years, based on the results of a series of progeny trials established in the coastal area. Using the information obtained in these trials, a new depurate clonal seed orchard has been recently installed, and the selection of a second breeding generation has been started (Zas and Merlo 2008). The important gains and good results achieved in the Coastal area encourage us to explore the possibility of using the coastal breeding material in the inland region, combining the breeding efforts and minimizing the overall costs. Galicia would constitute a single breeding area, and new material for the inland region would be available in a short space of time. However, the coastal seed orchard's families have only been tested in the coastal zone, and no information is available regarding their performance within the inland region. Previous results revealed a large genotype  $\times$  environment ( $G \times E$ ) interaction in the breeding population both in field conditions within the coastal area (Zas et al. 2004; Martín et al. 2009), and in a drought experiment under controlled conditions (Zas and Fernández-López 2005). However,  $G \times E$  interaction was found to be originated by a small number of families especially sensitive to environmental variation, whereas most of the families tested showed a stable behaviour. Selecting for stability has been thus suggested as an option for obtaining material suitable for both climatic regions (Zas and Fernández-López 2005).

A breeding programme in Western Australia (WA) started in the 1950s using a plus tree selection from within the Leiria (Portugal) provenance and has now completed several breeding selection cycles, achieving important genetic gains in growth, stem form and branching habit (Butcher 2007; Butcher and Hopkins 1993; Perry and Hopkins 1967). The Leiria provenance is a clear Atlantic provenance, whereas the current areas reforested with *P. pinaster* in WA are medium-to-low rainfall (400–600 mm) ex-agricultural sites with a marked Mediterranean influence (Butcher 2007). Drought tolerance is therefore an important trait for selection in this breeding programme (Butcher 2007; Butcher and Chandler 2007). The WA example therefore supports the feasibility of achieving successful results through recurrent selection upon Atlantic material for use in more Mediterranean conditions with strong summer droughts (Butcher 2007; Butcher and Chandler 2007).



**Fig. 1** Location of the *P. pinaster* plus trees (black dots), the five progeny trials (grey squares), the three provenance trials (black squares), and the clonal seed orchard (black star) from which CG families were obtained. Encircled numbers indicate the number of the 'identification and utilization regions' (RIUs) of forest reproductive material (García et al. 2001)

The present study aims to assess the field performance of improved materials with different levels of selection [Coastal Galician (CG) and WA breeding programmes] in the inland region of Galicia. We also analysed in detail the magnitude and relevance of the  $G \times E$  interaction within and between the two current deployments areas (Coastal and Inland Galicia) in order to assess the suitability of this zonification. To this end, we evaluated the performance of 111 half-sib CG *P. pinaster* families and six WA families in five sites, two located in the coastal and three in the inland region of Galicia, three and 7 years after planting. The feasibility of the Atlantic breeding materials in the inland sites was assessed through comparisons with unimproved seed sources planted in adjacent provenance trials.

## Materials and methods

### Genetic material and test sites

The study material consists of half-sib families obtained from 111 selected plus trees represented in a first generation clonal seed orchard (Sergude, 42.82°N, 8.45°W) which provide high genetic quality seed for reforestation in the coastal area of Galicia (Fig. 1). All these plus trees were individually selected from natural stands or from plantations within the Atlantic region of Galicia, for their superior growth, stem form, and branch characteristics.

In addition, six improved families from the WA breeding programme were also included in all the trials (WA1–WA6). The six families were open pollinated in the second generation clonal seed orchard at Manjimup (34.24°S, 116.14°E, WA). Parents were selected for vigour, stem form, small branching and resistance to drought within family trials established in WA upon open or cross pollinations between the original plus trees selected in Leiría and plus trees selected within the WA land race. Seedlot WA6 was a mixture of different families and can be considered to be representative of the average performance for the Manjimup clonal seed orchard (T. Butcher, personal communication).

One-and-a-half-year-old containerized seedlings of the 111 half-sib families and of the WA material were planted in five sites in 2001. Site characteristics are presented in Table 1. Daneiro and Laracha sites were within the RIU number 1 which constitutes, a priori, the deployment area for the selected material of the coastal seed orchards (Fig. 1). These sites have a typical Atlantic climate characterized by high annual precipitation, low summer drought, and low temperature oscillation (Table 1). The other three sites, Becerreá, Guntín, and Laza, were located within the RIU number 2 which includes most of the inland area of Galicia and constitutes a transitional region towards the more continental and Mediterranean climate characteristics of the central areas of the Iberian Peninsula, with prolonged summer drought and wide thermal oscillation (Table 1). Becerreá is the coldest site, while Guntín and

**Table 1** Location, main climatic features, and overall means for height at ages 3 and 7 of the *Pinus pinaster* progeny trials

	Coast		Inland		
	Daneiro	Laracha	Becerreá	Guntín	Laza
Longitude (W)	8°55'06"	8°31'47"	7°10'32"	7°40'42"	7°29'32"
Latitude (N)	43°9'35"	43°12'09"	42°50'16"	42°54'02"	42°02'24"
Altitude (m)	210	252	900	550	770
Aspect	SEE	SW	S	W	NE
Slope (%)	0	2	30	3	18
Annual precipitation (mm)	1,528	1,505	1,047	1,000	783
Summer precipitation (mm) <sup>a</sup>	144	140	132	99	76
Gausson index <sup>b</sup>	1	0	0	17	37
Annual mean temperature (°C)	13.2	12.4	10.4	11.6	11.1
Annual temperature oscillation (°C) <sup>c</sup>	10.1	10.8	13.1	13.3	13.7
No. of frost days ( $T_{\min} < 0^{\circ}\text{C}$ ) per year	10	23	58	38	29
Absolute minimum temperature (°C)	−2.8	−4.3	−7.8	−7.1	−4.8
Overall height mean 3 years (cm) <sup>d</sup>	78.6 ± 24.0	133.9 ± 30.9	109.1 ± 23.0	106.1 ± 20.4	88.0 ± 22.2
Overall height mean 7 years (cm) <sup>d</sup>			295.1 ± 60.1	350.3 ± 77.1	300.1 ± 120.8

<sup>a</sup> Rain fallen during the months of June, July, and August

<sup>b</sup> Gausson =  $\Sigma(2T-P)$  for each month where  $2T > P$  [ $P$ : monthly precipitation (mm),  $T$ : monthly mean temperature (°C)]

<sup>c</sup> Difference between the mean of daily maximum of the warmest month and the mean of daily minimum of the coldest month

<sup>d</sup> Overall mean and standard deviation of height at ages 3 and 7 without spatial correction

Laza show low annual and summer precipitation, with Laza being the drier of the two.

All five plantations follow a randomized complete block design with 25 replications (except Daneiro, with 23 replications) of one tree-plots with  $3 \times 2$  m spacing (except Laza, with  $2.5 \times 2$  m spacing), which is the typical spacing for *P. pinaster* plantations in this region.

In the three inland sites, a provenance trial was simultaneously planted adjacent to the progeny trials. Six Spanish provenances (Bajo Tiétar, Sierra de Gredos, Montaña de Soria-Burgos, Serranía de Cuenca, Albarracín, and Sierra Segura-Alcaraz) of the Mediterranean area were tested in each site. These provenances were selected on the basis of their quality for timber production within their natural stands and of their performance in previous provenance trials (Alía et al. 2001; Molina 1965). All three trials follow a randomized complete block design with 10 replications and five tree-row-plots. Seedlings of these provenance trials were cultivated together with the progenies following the same nursery protocols. Both the progeny and the provenance trials were planted at the same time, with the same spacing and soil preparation, and were measured at the same dates. Data from these trials were used to predict the performance of unimproved seed sources and to compare the Atlantic materials (see below). A specific analysis of these provenance trials are presented in a companion paper (de la Mata and Zas 2009).

#### Assessments

All trees from each site were assessed for growth, stem form, and branch characteristics at ages 3 and 7, except those dead or badly suppressed. Growth traits included total height (H) measured with a pole in centimetres and diameter at breast height (D) measured with a calliper in millimetres (only assessed at age 7). Stem form and branch traits were assessed following Galera et al. (1997). Stem form of each tree was evaluated by a straightness score (STR: 1 = straight to 6 = very crooked) and a stem leaning score (LEN: 1 = vertical to 4 = severe lean). The number of whorls (WH) was also recorded as a measure of the branch abundance. The spatial position of each tree was determined using a total station (Pentax R-315).

The two coastal sites, Daneiro and Laracha, were significantly affected by pests and diseases, so were only assessed at age 3. Trees in Daneiro were attacked by the large pine weevil, *Hylobius abietis* L., which kills trees by girdling the stem of the young seedlings. In Laracha, the root rot fungus *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink caused the death of up to 65% of the plants 3 years after planting (see Zas et al. 2007). In addition, the Becerreá provenance trial was affected by the construction of a forest access track in 2005, affecting several of the trial

trees. Data on provenance performance in this site are only available for the 3-year-old assessment.

#### Statistical analyses

##### *Correcting the spatial dependence*

We examined the spatial structure of the dependent variable in each site by constructing the empirical semivariogram for the residuals adjusted for family effects with the SAS VARIOGRAM procedure (SAS-Institute 1999). Those variables that were spatially dependent were corrected using the iterative spatial analysis (ISA) method (Zas 2006). Briefly, this method first fits a theoretical semivariogram model to the observed residual semivariogram using the SAS NLIN procedure (SAS-Institute 1999). Using the theoretical semivariogram model, the spatial variation of the dependent variable is then modelled by the kriging method using the KRIG2D procedure of SAS (SAS-Institute 1999). The original variable is then adjusted for its spatial autocorrelation, subtracting the kriging estimate in each position. Finally, the new corrected variable is reanalysed, and a new estimate of the family effects is obtained and used to generate new residuals. The process is repeated iteratively, until convergence of the BLUPs estimates of family effects. A detailed description of the method can be consulted in Zas (2006). The spatial adjustment was carried out for each site independently, including both the trees of the progeny and the adjacent provenance trials, and considering a single genetic effect (family or provenance) to obtain the original residuals. Once the dependent variable was spatially corrected, the progeny and provenance trials were analysed independently as shown in the following sections.

##### *Likelihood-based analyses of the site by family interaction*

Spatially adjusted data (for traits with non-random spatial structures), or original unadjusted data (for spatially independent traits), were analysed by fitting mixed models with site as a fixed factor, and block within site, family and family  $\times$  site interaction as random factors (Crossa et al. 2004; Yang 2002). The mixed models were fitted using the MIXED procedure of SAS (Littell et al. 2006), accommodating the SAS Programmes of Yang (2002) to our experimental design. Variance components were estimated using the REML method. The estimation of the family covariance structure (variances and covariance across sites) was achieved by including the SUBJECT and TYPE option in the RANDOM statement. Heterogeneity of residual variances across sites was implemented with the GROUP option of the REPEATED statement. Initial values (derived from single site analyses) were specified in the PARMs statement to facilitate convergence and speed calculations.

In order to explore and interpret the  $G \times E$  interaction, different reduced models constraining different elements of the family covariance structure were fitted. Constraints to the family covariance structures were specified by choosing appropriate predefined covariance models for the TYPE option in the RANDOM statement, and/or by fixing specific covariance parameters to certain values using the HOLD option of the PARMs statement (Crossa et al. 2004; Fry 2004; Yang 2002). Out-of-bond family correlations ( $>1$ , or  $<-1$ ) were avoided by including the UPPERB and LOWERB option in the PARMs statement. A detailed list of the

different models and the corresponding hypothesis analysed is given in Table 2. Hypothesis testing regarding the constraints imposed on the family covariance structure was done by comparing the restricted log-likelihoods (RLL) of the constrained model and the unconstrained model (usually the full model with an unstructured family covariance structure, see later). Under the null hypothesis that the full covariance model is not different from the reduced covariance model, the log-likelihood ratio  $LLR = -2(RLL_{reduced\ model} - RLL_{full\ model})$  is distributed approximately as  $\chi^2$  with degrees of freedom given by the

**Table 2** Description of the full model and reduced models for testing different hypotheses on the relevance and interpretation of the genotype by environment interaction

Model and hypothesis tested	Constraints	CovStruc	Parameters to be estimated	# parms	
				5 sites	3 sites
H0 Full model. All causes of genotype $\times$ environment interaction are allowed	None	UNR	$\sigma_{G1}^2, \sigma_{G2}^2, \sigma_{G3}^2, \sigma_{G4}^2, \sigma_{G5}^2$ $\rho_{12}, \rho_{13}, \rho_{14}, \rho_{15}, \rho_{23}, \rho_{24}, \rho_{25}, \rho_{34}, \rho_{35}, \rho_{45}$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	20	9
H1 No family by environment interaction	$\sigma_{Gi}^2 = \sigma_{Gj}^2 = \sigma_G^2 \forall i, j; \sigma_{GxE}^2 = 0$	CS*	$\sigma_G^2$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	6	4
H2 Homogeneity of family variance across sites	$\sigma_{Gi}^2 = \sigma_{Gj}^2 = \sigma_G^2 \forall i, j$	CS	$\sigma_G^2, \sigma_{GxE}^2$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	7	5
H3 Perfect family correlation between all site pairs	$\rho_{Gij} = 1 \forall i \neq j$	CSH*	$\sigma_{G1}^2, \sigma_{G2}^2, \sigma_{G3}^2, \sigma_{G4}^2, \sigma_{G5}^2$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	10	6
H4 Homogeneity of family covariance across all site pairs	$\rho_{Gij} = \rho_{Gi'j'} = \rho_G \forall i \neq j, i' \neq j'$	CSH	$\sigma_{G1}^2, \sigma_{G2}^2, \sigma_{G3}^2, \sigma_{G4}^2, \sigma_{G5}^2$ $\rho$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	11	7
H5 Perfect family correlation between sites within areas	$\rho_{Gij} = 1 \forall i, j \in same\ area$	UNR*	$\sigma_{G1}^2, \sigma_{G2}^2, \sigma_{G3}^2, \sigma_{G4}^2, \sigma_{G5}^2$ $\rho_{14}, \rho_{15}, \rho_{24}, \rho_{25}, \rho_{34}, \rho_{35}$ $\sigma_{e1}^2, \sigma_{e2}^2, \sigma_{e3}^2, \sigma_{e4}^2, \sigma_{e5}^2$	16	-

