

Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013

REGENERACIÓN DE *QUERCUS PYRENAICA* I: ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL EN MONTE BAJO Y MONTE HUECO Y FRUCTIFICACIÓN EN CLONES Y PIES DE SEMILLA: AUSENCIA DE PATRONES DIFERENCIADORES CLAROS.

MARÍA VALBUENA-CARABAÑA^{1*}, RAMÓN PEREA^{1,2} Y LUIS GIL¹

RESUMEN

La regeneración de las especies forestales es un proceso complejo en el que intervienen e interaccionan múltiples fases y factores. Aparte de la formación de las semillas, su dispersión y el establecimiento exitoso de las plántulas constituyen pasos fundamentales en el proceso de regeneración. En el caso de *Quercus pyrenaica*, roble submediterráneo cuyas principales áreas de distribución se localizan en la península Ibérica, las dos fases del proceso que en mayor medida comprometen la regeneración natural de la especie en toda su geografía son, precisamente, la falta de producción de bellotas en los montes bajos y la dificultad que tienen las plántulas para su establecimiento en montes abiertos con elevada carga de herbívoros. El proyecto 047/2010 (continuación de 030/2007) se centra en estas dos fases del proceso de regeneración y analiza las causas de su fracaso en dos poblaciones con estructuras forestales diferentes (monte bajo y monte con estructura adhesionada) localizadas en el P.N. de Cabañeros a través de estimaciones directas e indirectas. Los resultados se muestran en dos trabajos consecutivos en este Monográfico (Regeneración de *Quercus pyrenaica* I y II). En el presente trabajo se analiza la estructura genética espacial a escala local (SGS) del monte bajo y el monte hueco mediante el análisis de 14 marcadores moleculares microsatélites, estimándose de forma indirecta el flujo genético (dispersión) histórico a partir de ella. Las escasas diferencias en la diversidad genética (108 genotipos/ha en el monte bajo y 88 genotipos/ha en el monte hueco) y en la estructuración espacial de ambos tipos de montes ($Sp=0,00775$ en el monte bajo y $Sp=0,00961$ en el monte hueco) no parecen explicarse por las grandes diferencias en los niveles de fructificación observados en la actualidad, datos que sugieren que en el pasado las estructuras forestales de ambas poblaciones eran más parecidas que actualmente. Estos resultados permiten inferir que, de forma histórica, en los montes bajos han existido fuentes semilleras responsables de la alta diversidad y la débil SGS. Por otro lado, la estimación de la fructificación en pies adultos en función de su pertenencia o no a cepas (i.e. procedentes de un rebrote vegetativo o portadores de genotipos únicos (GU)) ha mostrado una alta variabilidad interindividual e interanual a lo largo de los tres años de estudio: en 2011 los pies de GU produjeron mayor número de bellotas, en 2012 las diferencias entre

¹ Departamento de Sistemas y Recursos Naturales. ETSI. Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n. 28040. Madrid. Tfno. 913 367 113.

² Ecology and Evolution group. Department of Biology. Stanford University, 94305 California, USA. Phone number: +1(650)725-6691. Email: ramonp@stanford.edu

*maria.valbuena@upm.es

grupos no fueron significativas; y en 2013 las cepas produjeron más bellotas que los pies de GU. La ausencia de un patrón diferenciador en la producción de semillas de uno y otro tipo de árboles no ayuda a explicar la falta de fructificación generalizada en los montes bajos (formados mayoritariamente por cepas), ni la existencia de un compromiso entre la reproducción asexual y sexual que sea independiente de la disponibilidad de recursos.

