



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a  
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

**Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022**

**ISBN 978-84-941695-6-4**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

---

Organiza



## Diversidad genética y poblacional del aliso en España

MARTÍN CUEVAS, A.<sup>1</sup>, MORENO PINEL, R.<sup>1</sup>, PÉREZ CALLE, M.D.<sup>1</sup>, SOLLA HACH, A.<sup>2</sup>, CUENCA VALERA, B.<sup>3</sup>, y PÉREZ MARTÍN, F.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética. ETSIAM. Universidad de Córdoba. (angela.martin@uco.es)

<sup>2</sup> Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Institute for Dehesa Research (INDEHESA), Universidad de Extremadura, Av. Virgen del Puerto 2, 10600 - Plasencia, Cáceres, España (asolla@unex.es).

<sup>3</sup> Grupo TRAGSA. Vivero de Maceda. Ctra. Maceda-Baldrei, Km 2. 32700. Macea, Ourense (bcuenca@tragsa.es).

<sup>4</sup> Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (FPerez@miteco.es).

### Resumen

Debido al decaimiento de las alisedas en los márgenes de los ríos producida en gran medida por el complejo *Phytophthora xalni*, la Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico creó en 2020 un grupo de trabajo para abordar el problema. Se planteó la necesidad de iniciar un programa de mejora genética para disponer de materiales de reproducción de *Alnus lusitanica* y *A. glutinosa* tolerantes a la enfermedad, para lo que era fundamental conocer antes su diversidad genética y poblacional en España. Se han muestreado 627 individuos de 22 poblaciones en 10 cuencas hidrográficas, realizándose una primera evaluación del estado sanitario. El nivel ploídico se ha analizado mediante citometría de flujo y la diversidad genética con 10 marcadores microsatélites. Únicamente las poblaciones localizadas en el País Vasco y Cataluña fueron diploides, correspondiendo a *A. glutinosa*, mientras que el resto fueron tetraploides de la especie *A. lusitanica*. El análisis molecular corroboró el nivel ploídico de las poblaciones analizadas y mostró una elevada diversidad genética con 129 alelos para los 10 loci y una marcada estructura poblacional. Se han encontrado alelos exclusivos de las poblaciones de *A. glutinosa* y de *A. lusitanica*.

### Palabras clave

Biodiversidad forestal, variabilidad poblacional, mejora genética, genética de poblaciones, decaimiento.

### 1. Introducción

Los bosques de ribera constituyen enclaves de extraordinaria relevancia desde el punto de vista de la conservación de la biodiversidad y de la estructura del paisaje, llegando en algunos casos a actuar como corredores naturales de especies forestales (FISCHER et al., 2000). *Alnus glutinosa* (L.) es la especie de ribera de mayor distribución geográfica, presente de forma natural en casi toda Europa, Asia y el norte de África. Es una betulácea que juega un papel crucial en la salud de los ecosistemas riparios, capaz de colonizar suelos rocosos y carentes de materia orgánica, gracias a su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico (CEBALLOS Y RUIZ DE LA TORRE, 1979). La degradación de las alisedas viene motivada, entre otros factores, por la fragmentación de sus poblaciones, la alteración de los cauces de los ríos, la lluvia ácida y las sequías periódicas. A esto hay que añadir que en la última década se ha producido un decaimiento severo de la especie atribuido al complejo *Phytophthora xalni* (FERREIRA et al., 2022). Los síntomas son el amarillamiento de las hojas, muerte regresiva de las ramas y necrosis de la corteza en el cuello y parte inferior del tallo (JUNG et al., 2003). Esta enfermedad se ha extendido rápidamente por toda Europa y en España se ha traducido en una excesiva mortalidad de individuos en muchos ríos del norte de la península (GIBBS et al., 2003; PINTOS et al., 2010; SOLLA et al., 2010).

La Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO), consciente de esta amenaza que pone en peligro la estabilidad de los ecosistemas riparios, crea en 2020 un grupo de trabajo en el que están representados, tanto la propia Dirección General como coordinador del mismo a través de la Subdirección General de Política Forestal y Lucha contra la Desertificación, como otras administraciones y organismos de investigación y universidades que llevan estudiando este problema en los últimos años.