Under the full model, the matrices for the family ( $\Sigma_G$ ) and error ( $\Sigma_e$ ) covariance structures are as follow:

$$\Sigma_G = \begin{matrix} & \begin{matrix} \text{Inner sites} & \text{Coastal sites} \end{matrix} \\ \begin{matrix} \sigma_{G1}^2 & \rho_{12} & \rho_{13} & \rho_{14} & \rho_{15} \\ \rho_{12} & \sigma_{G2}^2 & \rho_{23} & \rho_{24} & \rho_{25} \\ \rho_{13} & \rho_{23} & \sigma_{G3}^2 & \rho_{34} & \rho_{35} \\ \rho_{14} & \rho_{24} & \rho_{34} & \sigma_{G4}^2 & \rho_{45} \\ \rho_{15} & \rho_{25} & \rho_{35} & \rho_{45} & \sigma_{G5}^2 \end{matrix} \end{matrix}$$

$$\Sigma_e = \begin{matrix} & \begin{matrix} \text{Inner sites} & \text{Coastal sites} \end{matrix} \\ \begin{matrix} \sigma_{e1}^2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{e2}^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{e3}^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \sigma_{e4}^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \sigma_{e5}^2 \end{matrix} \end{matrix}$$

where  $\sigma_{Gi}^2$  and  $\sigma_{ei}^2$  are the family and residual variances in site  $i$ , and  $\rho_{ij}$  is the family correlation between sites  $i$  and  $j$ . The reduced models constrain different elements of the family variance–covariance structure by specifying in the RANDOM statement of PROC MIXED different types of covariance structures (CovStruc), and/or constraining different covariance parameters with the HOLD option of the PARMs statement. Further constrains in specific elements of the variance–covariance matrix are denoted by an \* in the CovStruc type. The parameters to be estimated in each model are shown for analyses involving 5 sites (traits assessed at age 3). The total number of parameters to be estimated (# parms) for analyses involving 5 and 3 sites is also given. All models assume heterogeneity of residual variances across sites. All hypotheses are tested by comparing the reduced models with the full model, except the H2 hypothesis which is tested by comparing the H2 model versus the H4 model

difference between the number of covariance parameter specifying the full model and the reduced model (Fry 2004).

Because we are dealing with multiple environments (three or five sites depending on the trait) the following strategy was employed (Yang 2002). Firstly, we analysed our data with the conventional mixed model typically used in tree breeding, which assumes a constant family variance and covariance across sites [i.e. a compound symmetry (CS) covariance structure], and homogeneity of residual variance. This model was compared with a less restrictive model in which residual variances were allowed to vary between sites. Homogeneity of residual variance is a main assumption of conventional statistical analyses, and the non-fulfilment of this requisite is known to be a possible cause of spurious interactions (Yang 2002). Significance of family and family  $\times$  site interaction was analysed comparing the RLL of each factor included versus excluded from this model. This test of  $G \times E$  interaction, although commonly used, may be not appropriate in cases of heterogeneous family variance and/or covariances across sites. A more precise analysis of the significance of the  $G \times E$  interaction in a broad sense was implemented comparing the CS model without the term  $G \times E$  (Model H1 in Table 2) with the unstructured covariance model (the full model H0), in which all possible causes of  $G \times E$  (i.e. family heterogeneity across sites and deviations from perfect family correlations between environments) are allowed (Yang 2002). Secondly, we specifically tested for the contribution of each of the different possible causes of  $G \times E$ . Heterogeneity of family variance was analysed by comparing the CS family covariance structure model (model H2 in Table 2) with the heterogeneous compound symmetry covariance structure model (CSH, model H4 in Table 2). Deviations from perfect correlations, which can be interpreted as a test of crossover interactions (Yang 2007), were analysed by comparing a model in which all family correlations are fixed to 1 (model H3 in Table 2) with the full model H0. Finally, if significant deviations from perfect correlations were detected, we examined whether family correlations between sites were constant across all pairs of environments (model H4 in Table 2) or whether they differed depending on the site pairs (full model H0). Additionally, for traits assessed in both Coastal and Inland sites (i.e., traits assessed at age 3), we also investigated whether the crossover interactions were due to deviations from perfect correlations between sites of different areas. This hypothesis was analysed comparing the full model with a model in which all family correlations between sites of the same area were fixed to 1, whereas family correlations between sites of different areas were unconstrained (model H5 in Table 2).

SAS codes for performing all these analyses are available from the second author upon request.

#### *Comparisons between WA and CG materials*

In order to analyse the statistical differences between the families of the WA and CG breeding programmes, we re-analysed the data including the breeding programme and the programme  $\times$  site interaction as fixed effects in the mixed models, and nesting families within breeding programmes. Additionally, the best linear unbiased predictor (BLUP) of each WA family was statistically compared with the BLUP of the average of all the 111 CG families using the ESTIMATE statement of the MIXED procedure (Littell et al. 2006, Chap. 6).

#### *Superiority of the improved materials*

Because no control seedlots were included in the trial series, we used the adjacent provenances tests to obtain predictors of unimproved seed sources with which to compare the selected materials. Despite the provenance and the progeny trials being two independent trials, with independent experimental designs, statistical comparisons between them were reliable due to the fact that common spatial adjustments accounted for the eventual microenvironmental differences between both trials. We estimated the confidence intervals at 95% for BLUPs of each family and provenance across the three inland sites using the ESTIMATE statement of the MIXED procedure (Littell et al. 2006). Non-overlapping confidence intervals were interpreted as significance differences between the improved families and the unimproved provenances. Becerreá was not considered for traits assessed at age 7 because data for the provenance trial from this site at age 7 were lacking.

## **Results**

Mean H were notably different over the different sites, indicating different site indexes. Height means varied from 78.6 cm in Daneiro to 133.9 cm in Laracha at age 3, and from 295.1 cm in Becerreá to 350.3 cm in Guntín at age 7 (Table 1). The dispersion of the individual tree heights within each site was very high, with coefficients of variation up to 40%. For instance, individual tree heights at age 7 varied in Laza from 52 cm to 683 cm, i.e. more than 5 m between the lowest and the highest tree. For each trait, the corrected data adjusted for spatial autocorrelation showed the same site mean as the uncorrected data, but a clearly smaller dispersion, with coefficients of variation of just 15–20% (data not shown).

The survival in the coastal sites was abnormally low (39 and 35% in Daneiro and Laracha at age 3, respectively) because of the sanitary problems explained before. Of the inland sites, survival rates were acceptable in Guntín and Laza with values of around 93% at age 7, whereas it was notably lower in Becerreá (58% at age 7).

Spatial dependence and homocedasticity

Residuals after subtracting family effects revealed pronounced non-random spatial structures for the growth traits and the number of whorls in all sites (Table 3). The spherical theoretical semivariogram fitted well to the observed semivariogram for most of these traits ( $r^2 > 0.85$ ,  $P < 0.001$ ). The variation explained by the spatial pattern varied from 10.6% for WH in Becerreá at age 3 to 73.2% for H in Laza at age 7 (Table 3, see also Figure S1 supplied as supplementary online material). Height at age 7 showed the largest intensities of the spatial dependence, with values of the patch variance to sill variance ratio varying from 41.4 to 73.2%. The range ( $a_0$ ) or patch size of the theoretical semivariograms was greatly variable, from 29.3 m for H in Daneiro at age 3 to 103.9 m for H in Laza at age 3 (Table 3). Stem form traits revealed random spatial structures with the exception of Becerreá and Daneiro sites, where STR and LEN revealed a slight spatial autocorrelation.

Heterogeneity of residual variances was observed for all traits and ages (see Table S1 as supplementary online

material). Log-likelihood ratios for the heterogeneous variance models were much lower than those for the respective equal variance models, and the differences were highly significant ( $P < 0.001$ ) in all cases.

Because of heterogeneity of residual variances in all cases, all further analyses presented in the following sections were based on heterogeneous error variance models, and in those cases where non-random spatial structures were found (Table 3), spatially adjusted data were employed.

Family variation and family × site interaction

Results of the conventional mixed model including family and family × site interaction as random effects (i.e., assuming a compound symmetry family covariance structure with constant variance and constant covariance) are shown in Table 4. Using this model, family variation was highly significant for all traits and ages, and the family × site interaction was significant ( $P < 0.05$ ) or marginally significant ( $P < 0.10$ ) for 7 out of the 9 traits. The number of whorls at age 3 and the leaning score at age 7 were the traits with no significant family × site interaction. The ratio of interaction to family variance component ( $\sigma_{fs}^2/\sigma_f^2$ ) was relatively low in all cases and varied between 0.10 for leaning at ages 7 to 0.54 for height at age 3.

A comprehensive likelihood-based analysis regarding the relevance and interpretation of the family × site

**Table 3** Patch size (range in metres,  $a_0$ ) and intensity of the spatial pattern structure (patch variance to sill variance ratio,  $I(\%) = [C_0/(C_0 + C_n)] \times 100$ ) derived from theoretical semivariograms fitted to different traits, adjusted for genetic effects in the five test sites at ages 3 and 7 after planting

	Coast				Inland					
	Daneiro		Laracha		Becerreá		Guntín		Laza	
	$a_0$ (m)	$I$ (%)	$a_0$ (m)	$I$ (%)	$a_0$ (m)	$I$ (%)	$a_0$ (m)	$I$ (%)	$a_0$ (m)	$I$ (%)
Age 3										
Height	29.3	19.3	78.9	25.8	53.6	29.5	36.8	24.1	103.9	38.1
No. whorls	Grad <sup>a</sup>	16.5 <sup>b</sup>	SI <sup>c</sup>		61.8	10.6	44.1	11.4	70.0	22.5
Leaning	99.0	26.6	SI		77.6	12.0	SI		SI	
Straightness	Grad	29.8	SI		77.2	15.8	SI		SI	
Age 7										
Height					42.7	41.4	94.6	47.5	47.8	73.2
Diameter					48.0	32.6	88.0	42.1	34.9	57.9
No. whorls					112.5	60.9	Grad	25.6	33.8	35.3
Leaning					113.5	17.7	SI		SI	
Straightness					Grad	18.1	SI		SI	

The shown patch size ( $a_0$ ) is the  $a_0$  parameter of the spherical model, but is  $a_0 \times 3$  for the exponential model (Webster and Oliver 1990)

<sup>a</sup> grad = gradient (linear semivariogram)

<sup>b</sup> For linear models, the intensity of the spatial pattern structure was calculated for a distance of 100 m as  $100 \times C_0 / (100 \times C_0 + C_n)$

<sup>c</sup> SI = spatially independent trait

**Table 4** Summary of the mixed model analyses for different traits assessed at ages 3 and 7 using a compound symmetry structure for the family variance–covariance matrix across sites

Age	Traits	Site $F^a$	Family VC $\pm$ SE	Family $\times$ site VC $\pm$ SE
3	Height	1,067.0***	20.316 $\pm$ 3.496***	11.053 $\pm$ 1.937***
	No. whorls	407.0***	0.046 $\pm$ 0.008***	0.005 $\pm$ 0.005 <sup>NS</sup>
	Leaning	329.4***	0.001 $\pm$ 0.0003***	0.0005 $\pm$ 0.0004 <sup>NS</sup>
	Straightness	75.1***	0.018 $\pm$ 0.003***	0.009 $\pm$ 0.003***
7	Height	635.6***	124.850 $\pm$ 24.946***	52.487 $\pm$ 16.651***
	Diameter	261.0***	4.513 $\pm$ 1.143***	1.617 $\pm$ 1.052*
	No. whorls	109.3***	0.075 $\pm$ 0.015***	0.022 $\pm$ 0.010**
	Leaning	101.5***	0.002 $\pm$ 0.001**	0.0002 $\pm$ 0.001 <sup>NS</sup>
	Straightness	86.3***	0.010 $\pm$ 0.003***	0.003 $\pm$ 0.002 <sup>NS</sup>

For fixed effects (site),  $F$ -ratio and associated significance levels are shown; for random effects (family, and family  $\times$  site interaction), variance component estimates  $\pm$  standard errors (VC  $\pm$  SE) and associated significance levels of the log-likelihood ratio test for significance of each variance component are shown

