

TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y SU USO EN LOS PROGRAMAS DE CONSERVACIÓN

P. JIMÉNEZ ¹, C. COLLADA ²

¹ Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética. ETSI MONTES, Universidad Politécnica de Madrid

² Departamento de Biotecnología. ETSI MONTES, Universidad Politécnica de Madrid

pjimenez@montes.upm.es

RESUMEN

La variación intraespecífica es un requisito para la evolución, al ofrecer la posibilidad de diferentes respuestas a las fuerzas selectivas. Es importante disponer de una estimación de la variabilidad de la especie. Con este fin se utilizan varios enfoques. Los caracteres fenotípicos resultan de fácil observación, pero están muy influenciados por el ambiente y su control genético es poco claro. Los marcadores moleculares permiten estudiar directamente el material genético, pero normalmente se trata de rasgos sin reflejo en el fenotipo.

Se distinguen dos tipos de variación: la diversidad neutral, es decir, aquellos rasgos no determinados por fuerzas selectivas, y la variación adaptativa, constituida por los caracteres con valor adaptativo. La primera se estima principalmente mediante marcadores moleculares, existiendo diversas técnicas para estudiar tanto proteínas como el ADN. Se ofrece una revisión de los métodos más usados y de sus aplicaciones.

El método clásico de estudio de la variación adaptativa son los ensayos de procedencia/progenies, en los que se analiza el grado de variabilidad y el porcentaje de ésta que corresponde a una variación genética. La base de estos estudios es ensayar distintos genotipos en un mismo ambiente con el fin de minimizar la variabilidad ambiental.

El conocimiento de la diversidad es necesario para los programas de conservación. Es un componente de la biodiversidad que debe ser preservado, pero, además, es una herramienta de utilidad en muchos aspectos, especialmente para conocer los procesos que determinan la estructura genética de la especie considerada.

PALABRAS CLAVE: Diversidad
Marcadores Genéticos
Adaptación
Conservación Genética

INTRODUCCIÓN

La existencia de variabilidad en el interior de las especies es un hecho fácilmente perceptible; los individuos no son idénticos entre sí. Esta variación surge por mutación del

material hereditario, y es el requisito necesario para que la especie evolucione y se adapte a nuevas condiciones, pues la selección no puede actuar si no existen diversas alternativas. Dada la importancia de la variación, su cuantificación ha sido un objetivo perseguido por los genetistas de poblaciones.

Sin embargo, no es fácil estimar el verdadero grado de variación genética. En principio, las únicas diferencias observables entre individuos eran rasgos fenotípicos (coloración, rasgos morfológicos, tamaño, diferencias de crecimiento o comportamiento...); pero la variación genética correspondiente a estas diferencias no está bien determinada: rasgos controlados por varios genes, interacción entre ellos, influencia del ambiente. A partir de los años sesenta, el desarrollo de técnicas para estudiar la variación a nivel molecular abrió la posibilidad de estudiar caracteres con un control genético sencillo, tales como las diferencias de movilidad en proteínas; posteriormente, se ha hecho posible estudiar directamente la variación en la molécula de ADN. Pero, si al estudiar la variabilidad fenotípica desconocíamos la variación subyacente en el genoma, al cuantificar la variación molecular o ignoramos el reflejo que tiene sobre el fenotipo, o sabemos que es nulo, pues a menudo se estudian fragmentos de ADN que no se transcriben (es decir, que no codifican para ningún carácter).

Existen, por tanto, dos tipos de variación genética: una diversidad neutral, es decir, que no se ve afectada por la selección natural, y una diversidad correspondiente a los caracteres con valor adaptativo. En los caracteres neutrales, las frecuencias de las diferentes variantes son consecuencia de procesos aleatorios o direccionales, como la migración entre poblaciones y la deriva genética, mientras que el mantenimiento de nuevos fenotipos surgidos por mutación depende de su valor selectivo.