*Alnus glutinosa* ha sido descrita generalmente como diploide ( $2n=2x=28$ ) (FEDEROV, 1969), aunque estudios recientes han revelado la existencia de diferentes citotipos dentro del complejo de la especie. En concreto se han descrito poblaciones tetraploidies en Marruecos (Lepais et al. 2013), Portugal (MARQUES-GOMES et al., 2022) y en los Balcanes (MANDÀK et al., 2016). Los resultados de estos trabajos han mostrado importantes diferencias entre las poblaciones de la Península Ibérica y Marruecos frente a las del resto de Europa, asociadas a la diferente adaptación de las poblaciones a las condiciones climáticas, lo que ha derivado en la asignación de las poblaciones tetraploidies a una nueva especie, *Alnus lusitanica* (MANDÀK et al., 2016; VÍT et al., 2017).

Cualquier estrategia para la conservación de las poblaciones más importantes de aliso en España debe partir de la evaluación de su diversidad genética, así como del establecimiento de su estructura poblacional. En este sentido, aunque estudios previos sobre la especie en Europa han incluido algunas poblaciones procedentes del noreste de España, no existe información sobre la especie en el resto de su área de distribución. En concreto, VÍT et al., (2017) establecen como prioridad ampliar los estudios de la especie en España con el fin de definir la distribución real de *A. glutinosa* y *A. lusitanica* y entender su estructura genética.

## 2. Objetivos

El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de la diversidad genética y poblacional de las especies de aliso (*A. glutinosa* y *A. lusitanica*) a lo largo de su área de distribución en España con objeto de mejorar la estrategia de manejo de la variabilidad intraespecífica en un futuro programa de mejora genética frente a *Phytophthora xalni*.

## 3. Metodología

Se han evaluado 627 individuos pertenecientes a 22 poblaciones representativas de las 10 principales cuencas hidrográficas donde se distribuye la especie (Figura 1). En la mayoría de las poblaciones se seleccionaron 30 individuos y de cada árbol se muestraron 6-8 hojas para la posterior extracción de ADN. Adicionalmente, para la identificación de la especie por citometría de flujo, se analizaron brotes jóvenes de tres árboles procedentes de cada población (3 brotes x 22 poblaciones = 66 muestras).

El nivel ploídico de las poblaciones se evaluó mediante la técnica de la citometría de flujo (Ploidy Analyser PA-I; Partec GmbH, Münster, Germany) con un protocolo de extracción y tinción de núcleos usado en el género *Rubus* (MENG & FINN, 2002) que mostró histogramas de fluorescencia relativa adecuados para la estima de los niveles ploídicos de aliso. La búsqueda de la muestra de referencia de aliso se realizó empleando tejido fresco de dos poblaciones, una ubicada en el margen del río Jerte (Plasencia, Extremadura) y otra ubicada en Roma (centro de Italia) de la que se tenía conocimiento de su naturaleza diploide. En la población de Plasencia se recogió semilla de varios individuos con el doble objetivo de: i) disponer de material vegetal fresco para la puesta a punto de marcadores moleculares, y ii) obtener raicillas para realizar un conteo cromosómico que permitiera confirmar el nivel ploídico de la población y su posible uso como referencia en los análisis de citometría de flujo.