Asterisks denote the significance level (\*\*\* =  $P < 0.001$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \* =  $P < 0.05$ ; NS =  $P > 0.05$ ) associated to the chi-square value given by the difference in two times the log likelihood of that factor included versus excluded from the model. Because variance components are constrained to be positive, test of variance components are one-tailed (Fry 2004)

<sup>a</sup>  $F_{4,118}$  for traits at age 3 and  $F_{2,67}$  at age 7

**Table 5** Likelihood ratios for testing different hypotheses on the relevance and interpretation of the genotype by environment interaction for different traits assessed at ages 3 and 7

Null hypotheses	df	Height		No. whorls		Straightness	
		$\chi^2$	$P > \chi^2$	$\chi^2$	$P > \chi^2$	$\chi^2$	$P > \chi^2$
Age 3							
H1: no family by environment interaction	14	100.7	<0.001	72.1	<0.001	912.8	<0.001
H2: homogeneity of family variance across sites	4	15.8	0.003	60.0	<0.001	19.5	<0.001
H3: perfect family correlation between all site pairs	10	77.3	<0.001	12.6	0.248	67.4	<0.001
H4: homogeneity of family covariance across site pairs	9	14.6	0.102	10.6	0.304	64.2	<0.001
H5: perfect family correlation between sites within deployment areas (coastal and inland Galicia)	4	59.5	<0.001	4.7	0.319	41.0	<0.001
Age 7							
H1: no family by environment interaction	5	21.3	<0.001	26.8	<0.001	256.3	<0.001
H2: homogeneity of family variance across sites	2	4.5	0.100	19.2	<0.001	26.6	<0.001
H3: perfect family correlation between all site pairs	3	12.3	0.006	6.3	0.098	4.2	0.241
H4: homogeneity of family covariance across site pairs	2	1.1	0.576	1.4	0.500	4.2	0.121

The chi-squared values shown are the differences in two times the log-likelihood of the full model (unstructured variance–covariance matrix) and different reduced models constraining different elements of the family variance–covariance structure across sites (see “Methods”). Degrees of freedom ( $df$ ) associated with the chi-squared values results from the difference between the number of covariance parameters specifying the full and reduced models.  $P$  values lower than 0.05 indicate that the null hypotheses should be rejected

interaction for three selected traits is shown in Table 5. When all possible causes of interaction are considered, the family  $\times$  site interaction was highly significant in all cases. These results disagree with those presented in Table 4 for the number of whorls at age 3 and straightness at age 7. These discrepancies arise because results presented in Table 4 are based on a model that assumes homogeneity of family variance and covariance across sites, which are clearly inappropriate assumptions in these cases. Indeed, the large heterogeneity of family variance across sites for

these traits (Table 5) is responsible for the significant family  $\times$  site interaction. On the other hand, the lack of perfect family correlation between sites contributed significantly to the family  $\times$  site interaction in the cases of height growth at both ages, and straightness at age 3, suggesting family rank changes across sites for these traits. Moreover, the results of the H4 hypothesis indicate that the family covariance across sites for height growth was fairly constant for all pairs of sites (Table 5). Thus, family rank changes are likely to be equally distributed among all pairs

**Table 6** REML estimates of genetic correlations between sites using an unstructured family variance–covariance matrix across sites for different traits at ages 3 (above the diagonal) and 7 (below the diagonal)

Trait	Site	Inland			Coastal	
		Becerreá	Guntín	Laza	Daneiro	Laracha
Height	Becerreá		0.63***	0.62***	0.77***	0.62***
	Guntín	0.63***		0.60***	0.42**	0.74***
	Laza	0.67***	0.79***		0.84***	0.67***
	Daneiro					0.60***
	Laracha					
No. whorls	Becerreá		0.79***	1.00***	0.24 <sup>NS</sup>	0.54**
	Guntín	0.86***		0.95***	1.00*	0.60**
	Laza	0.68***	0.82***		1.00*	0.80***
	Daneiro					1.00 <sup>NS</sup>
	Laracha					
Straightness	Becerreá		0.28 <sup>NS</sup>	0.27 <sup>NS</sup>	−0.41 <sup>NS</sup>	0.10 <sup>NS</sup>
	Guntín	1.00 <sup>NS</sup>		1.00***	1.00***	0.47**
	Laza	0.29 <sup>NS</sup>	1.00*		0.89***	0.45**
	Daneiro					0.10 <sup>NS</sup>
	Laracha					

Sites are grouped into the two major climatic regions (inland and coastal Galicia). Asterisks denote the significance level (\*\*\*) =  $P < 0.001$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \* =  $P < 0.05$ ; NS =  $P > 0.05$ ) associated to the chi-square value given by the difference in two times the log likelihood of that element included versus excluded (fixed to zero) from the model

**Table 7** Effects of the breeding programme origin from which families proceed (Coastal Galicia and Western Australia), and its interaction with sites for different traits evaluated at age 7 in the three inland sites

Effects	DF	Height		No. whorls		Straightness		
		F	P > F	F	P > F	F	P > F	
Programme	1	115	11.4	0.001	4.6	0.034	5.1	0.026
Site	2	67	138.7	<0.001	17.1	<0.001	26.0	<0.001
Programme × site	2	230	3.2	0.043	1.5	0.217	2.0	0.132

of sites, and no single site or group of sites is responsible for the crossover interaction (see the low variation in family correlations between sites in Table 6). This is not the case with straightness at age 3, where the common covariance model (H4) fitted significantly less well than the unstructured covariance model (Table 5). The family correlations between sites (Table 6) indicate that Becerreá, which shows no significant family correlations with any other site, has a clearly anomalous behaviour for this trait. Furthermore, in the case of height and straightness age 3, deviations from perfect correlations appeared both within and among the two deployment areas (coastal and inland Galicia). Assuming perfect correlation between sites of the same area and allowing family rank changes between sites of different areas (H5 hypothesis) resulted in clearly and significantly less well-fitting models (Table 5).

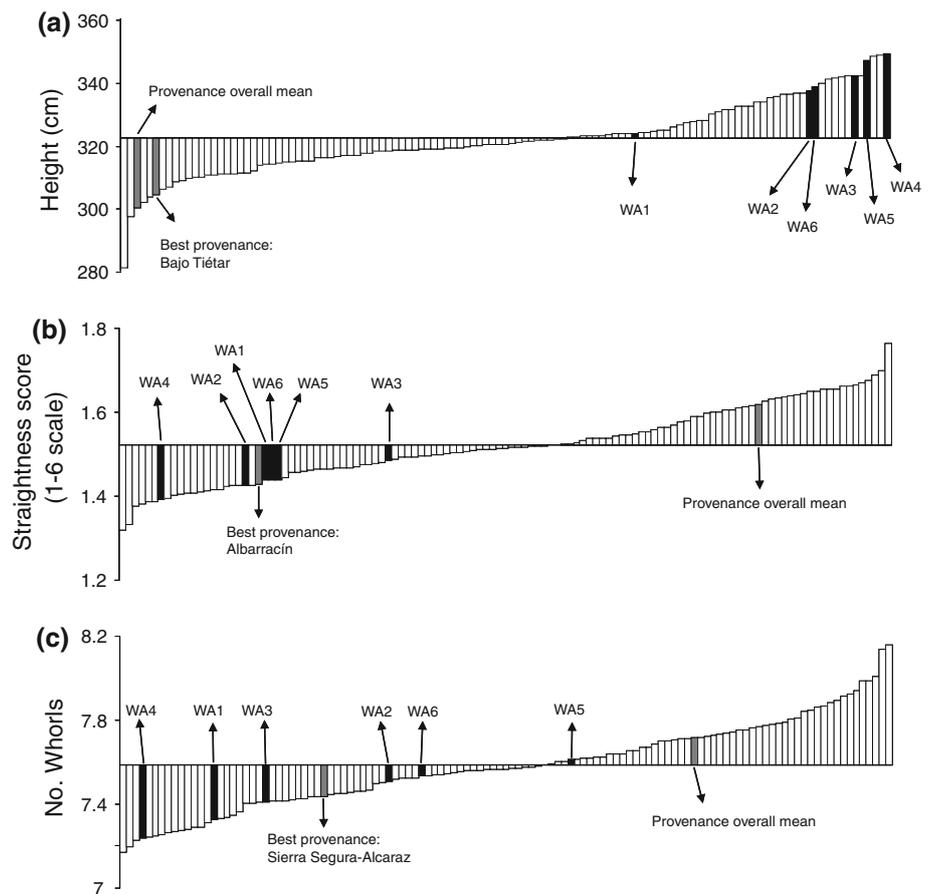
Performance of the CG and WA material

Grouping the families into the two breeding programmes which they originated (WA and CG) and including this origin and its interaction with sites as fixed effects in the

mixed models resulted in highly significant differences between programmes for all traits (Table 7). Families from WA performed, on average, significantly better than those from CG (Fig. 2). In the case of growth traits, the programme × site interaction was significant (Table 7), indicating that the superiority of the WA material was not uniform across sites. The superiority in height growth of the WA material was more evident in Laza and Guntín (Table 8). Among the different WA families tested, WA4 always ranked highly for all traits in each of the three inland sites (Table 8), whereas WA1 showed reduced growth and worse stem form. Other WA sources showed intermediate results.

Both the CG and WA materials grew significantly more than the average performance of the unimproved seed sources tested in the adjacent provenance trials, and none of the single provenances performed better than the average of the improved material (Fig. 2). However, although the mean performance in stem form traits of the six provenances was worse than the average of the improved materials, there were some single origins that stand out with very straight stems and low number of whorls (Fig. 2).

**Fig. 2** Best linear unbiased predictors (BLUPs) for the 111 half-sib families of the CG seed orchard (white bars) and the six families of the WA breeding programme (black bars, WA1-WA6), for **a** height, **b** straightness, and **c** number of whorls at age 7 in two sites (Guntín and Laza) located in the inland region of Galicia. The best linear unbiased predictor (BLUP) of the best provenance and the overall mean of all the provenances tested in the adjacent provenance trials (grey bars) are also shown. *x*-axis intersects the *y*-axis at the overall mean of the progeny trials



**Table 8** Ranking of the BLUPs of the Western Australia (WA) families in the three inland sites for height, straightness and number of whorls at age 7 ( $N = 117$  genetic entries)

WA families	Height			No. whorls			Straightness		
	Becerreá	Laza	Guntín	Becerreá	Laza	Guntín	Becerreá	Laza	Guntín
WA1	47	44	43	12	19	9*	39	23	46
WA2	16	14*	15*	83	63	70	7	15	4*
WA3	7*	9**	3***	16	22	21	35	58	31
WA4	4**	3**	1***	1**	1**	6*	3*	6	2*
WA5	61	16*	10*	70	65	74	36	27	35
WA6	15	13*	13*	32	30	59	28	26	21

Asterisks denote the significance level associated to the specific contrast between the BLUP of each WA family and the BLUP of the average performance of the 111 CG families for each trait

Significance levels: \*\*\* =  $P < 0.001$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \* =  $P < 0.05$

## Discussion

This paper provides new information about the performance of Atlantic improved material in the inland region of Galicia, where the Atlantic character is clearly modified by continental and Mediterranean influences. Growth patterns of maritime pine in Galicia are known to differ between the inland and the coastal area, as a consequence

of both environmental and genetic factors (Álvarez-González et al. 2005; Barrio-Anta et al. 2006). Our results are in agreement with this, and the height growth of the studied material in the inland sites was lower than that observed in the coastal region in an earlier trial series at similar ages (Zas et al. 2004). However, mean height growth in the three inland sites was similar to intermediate to high site index *P. pinaster* plantations in this area (Álvarez-

Gonzalez et al. 2005), suggesting that the coastal material also performed relatively well in the drier and colder environmental conditions of the inland region.

Results from the likelihood-based analyses of the  $G \times E$  interaction also indicate that there is not sufficient evidence to warrant the subdivision of the region into the two independent deployment areas of coastal and inland Galicia. This subdivision would be only justified if the relevance of the  $G \times E$  interaction were much lower within than between areas. The  $G \times E$  interaction is of consequence only when it involves rank changes across sites (i.e. crossover interactions), and so, deployment areas should cluster sites into groups with statistically negligible crossover interactions (e.g. Crossa et al. 2004). In this study, family  $\times$  site interaction was highly significant for most of the studied traits; however, this interaction was due to departures from perfect family correlations between sites only in the case of height growth and straightness at age 3. Imperfect genetic correlations between environments suggest crossover interactions (Yang 2007; Crossa et al. 2004). Thus, for these traits, there could be major disadvantages to merging both areas into a single deployment zone. However, the analysis of additional hypotheses regarding the genetic correlations between sites revealed that, in the case of height growth, crossover interactions are as important within areas as between areas. Constraining genetic correlations between sites of the same deployment area to 1 (i.e. avoiding family rank changes within areas) significantly reduced the log likelihood of the model, and thus resulted in an inappropriate model compared with the unconstrained full model. Moreover, genetic correlations between sites were similar for pairs of sites of the same or different areas, and the mixed models that assumed a constant family correlation between sites fitted as well as the unstructured full model. Thus, the pattern of the crossover interactions for height growth seemed to be similar between all possible pairs of sites, irrespective of the sites belonging to the same or different deployment areas.