Para determinar la cantidad y distribución de la diversidad genética en una especie se requiere el análisis de ambos tipos de variación, pues la acción de distintos procesos evolutivos sobre cada tipo de caracteres hace que los patrones de variación no se correspondan entre sí. La selección no actúa de igual modo en todas las partes del genoma, mientras que las tasas de migración son iguales para todos los genes, por lo que los marcadores neutrales no predicen necesariamente los patrones de variación de los rasgos sujetos a selección diferencial (Karhu *et al.*, 1996).

EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA NEUTRAL

Los marcadores moleculares nos dan una estimación de la diversidad genética neutral. Existen distintos tipos de técnicas, que ofrecen distinto tipo de información según las características de la molécula o fragmento de molécula analizado. Lo más común es detectar diferencias de tamaño; a partir de las frecuencias con que aparecen cada una de las distintas variantes (alelos) se calculan diversos parámetros que nos dan la medida de la diversidad neutral y permiten comparar entre especies y/o estudios. A partir de estos datos también es posible establecer relaciones de paternidad y parentesco, relaciones filogenéticas, o analizar qué procesos están ocurriendo en las poblaciones (migración, deriva genética, cuellos de botella, etc.). Los estudios con marcadores resultan relativamente baratos y, sobre todo, ofrecen resultados rápidamente. De acuerdo a la tecnología utilizada, suelen distinguirse dos grandes grupos de marcadores:

- Basados en el análisis de proteínas (análisis isoenzimático, polimorfismo posicional de péptidos).
- Basados en el análisis del ADN. En esta categoría encontramos dos grandes grupos de marcadores:
 - Los revelados mediante hibridación con sondas marcadas.
 - Los obtenidos mediante amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Además de esta división según el tipo de molécula utilizada y la técnica, los marcadores se caracterizan como haploides o diploides, dependiendo del tipo de genoma de que provengan, y como dominantes (cuando, en el caso de individuos heterocigotos, sólo es posible observar el alelo dominante) o codominantes (cuando pueden distinguirse los dos alelos en heterocigosis).

A continuación se describen brevemente los fundamentos metodológicos de los marcadores moleculares más utilizados en el análisis de variabilidad.

Marcadores proteicos

Los marcadores proteicos son generalmente codominantes, y permiten el análisis a la vez de varios *loci* con bajo coste. Los genotipos resultantes de dichos análisis se pueden procesar como cualquier clase de datos mendelianos codominantes y los resultados obtenidos se pueden utilizar en análisis de poblaciones, relaciones inter- e intrapoblacionales, taxonomía, análisis de parentesco, estudio de ligamientos e identificación de híbridos. Las técnicas más utilizadas son el análisis isoenzimático y la electroforesis en dos dimensiones.

Análisis isoenzimático

Esta técnica se basa en la separación de enzimas con la misma función y que se diferencian en tamaño, carga o conformación.

El extracto proteico se obtiene mediante trituración del tejido elegido, y se lleva a cabo la separación de las isoenzimas mediante un campo eléctrico que produce un desplazamiento de las proteínas en función de su carga. Como soporte donde se produce dicha separación se pueden utilizar geles de poliacrilamida o de almidón, siendo estos últimos los más utilizados. Para visualización de las enzimas se aprovecha su actividad catalítica, provocando una reacción en la que intervienen el sustrato específico y un producto coloreado o fluorescente.

Se trata de una técnica muy popular por su sencillez, bajo coste, rapidez y la gran cantidad de información que puede aportar. Presenta la limitación de unos bajos niveles de polimorfismo, lo que la limita para algunos usos (análisis de parentesco, identificación de material).

Electroforesis bidimensional de proteínas (2D-PAGE)

Esta técnica electroforética se emplea para la separación de proteínas sin actividad enzimática. Combina una primera separación en gel de poliacrilamida en función del punto isoeléctrico de las proteínas, y una segunda, en otra dimensión, en función del tamaño. Las proteínas se revelan mediante tinción con plata, y se comparan los patrones obtenidos para cada muestra.

Es una técnica menos utilizada que el análisis isoenzimático, pues su coste es ligeramente superior y la interpretación de los resultados más complicada.