Palabras clave: rebollar, cepa, resalvo, mutación somaclonal, estructura genética espacial, esfuerzo reproductor

SUMMARY

Natural regeneration of forest trees is a complex process where multiple species and factors interact. Beyond seed formation, effective dispersal and seedling recruitment are key steps in the whole regeneration process. For *Quercus pyrenaica*, a submediterranean oak species mainly distributed in the Iberian Peninsula, the two stages endangering the most species regeneration in the whole distribution area are, precisely, the generalized lack of acorn production in coppice woodlands and the lack of successful seedling establishment in open forests that typically host high density of grazing herbivores. The project 047/2010 (continuation of the former 030/2007) focuses on these two phases of the regeneration process trying to analyse by direct and indirect estimates the underlying causes of regeneration failure in two stands in Cabañeros National Park with contrasting wood structures (abandoned coppice *vs.* open woodland). Results are shown in two consecutive articles (Regeneration of *Quercus pyrenaica* I and II) in the current Monograph. In the present one, the spatial genetic structure at fine-scale (SGS) was analysed in both stands by means of nuclear microsatellite markers (nSRR) and was also used for indirectly estimate the historical gene dispersal at each stand. Low differences in genetic diversity levels (108 genotypes/ha in coppice *vs.* 88 genotypes/ha in open woodland) and in the SGS of both stands ($Sp=0.00775$ in coppice; $Sp=0.00961$ in open woodland) do not seem to be explained by the high contrasted levels of acorn production currently observed in both types of woodlands. These data suggest that in former times, both forest structures would have been more similar than today. All together, these results allow us to infer that despite the applied management promoting vegetative reproduction in coppices, trees acting as seed sources had to be historically common in this type of woodlands in order to explain the high diversity levels (high number of different genotypes) and the low SGS found. On the other hand, the assessment of acorn production by trees bearing unique genotypes (GU) and trees belonging to clonal clumps showed high inter-individual and inter-annual variability: in 2011 stems with GU presented higher acorn production than trees in clonal clumps; in 2012 there were no significant differences between both groups of trees; whereas in 2013, trees in clonal clumps produced more acorns than GU trees. The absence of a differentiation pattern in acorn production hinders to explain neither the generalized lack of fructification in coppice stands of the species (mainly formed by clonal assemblies) nor the existence of a trade-off independent of resources availability between sexual and asexual reproduction.

Key words: Oak coppice, clonal clump, standard stem, somaclonal variation, spatial genetic structure, reproductive effort.

INTRODUCCIÓN

La regeneración de las especies forestales es un proceso complejo en el que intervienen e interaccionan múltiples fases y factores (JORDANO y HERRERA, 1995). En las especies dominantes, denominadas ingenieras de ecosistemas, la dinámica de la regeneración condiciona otros procesos esenciales a nivel ecosistémico y la historia vital de los organismos que dependen de ellos (e.g. PULIDO y DÍAZ, 2005). Así, la interacción de otras especies (animales y vegetales) en las distintas fases de la regeneración forestal juega un papel fundamental al modificar el balance final del proceso, tanto de forma positiva (dispersores, facilitadores) como de forma negativa (patógenos, herbívoros). Al mismo tiempo, los procesos que determinan el éxito de la regeneración de estas especies condicionan sus propias dinámicas poblacionales, sus niveles de diversidad y estructuración genética y la funcionalidad a largo plazo de los ecosistemas que conforman (DÍAZ *et al.*, 2011). Por tanto, el conocimiento adecuado de la ecología de la regeneración de estas especies requiere la identificación de las fases demográficas claves del proceso completo y de los principales factores que lo condicionan.

Además de la formación de las semillas, su dispersión y el establecimiento exitoso de sus plántulas constituyen pasos fundamentales en el proceso de regeneración. Los rebollares o melojares son formaciones casi exclusivas de la península Ibérica, dominados por un roble de carácter submediterráneo (*Quercus pyrenaica* Willd.). Su extraordinaria capacidad de rebrote, no sólo de cepa, sino especialmente de raíz (RUIZ DE LA TORRE, 2006) le confiere a esta especie ciertos rasgos ecológicos relevantes que le han permitido sobrevivir a una larga historia de aprovechamientos. Cortados, quemados y carboneados, su manejo en monte bajo ha supuesto una práctica común en estos robledales desde la antigüedad, dando lugar a una total transformación de las estructuras naturales de la especie (VALBUENA-CARABAÑA y GIL 2013a). Sin embargo, una vez perdido el interés económico del carbón y las leñas, este manejo tradicional ha sido abandonado y actualmente los montes bajos se