The interpretation of the crossover interactions for straightness at age 3 was different. Assuming a constant family correlation between sites was not appropriate for this trait, and Becerreá seemed to be a site showing clearly anomalous behaviour. Family correlations between this site and the other four sites were not significant and even negative in some cases, whereas the remaining family correlations were significant and positive. The anomalous results for straightness in Becerreá, a site near the upper limit of the distribution of the species, are likely to be caused by the strong and irregular slope and the presence of snow during the winter. Additionally, straightness was assessed as an ordinal trait (1–6 scale), and residuals of the mixed models significantly ( $P < 0.05$ ; Kolmogorov–

Smirnov test) departed from normal distributions, although residual histograms were unimodal and relatively unskewed. Normality of residuals is a main assumption of mixed models (Littell et al. 2006), so the results regarding this trait should be managed with care here. Generalized linear mixed models would have provided a more appropriate way of analysing an ordinal trait such as this (Bolker et al. 2009), but fitting generalized linear mixed models to our large data set and imposing constraints to the family covariance structure resulted in a failure to converge.

The pest and disease problems that occurred in the coastal sites may be also distorting the results regarding the comparison of inland and coastal performance. Both the fungus and the pest significantly reduced the survival and growth of the pine seedlings (Zas et al. 2007) and may have also favoured severe deformities in the stems (Sampedro et al. 2009). In addition, pine growth and stem straightness in the five studied sites could also be heavily influenced by rooting problems induced by the relatively long time nursery period (up to 19 months) and the small containers used (Superleach 125 cm<sup>3</sup>; Climent et al. 2008).

Both across and within site variation in the studied traits was very high. The results indicated a strong spatial autocorrelation for all the growth variables, reflecting the strong within site heterogeneity, whereas no spatial pattern was found for the stem form variables, except in Becerreá and Daneiro. Spatial dependence in stem form traits in these sites may be caused by the strong and irregular slope and the presence of snow during the winter in Becerreá, and by the existence of patchy waterlogged areas in Daneiro, that caused severe deformities in the stem. Non-random spatial patterns in traits assessed in forest genetic trials are very common (Dutkowski et al. 2006; Fu et al. 1999). Augmenting standard analytical models with spatial components has shown to increase the accuracy of genetic parameter estimates and to increase the treatment correlation between tests (Dutkowski et al. 2006; Qiao et al. 2000; Zas 2006). The impact of the spatial autocorrelation on the analyses of forest genetic trials can be so dramatic that several authors stated that leaving data unadjusted in the presence of spatial autocorrelation is clearly unacceptable (Costa-Silva et al. 2001; Dutkowski et al. 2006; Zas 2006). PROC MIXED in SAS allows to fit spatial correlation models in which residuals are allowed to be autocorrelated among themselves, with autocorrelation being a function of the distance that separate them (Littell et al. 2006, Chap. 11; Saenz-Romero et al. 2001). The mixed models used in the present paper could thus have been augmented allowing for an autocorrelation structure of the residual variation within each site. However, both fitting spatial autocorrelation models and fitting heterogeneous residual variation models with unstructured family covariance structure across sites are computationally very demanding. Integrating all these

family and residual covariance structures into a single mixed model would be very difficult with a conventional personal computer. Thus, the procedure used here, in which we first adjusted data for spatial autocorrelation (Zas 2006) and then fitted these complex mixed models, seems to be an operative way to circumvent this problem.

The studied trial series lacks control seedlots of local origin with which to compare the improved materials. Indeed, finding a representative seedlot of the many different origins commonly used in the maritime pine plantations in the inland region of Galicia would be a difficult task. We took advantage of the adjacent provenance tests to get estimates of unimproved seed sources in the area. Comparisons between materials from these adjacent trials with independent experimental designs were possible thanks to the common spatial adjustment, which accounted for the microenvironmental variation between the two trials within each site. The results indicate that both the CG and WA improved materials grew significantly more than all the provenances tested. On average, stem form and branching habit of the improved materials were also better, but some individual provenances from Central Spain performed clearly better regarding these traits. Atlantic origins are known to present poor forms and are clearly surpassed in provenance tests by other mountain origins such as Morocco, Corsica, and Sierra de Gredos (Alía et al. 1995). In fact, the French maritime pine breeding programme, developed upon the basis of the Atlantic Landes provenance, has exploited interprovenance crosses with Corsican origins to improve stem straightness of the local population (Alazard 1988; Harfouche and Kremer 2000). Our results also suggest that the superiority of the Atlantic improved materials in inland Galicia could be complemented by introducing favourable genes for straightness and branching habit through introgression. Interprovenance crosses with Albarraçín (good stem straightness) and Sierra de Segura-Alcaraz (low number of whorls), or with other mountain origins of known stem straightness (e.g. Morocco, Corsica or Sierra de Gredos; Alía et al. 1995; Harfouche and Kremer 2000; Sierra de Grado et al. 2008) should therefore be considered.

The Western Australia breeding programme has achieved, using an Atlantic provenance, very good results and ample gains for use in areas of severe drought within that region (Butcher 2007). The wide genotypic variation within provenances (Mariette et al. 2001; Petit et al. 1995) and the characteristic phenotypic plasticity of the species (Alía et al. 1997; Chambel 2006) offer a plausible explanation for this large flexibility. The performance of the WA material in inland Galicia was also very good, always above the overall average at each site. The superiority of the WA families was evident for the three main studied traits: growth, stem form, and branch habits (Fig. 2,

Tables 7, 8). However, the performance of the WA families was fairly variable across the three inland sites (Table 8). As expected, the best development of this material occurred on the driest sites (Guntín and Laza), while the worst performance was on the coldest one (Becerreá). Among the different WA families, WA4, a full cross between “sexy” clones characterized by a high resistance to drought, good growth and strong apical dominance, was one of the most stable and stands out as one of the best families for the three main traits in the three inland sites. The remaining WA families, except WA1, also show superior growth in Laza and Guntín, but only intermediate performance in terms of stem form. Results from the WA6 seedlot, which is a mixture of different open pollinated families from the 2nd generation clonal seed orchard at Manjimup (WA), indicated that, on average, the material from this seed orchard performed better than that from the Galician coastal seed orchard, although the differences were only significant in the case of growth on the two warmest and driest sites. Because the tree breeding programme for maritime pine in WA has continued to progress in recent years (Butcher 2007), we could expect even greater gains with new WA materials with higher levels of selection. Testing new seedlots from WA is, therefore, highly recommended.

As a practical conclusion, the results of this paper suggest the feasibility of using both the CG and the WA breeding materials as possible sources of forest reproductive material for the inland region of Galicia. Specifically, based on the excellent results of the WA material, importing seed for reforestation in inland Galicia and/or including specific selected WA genotypes into the local breeding population should be strongly considered. Furthermore, judging from the results of the  $G \times E$  interaction analyses, there is not sufficient evidence to subdivide Galicia into the two current deployment areas, coastal and inland Galicia. Interaction patterns do not reveal significant differences between zones, and crossover interactions for height growth are present both between and within areas. Although a strategy is undoubtedly needed to deal with the overall crossover interactions, based on the results of the present paper, both zones could be merged into a single breeding and deployment area.

**Acknowledgments** This study was supported by the Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) projects RTA05-173 and RTA07-100. The series of trials were established under supervision of Guillermo Vega and Josefa Fernández-López, within the development of the Forest Genetic Improvement Programme of Galicia, funded by the European Union and Xunta de Galicia. We thank Ana Hernández for her helpful participation in data processing and field assessments, Dr. Esther Merlo for stimulating discussion on the results, Pablo Xesteira for helping in trial maintenance, and Ricardo Ferradás, Raquel Jares, Manuel Cerviño, Emilio Pérez, Xoaquín Moreira, and Patricia Martins for field assessments.

We also gratefully acknowledge Trevor Butcher (Department of Conservation and Land Management, WA) for providing the Western Australia improved seedlots and providing valuable suggestions on earlier versions of the manuscript. Valuable comments by Dr. Luis Sampedro and two anonymous reviewers also helped to improve the quality of the manuscript. David Brown helped with the revision of the language.

## References

- Alazard P (1988) Intérêt de la race Corse dans le programme d'amélioration génétique du pin maritime. *Ann Rech Sylv, AFOCEL*
- Alía R, Gil L, Pardos JA (1995) Performance of 43 *Pinus pinaster* Ait. provenances on 5 locations in central Spain. *Silvae Genet* 44:75–81
- Alía R, Martín S, De Miguel J, Galera R, Agúndez D, Gordo J, Catalán G, Gil L (1996) Las regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Ait. OA de Parques Nacionales. DGCONA, Madrid
- Alía R, Moro J, Denis JB (1997) Performance of *Pinus pinaster* provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. *Can J For Res* 27:1548–1559
- Alía R, Moro J, Denis J-B (2001) Ensayos de procedencias de *Pinus pinaster* Ait. en el centro de España: resultados a la edad de 32 años. *Inv. Agraria: Sist Rec For* 10:333–354
- Álvarez-Gonzalez JG, Ruiz-Gonzalez AD, Rodríguez-Soalleiro R, Barrio-Anta M (2005) Ecoregional site index models for *Pinus pinaster* in Galicia (NW Spain). *Ann For Sci* 62:115–127
- Barrio-Anta M, Mn Balboa-Murias, Castedo-Dorado F, Diéguez-Aranda U, Álvarez-González JG (2006) An ecoregional model for estimating volume, biomass and carbon pools in maritime pine stands in Galicia (NW Spain). *Forest Ecol Manage* 223:24–34
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen RP, Stevens MH, White JS (2009) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 24:127–135
- Butcher TB (2007) Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 7: Maritime pine and Brutian pine tree improvement programs in Western Australia. *Aust For* 70:141–151
- Butcher TB, Chandler AL (2007) Maritime pine for dry-land Western Australia. Joint Australian Forest Genetics and IUFRO Southern Pines working group (2.02.20) Conference. 11–14 April 2007, Hobart Australia. (Proceedings in press as CD and at <http://www.crcforestry.com.au/>)
- Butcher TB, Hopkins ER (1993) Realised gains from breeding *Pinus pinaster*. *For Ecol Manage* 58:211–231
- Chambel MR (2006) Variabilidad adaptativa y plasticidad fenotípica en procedencias de pinos ibéricos. Thesis. Departamento de Silvopascicultura. Universidad Politécnica de Madrid
- Climont J, Alonso J, Gil L (2008) Root restriction hindered early allometric differentiation between seedlings of two provenances of Canary Island Pine. *Silvae Genet* 57:187–193
- Costa-Silva J, Dutkowski GW, Gilmour AR (2001) Analysis of early tree height in forest genetic trials is enhanced by including a spatially correlated residual. *Can J For Res* 31:1887–1893
- Crossa J, Yang R-C, Cornelius PL (2004) Studying crossover genotype x environment interaction using linear-bilinear models and mixed models. *J Agric Biol Environ Stat* 9:362–380
- de la Mata R, Zas R (2009) Performance of maritime pine Spanish Mediterranean provenances at young ages in a transitional region between Atlantic and Mediterranean climates in NW Spain. *Silvae Genet* 59:8–17
- Dutkowski GW, Costa-e-Silva J, Gilmour AR, Wallendorf H, Aguiar A (2006) Spatial analysis enhances modelling of a wide variety of traits in forest genetic trials. *Can J Forest Res* 36:1851–1870
- Fry JD (2004) Estimation of genetic variances and covariances by restricted maximum likelihood using PROC MIXED. In: Saxton AM (ed) Genetic analysis of complex traits using SAS. SAS Institute, Cary
- Fu YB, Yanchuk AD, Namkoong G (1999) Spatial patterns of tree height variations in a series of Douglas-fir progeny trials: implications for genetic testing. *Can J For Res* 29:714–723
- Galera R, Martín S, Alía R, Gordo J, Aguado AM, Notivol E (1997) Manual de selección de masas productoras de semillas. Evaluación de caracteres. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. INIA, Madrid
- García JM, De-Miguel J, Alía R, Iglesias S (2001) Regiones de Identificación y Utilización de material forestal de reproducción. Ministerio de Medio Ambiente, Serie Cartográfica, Madrid
- Harfouche A, Kremer A (2000) Provenance hybridization in a diallel mating scheme of maritime pine (*Pinus pinaster*). I. Means and variance components. *Can J Forest Res* 30:1–9
- Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD, Schabenberger O (2006) SAS system for mixed models, 2nd edn. SAS Institute, Cary
- Mariette S, Chagne D, Lezier C, Pastuszka P, Raffin A, Plomion C, Kremer A (2001) Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 86:469–479
- Martíns P, Sampedro L, Moreira X, Zas R (2009) Nutritional status and genetic variation in the response to nutrient availability in *Pinus pinaster*. A multisite field study in Northwest Spain. *For Ecol Manage* 258:1429–1436
- Molina F (1965) Comportamiento racial del *Pinus pinaster* en el noroeste de España. *An IFIE* 2:221–238
- Perry DH, Hopkins ER (1967) Importation of breeding material of *Pinus pinaster* Ait. from Portugal. Bulletin 75, Forests Department, Western Australia
- Petit RJ, Bahrman N, Baradat P (1995) Comparison of genetic differentiation in Maritime Pine (*Pinus pinaster* Ait.) estimated using isozyme, total protein and terpenic loci. *Heredity* 75: 382–389
- Qiao CG, Basford KE, DeLacy IH, Cooper M (2000) Evaluation of experimental designs and spatial analyses in wheat breeding trials. *Theor Appl Genet* 100:9–16
- Saenz-Romero C, Nordheim EV, Guries RP, Crump PM (2001) A case study of a provenance/progeny test using trend analysis with correlated errors and SAS PROC MIXED. *Silvae Genet* 50: 127–135
- Sampedro L, Moreira X, Martíns P, Zas R (2009) Growth and nutritional response of *Pinus pinaster* after a large pine weevil (*Hylobius abietis*) attack. *Trees Struct Funct* 23:1189–1197
- Sanz F, Latour S, Neves M, Bastet E, Pischedda D, Piñeiro G, Gauthier T, Lesbats J, Plantier C, Marques A, Lanvin JD, Santos JA, Touza M, Pedras F, Parrot J, Reuling D, Faria C (2006) Aplicacions industriais da madeira de piñeiro pinaster. Rodi Artes Gráficas S.L, Ourense
- SAS Institute (1999) SAS/STAT user's guide, Version 8. SAS Institute Inc, Cary
- Sierra de Grado R, Pando V, Martínez-Xurimendi P, Penalvo A, Bascones E, Moulia B (2008) Biomechanical differences in the stem straightening process among *Pinus pinaster* provenances. A new approach for early selection of stem straightness. *Tree Physiol* 28:835–846
- Webster R, Oliver MA (1990) Statistical methods in soil and land resource survey. Oxford University Press, Oxford
- Yang R-C (2002) Likelihood-based analysis of genotype-environment interactions. *Crop Sci* 42:1434–1440