Marcadores de ADN

Los marcadores de ADN presentan una serie de ventajas frente a los proteicos: no se ven afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado, permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no y en la actualidad se han desarrollado un gran número de técnicas adecuadas a diferentes situaciones.

Los marcadores moleculares tienen diferentes características en cuanto a su tipo de herencia y dominancia; por tanto, la elección de los mismos debe hacerse pensando en la información que se quiere obtener. En ese sentido, al elegir la técnica a utilizar tendremos en cuenta si proporciona un marcador dominante o codominante, si maneja ADN nuclear (generalmente de origen biparental) o ADN mitocondrial de origen monoparental (materno) o ADN de cloroplasto, también de origen monoparental (dependiendo de las especies es paterno o materno). También será necesario tener en cuenta el coste y la dificultad de la técnica, así como la necesidad de información previa sobre la secuencia de ADN, o el uso de radiactividad.

El primer paso es siempre la extracción del ADN a partir del tejido deseado. Las diferentes técnicas difieren en el fragmento o fragmentos que se estudia y en la manera de aislarlo: enzimas de restricción, amplificación selectiva, o una combinación de ambos métodos. La separación de los fragmentos estudiados se realiza mediante electroforesis en gels de agarosa o acrilamida y se visualizan con diferentes técnicas de tinción.

RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

En esta técnica, el ADN obtenido en la extracción es digerido mediante enzimas de restricción (enzimas que cortan el ácido nucleico en determinados puntos); los fragmentos resultantes se separan mediante electroforesis y se visualizan mediante tinción con bromuro de etidio. Posteriormente, se realiza la transferencia del ADN del gel a una membrana (Southern blotting), normalmente de nailon. El paso siguiente es la hibridación con una sonda, es decir, un fragmento de secuencia conocida marcado mediante radiactividad o quimioluminiscencia. La sonda se une a los fragmentos de ADN fijados en la membrana que posean una secuencia complementaria, y estos son revelados a través de una autorradiografía.

Los RFLPs proporcionan marcadores codominantes que se han utilizado en la realización de mapas de ligamiento, estudios de segregación, recombinación, paternidad, etc. Sin embargo, se trata de una técnica costosa y muy laboriosa, que precisa una gran cantidad de ADN y una información previa sobre la secuencia, por lo que está siendo desplazada por los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa.

Técnicas basadas en la PCR (Polymerase Chain Reaction)

Todas las técnicas que se describen a continuación presentan en común la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986), como sistema de amplificación *in vitro* de ADN. La PCR se basa en la copia de fragmentos de un ADN molde por acción de una polimerasa termoestable, y requiere la presencia de oligonucleótidos que actúen como cebadores (*primers*). Los cebadores son fragmentos de ADN de una única hebra cuya secuencia es complementaria de las que enmarca la región que se va a amplificar. La reacción que tiene lugar es cíclica, de modo que las copias obtenidas aumentan de manera exponencial, obteniendo millones de ellas a partir de una cantidad inicial muy pequeña de ADN.

La principal diferencia entre las técnicas basadas en la PCR radica en los cebadores que se empleen, que fundamentalmente pueden ser de tres tipos: específicos (diseñados a partir de una secuencia de ADN conocida previamente y complementarios de la misma); semiespecíficos (complementarios de elementos repetitivos de ADN) y arbitrarios (uno o dos cebadores cortos de secuencia arbitraria, por lo cual no requieren conocimiento previo de la secuencia de ADN).

RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs)

Esta técnica utiliza cebadores arbitrarios, con lo cual se amplifica cualquier región del genoma flanqueada por secuencias complementarias al cebador y de una longitud adecuada. El número de fragmentos obtenidos es independiente de la complejidad del genoma y se distribuyen arbitrariamente en éste.

