



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 estructura poblacional de *Quercus ilex* y *Q. suber* en España

MARTÍN CUEVAS, A.¹, ALCAIDE ROMERO, F.², GONZÁLEZ GONZÁLEZ, R.², CUENCA VALERA, B.³, OCAÑA BUENO, L.⁴, LUQUERO RAMOS, L.⁴, PÉREZ MARTÍN, F.⁵, SOLLA HACH, A.²

¹ Departamento de Genética. ETSIAM. Universidad de Córdoba (angela.martin@uco.es).

² 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).

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

⁴ Grupo TRAGSA. Subdirección de Innovación. C/ Conde de Peñalver, 84. 28006 Madrid. (lluquero@tragsa.es).

⁵ Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (FPerez@miteco.es).

Resumen

La encina y el alcornoque son especies prioritarias de mejora ante las condiciones adversas de cambio global, particularmente ante estrés hídrico y *Phytophthora cinnamomi*. Se presentan aquí los resultados de un análisis molecular mediante marcadores microsatélites (SSR) para cuantificar la diversidad genética y la estructura poblacional de 73 encinas y 70 alcornoques que conforman una población de mejora. Se analizaron 9 poblaciones representativas por especie y 8 árboles por población. En *Quercus ilex* se observaron 77 alelos para el conjunto de los siete SSRs utilizados y una elevada diversidad genética en el conjunto de poblaciones ($U_{He} = 0,731$). Todas las poblaciones presentaron alelos exclusivos. Según STRUCTURE se identificaron 3 grupos representativos, el primero de ellos incluyendo a las poblaciones de la subespecie *ilex* del este peninsular. En *Q. suber* se observaron 31 alelos para el conjunto de los siete SSRs evaluados y un valor medio de diversidad genética inferior a la observada en *Q. ilex*, pero variable entre poblaciones ($0,500 \leq U_{He} \leq 0,342$). Sólo cinco poblaciones de alcornoque presentaron alelos exclusivos y en número inferior a los detectados en *Q. ilex*. En *Q. suber* no se detectó estructural genética poblacional.

Palabras clave

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

1. Introducción

El género *Quercus* ha sido muy estudiado por su relevancia económica y ecológica. En particular, la encina (*Quercus ilex*) y el alcornoque (*Q. suber*) son dos especies de elevada importancia socioeconómica en el Mediterráneo occidental, tanto por la producción de bellota como por la producción de corcho. Encina y alcornoque son especies pertenecientes a las secciones *ilex* y *cerris* respectivamente, dentro del subgénero *Cerris* (MANOS et al., 1999). Ambas especies son muy comunes en la Península Ibérica y están distribuidas en una amplia variedad de ambientes. A nivel fenotípico, *Q. suber* posee una gran plasticidad, siendo capaz de expresar distintos fenotipos ante diferentes condiciones ambientales, y *Q. ilex* presenta múltiples adaptaciones morfológicas, fisiológicas, y moleculares que le permiten resistir al estrés, lo cual resulta importante para los ambientes en los que se distribuyen (SOTO et al., 2007; BARBETA & PEÑUELAS, 2016; SOLLA et al., 2016; CORCOBADO et al., 2017).

Aunque la encina y el alcornoque no están catalogadas como especies amenazadas en sentido estricto, se enfrentan a serios problemas que ponen en riesgo su conservación, entre los que destacan el envejecimiento del arbolado, la sobreexplotación o la falta de regeneración. A esto hay que sumar que en las últimas décadas se ha producido un progresivo deterioro de ambas especies con la pérdida de muchos ejemplares debido al síndrome de la seca, causado, entre otros factores,

por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* que está considerado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como uno de los 100 organismos patógenos más devastadores del mundo. La reducción del número de individuos se traduce en pérdidas ecológicas y económicas considerables, así como de un patrimonio genético de incalculable valor que en muchos casos resulta irrecuperable (ENCINAS-VALERO et al., 2022). Ante la seca de los *Quercus*, en 2017, se constituye el subgrupo de trabajo “Mejora genética y fisiológica” coordinado por el MAPA-MITECO (PÉREZ et al., 2020), en el que se encuadra este estudio.