- Yang R-C (2007) Mixed-model analysis of crossover genotype-environment interactions. *Crop Sci* 47:1051–1062
- Zas R (2006) Iterative kriging for removing spatial autocorrelation in analysis of forest genetic trials. *Tree Genet Genom* 2:177–186
- Zas R, Fernández-López J (2005) Juvenile genetic parameters and genotypic stability of *Pinus pinaster* Ait. open pollinated families under different water and nutrient regimes. *Forest Sci* 51:165–174
- Zas R, Merlo E (2008) El programa de mejora de *Pinus pinaster* en Galicia. *Boletín CIDEU*. URL: <http://www.uhu.es/cideu/Boletin/TemasBoletines.htm>
- Zas R, Merlo E, Fernández-López J (2004) Genotype × environment interaction in Maritime pine families in Galicia, Northwest Spain. *Silvae Genet* 53:175–182
- Zas R, Solla A, Sampedro L (2007) Variography and kriging allow screening *Pinus pinaster* resistant to *Armillaria ostoyae* in field conditions. *Forestry* 80:201–209

## **PUBLICACIÓN -3-**

**Raúl de la Mata**, Jordi Voltas, Rafael Zas (2012) Phenotypic plasticity and climatic adaptation in an Atlantic maritime pine breeding population. *Annals of Forest Science* 69 (4):477-487



# Phenotypic plasticity and climatic adaptation in an Atlantic maritime pine breeding population

Raúl de la Mata · Jordi Voltas · Rafael Zas

Received: 5 October 2011 / Accepted: 14 December 2011 / Published online: 14 January 2012  
© INRA / Springer-Verlag France 2012

## Abstract

• **Context** *Pinus pinaster* Ait. is found in the Iberian Peninsula under Mediterranean and Atlantic conditions. Both climates encounter each other in Galicia (NW Spain), where two bioclimatic regions can be differentiated: coastal and inland. A breeding program was launched in the coastal area, with two breeding and deployment areas delimited.

• **Aims** We analyse plasticity patterns across regions in a coastal breeding population to assess the suitability of current breeding areas and how genetic material will likely respond to future climate.

• **Methods** Total height at ages 3 and 8 years was assessed in 16 trials established along the coast and in inner Galicia. Clustering of environments with similar genotypic performance, family sensitivities to climatic factors and stability analyses were performed.

• **Results** Sizeable genetic variation in plasticity was found among families, and crossover genotype-by-environment

interactions were detected within and between regions. It was unfeasible to regionalize Galicia into alternative areas of stable genotypic performance. Only the cold regime was found to noticeably underlie the array of phenotypic responses to changing environmental conditions.

• **Conclusions** Results suggest that previous delimitation in two breeding areas is pointless and indicate reduced effects of a changing climate towards Mediterranean conditions on decreasing population fitness.

**Keywords** Genotype × environment interaction · Crossover interaction · Environmental stability · Phenotypic plasticity · Climate change · *Pinus pinaster*

**Handling Editor:** Eric Rigolot

**Contribution of the co-authors** RM, JV and RZ conceived the paper; RM coordinated field assessments and processed the data; RM, JV and RZ performed the statistical analysis; RZ achieved the funds; RM coordinated the writing of the manuscript; RZ and JV helped in writing by subsequent revisions.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s13595-011-0173-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

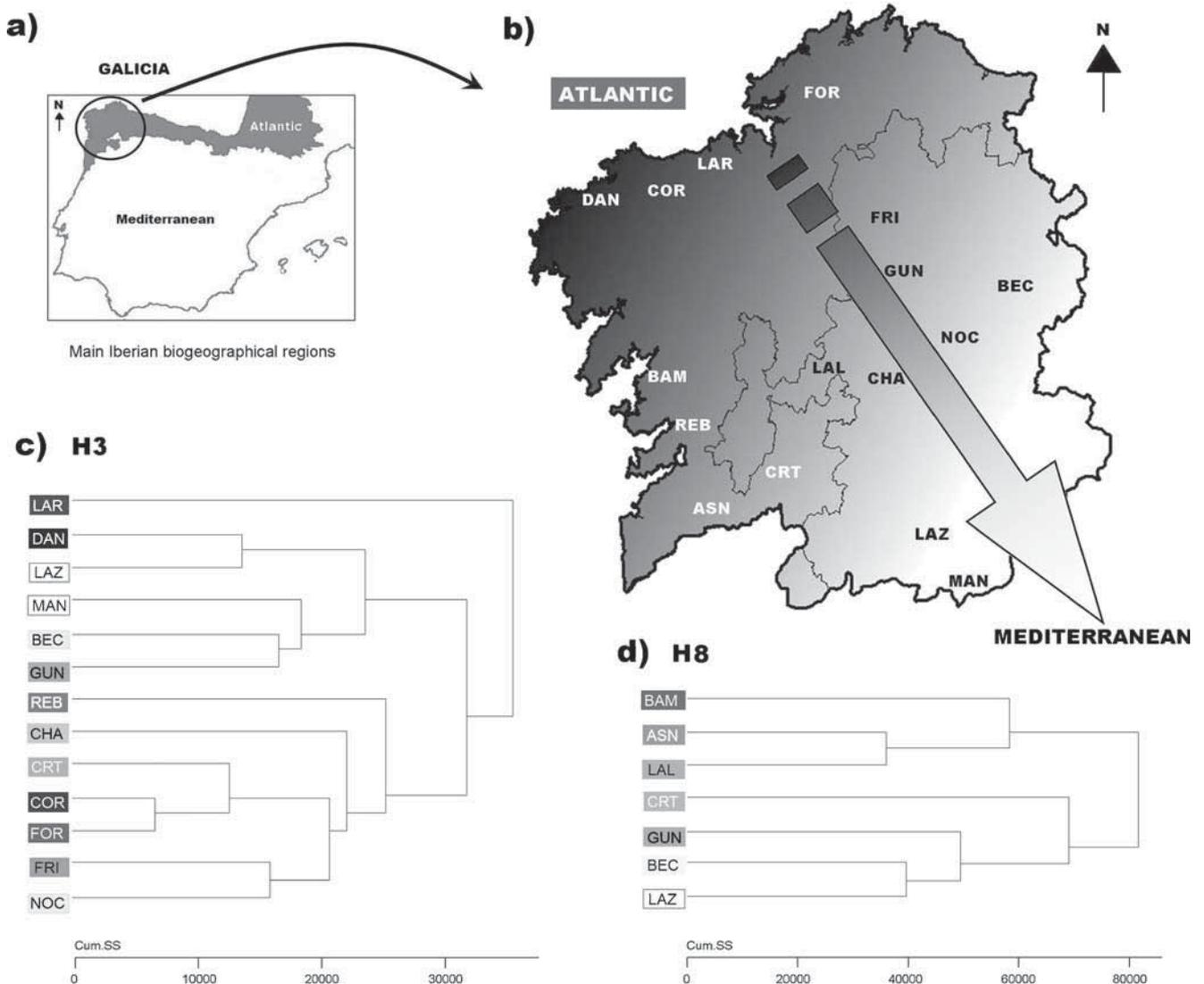
R. de la Mata (✉) · R. Zas  
Misión Biológica de Galicia, MBG-CSIC,  
Apdo. 28,  
36080 Pontevedra, Spain  
e-mail: delamatapombo@yahoo.es

J. Voltas  
Department of Crop and Forest Sciences, University of Lleida,  
Lleida, Spain

## 1 Introduction

Two main bioclimatic regions can be distinguished in the Iberian Peninsula: Atlantic and Mediterranean. The Atlantic region, which occupies a narrow coastal strip in the north and the northwest (Fig. 1), is characterized by high and well-distributed precipitations and a narrow seasonal oscillation of temperature. In the Mediterranean region, precipitations are lower and concentrate in autumn and winter, summer drought being the most limiting factor for plant growth. In Galicia (NW Spain), both regions encounter each other, and the typical Atlantic coast climate is gradually transformed towards the interior, following a NW–SE gradient, into clear Mediterranean conditions (Fig. 1).

Local climate models in Galicia predict an increase in mean temperature coupled with an increasing frequency of extreme heat events in summer, milder winter cold extremes and important changes in rain distribution over the course of the year (Pérez-Muñuzuri et al. 2009). Climate in the coastal



**Fig. 1** **a** The two main biogeographical regions of the Iberian Peninsula: Atlantic (grey shaded) and Mediterranean (white shaded). **b** Location of the test sites across the NW–SE environmental gradient between Atlantic and Mediterranean conditions in Galicia. The grey pattern and the arrow illustrate the gradual increase of thermal oscillations and summer drought, and the decline in annual rainfall from the NW (dark grey) to the SE of the region (light grey). The thin black line denotes the boundary between the two bioclimatic areas currently operative for breeding and deployment

purposes. The 16 test sites are represented in the map by their respective codes (see Online Resource 1, 2 and 3). **c, d** Dendrograms representing the environmental cluster obtained by means of the CINTERACTION procedure for height growth at ages 3 and 8 years. Sites are coloured according to their location in the Atlantic–Mediterranean gradient, following a colour gradient from dark (true Atlantic climate) to white (strong Mediterranean influence)

Atlantic areas will, thus, likely evolve towards more Mediterranean conditions in the near future.

In the Iberian Peninsula, maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) is found both in the Atlantic and the Mediterranean regions, showing a wide array of adaptation patterns to contrasting environments. Indeed, populations have evolved to adapt to local environmental conditions (Fernandes and Rigolot 2007; González-Martínez et al. 2002; Tapias et al. 2004), leading to a high genetic differentiation among populations and a geographically highly structured intraspecific variation both in terms of quantitative traits and neutral

genetic variation (Bucci et al. 2007; González-Martínez et al. 2002). Among Mediterranean pines, *P. pinaster* has been shown to display high levels of plasticity, modulating its phenotype according to the environment where it grows (Chambel et al. 2007; Corcuera et al. 2010).

*P. pinaster* is particularly valuable in Galicia, where it is the dominant forest tree species in both bioclimates and also the one mostly used for reforestation. Previous studies have identified important differences in terms of growth patterns and genetic structure of *P. pinaster* stands originating from both bioclimatic regions (Alía et al. 1996; Álvarez-González

et al. 2005). While coastal stands show excellent growth and branch characteristics, and also satisfactory stem form, the stands of the inner region, mostly of unknown origin, have clearly inferior quality in relation to growth, stem form and branch habit (Alía et al. 1996). These differences have also been observed in common-garden tests (Molina 1965). The outstanding performance of the coastal stands has prompted the implementation of a classical breeding program aimed to supply genetically improved seeds for reforestation in the region. This program included phenotypic mass selection in coastal stands to make up a breeding population upon which three series of open-pollinated progeny trials were established both along the coast and in inner Galicia. This multi-environment trial (MET), which tests many genetics entries along the Atlantic–Mediterranean gradient, provides an excellent experimental device to assess how climate modulates phenotypes and whether this modulation is under genetic control. The analysis of the Genotype by Environment ( $G \times E$ ) interaction should, thus, be valuable for understanding phenotypic responses of this Atlantic maritime pine breeding population to future climate change.