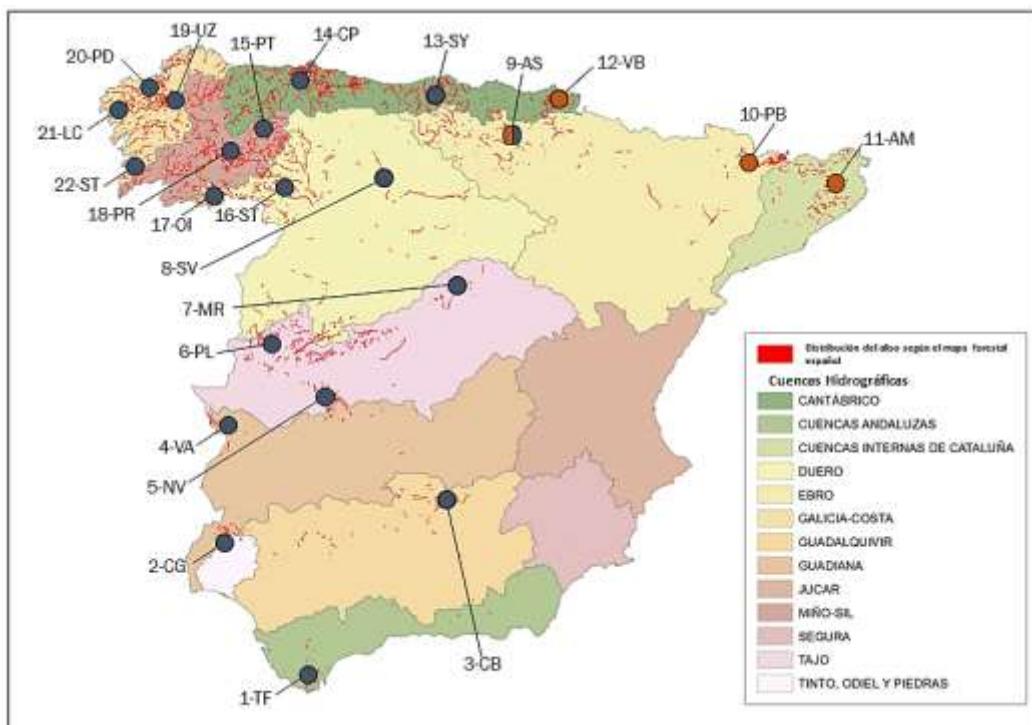


Figura 1. Poblaciones de aliso analizadas en el estudio. Los círculos naranjas corresponden a las poblaciones diploides de *Alnus glutinosa* y los grises a las poblaciones tetraploides de *Alnus lusitanica*.

El genotipado de las poblaciones se ha llevado a cabo con el empleo de marcadores moleculares de tipo microsatélite. La extracción de ADN se realizó sobre 20 mg de tejido foliar liofilizado con el kit DNeasy Plant Mini de Qiagen según las instrucciones del fabricante. Para la amplificación se han seleccionado 10 marcadores microsatélites (AG01, AG05, AG09, AG10, AG13, AG23, AG25, AG27, AG30, AG35) desarrollados en *Alnus* spp. (LEPAIS & BACLES, 2011) (Tabla 1). Estos marcadores se han elegido por su alto grado de polimorfismo y poder de discriminación descritos en poblaciones europeas de la especie (LEPAIS et al., 2013; MANDÁK et al., 2016). Las PCRs se realizaron bajo las condiciones descritas por el protocolo de Multiplex Type-it de Qiagen y se analizaron con un secuenciador ABI-PRISM 3100. Los alelos se definieron en función de su tamaño en pares de bases comparándolos con un tamaño estándar (LIZ-500).

A partir de los resultados obtenidos con los marcadores microsatélites, se creó una matriz binaria en la que los alelos de cada marcador se transformaron en 1 (presencia) y 0 (ausencia). El valor del PIC (*polymorphic information content*) de cada marcador se calculó mediante la fórmula  $PIC = 1 - \sum p_j^2$ , donde  $p_j$  es la frecuencia de cada alelo  $j$  en las plantas analizadas. Este coeficiente mide el polimorfismo o capacidad de discriminación de cada marcador en el conjunto de individuos evaluados, con valores comprendidos entre 0 y 1, indicando mayor información cuanto más cercano a 1 sea el valor de PIC.

Para analizar la diferenciación genética de las poblaciones se ha realizado un análisis de coordenadas principales (PCoA) empleando para ello el programa GENALEX 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). Este tipo de análisis se ha descrito como una herramienta útil en estudios en los que se han utilizado poblaciones con diferentes niveles ploidicos (KLODA et al., 2008).

#### 4. Resultados

El conteo cromosómico indicó que la población control de Plasencia presentaba un total de 56 cromosomas, indicando su nivel tetraploide ( $2n=4x=56$ ). Estos resultados fueron confirmados mediante citometría de flujo. En el caso de la población de Roma, los resultados de citometría indicaron que la población era diploide y, por tanto, las plantas analizadas podrían pertenecer a la especie *A. glutinosa*.