La diversidad genética de las especies son los recursos con los que éstas evolucionan y pueden ser mejoradas, por lo que su conservación es fundamental. Esta diversidad genética indica la capacidad de adaptación de los organismos frente a los cambios ambientales a través de la selección natural. Por ello, el conocimiento sobre la cantidad de variación genética existente en las poblaciones es requisito fundamental para predecir la capacidad de adaptación de cada población ante una futura situación cambiante. El reciente desarrollo de la biología molecular y de las herramientas estadísticas ha permitido identificar y analizar la variación genética de las especies empleando marcadores moleculares (TUSKAN et al., 2004). Dentro de ellos, los marcadores microsatélites (SSR, *Simple Sequence Tags*) presentan una serie de características que los hacen ventajosos frente a otros tipos de marcadores moleculares. Estas características se resumen en su elevado grado de polimorfismo, su herencia mendeliana simple, codominancia (por la que pueden diferenciarse individuos homocigotos de heterocigotos) y su alta reproducibilidad (VARSHNEY et al., 2005). Otra ventaja es que las regiones que flanquean estas repeticiones suelen estar bien conservadas dentro de un mismo género, lo que facilita que sean empleados en diferentes especies.

A nivel de diversidad genética, los marcadores microsatélites han sido ampliamente utilizados en numerosas especies del género *Quercus*, como *Q. petraea*, *Q. robur*, *Q. coccifera*, *Q. suber* y *Q. ilex* (STEINKELLNER et al., 1997; NEOPHYTOU et al., 2011; SOTO et al., 2007, BURGARELLA et al., 2009). Estos trabajos han puesto de manifiesto la compleja estructura genética de las poblaciones de las diferentes especies, acentuada por el hecho constatado de que no existe aislamiento reproductivo en el género *Quercus* (VAN VALEN, 1976; SALVINI et al., 2009; LEPAIS & GERBER, 2011). La hibridación es un fenómeno importante a tener en cuenta en muchos taxones vegetales, pudiendo jugar un papel relevante en la formación de nuevas especies, además de afectar a la variabilidad genética y a la adaptación a condiciones locales (ALLENDORF et al., 2001; ALDRICH et al., 2003). Diversos trabajos han señalado la posible hibridación y retrocruzamiento en masas mixtas de encina y alcornoque que señalan el intercambio genético entre las dos especies, aunque resulta difícil confirmar si pertenecen a híbridos de primera generación o a retrocruzamientos con las especies parentales (BELAHBIB et al., 2001; SOTO et al., 2007).

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la diversidad genética y de la estructura poblacional de poblaciones de encina y alcornoque representativas de su área de distribución en España para evaluar sus recursos genéticos y establecer estrategias de conservación y mejora de ambas especies.

3. Metodología

En total se han analizado 143 individuos procedentes de nueve poblaciones de *Q. ilex* y nueve poblaciones de *Q. suber*, y ocho individuos por población (Figura 1). La extracción de ADN se realizó en 20 mg de muestra de tejido foliar liofilizado con el kit Plant-Mini de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. El secado de las hojas se realizó en sobre de papel dentro de cajas con gel de sílice, que actuó como desecante absorbiendo el agua de las muestras.

La caracterización molecular se realizó empleando 13 marcadores microsatélites (SSRs), cinco desarrollados en *Quercus* spp. (MSQ13, QpZag7, QpZag9, QpZag20, QpZag36) (DOW et al., 1995; HAMPER et al., 1998) y ocho desarrollados en *Castanea sativa* (CsCAT2, CsCAT3, CsCAT14, CsCAT41, EMCs14, EMCs15, EMCs38, OCI) (BUCK et al., 2003; MARINONI et al., 2003; GOBBIN et al., 2007) (Tabla 1). La puesta a punto de las amplificaciones se llevó a cabo empleando reacciones individuales para cada marcador. Posteriormente, basándonos en los marcadores que amplificaron y en el tamaño de los productos de amplificación, se diseñaron dos mezclas multiplex-PCR, en las que se amplifican de forma simultánea en una única reacción dos o más pares de cebadores marcando el *forward* con un fluorocromo (6-FAM, VIC, NED; Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ L siguiendo el protocolo Multiplex Kit 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).