encuentran en un estado de degradación avanzado. Hoy en día, los rebollares de *Q. pyrenaica* presentan problemas de falta de regeneración sexual, estancamiento del crecimiento de los pies y un incremento en el riesgo de incendios debido a las elevadas densidades del rebrote (SERRADA *et al.*, 1994; SAN MIGUEL *et al.*, 2011; SALOMÓN *et al.*, 2013). Su regeneración sexual se encuentra fuertemente comprometida como consecuencia de la falta de producción de bellotas en los montes bajos y la dificultad que tienen las plántulas para su establecimiento en montes abiertos con elevada carga de herbívoros (referencias en VALBUENA-CARABAÑA *et al.*, 2008; PEREA *et al.*, 2014). Más allá de estos problemas de tipo ecológico (degradación de las masas por el envejecimiento de las cepas), económico (abandono del aprovechamiento excepto un uso residual de leñas) y social (peligro de incendios debido a la alta densidad de combustible) a los que se enfrentan actualmente los rebollares de *Q. pyrenaica*, el interés ambiental, ecológico, paisajístico y productivo de estas masas forestales requiere del conocimiento de los mecanismos implicados en su regeneración natural, para dotar a los gestores de herramientas y esquemas de gestión que garanticen la perpetuación de estas formaciones a través de la regeneración natural. El proyecto 047/2010 (continuación de 030/2007) analiza los problemas relacionados con ambas fases del proceso en dos trabajos consecutivos.

En las poblaciones vegetales, existen numerosos factores demográficos y ecológicos que actúan a diferentes escalas sobre sus patrones reproductivos. A nivel poblacional, son importantes el tamaño y la densidad de la población, el tipo de polinización, la sincronía de la floración (EL-KASSABY y JAQUISH, 1996; ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, 2004; O'CONNELL *et al.*, 2006; GÉRARD *et al.*, 2006). Además, otros factores relacionados con el manejo selvícola pueden influir sobre los patrones reproductivos al modificar las tasas de cruzamiento entre individuos (MURAWSKI *et al.*, 1994; EL-KASSABY *et al.*, 2003) o influir directamente en el modo de reproducción, como sería el caso en *Q. pyrenaica* (VALBUENA-CARABAÑA y GIL, 2013a, 2014). A nivel individual, la forma y el tamaño de la planta, el esfuerzo reproductor (femenino y masculino) y la

posición social dentro de la masa actúan a su vez sobre los patrones de reproducción (BURCZYK *et al.*, 1996, 2002; DOW y ASHLEY 1998; O'CONNELL *et al.*, 2004; VERDÚ *et al.*, 2006). En especies capaces de crear agregaciones clonales, la propagación vegetativa puede tener efectos importantes en la estructura genética intrapoblacional: en aquellas alógamas obligadas ((como es el caso del género *Quercus* (DUCOUSSO *et al.*, 1993)) una fuerte estructura clonal puede restringir la contribución de la reproducción sexual al impedirse la fecundación (y por tanto la fructificación) debido a un aporte excesivo de polen procedente de pies genéticamente iguales (HANDDEL, 1985). Aparte de las oportunidades para la polinización efectiva, la posible existencia de un compromiso entre los esfuerzos dedicados a la fructificación y a la extensión del rebrote vegetativo (*trade-off* entre la reproducción sexual y asexual) podría jugar un papel importante en el mantenimiento de la diversidad genética y en la dinámica y continuidad de las poblaciones en función de los recursos disponibles (véase revisión en ZHANG y ZHANG, 2007). En el caso de *Q. pyrenaica*, se ha sugerido que el aprovechamiento en monte bajo ha abundado sobre la importante vecería que afecta a la especie (BRAVO *et al.*, 2008) sin profundizar en las causas que la producen.