De las 22 poblaciones analizadas, 18 mostraron valores de citometría similares a la referencia tetraploide (población de Plasencia), por lo que podrían pertenecer a la especie *A. lusitanica*. Estas 18 poblaciones están distribuidas ampliamente en España en distintas Comunidades: Galicia, Asturias, Castilla y León, Castilla-La Mancha, Extremadura y Andalucía (01-TF, 02-CG, 03-CB, 04-VA, 05-NV, 06-PL, 07-MR, 08-SV, 13-SY, 14-CP y 15-PT, 16-ST, 17-OI, 18-PR, 19-UZ, 20-PD, 21-LC y 22-ST). Por el contrario, otras tres poblaciones (10-PB, 11-AM, y 12-VB) mostraron valores de citometría correspondientes a plantas diploides, por lo que podrían pertenecer a la especie *A. glutinosa*. Finalmente, solo una población localizada en el límite entre La Rioja y Álava (09-AS) ha mostrado los dos niveles ploidícos (2x, 4x) en los individuos muestreados (Figura 2; Tabla 2).

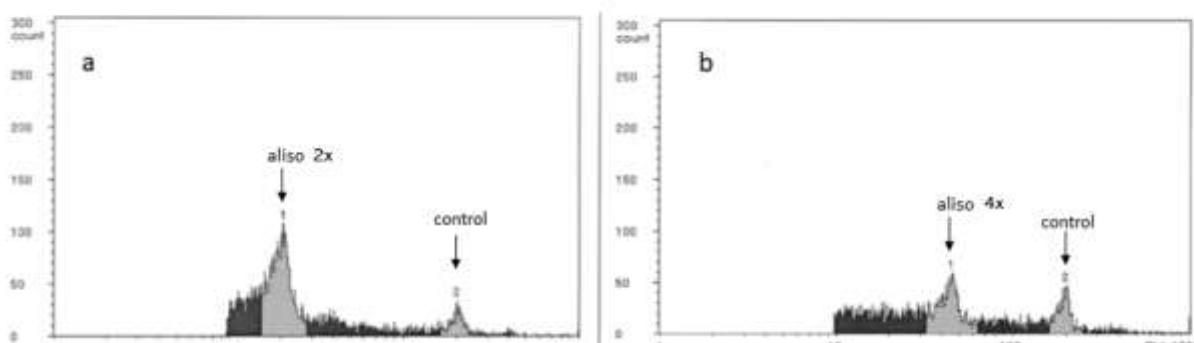


Figura 2. Histogramas de fluorescencia relativa en aliso. a) Muestra diploide de un ejemplar de *Alnus glutinosa*. b) Muestra de un ejemplar de *Alnus lusitanica* procedente de la ribera del río Jerte, Plasencia. En ambos casos se incluye como control una planta de espárrago octoploido ( $2n=8x=80$ ).

El genotipado de las 22 poblaciones ha confirmado los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, corroborando la existencia de poblaciones diploides y tetraploides. En lo que respecta a la caracterización molecular, se han encontrado 129 alelos, lo que supone un valor medio de 12,9 alelos por locus en el conjunto de las poblaciones. Analizando a nivel de marcador, los loci AG01 y AG13 presentaron el mayor número de alelos, mientras que el menor número se detectó en AG23 y AG10. En relación al contenido de información polimórfica de cada marcador (PIC), los loci AG35 y AG13 mostraron un mayor valor de discriminación, mientras que nuevamente AG23 y AG10 fueron los menos discriminantes (Tabla 1). Sin embargo, aunque estos dos marcadores fueran poco informativos se ha detectado que incluyen alelos exclusivos para las poblaciones diploides, lo que resulta de gran interés para el análisis de la diversidad.

Al analizar los marcadores de forma independiente en poblaciones diploides y tetraploides se encontraron 89 y 124 alelos, respectivamente. Los loci AG35 y AG05 fueron los más discriminantes en el caso de las poblaciones diploides, mientras que AG01, AG13 y AG35 lo fueron en las tetraploides. Se detectaron cinco alelos presentes sólo en las poblaciones diploides, catalogados como exclusivos de la especie *A. glutinosa*, así como otros 40 en las poblaciones tetraploides, clasificados como exclusivos de *A. lusitanica*. Además, se han encontrado 11 alelos exclusivos en el conjunto de las 22 poblaciones que han estado presentes en una sola población (Tabla 2).

Tabla 1. Diversidad genética encontrada en los 10 loci estudiados.