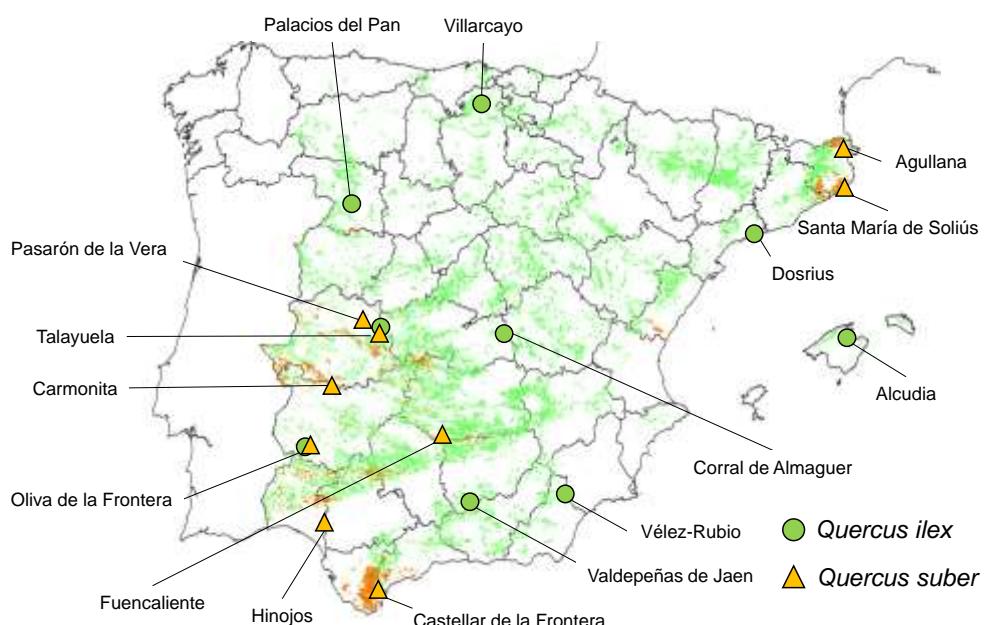


Figura 1. Origen del material vegetal utilizado.

Los índices de diversidad genética de las poblaciones analizadas se estimaron utilizando el programa GenAIEx 6 (PEAKALL & SMOUSE, 2005). Se calculó el número de alelos totales por locus (Na), el número de alelos exclusivos (Pa) y la heterocigosidad esperada (UHe). El coeficiente de diferenciación entre poblaciones se analizó con el programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005). Además, se calculó el análisis molecular de la varianza para cuantificar la proporción de variación genética entre las poblaciones dentro de cada especie. La significación de cada uno de los componentes de la varianza se estimó a partir de distribuciones generadas mediante 10.000 permutaciones al azar.

La estructura genética de las poblaciones se analizó aplicando un enfoque bayesiano mediante el programa STRUCTURE v.2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). En este método se establece el número más probable de grupos genéticos (K) suficientemente diferenciados. Posteriormente, se asignan probabilísticamente los individuos a los distintos grupos, sin haber establecido *a priori* las frecuencias alélicas de cada uno de esos grupos. El número de grupos diferentes (K) es confirmado mediante el método MCMC (Markov Chain Monte Carlo), y el programa calcula a posteriori la probabilidad “Q” de cada individuo de pertenecer a los citados grupos. Se han realizado 10^5 réplicas (MCMC) y una fase inicial de optimización y filtrado (*burn-in period*) de 10.000 interacciones para cada K . En la determinación del número K que mejor representaba la estructura poblacional se empleó el test

descrito por EVANNO et al. (2005), utilizando el programa STRUCTURE HARVESTER (EARL & VONHOLDT, 2012). Se realizaron 20 ejecuciones independientes de cada simulación por cada valor de K y se promediaron utilizando el programa CLUMPP (JAKOBSSON & ROSENBERG, 2007).

4. Resultados

Los cinco SSRs desarrollados en *Quercus* spp. y dos (CsCAT3, CsCAT14) de los ocho procedentes de *C. sativa* mostraron buena amplificación y alto nivel de polimorfismo, mientras que los restantes se descartaron del análisis ya que dos fueron monomórficos (CsCAT2 en *Q. ilex* y EMCs14 en *Q. suber*) y el resto no amplificaron.

En el conjunto del material analizado se han encontrado 89 alelos para los siete SSRs que han amplificado en ambas especies. El número de alelos por locus varió entre siete (CsCAT3) y 15 (CsCAT14), con un valor medio de 12,7 alelos por locus (Tabla 1). El promedio de heterocigosidad esperada (U_{He}) fue de 0,777, con los valores más bajos para los loci QpZAG9 y MSQ13 y los más altos para QpZAG36 y CsCAT14. Por especies, *Q. ilex* ha mostrado mayores valores de diversidad genética para todos los parámetros evaluados: 77 alelos detectados frente a 31 en *Q. suber*, así como una heterocigosidad esperada promedio de 0,731 frente a 0,426, respectivamente (Tabla 1). El coeficiente de diferenciación genética entre especies ha mostrado un valor superior al 20% ($F_{ST} = 0,226$).