Dentro de poblaciones continuas y en ausencia de selección natural, la restricción en la dispersión de polen y semilla y el apareamiento preferencial entre individuos próximos puede dar lugar a la diferenciación por deriva genética de subgrupos de individuos mediante el proceso denominado aislamiento por distancia (IBD *isolation by distance*) (WRIGHT, 1943; MALÉCOT, 1950; ROUSSET, 2000). Esta distribución no aleatoria de genotipos dentro de una población, generalmente en forma de agregados, se caracteriza mediante la estructura genética espacial a escala local (SGS) y es un aspecto ampliamente estudiado en plantas (WELLS y YOUNG, 2002; VEKEMANS y HARDY, 2004) ya que proporciona información relevante sobre los sistemas de reproducción y las dinámicas demográficas, las cuales pueden resultar útiles a la hora de definir estrategias de mejora y conservación de los recursos genéticos forestales (EPPERSON, 1990,

1992; CHUNG *et al.*, 1998). La SGS representa pues la magnitud de las relaciones familiares entre los individuos de una población en relación a la distancia que los separa. La correlación genética espacial existente se describe generalmente en manera de autocorrelogramas (HEYWOOD, 1991; HARDY y VEKEMANS, 1999) que, de forma indirecta, pueden ser utilizados para estimar parámetros demográficos relacionados con el tamaño poblacional de la población reproductiva y las tasas de dispersión histórica conforme al desarrollo matemático del modelo IBD (HARDY y VEKEMANS, 1999; ROUSSET 1997, 2000; VEKEMANS y HARDY, 2004). Si los marcadores genéticos utilizados son neutrales – es decir, asumiendo que no se ven afectados por la selección natural– las autocorrelaciones genéticas proporcionan una estimación indirecta del tamaño efectivo de una población (N_e). Éste corresponde al de una población ideal teórica en la que, entre otros requisitos, todos los individuos contribuyeran activamente con sus genes en la misma proporción a la siguiente generación. Generalmente, el número de individuos que dejan descendencia es menor que el número de individuos real de la población ($N_e < o \ll N$), por lo que, entre otros factores, el tamaño efectivo poblacional se ve condicionado por la variación en el éxito reproductor de sus individuos. Dicha estimación de N_e equivale, dentro de un rango adecuado de distancias (ROUSSET, 2001), a $\pi D_e \sigma^2$ ($N_e = \pi D_e \sigma^2$), donde D_e es la densidad efectiva de la población reproductiva, y σ representa la desviación estándar de la dispersión genética efectiva de los propágulos (que combina la dispersión de la semilla y del polen). Así, el producto $D_e \sigma^2$ describe el grado de solapamiento de la dispersión genética individual de los adultos (solapamiento de la dispersión efectiva de la «sombra» de semillas y de la «nube» de polen generada por cada individuo reproductor), y es función de la capacidad de dispersión de los mismos y de la densidad a la que se encuentran los individuos reproductores en la población. En este trabajo el análisis de la diversidad genética y la estructura genética espacial a escala local (SGS) será utilizado para estimar y comparar el efecto acumulado de la dispersión histórica en relación con el tamaño efectivo poblacional en dos parcelas de *Q. pyrenaica* del P.N. de Cabañeros que pre-

sentan marcadas diferencias en cuanto a su estructura forestal (monte bajo y monte hueco con estructura adhesionada). Además, en la parcela con estructura adhesionada, la estimación de la producción de bellota en pies pertenecientes a cepas (clones, procedentes de reproducción asexual) y pies portadores de genotipos únicos (GU) permitirá indagar acerca de la posible existencia de un *trade-off* entre los dos tipos de reproducción –sexual y asexual– y las posibles causas de la escasa fructificación observada en los montes bajos de la especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