Locus	Na	PIC	Pa	Tamaño (bp)	Fluorocromo
AG01	20	0,816	2	126-168	Pet
AG05	16	0,815	1	141-173	6-Fam
AG09	12	0,811	1	240-262	Ned
AG10	8	0,627	1	205-232	6-Fam
AG13	18	0,871	2	251-286	6-Fam
AG23	5	0,553	1	354-362	Pet
AG25	12	0,779	2	91-114	Ned
AG27	12	0,633	1	92-123	Vic
AG30	9	0,831	0	97-113	6-Fam
AG35	17	0,917	0	173-204	Vic
<b>Total</b>	<b>129</b>	<b>0,765</b>	<b>11</b>		

Na, número de alelos; PIC, contenido de información polimórfica; Pa, número de alelos exclusivos.

Por poblaciones, Paderne (20-PD, Galicia) mostró el mayor número medio de alelos por locus, seguida de las poblaciones de Las Campas (14-CP, Asturias) y Oimbra (17-OI, Galicia) (Tabla 2). La población menos variable fue Puebla de Segur (10-PB, Cataluña), seguida de Amer (11-AM, Cataluña) y Primout (15-PT, Castilla y León). Separando las poblaciones por nivel ploídico, dentro de las tetraploidies Paderne continuó siendo la más diversa frente a Primout, que fue la menos diversa. En el caso de las poblaciones diploides, Villabona (12-VB, País Vasco) fue la que mostró mayor número de alelos por locus frente a Puebla de Segur, que fue la menos variable. En relación a la diferenciación genética entre poblaciones obtenida del análisis de coordenadas principales se observaron diferencias claras entre las poblaciones tetraploidies y diploides, pudiéndose considerar como dos grupos diferentes en el conjunto de poblaciones analizadas (Figura 3). Además, dentro del grupo de poblaciones tetraploidies se observaron diferencias en el patrón de variación genética, que en parte corresponden con la distribución geográfica de las poblaciones.

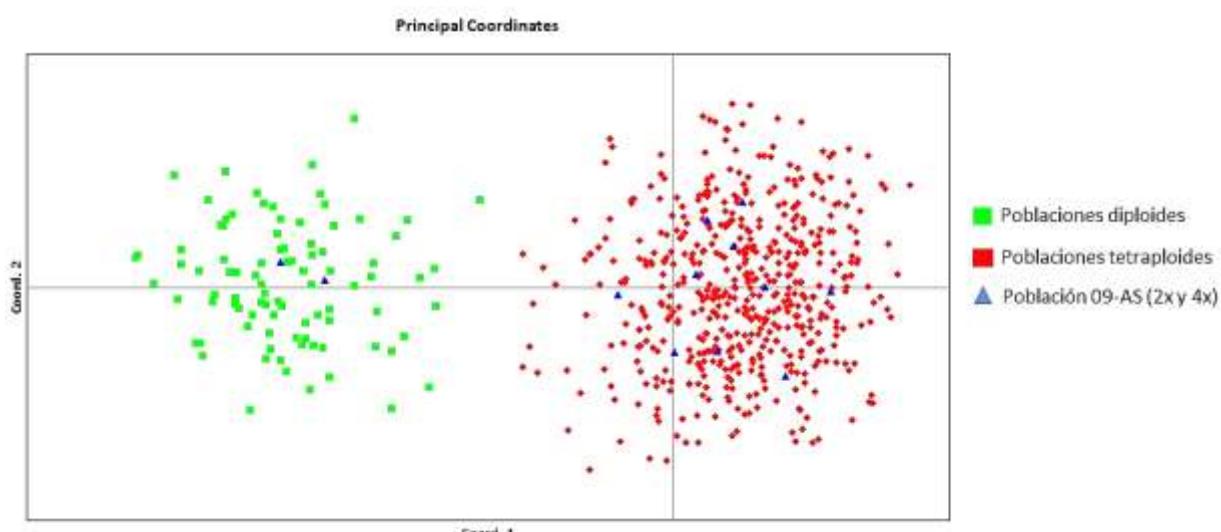


Figura 3. Análisis de coordenadas principales basado en los datos obtenidos con los 10 marcadores microsatélites y las 22 poblaciones de aliso estudiadas. El primer eje explica el 35% de la variación y el segundo eje el 14,5%. Poblaciones diploides marcadas en verde y agrupadas en la parte izquierda del gráfico; poblaciones tetraploidies marcadas en rojo y agrupadas en la parte derecha del gráfico. Los triángulos azules corresponden a la población de Assa (09-AS), en la que dos individuos se agrupan con las poblaciones diploides y diez individuos se agrupan con las poblaciones tetraploidies.