When studying  $G \times E$  interaction, it is important to note that not all types of non-parallel responses have the same adaptive or breeding relevance. On the one hand, *crossover* interactions (COI), caused by changes in rank order for genotypes between environments, usually have large impacts in selection processes as the best genotypes may differ across environments (Hammer and Cooper 1996). On the other hand, *non-crossover* interactions, caused by heterogeneity of either genetic or residual variances, or both combined, are irrelevant for selection providing that the testing environments covers the range of environmental conditions where the species is prone to be used (Delacy et al. 1996). Former evaluations of the Atlantic *P. pinaster* breeding population of NW Spain, both in field trials located in the Atlantic zone (trial series 1995 as described in Online Resource 1, Zas et al. (2004)) and under controlled conditions in the greenhouse (analysing a subset of the breeding population under different water and nutrient availabilities, Zas and Fernández-López (2005)), showed that  $G \times E$  interaction was sizeable, although most interaction could be attributed to a few highly interactive families (Zas et al. 2004). When analysed across bioclimatic regions (coastal and inland Galicia, trial series 2001 as described in Online Resource 1) crossover effects were observed both between and within regions, suggesting improper territorial division for stable genotypic performance (de la Mata and Zas 2010b). However, these findings demand further confirmation as they were based on a reduced number of field trials, and some of them suffered important sanitary problems.

This work takes advantage of the MET device established along the coast and in inner Galicia to (1) understand how climatic factors modulate the phenotype of different *P.*

*pinaster* genotypes from an Atlantic breeding population, (2) further assess the suitability of the current deployment areas for Galicia, and (3) seek, if necessary, for alternative geographic divisions that minimize the impact of  $G \times E$  interaction for growth. To this end, we analysed 16 progeny trials corresponding to the whole experimental device including those nine trials belonging to previous series and seven new trials including all the 116 families of the breeding program. We used a two-stage analysis in which we first corrected the original data for spatial autocorrelation at the trial level, and then we investigated  $G \times E$  interaction patterns using a restricted maximum likelihood (REML) approach implemented in mixed-model analysis (Searle et al. 1992) along with multivariate procedures.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Genetic material, test sites and growth measurements

The genetic material consisted of 116 half-sib families obtained from plus trees replicated in a first generation clonal seed orchard (Sergude, Consellería de Medio Rural, Xunta de Galicia, 42.82° N, 8.45° W) that provides high-quality seed for reforestation in the coastal area of Galicia. Plus trees were individually selected in either natural or artificial stands located in the Atlantic region of Galicia according to their superior growth, stem form and branch habit.

Data were obtained from three series of trials installed in 1995, 2001 and 2005. A total of 16 individual trials were measured, with each trial including between 73 and 116 families of the whole collection, with an average of 20 individuals per family and site. Eight trials were established in the Atlantic region and eight trials in the inland region where Mediterranean influence is strong (Fig. 1). The number of common families between sites varied from 62 to 116 for sites of the same region and from 59 to 116 for sites of different regions. Site characteristics, experimental design, mean tree growth and mean mortality in each trial are shown in Online Resource 1, 2 and 3.

All trees from each trial (except those dead or badly suppressed) were measured for total height ( $H$ ) from the root collar to the extreme of the apical bud with a pole in centimetres. Measurements were made at 3, 7 and 8 years after planting depending on the particular trial. Height at ages 7 and 8 years were considered equivalent (and referred to as  $H_8$ ) since no relevant changes in family rankings are expected between both ages. Therefore, 3- ( $H_3$ ) and about 8 ( $H_8$ )-year-old measurements were used for analysis. In four out of 16 trials, heights were measured at both ages; in nine trials,  $H_3$  was only measured, and in the remaining three sites,  $H_8$  was the only evaluation (Online Resource 3).

## 2.2 Statistical analyses

### 2.2.1 Spatial adjustments

Since spatial autocorrelation is a common concern in forest genetic trials (Magnussen 1990) and the available information belongs to different series of trials with different block designs, we first corrected the dependent variable for spatial autocorrelation at each site. Spatial adjustments were done using the iterative spatial analysis method (Zas 2006). This method uses geostatistics tools (variography and kriging) to model the spatial variation of the residuals of height data adjusted for genetic effects. Residuals are obtained assuming a complete randomised design and disregarding block effects to prevent the occurrence of artificial boundaries that might hinder the modelisation of the spatial structure. Then, the spatial model of the residual variation is used to adjust the original variable for its spatial autocorrelation (see details in Zas 2006). Spatially adjusted data from each trial were then jointly analysed to study the relevance and patterns of  $G \times E$  interaction. Because the joint modelling of spatial variation and genetic variance–covariance structures across sites is computationally very demanding, this two-stage approach is an attractive alternative for the analysis of large data sets (Cappa et al. 2009; de la Mata and Zas 2010b).

### 2.2.2 Age-to-age correlation

The genetic correlation between ages 3 and 8 years was estimated using a mixed multivariate repeated measures analysis (Holland 2006) for those sites in which height was measured at both ages.

### 2.2.3 Relevance of $G \times E$ interaction

As a first assessment of the relevance of  $G \times E$  interaction, we fitted a simple two-way linear mixed model for the spatially adjusted dataset:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_j + G \times S_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

where  $Y_{ijk}$  is the observation of the  $k$ th tree of the  $i$ th family in the  $j$ th site,  $\mu$  is the overall mean,  $G_i$  is the random effect of the family  $i$ ,  $S_j$  is the fixed effect of the site  $j$ ,  $G \times S_{ij}$  is the random effect of interaction between the family  $i$  and the site  $j$ , and  $\varepsilon_{ijk}$  is the random tree effect of the  $k$ th individual or error term. The within-site block effect was not included in the model since the dependent variable was already free of spatial correlation. The mixed model was fitted using the MIXED procedure of SAS (Littell et al. 2006), and variance components were estimated using the REML method. The fitted model also allowed for heterogeneity of error

variances in order to account for heterogeneous standard errors of genotype–environment means, as large differences in height growth were observed among sites.

### 2.2.4 Geographic patterns of $G \times E$ interaction

To determine whether  $G \times E$  interaction was caused mainly by differential family performance across main climatic regions, we tested whether COI was relevant only at the regional level. To this end, we used a log-likelihood ratio test to compare the fit of a model with no restrictions in the family variance–covariance matrix (full model, unconstrained genetic correlations across sites) with a reduced model in which family covariances among sites of the same region are constrained to  $R_G=1$  (i.e. no family rank changes are allowed within regions) (de la Mata and Zas 2010b; Yang 2002). Both models are extensions of the more general model (Eq. 1) in which alternative variance–covariance structures are tested to accommodate heterogeneity of variances and covariances at the level of the random term  $G \times S_{ij}$ . Under the null hypothesis, the difference in minus two times the log-likelihood of the reduced and the full models is  $\chi^2$ -distributed, with degrees of freedom given by the difference in the number of covariance parameters of both models (Fry 2004; Yang 2002).

### 2.2.5 Environmental clustering

Because relevant COI occurred within regions (see “Results”), a method was implemented for seeking for clusters of sites minimizing  $G \times E$  interaction at the within-group level while simultaneously maximising the dissimilarity between groups for  $G \times E$  interaction. To this end, the CINTERACTION procedure of GenStat (Payne et al. 2006), which is based on the agglomerative hierarchical clustering method defined by Corsten and Denis (1990), was applied to the dataset. This procedure sequentially groups genotypes and environments in successive steps so that most of  $G \times E$  interaction is explained between groups of genotypes and environments at the end of the merging process, minimising the residual  $G \times E$  interaction. This analysis was done using family means per site for those families represented in all sites at each age (76 and 57 families at ages 3 and 8 years, respectively). The mean error variance across sites and its degrees of freedom were used as starting parameters of the procedure.

### 2.2.6 Relevance of environmental factors explaining $G \times E$ interaction

The exploration of environmental factors underlying  $G \times E$  interaction was performed using factorial regression models (Denis 1988). Factorial regression analysis allows quantifying the relative merit of explicit environmental factors on

the explanation of  $G \times E$  interaction. In particular, the amount of interaction between the genotype effect and an environmental covariate is related to the relevance of the genotypic variation in sensitivity (i.e. slope of response) to that explicit factor. Biologically, factorial regression models are informative on the extent by which differences across sites in environmental characteristics can explain differential genotypic performance. In other words, with these models, we can quantify the genetic variation in phenotypic plasticity attributable to specific environmental parameters.

In this study, the original  $G \times S$  term in (Eq. 1) was replaced by single effects accounting for the random interaction of genotypes with specific environmental variables; a residual variance component was also estimated reflecting the variation that remained after each single explanatory source was removed from the original  $G \times S$  term (Frensham et al. 1998):

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_j + G \times S_{ij} + G \times Cov_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (2)$$

Where the terms are the same than in model (Eq. 1) except  $G \times Cov_{ij}$ , which refers to the random interaction of genotypes with a single environmental covariate and  $G \times S_{ij}$  that now denotes the residual variance of the interaction. Models were fitted with the MIXED procedure of SAS.

The environmental factors considered included altitude, annual precipitation, summer precipitation (from June to August), the Gausson Index as an indicator of the intensity of summer drought ( $GI = \sum(2T - P)$  for each month where  $2T > P$ , where  $T$  is the mean temperature and  $P$  the monthly precipitation), annual mean temperature, number of frost days ( $T_{\min} < 0^\circ\text{C}$ ) per year, absolute minimum and maximum temperature, and mean of daily minimum temperatures of the coldest month, and of the maximum temperatures of the warmest month. Climatic factors were obtained from the closest meteorological stations to each test site for the corresponding 3 or 8 years growth period.

### 2.2.7 Genotypic stability

We also quantified the particular contribution of each family to the  $G \times E$  interaction. If the interaction is mainly caused by just a reduced group of interactive families, then its relevance can be minimised by removing these families from the breeding population. Shukla's stability variance (Shukla 1972) was chosen as a biologically intuitive method to estimate variability in family stability across environments. The model was implemented with the MIXED procedure of SAS using family means per site (Piepho 1999), including the maximum number of families that allowed model convergence (100 and 68 families at age 3 and 8 years, respectively). In Shukla's stability variance, a

separate variance (or genotypic stability) is assigned to each genotype. The model is fitted using a variance–covariance matrix with a banded main diagonal structure at the level of the random  $G \times S$  term where the variances of the diagonal are interpreted as the environmental stability of each genotype (Piepho 1999). Larger stability variance values correspond to more interactive genotypes. Shukla's stability variance is linearly related to the classical ecovalence value (Wricke 1962), which quantifies the contribution of a genotype to the interaction sum of squares.

## 3 Results

Mean height growth was highly variable across sites, ranging from 78.2 to 155.4 cm at age 3 years and from 294.9 to 558.1 cm at age 8 years (Online Resource 3). On average, height growth was 21% and 38% higher in the coastal sites than in the inner sites at ages 3 and 8 years, respectively. Average mortality in the test sites was generally low and below the usual thresholds for forest plantations in Galicia (Online Resource 3). Several sites, however, showed abnormally high mortality due to the incidence of different unexpected problems such as insect herbivory (Daneiro), fungal diseases (Laracha), water logging conditions (Chantada) or high post-transplanting stress (Becerreá). Because the causes underlying these high mortality rates were beyond the ordinary environmental variation found among sites, survival was not further considered in the analyses.

Residuals after subtracting family effects revealed pronounced non-random spatial structures at both ages in all sites (Online Resource 4). Either spherical, exponential or linear theoretical semivariograms fitted well the residuals of each trial ( $r^2 > 0.87$ ,  $P < 0.001$ ). The percentage of total residual variation explained by the spatial pattern (intensity of the spatial dependence) varied from 22% to 59% at age 3 years and from 41% to 74% at age 8 years (Online Resource 4).

### 3.1 Geographical pattern of $G \times E$ interaction

The ratio of estimated variance components for  $G \times S$  interaction and family effects ( $\sigma_{G \times S}^2 / \sigma_G^2$ ) was larger than unity (1.34 and 1.11 at ages 3 and 8 years, respectively), indicating a high relevance of the interaction as compared with the genotype main effect. The genetic correlation between both ages was  $0.708 \pm 0.085$ , reasonably high to assume that a 3-year assessment is representative of tree performance at age 8 years.

The model that assumes absence of COI within regions (i.e. assuming perfect genetic correlations,  $R_G = 1$ , between all pair of sites belonging to the same region) showed a

significantly worse goodness of fit (i.e. larger -2RLL in Table 1) than the full model with unrestricted genetic correlations, suggesting that COI existed both within and between bioclimatic regions (see also Online Resource 5). In agreement with this result, genetic correlations between sites from a particular bioclimatic region were not significantly larger than those involving sites of different regions ( $F_{1,19}=3.35, P=0.083$  for age 3 years and  $F_{1,76}=0.03, P=0.853$  for age 8 years; Table 2).

Overall, the clustering procedure tended to separate Atlantic from Mediterranean sites (Fig. 1), although both main groups also included sites from the alternative climatic region, and some few sites were classified independently from these main groups. Nevertheless, COI was still present within these optimal clusters, as models assuming absence of ranking change for genotypes between sites of the same cluster showed a significantly worse goodness of fit than the full, unconstrained model (Table 1). Therefore, grouping sites into regions with negligible G×E interaction was unfeasible.