A nivel de marcadores, todos han sido polimórficos en ambas especies, siendo QpZAG36 y QpZAG7 los más variables en *Q. suber* y QpZAG20 y CsCAT14 en *Q. ilex*. Todos los marcadores han mostrado alelos exclusivos en *Q. ilex*, un total de 58, mientras que en seis de los siete marcadores se han detectado alelos exclusivos en *Q. suber* (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de diversidad genética para cada marcador microsatélite (SSR) evaluado para ambas especies y en el conjunto de material evaluado

Locus	<i>Quercus suber</i>			<i>Quercus ilex</i>			Conjunto		
	Na	UHe	Pa	Na	UHe	Pa	Na	UHe	FST
<i>Desarrollados en Quercus</i>									
QpZAG7	6	0,721	5	3	0,514	2	8	0,761	
QpZAG9	5	0,090	2	11	0,784	8	13	0,725	
QpZAG20	4	0,597	1	17	0,888	14	18	0,794	
QpZAG36	7	0,727	0	12	0,860	5	12	0,880	
MSQ13	2	0,058	2	11	0,851	11	13	0,736	
<i>Desarrollados en Castanea</i>									
CsCAT3	4	0,395	1	6	0,765	3	7	0,739	
CsCAT14	3	0,372	1	17	0,839	15	18	0,815	
Promedio total	31	0,426	12	77	0,731	58	89	0,777	0,226

Na, nº de alelos por locus; UHe, heterocigosidad esperada; Pa, alelos exclusivos; FST, coeficiente de diferenciación entre especies.

A nivel de población, en *Q. ilex* se han encontrado valores de diversidad genética elevados, que además fueron muy similares en las nueve poblaciones (Tabla 2). Oliva de la Frontera fue la población con el mayor valor de variación ($U_{He} = 0,758$) frente a Palacios del Pan que mostró el valor más bajo ($U_{He} = 0,693$). Lo más interesante a destacar es que todas las poblaciones presentaron alelos

exclusivos (es decir únicos en la población), mostrando cada una de ellas una importante integridad genética. En el caso de *Q. suber*, los valores de diversidad genética han sido bajos en el conjunto de poblaciones con un valor medio de heterocigosidad de 0,426 (Tabla 3). No obstante, pueden observarse diferencias entre poblaciones, siendo Hinojos la población con mayor diversidad genética ($UH_e = 0,500$) y Carmonita la menos diversa ($UH_e = 0,342$). Los resultados muestran que sólo cinco poblaciones presentan alelos exclusivos y en un número inferior a los detectados en el caso de *Q. ilex* (Tabla 3), lo que indica una menor integridad genética de las poblaciones.

Tabla 2. Parámetros de diversidad genética de las poblaciones de encina (*Quercus ilex*) obtenidos a partir de siete marcadores microsatélites (SSRs)

Población	Na	UHe	Alelos exclusivos
Corral de Almaguer	5,7	0,743	2
Dosrius	4,9	0,739	1
Alcudia	5,3	0,744	2
Oliva de la Frontera	5,6	0,758	2
Palacios del Pan	5,1	0,693	2
Talayuela	4,4	0,732	1
Valdepeñas de Jaén	5,6	0,719	4
Vélez-Rubio	4,7	0,718	1
Villarcayo	6,1	0,727	3
Promedio	5,3	0,731	18

Na, nº de alelos por locus, UHe = heterocigosidad esperada.

Los resultados del análisis de la varianza han mostrado una diferenciación moderadamente alta entre las poblaciones de *Q. ilex* ($F_{ST} = 0,079$; $P < 0,01$), lo que era de esperar por el alto número de alelos exclusivos encontrados (Tabla 2). Por el contrario, los resultados han mostrado que no hay una diferenciación significativa entre las poblaciones de *Q. suber* ($F_{ST} = 0,002$; $P < 0,30$), lo que es congruente con el escaso número de alelos exclusivos encontrados (Tabla 3).