En base a los resultados obtenidos se pueden establecer tres *pools* de variación genética. El primer grupo incluye tres poblaciones procedentes de Galicia (17-OI, 18-PR y 22-ST), del que destaca la población 17-OI por su elevada diversidad genética. El segundo grupo incluye la población de Tarifa (01-TF), que representa el límite sur de distribución de la especie en la Península Ibérica. El último grupo incluye el resto de poblaciones tetraploides y la población de Assa (09-AS), en la que se han identificado individuos de ambos niveles ploidicos.

*Tabla 2. Número medio de alelos por locus, alelos exclusivos y nivel ploidico detectado en las 22 poblaciones de aliso evaluadas en este estudio.*

Población	Localidad	Na	Pa	Nivel Ploidico
1	Tarifa (TF)	7,0	1	4x
2	Cortegana (CG)	7,2	0	4x
3	Charco del Batán (CB)	7,9	1	4x
4	Valencia de Alcántara (VA)	7,0	0	4x
5	Navalvillar de Ibor (NV)	7,7	0	4x
6	Plasencia (PL)	8,2	2	4x
7	Muriel (MR)	7,0	1	4x
8	Sta. Olaja de la Vega (SV)	7,0	0	4x
9	Assa (AS)	7,5	0	2x/4x
10	Puebla de Segur (PB)	6,4	1	2x
11	Amer (AM)	6,6	2	2x
12	Villabona (VB)	7,5	0	2x
13	Sta. M <sup>a</sup> de Cayón (SY)	8,4	1	4x
14	Las Campas (CP)	8,6	0	4x
15	Primout (PT)	6,6	0	4x
16	Sta. Marta de Tera (ST)	8,2	0	4x
17	Oimbra (OI)	8,6	2	4x
18	Penasrrubias (PR)	7,0	0	4x
19	Uriz (UZ)	8,2	0	4x
20	Paderne (PD)	8,8	0	4x
21	La Colina (LC)	8,2	0	4x
22	Soutomaior (ST)	7,8	0	4x

Na, número medio de alelos; Pa, número de alelos exclusivos.

## 5. Discusión

Este trabajo supone un análisis exhaustivo de las poblaciones de aliso en España en relación a su nivel de ploidía y estructura genética, tanto por lo extenso del área cubierta en el muestreo como por el número de genotipos evaluados. Además, el análisis combinado de la variación del nivel ploidico y de los marcadores microsatélites ha permitido establecer la distribución de la diversidad genética de la especie. De este modo, los resultados obtenidos aportan una información muy relevante que hasta el momento no estaba disponible sobre la distribución de *Alnus* spp. en Europa (MANDÁK et al., 2016).

En total, 18 de las 22 poblaciones han resultado tetraploides, correspondientes a la especie *A. lusitanica* y con una clara distribución geográfica desde el noroeste hasta el sur de la Península Ibérica. Sólo tres poblaciones localizadas en el noreste (Cataluña y País Vasco) han sido diploides y por tanto pertenecientes a *A. glutinosa*. Estos resultados concuerdan con los mostrados por otros autores con poblaciones de toda Europa en los que describen la presencia de poblaciones tetraploides de *A. lusitanica* en la Península Ibérica (MANDÁK et al., 2016; VÍT et al., 2017; MARQUES-GOMES et al., 2022). También existe constancia de la presencia de poblaciones tetraploides en el Norte de África, cuyo origen se especula sea debido a la hibridación entre poblaciones muy distantes de *A. glutinosa* y a su posterior poliploidización en las localizaciones más extremas de su distribución (LEPAIS et al., 2013). Los valores de diversidad genética encontrada en las poblaciones han sido elevados y similares a los descritos en lotes de semillas de la especie en España (RUEDA et al., 2017) o a los reportados en poblaciones de Marruecos (LEPAIS et al. 2013). Estos valores han sido superiores a los encontrados en *A. glutinosa* en el centro y norte de Europa (BEATTY et al., 2015; MINGEOT et al., 2016). Es importante señalar que esta mayor diversidad podría deberse al carácter tetraploide de las poblaciones (RAUSCH & MORGAN, 2005; HOF et al., 2011). Además, separando las poblaciones por su nivel ploídico, se ha encontrado que las poblaciones tetraploides del estudio han mostrado valores similares de diversidad, mientras que las diploides han sido más variables en cuanto a diversidad.