Los polimorfismos que se observan son debidos a inserciones y deleciones que alteran la secuencia en uno o los dos puntos de homología con el cebador, y se hacen visibles por la presencia o ausencia de una banda. Se trata, por tanto, de marcadores dominantes. Estos marcadores se pueden utilizar en estudios de variabilidad, así como en la construcción de mapas de ligamiento. Las ventajas de esta técnica son el poder manejar cebadores universales, su bajo coste y sencillez. Entre sus inconvenientes se encuentran su carácter dominante y las dudas acerca de su reproducibilidad (Boscherini *et al.*, 1994, Moreno *et al.*, 1997).

Microsatélites nucleares y de cloroplasto (SSRs Simple Sequence Repeats)

Los microsatélites son repeticiones de secuencias simples que aparecen dentro del genoma (p. ej., (TG)_n, (AAT)_n). Los polimorfismos observados corresponden a diferencias

de longitud provocadas por un número distinto de repeticiones. Dependiendo del ADN utilizado como molde en la amplificación, los microsatélites son nucleares (genoma nuclear) o de cloroplasto (genoma de este orgánulo). La amplificación de estos elementos exige un conocimiento previo de la secuencia que flanquea a los microsatélites para poderla utilizar como cebador en la amplificación.

Los microsatélites se corresponden con regiones hipervariables, por lo que presentan un alto grado de polimorfismo. Son marcadores codominantes en el caso de los nucleares, que permiten realizar estudios individuales entre poblaciones, mapas genéticos y estudios filogenéticos. Los de cloroplasto son especialmente interesantes en el estudio de historia de las poblaciones, flujo genético, hibridación e identificación de áreas que guardan una alta diversidad genética.

PCR-RFLP de ADN citoplasmático

Esta técnica combina la amplificación mediante PCR y la digestión con enzimas de restricción. El material de partida es ADN de cloroplasto o mitocondria. Se amplifica mediante el empleo de cebadores específicos. A continuación se procede a la digestión de los mismos mediante distintos enzimas de restricción.

Esta técnica permite detectar inserciones, deleciones y mutaciones puntuales que afecten a los sitios de restricción. Es útil en el estudio de filogenia y genética de poblaciones debido a que tanto el ADN cloroplástico como mitocondrial son haploides. Al igual que los microsatélites, requiere un conocimiento previo de la secuencia, pero el ADN de cloroplasto está muy conservado en tamaño y estructura, lo que ha permitido diseñar cebadores universales (Demesure *et al.*, 1995). El ADN mitocondrial varía mucho más en tamaño y organización, siendo más difícil el diseño de cebadores para regiones no codificantes del genoma; sin embargo, hay intrones y regiones entre genes que presentan secuencias comunes a varias especies (Al-Janabi *et al.*, 1994; Rabbi, y Wilson, 1993) y permiten su utilización.

AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*)

Esta técnica es intermedia entre RFLPs y PCR (Vos *et al.*, 1995). Combina la digestión con enzimas de restricción del ADN génico con una preamplificación y una amplificación selectiva de los fragmentos de restricción. Dichos fragmentos se separan en un gel de secuenciación y pueden ser visualizados mediante autorradiografía o quimioluminiscencia. No necesita información previa sobre la secuencia del ADN.

Se obtienen marcadores dominantes altamente polimórficos. Por tanto, esta técnica se puede utilizar en la elaboración de mapas genéticos, análisis de filogenia, identificación de cultivares, etc. Asimismo permite la caracterización de individuos dentro de una población, por lo que es muy útil en análisis de paternidad y estudios de flujo genético. Al tratarse de marcadores dominantes, como los RAPDs, son menos eficaces en el estudio de genética de poblaciones; sin embargo, esta desventaja puede ser subsanada por el alto número de polimorfismos que se pueden detectar.

En resumen, se pueden indicar las aplicaciones de los marcadores tal como se recoge en la Tabla 1.