Las poblaciones de estudio se situaron en el P.N. de Cabañeros en el que, como en el resto de nuestra geografía, las masas forestales han sido intensamente aprovechadas y la gestión tradicional de *Q. pyrenaica* abandonada. La mayoría de las formaciones de la especie presentan una estructura de monte bajo más o menos cerradas e irregulares. Por lo general, los pies de las clases diamétricas mayores (probablemente resalvos de las últimas cortas) aparecen en bajas densidades acompañados de un estrato inferior más numeroso de brotes. En casos menos numerosos, se pueden encontrar montes con estructuras forestales más desarrolladas formadas por pies de grandes diámetros (60-70 cm), que por lo general crecen a bajas densidades, y en los cuales, la presencia de pies juveniles de pequeño diámetro resulta muy escasa. Para este trabajo, se han seleccionado dos poblaciones caracterizadas por sus diferencias en cuanto a la estructura forestal (La Calanchera, monte bajo; El Brezoso, monte hueco en galería), las cuáles habían sido parcialmente analizadas en el proyecto anterior (030/2007) del que éste es continuación (VALBUENA-CARABAÑA y GIL, 2011).

Muestreos genéticos

La Calanchera se sitúa en el término municipal de Los Navalucillos (Toledo) en la Comarca de los Montes de Toledo históricamente quemada,

pastoreada y carboneada. Se trata de un monte bajo situado en un terreno pedregoso con matriz de suelo en una zona de escasa pendiente y una elevada densidad de brotes de pequeño diámetro. El muestreo de los pies > 5 cm *dbh* se ha realizado de forma intensiva en una parcela de superficie de $S^2 \approx 0,3$ ha en la que ya habían sido analizados mediante 7 marcadores microsatélites nucleares (nSSR) un total de N=152 árboles (proyecto 030/2007). Durante el desarrollo de este proyecto se amplió la muestra con diversos objetivos, recogiendo hojas para la caracterización genética de 110 árboles (*dbh* medio=10,5 ± 4,0 cm) en torno a los ya muestreados, con el fin de delimitar detalladamente las cepas, algunas de las cuales mostraban un solapamiento espacial notable. Además se muestrearon todos los árboles de mayores dimensiones (29 resalvos; *dbh* medio=11,6 ± 3,5 cm) en una superficie de 1,4 ha (que incluye la parcela anterior) comparable a la de la población de El Brezoso (también analizada en el proyecto anterior) y con el fin de confrontar la estructura genética espacial de estos dos montes con estructuras forestales diferentes (monte bajo y monte hueco). Todos los árboles fueron georreferenciados mediante hipsómetro vértex, cinta métrica y GPS (Trimble, Geo XT 2005). Además, se ampliaron los análisis genéticos de todas las muestras (N=262) que en total fueron amplificadas con 14 nSSR (MSQ4, MSQ13, QpZAG9, QpZAG110, QpZAG36, QrZAG39, QrZAG11, QrZAG5 y QrZAG7, QrAG20, QrAG15, QrAG46, QrAG87, QrAG65). Para ello, la extracción del material genético se realizó a partir de ~5 mg de hoja seca (deshidratada en gel de sílice) mediante un kit comercial (Invitex Spin Plant Mini Kit). Una vez extraído el ADN se procedió a la amplificación mediante técnicas de PCR (termocicladores Applied Biosystems GeneAmp 9700) de los mencionados marcadores siguiendo el protocolo descrito en VALBUENA-CARABAÑA *et al.* (2007) para los nueve primeros, y con ligeras modificaciones respecto a las publicadas de los 5 restantes (BARRNECHE *et al.*, 1998). La electroforesis de los productos de PCR se realizó mediante un secuenciador automático de ADN, Li-Cor 4300 (Li-Cor Biosciences). Los tamaños de los fragmentos obtenidos fueron determinados mediante el *software* SAGA GT (Li-Cor, Biosciences) y por

comparación con patrones de tamaños conocidos (Sequamarck TM, Invitrogen). Los resultados de relativos al marcador *QrZAG39* en ambas poblaciones no serán detallados en el presente estudio al presentar 3 alelos en el 24% de los individuos de La Calanchera y de El Brezoso.