### 3.2 Environmental factors underlying G×E interaction

Most factorial regression models showed a marginal or lack of significance for most environmental variables at age 3 years. The mean daily minimum temperature of the coldest month was the only parameter that was able to significantly reduce the original G×S term (a reduction of 8.8% decrease in variance component). At age 8 years, annual precipitation and annual mean temperature also played some role in the explanation of G×S interaction, but the mean daily minimum temperature of the coldest month was again the most relevant parameter underlying genotypic responses to changing environmental conditions (Table 3).

### 3.3 Stability analysis

Shukla's stability variances of families followed a unimodal but positively skewed distribution with a few families showing relatively high values (about two to three times larger than the average stability) (Fig. 2). Therefore, not all families contributed equally to the total G×E interaction. Sequentially removing the most interactive families from the analyses progressively reduced the relative importance of the interaction term, but too many families had to be removed to achieve a negligible interaction (Fig. 2).

## 4 Discussion

### 4.1 Genetic variation in phenotypic plasticity

The large variability in height growth among test sites is indicative of the relevance of plastic responses in *P. pinaster*. Tree performance was better in the Atlantic area, where the genotypes were originally selected and the environmental conditions are also more favourable for growth. The high ratio of G×E interaction to family variance components ( $\sigma_{G \times S}^2 / \sigma_G^2$ ) suggests the presence of contrasting adaptation patterns within the Atlantic breeding population when tested across the Galician territory and confirms that genetic variation in plasticity does exist for this population. These results agreed with previous findings upon the same breeding population both within the Atlantic region (Zas et al. 2004) and across the two bioclimatic regions of Galicia (de la Mata and Zas 2010b). The existence of significant crossover interactions both within and between regions suggests a large impact of G×E interaction on achieving progress from selection.

**Table 1** Log-likelihood ratios testing for crossover interactions appearing either within and across regions or only across regions

Model	AGE 3				AGE 8			
	-2RLL	LLR	DF <sup>a</sup>	$p > \chi^2$ <sup>b</sup>	-2RLL	LLR	DF <sup>a</sup>	$p > \chi^2$ <sup>b</sup>
Full	178980	–	–	–	137566	–	–	–
Atl-Medit	179144	163.6	36	<0.001	137640	74.5	11	<0.001
2 Groups	179088	108.1	36	<0.001	137629	63.5	9	<0.001
3 Groups	179085	104.9	31	<0.001	137610	44.2	6	<0.001

The table shows the restricted log-likelihood (RLL) value of the full model (unconstrained variance-covariance matrix) and of different reduced models in which genetic covariances across sites of the same region were constrained to unity. The corresponding log-likelihood ratio (LLR = -2 (RLL<sub>reduced model</sub> - RLL<sub>full model</sub>)), associated degrees of freedom (DF) and probability levels are presented. Sites were grouped according to the bioclimatic region (Atlantic or Mediterranean regions), or according to the optimal clustering obtained by the CINTERACTION procedure (see Fig. 1), assuming the first two levels of subdivision in two or three groups

<sup>a</sup> LLR is distributed approximately as  $\chi^2$  with degrees of freedom given by the difference between the number of covariance parameter specifying the full model and the reduced model (Fry 2004)

<sup>b</sup> Significance of  $\chi^2$  test for LLR. P values lower than 0.05 indicate that the reduced model fits significantly worse than the full model

**Table 2** REML estimates of genetic correlations (and approximate standard errors within brackets) between pairs of sites for height growth at ages 3 and 8 years

Age 3 years		Age 8 years													
		Atlantic							Mediterranean						
		CRT	DAN	FOR	LAR	REB	BEC	CHA	FRI	GUN	LAZ	MAN	NOC		
COR	<b>0.72±0.15</b> ***	<b>0.42±0.22</b> ***	<b>0.18±0.23</b>	<b>1±0.00</b> ***	<b>0.18±0.23</b>	<b>1±0.00</b> ***	-0.32±0.24	0.69±0.21 ***	0.79±0.24**	0.46±0.19 *	0.35±0.18	0.80±0.26 **	0.80±0.20 ***		
CRT		<b>0.63±0.14</b> ***	<b>0.75±0.14</b> ***	<b>0.51±0.17</b> **	<b>0.64±0.15</b> ***	<b>0.64±0.15</b> ***	0.28±0.19	0.58±0.17 ***	0.64±0.18 ***	0.40±0.15 **	0.46±0.13 ***	0.31±0.22	0.51±0.18 **		
DAN			<b>0.43±0.21</b> *	<b>0.43±0.21</b> *	<b>0.01±0.22</b>	0.63±0.19 ***	0.63±0.19 ***	0.26±0.23	0.38±0.24	0.24±0.18	0.84±0.11 ***	0.60±0.24 *	-0.01±0.24		
FOR				<b>0.78±0.19</b> ***	<b>0.87±0.17</b> ***	<b>0.87±0.17</b> ***	0.25±0.23	0.78±0.20 ***	0.56±0.24 *	0.37±0.19 *	0.55±0.16 ***	0.31±0.27	0.86±0.19 ***		
LAR					<b>0.34±0.23</b>	<b>0.34±0.23</b>	0.41±0.23	0.64±0.21 **	0.30±0.25	0.62±0.16 ***	0.55±0.16 ***	0.25±0.27	0.14±0.25		
REB							0.34±0.23	1±0.00 ***	0.55±0.24 *	0.12±0.19	0.07±0.19	0.12±0.26	1±0.00 ***		
BEC								<b>0.41±0.23</b>	<b>-0.12±0.26</b>	<b>0.59±0.17</b> ***	<b>0.56±0.16</b> ***	<b>0.40±0.26</b>	<b>0.03±0.25</b>		
CHA									<b>0.52±0.18</b> **	<b>0.52±0.18</b> **	<b>0.38±0.18</b> *	<b>0.86±0.25</b> ***	<b>0.74±0.21</b> ***		
FRI									<b>0.21±0.21</b>	<b>0.21±0.21</b>	<b>0.22±0.20</b>	<b>0.46±0.29</b>	<b>0.78±0.24</b> **		
GUN											<b>0.41±0.14</b> **	<b>0.29±0.22</b>	<b>0.32±0.20</b>		
LAZ												<b>0.54±0.20</b> **	<b>0.20±0.19</b>		
MAN													<b>0.09±0.29</b>		
Age 8 years		Atlantic							Mediterranean						
		BAM	CRT	BEC	GUN	LAL	LAZ								
ASN	<b>0.67±0.12</b> ***	<b>0.14±0.21</b>	<b>0.14±0.21</b>	0.30±0.26	0.14±0.19	0.48±0.16 **	0.47±0.18 **								
BAM		<b>0.46±0.18</b> *	<b>0.46±0.18</b> *	0.21±0.25	0.31±0.18	0.50±0.15 **	0.28±0.19								
CRT				0.01±0.30	0.40±0.20	0.37±0.20	0.15±0.23								
BEC					<b>0.60±0.25</b> *	<b>0.16±0.27</b>	<b>0.70±0.25</b> **								
GUN						<b>0.25±0.20</b>	<b>0.79±0.15</b> ***								
LAL							<b>0.37±0.19</b>								

Test sites are grouped according to bioclimatic regions (Atlantic and Mediterranean). Bolded values denote correlations between pair of sites of the same region \*\*\**P*<0.001; \*\**P*<0.01; \**P*<0.05 significance levels

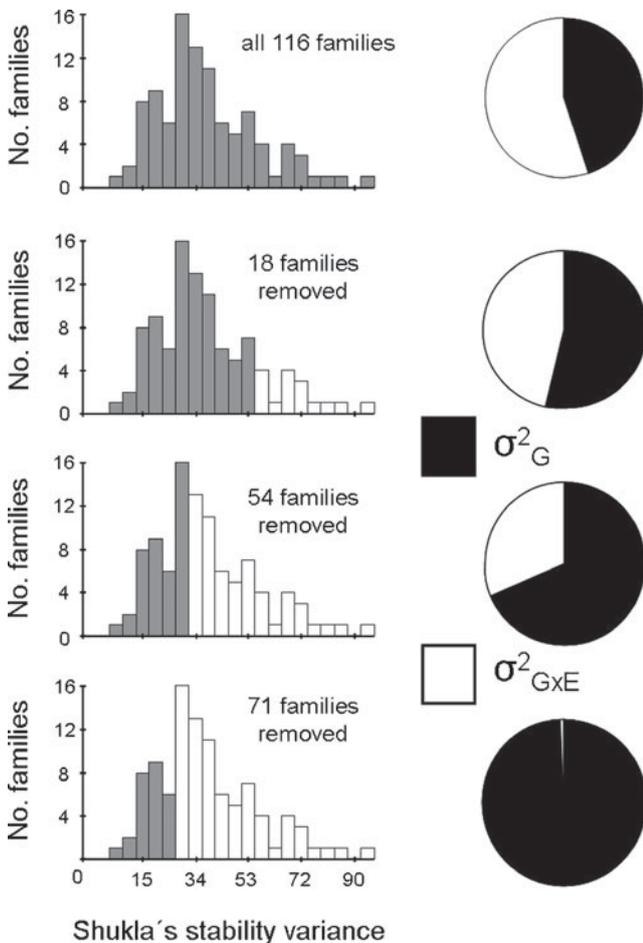
**Table 3** Relative merit of explicit climatic factors on the explanation of G×E interaction at age 8 years

Climatic variables	Simple model	Extended models		
	$\sigma_{G \times S}^2$	$\sigma_{G \times COV}^2$	$\sigma_{G \times S}^2$	Reduction in original $\sigma_{G \times S}^2$ (%)
	105.84 (13.64)			
Annual precipitation (mm)		4.30 E <sup>-5</sup> (1.40 E <sup>-5</sup> )	93.09 (13.28)	12.05
Summer precipitation (mm)		4.99 E <sup>-3</sup> (3.10 E <sup>-3</sup> )	102.35 (13.59)	3.30
Annual mean temperature (°C)		0.64 (0.12)	98.89 (13.25)	6.57
Average min temperature <sup>a</sup> (°C)		4.64 (1.47)	81.09 (12.90)	23.38

The variance component (and approximate standard errors within brackets) of the original G×S term was obtained from a simple two-way linear mixed model (Eq. 1 in “Materials and methods”). In the extended models (Eq. 2 in “Materials and methods”), the G×S term was replaced by a covariate term accounting for the interaction of genotypes with specific climatic variables plus a G×S residual reflecting the variation that remained after each single explanatory source was removed from the original G×S term. Only those factors explaining a relevant amount of the original G×S are presented

<sup>a</sup> Mean of daily minimum of the month of lowest average

Remarkably, the relevance of G×E interaction in the studied breeding population seems higher than that observed in



**Fig. 2** Frequency histogram of Shukla's stability variance for height growth at age 3 years and magnitude of the G×E interaction in relation to genotypic variation as the most interactive families were sequentially eliminated from the analysis. The grey and white bars in the histograms represent families included and excluded, respectively

provenance MET data for this species (Guyon and Kremer 1982; de la Mata and Zas 2010a; Matziris 1982). This is somewhat surprising given the small size of the targeted area and the fact that genotypes were selected for the same phenotypic traits within a rather homogeneous region of origin (Atlantic Galicia). The family×site interaction variance has been shown, however, to be much higher than the provenance×site interaction variance in provenance MET analysis with family structure (Corcuera et al. 2010). In this regard, the sizeable amount of genetic variation in plasticity detected in the present study may have facilitated local adaptation of individuals to transitional climates. This possibility has also been suggested for *P. pinaster* Atlantic populations by other authors (Alía et al. 1997; Chambel et al. 2007).

It should be noted that the relatively early evaluation ages (3 and 8 years) may underlie the large impact of G×E interactions on height growth and, hence, may not completely reflect definitive adaptation patterns of the target population to different environments. Although the relative magnitude of G×E interaction (expressed as ratio of G×E to G variance components) was reduced from age 3 to 8 years, such reduction was nevertheless small, and genetic correlations between both ages were relatively high, suggesting a quite uniform genotypic performance across ages. Previous studies reporting age–age correlations in *P. pinaster* revealed that selection can be reasonably effective when trees are about 8 to 12 years old (Danjon 1994; Kremer 1992). In the present study, the assessment at ages 7–8 years can be thus considered quite effective for achieving a reliable understanding of adaptation patterns to local environmental conditions.

#### 4.2 Geographical pattern of plastic responses

Both the estimation of genetic correlations across sites and the likelihood analysis on the relevance of crossover

interactions indicated that family performance varied as much within as between bioclimatic regions. We can conclude, thus, that there is not enough evidence to subdivide Galicia into the two currently operative deployment areas. An optimal clustering of sites minimizing  $G \times E$  interaction at the within-group level provided no clear geographical pattern of site grouping. Although Atlantic and Mediterranean sites tended to group apart in the clustering history, this trend was spoiled by some sites that were not grouped as could be expected. These were, however, sites either with anomalous growth due to the incidence of pests (Daneiro) or diseases (Laracha) (see de la Mata and Zas 2010b), or located in the central part of Galicia relatively close to the boundary between the two deployment areas (Chantada, Cortegada, Friol, Lalín and Noceda). Altogether, these results suggest that there is not a clear delimited limit between both bioclimatic regions, but rather a diffuse gradient between coastal areas, with a mild Atlantic climate, and the inland zone, characterised by more extreme climatic conditions. Within each bioclimatic region, adjacent sites did not appear as the closer in the clustering history, evidencing the irregularity of this transitional gradient, probably originated by the strong geographic heterogeneity of the region, which also generates large environmental variability at intermediate scales (Martínez et al. 1999).