TABLA 1
CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES DE LOS MARCADORES
GENÉTICOS (FORREST ET AL. 2000)

Characteristics and applications of genetic markers (after Forrest et al. 2000)

Tipo de marcador	Genética	Aplicación				
		Diver- sidad	Evo- lución	Dif. de Poblaciones	Flujo de Polen	Flujo de Semilla
NUCLEAR						
metabólico	Fenoles	Co-d, Ad	+	+	(+)	
	Terpenos	Co-d, Ad	+	(+)	+	
proteína	Isoenzimas	Co-d, N(/Ad)	+		(+)	
DNA	RAPD	Dom, N	+	(+)	(+)	
	LRND	Co-d, N/Ad	+			
	SSR	Co-d, N	+			
	ITS	Co-d, N	+	+		
	AFLP	Dom, N	+		(+)	
CITOPLASMÁTICO						
mtDNA	RFLP	Maternal, N		+	+	+
cpDNA	RFLP, SSR	Maternal/ Paternal, N	(+)	+	+	+

Abreviaturas: mtDNA - DNA mitocondrial; cpDNA - DNA de cloroplasto;
 RAPD - random amplified polymorphic DNA;
 LRND - low repeat number DNA;
 SSR - simple sequence repeats;
 ITS - internal transcribed spacer of ribosomal DNA;
 AFLP - amplified fragment length polymorphism;
 RFLP - restriction fragment length polymorphism;
 Co-d - co-dominante; Dom - dominante;
 Ad - adaptativo; N - neutral.

EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN ADAPTATIVA

Los ensayos de procedencias-progenies son el método clásico de determinar el grado en que la variación de rasgos con valor selectivo corresponde a una variación genética y cuánto a la influencia del ambiente. La base de los ensayos es observar la respuesta de distintos genotipos creciendo en las mismas condiciones, con lo que se minimiza la influencia ambiental; a la vez, el ensayo se repite en diferentes localidades para determinar la variación de un mismo genotipo en distintos ambientes (interacción genotipo \times ambiente).

Este tipo de ensayos se ha usado mayoritariamente en los programas de mejora de especies con importancia económica, por lo que esta información escasea para muchas especies y se encuentra sesgada hacia caracteres con importancia productiva (crecimiento, resistencia a plagas y enfermedades, características de la madera). Los ensayos de procedencia se suelen establecer para evaluar fuentes de semilla comercial o para obtener material selec-

to, mientras que los ensayos de progenies proporcionan información para seleccionar la siguiente generación de mejora y para obtener estimaciones de parámetros genéticos como la heredabilidad o los coeficientes de variación genética aditiva (González y Alía, 1999).

Para obtener el máximo de información de un ensayo, es importante que el diseño sea el más adecuado. Un buen diseño tiene que considerar los siguientes aspectos (González y Alía, 1999):

- Unidades experimentales: pueden estar constituidas por un solo árbol o por varios de la misma procedencia/progenie. Esta última opción facilita la realización de aclareos para evitar la excesiva competencia en ensayos de larga duración, sin alterar el diseño.
- Debe incluir una muestra aleatoria del material a ensayar, así como situar las unidades experimentales en el diseño mediante un procedimiento aleatorio para evitar errores sistemáticos.
- Para controlar la variación debido a la heterogeneidad ambiental del sitio de ensayo se establecen varias repeticiones dentro de la parcela. Esto permite conocer también la magnitud del error cometido en las estimaciones.

La elección del diseño depende de las variables que se vayan a estudiar, del material vegetal, del número de repeticiones, características de la parcela, etc. Los más comúnmente utilizados son:

- Bloques completos al azar. En cada bloque se representan aleatoriamente cada una de las unidades experimentales. Es fácil de instalar, diseñar y analizar, pero su eficacia disminuye cuando hay muchas unidades a comparar. Resultan adecuados cuando sólo hay un gradiente ambiental en la parcela.
- Bloques incompletos. Cada bloque incluye sólo una parte de las unidades. Pueden ser equilibrados (cada par de unidades está el mismo número de veces en el mismo bloque) y conectados (las unidades están siempre representadas con todas las demás en alguno de los bloques). Los bloques son más pequeños que en el caso anterior, pero el análisis de los datos puede presentar más dificultades.
- Diseño en parcelas divididas. Cada bloque o nivel de estratificación se asocia a distintos factores o tratamientos. El diseño es sencillo si hay pocos factores, pero el análisis es más complicado.
- Diseños factoriales: combinan los ensayos de progenie o procedencias con otro factor. En cada bloque se representan aleatoriamente cada una de las unidades. Presentan gran facilidad de instalación, diseño y análisis, pero son poco eficaces si hay muchas unidades experimentales.
- Diseños en filas y columnas: Su característica esencial es que se impone una estructura de bloques en dos direcciones, permitiendo un ajuste de las tendencias de variación en filas, columnas, o ambas direcciones.