Por último, es importante prestar atención a la población mixta localizada en el límite entre Álava y La Rioja, en la que conviven individuos diploides y tetraploides. Aunque no es común encontrar zonas de contacto con diferentes citotipos, también han sido descritas en el norte de Europa (KOLÁŘ et al., 2009; CASTRO et al., 2012). En algunos casos se ha indicado que estas zonas de contacto podrían ser el resultado de la expansión de nuevos poliploides formados a partir de poblaciones diploides (PETIT et al., 2002), aunque en el caso del aliso en Europa la hipótesis más aceptada es que la aparición de diferentes citotipos sea debida al efecto de las últimas glaciaciones (MANDÁK et al., 2016). En *Alnus* sp., además de los citotipos comunes (diploides y tetraploides), se ha descrito la presencia de individuos triploides en el límite entre poblaciones diploides y tetraploides en el norte de Europa, aunque en un número muy reducido.

## 6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto que las alisedas en España son un importante reservorio de diversidad genética. Además, se ha constatado la presencia de las especies *A. lusitanica* y *A. glutinosa*, siendo la primera representativa del noroeste, centro y sur de la Península Ibérica. También se ha detectado una zona de contacto entre individuos diploides y tetraploides lo que sugiere la ampliación de los estudios en la zona con el fin de determinar el origen de la misma, así como comprobar si existen individuos triploides fruto de hibridaciones entre individuos de diferentes niveles ploídicos. Este dato resulta crucial a la hora de la selección de poblaciones para el programa de mejora de la especie ya que los individuos triploides suelen ser altamente infériles.

## 7. Agradecimientos

El estudio ha sido financiado por el MITECO a través del Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014 – 2020, dentro de la submedida 15.2, de apoyo al fomento y la conservación de los recursos genéticos forestales, que dispone de una cofinanciación de fondos FEADER al 75%.

## 8. Bibliografía

BEATTY, G.E.; MONTGOMERY, W.I.; TOSH, D.G.; PROVAN, J.; 2015. Genetic provenance and best practice woodland management: a case study in native alder (*Alnus glutinosa*). *Tree Genet Genom* 11, 1-7.

CASTRO, S.; LOUREIRO, J.; PROCHÁZKA, T.; MÜNZBERGOVÁ, Z.; 2012. Cytotype distribution at a diploid–hexaploid contact zone in *Aster amellus* (Asteraceae). *Ann Bot* 110, 1047-1055.

CEBALLOS, L.; RUÍZ DE LA TORRE, J.; 1979. Árboles y arbustos de la España Peninsular. IFIE y ETSIM Madrid.

FEDOROV, A.A.; 1969. Chromosome numbers of flowering plants. *Acad Sci USSR Moscow Repr*, 419-429.

FERREIRA, V.; PAZIANOTO, L. H.; SOLLA, A.; 2022. Invasive forest pathogens affect the characteristics, microbial colonisation, and decomposition of leaf litter in streams. *Freshw Biol* 67, 416-429.

FISCHER, R.A.; MARTIN, C.O., FISCHENICH, J.C.; 2000. Riparian ecology and management in multi-land use watersheds. International Conference on American Water Resources Association, 1-7.

GIBBS, J.N.; VAN DIJK, C.; WEBBER, J.F.; 2003. *Phytophthora* disease of Alder in Europe. Forestry Commission Bulletin 126. Edinburgh, UK.

HOF, C.; LEVINSKY, I.; ARAUJO, M.B.; RAHBEK, C.; 2011. Rethinking species' ability to cope with rapid climate change. *Glob Change Biol* 17, 2987-2990.

JUNG, T.; BLASCHKE, M.; SCHLENZIG, A.; OßWALD W.; GULDER H.J.; 2003. *Phytophthora* disease of alders in Bavaria: extent of damage, mode of spread and management strategies. In: MCCOMB, J.A;

HARDY, G.E.S.; TOMMERUP, I.; eds.): *Phytophthora* in Forests and Natural Ecosystems. Pp. 226-234. Murdoch University, Perth, Western Australia.

KLODA, J.M.; DEA, P.D.G.; MADDREN, C.; MACDONALD, D.W.; MAYES, S.; 2008. Using principal component analysis to compare genetic diversity across polyploidy levels within plant complexes: an example from British Restharrows (*Ononis spinosa* and *Ononis repens*). *Heredity* 100, 253-260.