Para *Q. ilex*, el programa informático STRUCTURE basado en los siete marcadores moleculares (SSRs) mostró $K = 3$ como el número de grupos más probable (Figura 2). Claramente, las dos primeras poblaciones procedentes de Barcelona (Dosrius) y Mallorca (Alcudia) forman un clúster ($Q_1 = \text{rojo}$), que concuerda con la presencia mayoritaria de la subespecie *Q. ilex* L. subsp. *ilex* en ambas regiones. El resto de poblaciones analizadas presentan dos grupos genéticos mezclados en una proporción aproximada del 50% ($Q_2 = \text{amarillo}$ y $Q_3 = \text{verde}$), aunque las poblaciones de Palacios del Pan, Talayuela, Vélez-Rubio y Corral de Almaguer presentaron una mayor proporción del clúster Q_3 (verde) y las tres últimas, Valdepeñas de Jaén, Villarcayo y Oliva de la Frontera, del clúster Q_2 (amarillo) (Figura 2).

STRUCTURE no encontró estructura en el caso de *Q. suber*. A pesar de la falta de estructura, se han detectado pequeñas diferencias en relación al grado de identidad genética de las poblaciones en función de su coeficiente de diferenciación F_{ST} , donde se observa una ligera diferencia entre las poblaciones de Hinojos (la que mostró mayor diversidad genética) y Talayuela con respecto al resto.

Tabla 3. Parámetros de diversidad genética de las poblaciones de alcornoque (*Quercus suber*) obtenidos a partir de siete marcadores microsatélites (SSR)

Población	Na	UHe	Alelos exclusivos
-----------	----	-----	-------------------

Agullana	3,0	0,387	0
Carmonita	2,9	0,342	0
Castellar de la Frontera	3,1	0,427	1
Fuencaliente	2,4	0,388	0
Hinojos	3,0	0,500	0
Santa M. ^a de Soliús	2,9	0,413	1
Oliva de la Frontera	2,9	0,485	1
Pasarón de la Vera	2,6	0,429	1
Talayuela	3,0	0,461	1
Promedio total	2,86	0,426	5

Na, nº de alelos por locus, UH_e = heterocigosidad esperada.

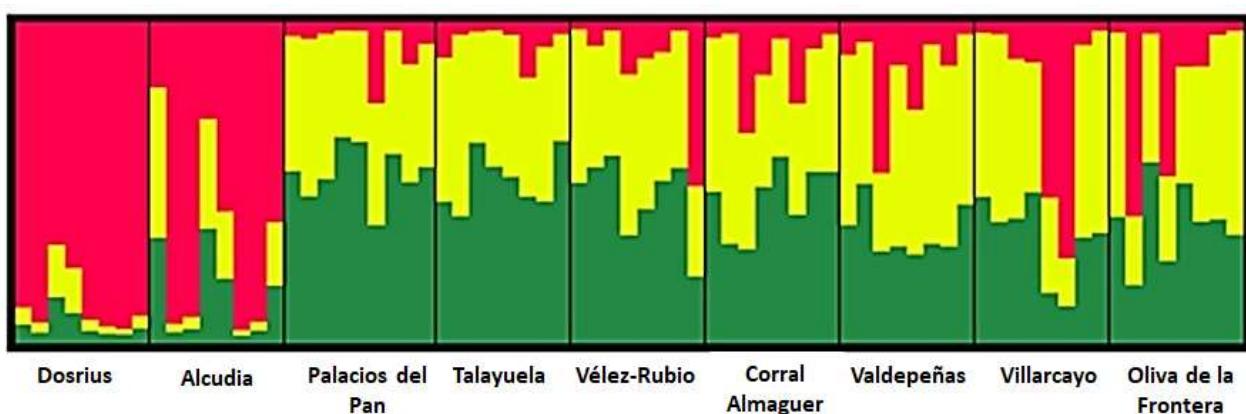


Figura 2. Estructura de las poblaciones de *Quercus ilex* usando el programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) para K=3. Cada individuo se muestra en una barra vertical y cada color representa la proporción del clúster al que pertenece.

5. Discusión

Los marcadores microsatélites (SSRs) empleados en este trabajo han sido lo suficientemente polimórficos para permitir genotipar las 18 poblaciones de *Q. suber* y *Q. ilex*, definir su estructura genética y constatar que las poblaciones estudiadas no están introgresadas con material de la otra especie.