A través de técnicas estadísticas relacionadas con el análisis de varianza, la variación existente en un ensayo se divide en sus componentes genético y ambiental y, en ocasiones, la interacción entre ellos. Se puede determinar así si las diferencias entre procedencias o familias se deben a un efecto genético y la magnitud de esta diferenciación. Por otro lado, los componentes de la varianza permiten estimar parámetros como la heredabilidad o los coeficientes de variación genética aditiva. Una heredabilidad alta indica que gran parte de la variación observada en un determinado carácter es de origen genético.

La duración de los ensayos ha impulsado la búsqueda de parámetros que permitan predecir a partir de las etapas juveniles el comportamiento del material adulto. Sin embargo, normalmente las correlaciones juvenil-adulto no suelen ser satisfactorias, especialmente para el crecimiento, por lo que se debe ser prudente a la hora de obtener estas estimaciones precoces.

UTILIDAD PARA LA CONSERVACIÓN

Los estudios de variabilidad genética han constituido, en los últimos años, una herramienta, no sólo de interés académico, sino también de aplicación práctica en el mundo forestal. La Estrategia Forestal Española (Ministerio de Medio Ambiente, 2000) recoge la importancia de este conocimiento, estableciendo entre los objetivos básicos de la Red de Mejora y Conservación de los Recursos Genéticos Forestales «la elaboración de estudios de la diversidad genética de las principales especies forestales en relación con su uso en reforestación y como indicador de la diversidad de los sistemas forestales».

Pero, además, la diversidad genética constituye un componente de la biodiversidad (Moritz y Faith, 1998), y como tal debe contemplarse su conservación y mantenimiento. La Estrategia Española para la conservación y el uso sostenible de la Diversidad Biológica contempla la finalidad del Convenio sobre Biodiversidad (Río de Janeiro, 1992): «el conocimiento y la conservación de la biodiversidad en su conjunto, es decir, de la variedad de la vida en sus formas genética, de especies y de comunidades...» (Ministerio de Medio Ambiente, 1999).

La tendencia actual es considerar como objetivo de los programas de conservación el mantenimiento del potencial adaptativo de la especie, protegiendo los procesos ecológicos y evolutivos que han actuado hasta el momento (Eriksson *et al.*, 1993; Moritz, 1999). Los datos moleculares constituyen una aproximación adecuada para determinar los procesos que configuran la estructura genética de una especie, ya que proporcionan información tanto sobre la distribución actual de la diversidad genética neutral y los procesos que actúan sobre ella (flujo genético, deriva, endogamia), como sobre la historia de la población, en particular sobre los patrones geográficos y la importancia del aislamiento histórico (Moritz, 1999). Los datos genéticos permiten el estudio de las tendencias a largo plazo, a diferencia de los parámetros demográficos que señalan la evolución a corto plazo. De este modo, es posible comparar las tendencias actuales con las históricas y comprobar si se están produciendo desviaciones que puedan comprometer la supervivencia de la población o la especie.

A nivel práctico, los marcadores moleculares tienen diversas aplicaciones en el campo de la conservación (Glaubitz y Moran, 2000):

- medida de la diversidad genética y la diferenciación
- estimación de las tasas de flujo genético o migración
- caracterización del sistema de reproducción (*mating system*)
- análisis de paternidad y parentesco
- determinación de la eficiencia de los huertos semilleros
- identificación de clones y material forestal de reproducción

- estudios de filogenia y taxonomía
- mapas de ligamiento genético, análisis de genes que controlen rasgos cuantitativos (QTLs), selección asistida por marcadores.