KOLÁŘ, F.; ŠTECH, M.; TRÁVNÍČEK, P.; RAUCHOVÁ, J.; URFUS, T.; VÍT, P.; SUDA, J.; 2009. Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. *Ann Bot* 103, 963-974.

LEPAIS, O.; BACLES, Z.; 2011. Amplification of microsatellite markers for Black Alder (*Alnus glutinosa*) and related species using SSR-enriched shotgun pyrosequencing. *J Heredity* 102, 627-632.

LEPAIS, O.; MULLER, S.; SAAD-LIMAM, O.; RHAZI, L.; BELOUAHEM-ABED, D.; DAOUD-BOUATTOUR, A.; MOKHTAR GAMMAR, A.; GHRABI-GAMMAR, Z., BACLES, Z.; 2013. High genetic diversity and distinctiveness of rear-edge climate relicts maintained by ancient tetraploidisation for *Alnus glutinosa*. *Plos One* 8, e75029.

MANDÁK, B.; VÍT, P.; KRAK, K.; TRÁVNÍČEK, P.; HAVRDOVÁ, A.; HANDICOVÁ, V.; ZÁKRAVSKY, P.; JAROLÍMOVÁ, V.; BACLES, C.; DOUDA, J.; 2016. Flow cytometry, microsatellites and niche models reveal the origins and geographical structure of *Alnus glutinosa* populations in Europe. *Ann Bot* 117, 107–120.

MARQUES-GOMES, I.; FARIA, C.; RODRIGUES-CONCEIÇÃO, S.I.; JANSSON, R.; CORCOBADO, T.; MILANOVIĆ, S.; LAUREN, Y.; BERNEZ, I.; DUFOUR, S.; MANDÁK, B.; ENNOUNI, H.; SAHLI, A.; ATER, M.; DORADO, F.J.; CAPERTA, A.D.; DAVID, T.; SOLLA, A.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.M.; 2022. Germination and seed traits in common alder (*Alnus* spp.): the potential contribution of rear-edge populations to ecological restoration success. *Restor Ecol* 30, e13517.

MENG, R.; FINN, C.; 2002. Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by cytometry. *J Am Soc Hort Sci* 127, 767–775.

MINGEOT, D.; HUSSON, C.; MERTENS, P.; WATILLON, B.; BERTIN, P.; DRUART, P.; 2016. Genetic diversity and genetic structure of black alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn) in the Belgium-Luxembourg-France cross-border area. *Tree Genet Genom* 12, 24.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E.; 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539.

PINTOS VARELA, C.; RIAL MARTÍNEZ, C.; MANSILLA VÁZQUEZ, J.P.; AGUÍN CASAL, O.; 2010. First Report of *Phytophthora* Rot on Alders Caused by *Phytophthora alni* subsp. *alni* in Spain. *Plant Dis* 94, 273-273.

RAUSCH, J.H.; MORGAN, M.T.; 2005. The effect of self-fertilization, inbreeding depression, and population size on autoploid establishment. *Evolution* 59, 1867-1875.

RUEDA, J.; PRADA, M.A.; AGUILAR, S.; RODRÍGUEZ-VILLAFRUELA, R.; VILLAMEDIANA, I.; HIDALDO, E.; EZQUERRA, F.J.; DE LUCA, A.I.; 2017. Diversidad genética de lotes de semillas de *Alnus glutinosa* (L.) gaertn., *Betula pubescens* Ehrh., *Fraxinus angustifolia* Vahl y *Sorbus aucuparia* L. en Castilla y León. En: 7º Congreso Forestal Español. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales. 7CFE01-296. Plasencia.

SOLLA, A.; PÉREZ-SIERRA, A.; CORCOBADO, T.; HAQUE, M.M.; DIEZ, J.J.; JUNG, T.; 2010. *Phytophthora alni* on *Alnus glutinosa* reported for the first time in Spain. *Plant Pathol* 59, 798-798.

VÍT, P.; DOUDA, J.; KRAK, K.; HAVRDOVÁ, A.; MANDÁK, B.; 2017. Two new polyploid species closely related to *Alnus glutinosa* in Europe and North Africa—an analysis based on morphometry, karyology, flow cytometry and microsatellites. *Taxon* 66, 567-583.