En relación a la diversidad genética, *Q. ilex* ha presentado valores significativamente superiores a los de *Q. suber* para todos los parámetros genéticos. Este resultado coincide con lo reportado por otros autores empleando diferentes tipos de marcadores moleculares (TOUMI & LUMARET, 1998; LÓPEZ DE HEREDIA et al., 2005; LUMARET et al., 2005; LUMARET & JABBOUR-ZAHAB, 2009). Así, los valores de variación obtenidos han sido similares a los descritos en otros trabajos para ambas especies, incluso en estudios a gran escala (LUMARET & JABBOUR-ZAHAB, 2009). La variabilidad molecular existente en poblaciones naturales de encina está estrechamente relacionada con su amplia plasticidad frente a cambios climáticos del pasado, los cuales determinan la compleja filogeografía de la especie y condicionan su evolución futura. Sin embargo, estos valores de diversidad han resultado inferiores a los de otras especies relacionadas como *Q. petraea* o *Q. robur* (COTTRELL et al., 2003; VALBUENA-CARABAÑA et al., 2005).

Del mismo modo, se ha detectado un alto grado de diferenciación entre especies lo cual es esperable entre especies distantes (MIR et al., 2009). En *Q. ilex*, las poblaciones procedentes de

Barcelona y Mallorca, pertenecientes a la subespecie *Q. ilex* L. subsp. *ilex*, han mostrado una clara separación con el resto de poblaciones, y éstas a su vez han mostrado dos grupos genéticos mezclados en una proporción aproximada del 50%. En España, diversos trabajos han puesto de manifiesto una falta de estructura genética en *Q. ilex*, atribuida a un flujo genético efectivo que asegura la ausencia de endogamia en la especie (LORENZO RODRÍGUEZ, 2006; SOTO et al., 2007). Sin embargo, aunque los marcadores microsatélites empleados en dichos trabajos son similares a los del presente estudio, el diseño del muestreo no nos permite comparar los resultados. En nuestro caso, se han analizado nueve poblaciones de cada especie representativas de su área de distribución al recoger las principales regiones de procedencia, 9 diferentes en el caso de *Q. suber* y 8 en el caso de *Q. ilex* (la región de procedencia Extremadureña está representada por 2 poblaciones debido a su extensión), mientras que en los trabajos citados anteriormente se analizan masas mixtas donde conviven ambas especies, pues se pretendía detectar introgresión.

En nuestro estudio, *Q. ilex* dobla el valor de diversidad genética de *Q. suber* ($N_a = 77$ vs. 31; $UHe = 0,731$ vs. 0,426; $Pa = 58$ vs. 12, respectivamente). Nuestro estudio no ha detectado estructura en *Q. suber*, hecho que ha sido expuesto por otros autores previamente (MAGRI et al., 2007). Esta falta de estructura genética pudiera ser debida a que las poblaciones, excepto Oliva de la Frontera, fueran monomórficas para al menos un marcador. Sin embargo, la elección de los marcadores ha sido correcta en relación a su polimorfismo, ya que el número de alelos detectados es similar al reportado en otros trabajos sobre la especie (SOTO et al., 2007), teniendo en cuenta, además, que nuestro tamaño poblacional es significativamente inferior. Por otra parte, LUMARET & JABBOUR (2009) destacan dos grupos claramente diferenciados entre las poblaciones situadas al este y las del oeste de su área de distribución en el Mediterráneo. Estos resultados son compatibles con los obtenidos en este estudio ya que las poblaciones analizadas de la Península Ibérica corresponden todas al mismo grupo.

Existen trabajos que ponen de manifiesto que, aunque rara, es posible la hibridación entre ambas especies, sin embargo, en nuestro estudio hemos podido confirmar que no existen individuos introgresados entre ambas. BURGARELLA et al. (2009) identificaron por primera vez en campo híbridos de *Q. suber* y *Q. ilex* utilizando microsatélites, mostrando que existía una baja proporción de flujo genético entre ambas especies. Sin embargo, aunque se observó una baja tasa de hibridación, esto no supone que en el pasado no haya existido mayor hibridación con *Q. ilex*, tal y como sugieren algunos estudios que han utilizado marcadores cloroplásticos (LÓPEZ DE HEREDIA et al., 2007; LUMARET et al., 2009).