Además, el conocimiento de la estructuración de la diversidad a lo largo del área de la especie es fundamental a la hora de diseñar el muestreo más adecuado. Los programas de conservación deben incluir tanto los recursos representativos como los únicos y singulares, para lo cual es necesario conocer el grado de variabilidad y cómo se reparte en las distintas poblaciones. La simulación llevada a cabo por Bataillon *et al.* (1996) señala cómo un muestreo encaminado a recoger la máxima riqueza alélica en genes neutrales, combinado con la inclusión de muestras representativas de las distintas condiciones ambientales, conlleva también el máximo mantenimiento de la riqueza en caracteres no neutrales. Por tanto, la información obtenida a partir de marcadores moleculares es útil no sólo para recoger la variabilidad neutral.

Los marcadores moleculares también se han tratado de emplear como bioindicadores, es decir, como parámetros que permitan medir la respuesta de las poblaciones frente a los impactos ambientales (Müller-Starck y Schubert, 2000). Esto se basa en los cambios genéticos que ocurren asociados a la presión selectiva originada por los nuevos factores de estrés. Sin embargo, esta utilidad se ve limitada por cuestiones como el modo en que fuerzas selectivas alteran los patrones de moléculas que mayoritariamente no están sujetos a selección. Los marcadores que hasta el momento se han usado como bioindicadores se limitan a algunos alelos enzimáticos y a algunos genes identificados en la síntesis de proteínas o enzimas influidas por condiciones ambientales (Geburek, 2000; Müller-Starck y Schubert, 2000).

No sólo es necesario disponer del conocimiento sobre la variación neutral de cara a los programas de conservación. En ocasiones, la conservación requiere actuaciones de restauración, con introducción de nuevos individuos. En estos casos suele recomendarse el empleo de semilla local como garantía de adaptación a las condiciones del medio, pero debería disponerse de información sobre el grado de variación de la especie. Los estudios de variación adaptativa revelan si se trata de una especie homogénea o si las distintas poblaciones están muy diferenciadas respecto a su adaptación al hábitat. Por tanto, proporcionan información sobre el comportamiento fuera de la estación y las posibilidades de traslado (Boshier y Young, 2000).

Los ensayos de procedencia/progenies dan información acerca de los patrones de variación genética cuantitativa y la extensión de la interacción genotipo-ambiente, es decir, sobre la variación en respuesta a la heterogeneidad del hábitat. Una posible limitación de estos estudios es que a menudo los caracteres que se contemplan son rasgos con importancia de cara a la producción, en lugar de aspectos relacionados con la supervivencia.

Por último, hay que señalar la necesidad de integrar toda la información genética de que se disponga con la ecológica, selvícola y sociológica, para obtener una visión de los verdaderos riesgos de desaparición o declive de la especie considerada, así como de las medidas en que han de basarse los programas de conservación. Los capítulos del presente monográfico dedicados a los distintos grupos de especies son ejemplos de cómo la información existente proporciona las pautas para definir las estrategias más adecuadas.

SUMMARY

Evaluation of genetic diversity and its use in conservation programmes

Intraspecific variation is the requirement for evolution and adaptation of a species to new conditions, since it offers the possibility of different responses to selective forces. The quantification of variability is then highly desirable. For assessing variability, several approaches have been used. Phenotypic characters are easily recordable, but show a strong environmental influence and their genetic control is unclear. Molecular markers allow the direct study of genetic material variation but usually traits without phenotypic value are recorded.

Two types of variation can be distinguished: Neutral variability, those traits not influenced by selective forces, and adaptive variation, features with selective value. Neutral genetic diversity is estimated mainly by molecular markers. In the last years several techniques have been developed to study both proteins (products of genes) or DNA (hereditary material). A review of the most commonly used techniques is offered, as well as their main applications.