#### 4.3 Variation in climate sensitivity

Factorial regression models pointed to the thermal regime, especially winter cold, as the climate factor better explaining the  $G \times E$  interaction patterns for the studied breeding population. Therefore, regional differences in thermal regime probably underlie the observed divergence in phenotypic plasticity among genotypes. Contrary to what could be expected, our results indicate that both annual and summer rainfall play a reduced role on the explanation of adaptive patterns in the studied population. Overall, this population appears to be well adapted in terms of growth rate to the intensity and duration of drought events typically found in the Mediterranean region of Galicia. Therefore, the variation in precipitation patterns over the targeted regions does not seem to be responsible of changes in family ranking whereas the cold regime arises as key determinant of genetic variation in phenotypic plasticity in this Atlantic breeding population of maritime pine. The Landes provenance (SW France), another Atlantic origin present in non-water-limiting areas, has also shown a high tolerance to drought that has been attributed to adaptation to windy and sandy areas (Corcuera et al. 2010). The Galician coastal provenance could have experienced a similar process, and, thus the acquisition of some degree of drought tolerance would allow using this material in regions with relatively lower rainfall, but where winds and water soil retention are not so

limiting. By contrast, the results indicate a high relevance of the thermal regime as important driver of relative changes in performance among coastal breeding material. This observation agrees with results on young seedlings of less thermophilic species such as *Pinus sylvestris* (Sonesson and Eriksson 2000) or *Pseudotsuga menziesii* (Campbell and Sorensen 1978), but differs from the performance of other thermophilic pines such as *Pinus taeda*, for which rainfall regime was the factor that better explained the  $G \times E$  interaction (e.g. Cannell et al. 1978; Waxler and van-Buijtenen 1981).

Local climate models in NW Spain predict an increase in temperatures, especially in summer, and important changes in seasonal precipitation distribution, with a progressive evolution towards more Mediterranean conditions (Pérez-Muñuzuri et al. 2009). Our results suggest, thus, a relatively low impact of future climate conditions on the relative performance of the Atlantic breeding population. Because little changes in extreme colds are expected, this population would be well-adapted to the predicted evolution towards conditions similar to the actual climate of inner Galicia.

#### 4.4 Genetic variation in stability

The stability analysis showed that families varied largely in their sensitivity to changing environmental conditions, with some progenies being much more influenced than others. A few especially interactive families were therefore particularly responsible for  $G \times E$  interaction effects. These results are consistent with those previously obtained for the same breeding population in the field (Zas et al. 2004) and under controlled conditions (Zas and Fernández-López 2005). Indeed, this behaviour is common to many other pines (e.g. McKeand et al. 2006; Sonesson and Eriksson 2000).

Removing unstable families is an alternative to reduce the impact of  $G \times E$  interaction in breeding populations. Many authors have suggested considering the genotypic stability across sites as a screening trait in selection processes (e.g. Johnson and Burdon 1990). Selection based on stability parameters is also a safeguard decision regarding the current global change scenarios. Under this uncertain situation, selection for specific adaptation at present may lead more easily to future adaptation concerns in the deployed material (Ledig and Kitzmiller 1992). Removing the most interactive families indeed reduced  $G \times E$  interaction, but achieving near-complete stability in the breeding population would require roguing up to 70% of the initial material. This would imply a too large reduction in genetic variability which is by far not the best decision from a sustainability point of view. Applying a low intensity selection for stability, that is, removing around one third of the most interactive families should be the option of choice as it may substantially reduce COI effects while probably keeping a sufficient genetic pool for future activities in the breeding program.

## 5 Conclusions

We found a sizeable G×E interaction for early height growth that suggests the presence of contrasting adaptation patterns among families in the studied maritime pine population. The large G×E interaction did not follow any clear geographical pattern, with COI effects appearing both within and across bioclimatic regions. Some climatic variables, however, significantly influenced the relative performance of the pine families. Particularly, winter cold rather than drought appeared to be the most relevant modulator of phenotypic plasticity, being the climatic factor that had a greater effect on changes in family rankings. Both the large genetic variation in phenotypic plasticity of the studied Atlantic population and its low sensitivity to summer drought suggest reduced effects of predicted climate change, so a good overall adaptation is expected to future Mediterranean-like climatic conditions in the region. Accordingly, the observed G×E patterns indicate that there is not enough evidence to subdivide Galicia into the two currently operative deployment areas for improved material.

**Acknowledgments** We gratefully acknowledge the effort made by many researchers and technicians of the Forestry Research Centre of Lourizán that contributed to establish and maintain the different trial series. Particularly, we thank Guillermo Vega and Josefa Fernández-López, earlier managers of the Maritime pine-breeding program in Galicia, and Pablo Xesteira, Ricardo Ferradás, Mariano Arnedo, Agustín Quintairós, José María Mendaña, Sonia Queimadelos, Marisa Blanco, Pilar Soto, Maribel Juncal, Raquel Jares, Manuel Cerviño, Emilio Pérez, Ana Hernández, Esther Merlo, Xoaquín Moreira and Patricia Martins for helping in the establishment, maintenance or assessments of the trials.

**Funding** This study was partially supported by the research grants RTA05-173, RTA07-100 and PSE310000. Field trials were established and maintained by the Forestry Research Centre of Lourizán under the Forest Genetic Improvement Programme of Galicia, funded by the European Union and Xunta de Galicia. Raúl de la Mata enjoyed a scholarship funded by Xunta de Galicia.

## References

- Alía R, Martín S, De Miguel J, Galera R, Agúndez D, Gordo J, Catalán G, Gil L (1996) Las regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Ait. OA de Parques Nacionales, DGCONA, Madrid, Spain
- Alía R, Moro J, Denis JB (1997) Performance of *Pinus pinaster* provenances in Spain: interpretation of the genotype by environment interaction. *Can J For Res* 27:1548–1559
- Álvarez-González JG, Ruíz-González AD, Rodríguez-Soalleiro R, Barrio-Anta M (2005) Ecoregional site index models for *Pinus pinaster* in Galicia (NW Spain). *Ann For Sci* 62:115–127
- Bucci G, Gonzalez Martinez SC, Le Provost G, Plomion C, Ribeiro MM, Sebastiani F, Alía R, Vendramin GG (2007) Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Mol Ecol* 16:2137–2153
- Campbell RK, Sorensen FC (1978) Effect of test environment on expression of clines and on delimitation of seed zones in Douglas-Fir. *Theor Appl Genet* 51:233–246
- Cannell MGR, Bridgwater FE, Greenwood MS (1978) Seedling growth rates, water stress responses and root-shoot relationships related to eight-year volumes among families of *Pinus taeda* L. *Silvae Genet* 27:237–248
- Cappa EP, Yanchuk AD, Cartwright CV (2009) Bayesian estimation of genetic (co)variances across sites for spatial adjusted data of large forest genetic trials. In: XIII World Forestry Congress, Buenos Aires, Argentina, 18–23 October 2009. pp 1–9
- Corcuera L, Gil-Pelegrin E, Notivol E (2010) Phenotypic plasticity in *Pinus pinaster* delta(13)C: environment modulates genetic variation. *Ann For Sci* 67:812
- Corsten LCA, Denis JB (1990) Structuring interaction in two-way tables by clustering. *Biometrics* 46:207–215
- Chambel MR, Climent J, Alía R (2007) Divergence among species and populations of Mediterranean pines in biomass allocation of seedlings grown under two watering regimes. *Ann For Sci* 64:87–97
- Danjon F (1994) Stand features and height growth in a 36-year-old maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenance test. *Silvae Genet* 43:52–62
- de la Mata R, Zas R (2010a) Performance of maritime pine Spanish Mediterranean provenances at young ages in a transitional region between Atlantic and Mediterranean climates in NW Spain. *Silvae Genet* 59:8–17
- de la Mata R, Zas R (2010b) Transferring Atlantic maritime pine improved material to a region with marked Mediterranean influence in inland NW Spain: a likelihood-base approach on spatially adjusted field data. *Eur J For Res* 129:645–658
- Delacy IH, Cooper M, Basford PK (1996) Relationships among analytic methods used to study genotype-by-environment interactions and evaluation of their impact on response to selection. In: Kang MS, Gauch HG (eds) *Genotype by environment interaction: new perspectives*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 51–84
- Denis JB (1988) Two-way analysis using covariates. *Statistics* 19:123–132
- Fernandes PM, Rigolot E (2007) The fire ecology and management of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *For Ecol Manage* 241:1–13
- Frensham AB, Barr AR, Cullis BR, Pelham SD (1998) A mixed model analysis of 10 years of oat evaluation data: use of agronomic information to explain genotype by environment interaction. *Euphytica* 99:43–56
- Fry JD (2004) Estimation of genetic variances and covariances by restricted maximum likelihood using PROC MIXED. In: Saxton AM (ed) *Genetic analysis of complex traits using SAS*. SAS Institute, Cary, NC, USA
- González-Martínez SC, Alía R, Gil L (2002) Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity* 89:199–206
- Guyon JP, Kremer A (1982) Phenotypic stability of height growth, daily changes in sap pressure and transpiration in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Can J For Res* 12:936–946
- Hammer GL, Cooper M (1996) *Plant adaptation and crop improvement*. CAB International, Wallingford, UK
- Holland JB (2006) Estimating genotypic correlations and their standard errors using multivariate restricted maximum likelihood estimation with SAS Proc MIXED. *Crop Sci* 46:642–654
- Johnson GR, Burdon ED (1990) Family-site interaction in *Pinus radiata* implications for progeny testing strategy and regionalised breeding in New Zealand. *Silvae Genet* 39:55–62
- Kremer A (1992) Predictions of age-age correlations of total height based on serial correlations between height increments in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theor Appl Genet* 85:152–158
- Ledig FT, Kitzmiller JH (1992) Genetic strategies for reforestation in the face of global climate change. *For Ecol Manage* 50:153–169

- Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD, Schabenberger O (2006) SAS system for mixed models, 2nd edn. SAS Institute, Cary, NC, USA
- Magnussen S (1990) Application and comparison of spatial models in analyzing tree-genetics field trials. *Can J For Res* 20:536–546
- Martínez CA, Pérez AA, Castillo RF, Valcarcel DM, Blanco CR (1999) Atlas climático de Galicia. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, Spain
- Matziris DI (1982) Variation on growth and quality characters in *Pinus pinaster* provenances grown at seven sites in Greece. *Silvae Genet* 31:168–173
- McKeand SE, Jokela EJ, Huber DA, Byram TD, Allen HL, Li B, Mullin TJ (2006) Performance of improved genotypes of loblolly pine across different soils, climates, and silvicultural inputs. *For Ecol Manage* 227:178–184
- Molina F (1965) Comportamiento racial del *Pinus pinaster* en el noroeste de España. *An IFIE* 2:221–238
- Payne RW, Harding SA, Murray DA, Soutar DM, Baird DB, Welham SJ, Kane AF, Gilmour AR, Thompson R, Webster R, Tunnicliffe E, Wilson G (2006) GenStat release 9 reference manual, part 2 directives. VSN International, Hemel Hempstead, UK
- Pérez-Muñuzuri V, Fernández-Cañamero M, Gómez-Gesteira JL (2009) The evidence for and impact of climate change in Galicia. Xunta de Galicia. Consellería de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible. URL: [www.meteogalicia.es](http://www.meteogalicia.es), Santiago de Compostela, Spain
- Piepho HP (1999) Stability analysis using the SAS system. *Agron J* 91:154–160
- Searle SR, Casella G, McCulloch CE (1992) Variance components. John Wiley, New York, USA
- Shukla (1972) Some statistical aspects of partitioning genotype - environmental interaction components of variability. *Heredity* 29:237–245
- Sonesson J, Eriksson G (2000) Genotypic stability and genetic parameters for growth and biomass traits in a water×temperature factorial experiment with *Pinus sylvestris* L. seedlings. *For Sci* 46:487–495
- Tapias R, Climent J, Pardos JA, Gil L (2004) Life histories of Mediterranean pines. *Plant Ecol* 171:53–68
- Waxler MS, van-Buijtenen JP (1981) Early genetic evaluation of Loblolly pine. *Can J For Res* 11:351–355
- Wricke G (1962) Über eine methode zur erfassung der ökologischen streubreite in feldversuchen. *Z Pflanzenzucht* 47:92–96
- Yang R-C (2002) Likelihood-based analysis of genotype–environment interactions. *Crop Sci* 42:1434–1440
- Zas R (2006) Iterative kriging for removing spatial autocorrelation in analysis of forest genetic trials. *Tree Genet Genomes* 2:177–185
- Zas R, Fernández-López J (2005) Juvenile genetic parameters and genotypic stability of *Pinus pinaster* Ait. open pollinated families under different water and nutrient regimes. *For Sci* 51:165–174
- Zas R, Merlo E, Fernández-López J (2004) Genotype x environment interaction in Maritime pine families in Galicia, Northwest Spain. *Silvae Genet* 53:175–182







Universida<sub>d</sub>eVigo