6. Conclusiones

Los marcadores microsatélites empleados en este trabajo han sido lo suficientemente polimórficos para permitir genotipar las poblaciones de *Q. suber* y *Q. ilex* evaluadas, así como para permitir identificar nuevos recursos genéticos de ambas especies en la Península Ibérica. Esta información será de gran valor para la toma de decisiones relacionadas con la selección de árboles madre y brizales tolerantes a estrés hídrico y a *P. cinnamomi* en el actual programa de mejora de estas especies (PÉREZ et al., 2020).

7. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el MITECO a través del *Programa Nacional de mejora y Conservación de los Recursos Genéticos de la Encina y el Alcornocal frente al Síndrome de la Seca*; con una cofinanciación de fondos FEADER al 75%, al estar incluido en el 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. Además, también ha sido financiado por el VI-Plan Regional de I+D+i de la Consejería de Economía e Infraestructuras (Junta de Extremadura) bajo el proyecto

'Impacto del estrés térmico en castaño y alcornoque: obtención de genotipos tolerantes para Extremadura' (IB18091), y por fondos FEDER de la Unión Europea.

8. Bibliografía

- ALDRICH, P.R.; PARKER, G.R.; MICHLER, C.H.; ROMERO-SEVERSON, J.; 2003. Whole-tree silvic identifications and the microsatellite genetic structure of a red oak species complex in an Indiana old-growth forest. *Can J For Res* 33, 2228-2237.
- ALLENDORF, F.W.; LEARY, R.F.; SPRUELL, P.; WENBURG, J.K.; 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol Evol* 16, 613-622.
- BARBETA, A.; PEÑUELAS, J.; 2016. Sequence of plant responses to droughts of different timescales: lessons from holm oak (*Quercus ilex*) forests. *Plant Ecolog Divers* 9, 321-338.
- BELAHBIB, N.; PEMONGE, M.H.; OUASSOU, A.; SBAY, H.; KREMER, A., PETIT, R.J.; 2001. Frequent cytoplasmic exchanges between oak species that are not closely related: *Quercus suber* and *Q. ilex* in Morocco. *Mol Ecol* 10, 2003-2012.
- BUCK, E.J.; HADONOU, M.; JAMES, C.J.; BLAKESLEY, D.; RUSSELL, K.; 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Mol Ecol Notes* 3, 239-241.
- CORCOBADO, T.; MIRANDA-TORRES, J.J.; MARTÍN-GARCÍA, J.; JUNG, T.; SOLLA, A.; 2017. Early survival of *Quercus ilex* subspecies from different populations after infections and co-infections by multiple *Phytophthora* species. *Plant Pathol* 66, 792-804.
- COTTRELL, J.E.; MUNRO, R.C.; TABBENER, H.E.; MILNER, A.D.; FORREST, G.I.; LOWE, A.J.; 2003. Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oakwoods differing in population history. *For Ecol Manag* 1761, 287-303.
- DOW, B.D.; ASHLEY, M.V.; HOWE, H.F.; 1995. Characterization of highly variable (GA/CT) n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theor Appl Genet* 91, 137-141.
- EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M.; 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4, 359-361.
- ENCINAS-VALERO, M.; ESTEBAN, R.; HERES, A.M.; BECERRIL, J.M.; GARCÍA-PLAZAOLA, J.I. et al. 2022. Photoprotective compounds as early markers to predict holm oak crown defoliation in declining Mediterranean savannahs. *Tree Physiol* En prensa. Doi: 10.1093/treephys/tpab006
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J.; 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611-2620.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S.; 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf* 1, 117693430500100003.

GOBBIN, D., HOHL, L., CONZA, L., JERMINI, M., GESSLER, C. AND CONEDERA, M. 2007. Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. *Genome* 50, 1089–1103.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N.A.; 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801-1806.

LEPAIS, O.; GERBER, S.; 2011. Reproductive patterns shape introgression dynamics and species succession within the European white oak species complex. *Evol Int J Org Evol* 65, 156-170.

LÓPEZ DE HEREDIA, U.; JIMÉNEZ, P.; DÍAZ-FERNÁNDEZ, P.; GIL, L.; 2005. The Balearic Islands: a reservoir of cpDNA genetic variation for evergreen oaks. *J Biogeogr* 326, 939-949.

LORENZO RODRÍGUEZ, Z.; 2006. Estudio de las pautas de reproducción de *Quercus ilex* L. y *Q. suber* L. mediante marcadores moleculares. Doctoral dissertation, UPM, Madrid.