The classic method for the study of adaptive variation are provenance/progeny trials, in which levels of variation and the amount corresponding to genetic variability are analyzed. The basis is to test different genotypes in the same site, in order to minimize the environmental variation.

The knowledge of diversity is a prerequisite in any conservation program. It is a component of biodiversity that must be preserved, but, also, it is a useful tool for many aspects, specially for determining what processes are involved in the genetic structure of the target species.

KEY WORDS: Diversity
Genetic markers
Adaptive traits
Genetic conservation

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-JANABI S.M., MCCLELLAND M., PETERSEN C., SOBRAL B.W.S., 1994. Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the Andropogoneae: Saccharinae. *Theor Appl Genet* 88, 933-944.
- BATAILLON T.M., DAVID J.L., SCHOEN D.J., 1996. Neutral genetic markers and conservation genetics: simulated germplasm collections. *Genetics*, 144, 409-417.
- BOSCHERINI G., MORGANTE M., ROSSI P., VENDRAMIN G.G., VICARIO F., 1994. Detection of DNA polymorphisms in *Pinus leucodermis* Ant. using random amplification. *Forest Genetics* 1 (3), 131-137.
- BOSHIER D.H., YOUNG A.G., 2000. Forest conservation genetics: limitations and future directions. En: YOUNG A., BOSHIER D., BOYLE T. (eds.). *Forest conservation genetics: principles and practice*. CSIRO-CABI, 289-297.
- DEMASURE B., SODZI N., PETIT R.J., 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol* 4, 129-131.
- ERIKSSON G., NAMKOONG G., ROBERDS J.H., 1993. Dynamic gene conservation for uncertain futures. *For. Ecol. Man.* 62, 15-37.
- GEBUREK T., 2000. Effects of environmental pollution on the genetics of forest trees. En: YOUNG A., BOSHIER D., BOYLE T. (eds.). *Forest conservation genetics: principles and practice*. CSIRO-CABI, pp. 135-157.
- GLAUBITZ J.C., MORAN G.F., 2000. Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. En: YOUNG A., BOSHIER D., BOYLE T. (eds.). *Forest conservation genetics: principles and practice*. CSIRO-CABI, pp. 39-59.
- GONZÁLEZ S.C., ALÍA R., 1999. Ensayos del material de reproducción. Consideraciones generales para su establecimiento y análisis. Curso sobre materiales forestales de reproducción. CENEAM, Valsain, 6-9 septiembre 1999. DGCONA-Ministerio de Medio Ambiente (inédito).
- KARHU A., HURME P., KARJALAINEN M., KARVONEN P., KÄRKKÄINEN K., NEALE D., SAVOLAINEN O., 1996. Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theor. Appl. Genet.* 93, 215-221.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, 1999. Estrategia Española para la Conservación y el Uso Sostenible de la Diversidad Biológica. Secretaría General de Medio Ambiente. Dirección General de Conservación de la Naturaleza.

- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, 2000. Estrategia Forestal Española. Secretaría General de Medio Ambiente. Dirección General de Conservación de la Naturaleza.
- MORENO S., GORGONCENA Y., ORTIZ J.M., 1997. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae* (Netherlands) 62 (4), 237-243.
- MORITZ C., 1999. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas*. 130, 217-228.
- MORITZ C., FAITH D.P., 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol. Ecol.* 7, 419-429.
- MÜLLER-STARCK G., SCHUBERT R., 2000. Genetic markers as a tool for bioindication in forest ecosystem. En: YOUNG A., BOSHIER D., BOYLE T. (eds.). *Forest conservation genetics: principles and practice*. CSIRO-CABI, 227-237.
- MULLIS K.B., FALOONA F.A., SCHARF S., SAIKI R., HORNO G., ERLICH H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51, 263-273.
- RABBI M.F., WILSON K.G., 1993. The mitochondrial *coxII* intron has been lost in two different lineages of dicots and altered in others. *Amer. J. Bot.* 80, 1216-1223.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., MORNES M., FRITJES A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.