LUMARET, R.; TRYPHON-DIONNET, M.; MICHAUD, H.; SANUY, A.; IPOTESI, E.; BORN, C.; MIR, C.; 2005. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in cork oak *Quercus suber*. *Ann Bot* 965, 853-861.

LUMARET, R.; JABBOUR-ZAHAB, R.; 2009. Ancient and current gene flow between two distantly related Mediterranean oak species, *Quercus suber* and *Q. ilex*. *Ann Bot* 104, 725-736.

MAGRI, D.; FINESCHI, S.; BELLAROSA, R.; BUONAMICI, A.; SEBASTIANI, F.; SCHIRONE, B.; VENDRAMIN, G.G.; 2007. The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Mol Ecol* 16, 5259-5266.

MANOS, P.S.; DOYLE, J.J.; NIXON, K.C.; 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Mol Phyl Evol* 12, 333-349.

MARINONI, D.; AKKAK, A.; BOUNOUS, G.; EDWARDS, K.J; BOTTA, R.; 2003 Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Mol Breed* 11, 127–136.

MIR, C.; JARNE, P.; SARDA, V.; BONIN, A.; LUMARET, R.; 2009. Contrasting nuclear and cytoplasmic exchanges between phylogenetically distant oak species (*Quercus suber* L. and *Q. ilex* L.) in Southern France: inferring crosses and dynamics. *Plant Biol* 11, 213-226.

NEOPHYTOU, C.; ARAVANOPoulos, F.A.; FINK, S.; DOUNAVI, A.; 2011. Infertile oaks in an island environment. II. Limited hybridization between *Quercus alnifolia* Poech and *Q. coccifera* L. in a mixed stand. *Eu J For Res* 130, 623-635.

KAMPFER, S.; LEXER, C.; GLOSSL, J., STEINKELLNER, H.; 1998. Brief report characterization of (GA) n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas* 129, 1-86.

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.

PÉREZ, F.; CUENCA, B.; RUIZ-GÓMEZ, F. J.; REY, M. D.; RUIZ-GALEA, M.; ARRILLAGA, I. et al. 2020. Programa de mejora y conservación de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de la “seca”. *Foresta* 78, 56-61.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P.; 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

SALVINI, D.; BRUSCHI, P.; FINESCHI, S.; GROSSONI, P.; KJAER, E.D.; VENDRAMIN, G.G.; 2009. Natural hybridisation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. within an Italian stand as revealed by microsatellite fingerprinting. *Plant Biol* 11, 758-765.

SOLLA, A.; MILANOVIĆ, S.; GALLARDO, A.; BUENO, A.; CORCOBADO, T.; CÁCERES, Y., et al.; 2016. Genetic determination of tannins and herbivore resistance in *Quercus ilex*. *Tree Genet Genomes* 12, 117.

SOTO, A.; LORENZO, Z.; GIL, L.; 2007. Differences in fine-scale genetic structure and dispersal in *Quercus ilex* L. and *Q. suber* L.: consequences for regeneration of Mediterranean open woods. *Heredity* 99, 601-607.

STEINKELLNER, H.; LEXER, C.; TURETSCHEK, E.; GLÖSSL, J.; 1997. Conservation of (GA) n microsatellite loci between *Quercus* species. *Mol Ecol* 6, 1189-1194.

TOUMI, L.; LUMARET, R.; 1998. Allozyme variation in cork oak (*Quercus suber* L.): the role of phylogeography and genetic introgression by other Mediterranean oak species and human activities. *Theor Appl Genet* 97, 647-656.

TUSKAN, G.A.; GUNTER, L.E.; YANG, Z.K.; YIN, T; SEWELL, M.M.; DIFAZIO, S.P.; 2004. Characterization of microsatellites revealed by genomic sequencing of *Populus trichocarpa*. *Can J For Res* 34, 85-93.

VALBUENA-CARABANA, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; SORK, V.L.; COLLADA, C.; SOTO, A.; GOICOECHEA, P.G.; GIL, L.; 2005. Gene flow and hybridisation in a mixed oak forest *Quercus pyrenaica* Willd. and *Quercus petraea* Matts. Liebl. in central Spain. *Heredity* 95, 457-465.

VAN VALEN, L.; 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* 25, 233-239.

VARSHNEY, RK.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E.; 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23, 48-55.