La población de El Brezoso se localiza en el término municipal de Alcoba (Ciudad Real). Se trata de un bosque en galería a lo largo del arroyo del mismo nombre en el que los árboles alcanzan grandes diámetros (falta la clase diametral 5-15 cm; *dbh* medio=40,5 ± 13,2 cm) y crecen en una estructura de monte adhesionado. La mayoría de los pies presenta signos de podas y escasas alturas. En la población de El Brezoso, los datos genéticos del proyecto anterior sobre N=99 árboles analizados mediante 7 nSSR en una superficie aproximada de 0,8 ha que habían servido para caracterizar la diversidad genética y la estructura clonal, han sido utilizados en este trabajo para el cálculo de la SGS.

Estimación del esfuerzo reproductor

Con el fin de caracterizar la producción de bellota y polen en cepas y genotipos únicos en la parcela de El Brezoso, se instalaron en septiembre de 2011 dos colectores de semillas de 1 m² de superficie bajo las copas de 20 árboles, la mitad genotipos únicos (GU) y la otra mitad pertenecientes a cuatro cepas (clones) distintas (cuadrados azules y grises en la Figura 1). En otoño de 2011, 2012 y 2013 se recogieron con distinta frecuencia, y en función de la abundancia de la fructificación, las bellotas producidas por cada árbol, contabilizándose su número, su estado de desarrollo, y la incidencia de ataques por insecto. Asimismo, se efectuó una estimación del esfuerzo reproductor masculino de los mismos 20 árboles en los años 2012 y 2013, para lo que se contabilizaron en verano los amentos producidos durante la primavera y recogidos en los mismos colectores. En el laboratorio, a fin de estimar la producción relativa de polen en las dos submuestras de árboles, los amentos fueron secados en estufa a 40°C durante al menos 48 horas hasta obtener el peso seco de la muestra total recogida en cada uno de los colectores. Asimismo, se rea-

lizó el pesado de una submuestra representativa (es decir, amentos de distinta longitud y distinta cantidad de anteras) con el fin de estimar el peso medio por amento.

Caracterización clonal

La caracterización clonal en La Calanchera se ha realizado nuevamente para el conjunto de muestras y marcadores. El gran número de variables alélicas detectado proporciona una elevada confianza estadística para la caracterización individual de los pies y la detección de las cepas. Mediante el *software* GenClone (ARNAUD-HAOND y BELKHIR, 2007) se calculó la probabilidad P_{gen} (corregida por el índice de endogamia) de que dos árboles presenten el mismo genotipo por azar (PARKS y WERTH, 1993; ARNAUD-HAOND *et al.*, 2007). Además, para cada grupo de pies con el mismo genotipo se calculó la probabilidad P_{sex} de pertenecer a un mismo clon (cepa), la cual es función del poder discriminatorio de los marcadores (P_{gen}), del número de pies con igual genotipo y del número de muestras analizadas en cada población (PARKS y WERTH, 1993). En ciertos casos, algunos pies contiguos presentaron genotipos casi idénticos, difiriendo tan sólo en uno de los alelos obtenidos. Tras las pertinentes comprobaciones en el laboratorio (véase VALBUENA-CARABAÑA y GIL, 2013b), se dedujo la existencia de mutaciones somáticas ocurridas durante la división celular en el proceso de rebrote vegetativo experimentado por las cepas. En estos casos, se consideró que dichos pies, aún presentando genotipos multilocus ligeramente diferentes, fueron originados de un mismo linaje o cepa (MLL).

Las dimensiones de las distintas cepas encontradas (considerando los linajes multilocus (MLL) que aparecen en más de un individuo) se establecieron, por un lado, en función del número de pies que las conforman, y por otro, según la superficie que ocupan en el nivel del suelo mediante diversas herramientas de ArcGis (ESRI ArcMap 9.3). La caracterización de las cepas ha permitido evaluar los parámetros de diversidad y estructura genética poblacional de los linajes presentes en las poblaciones evitando el sesgo

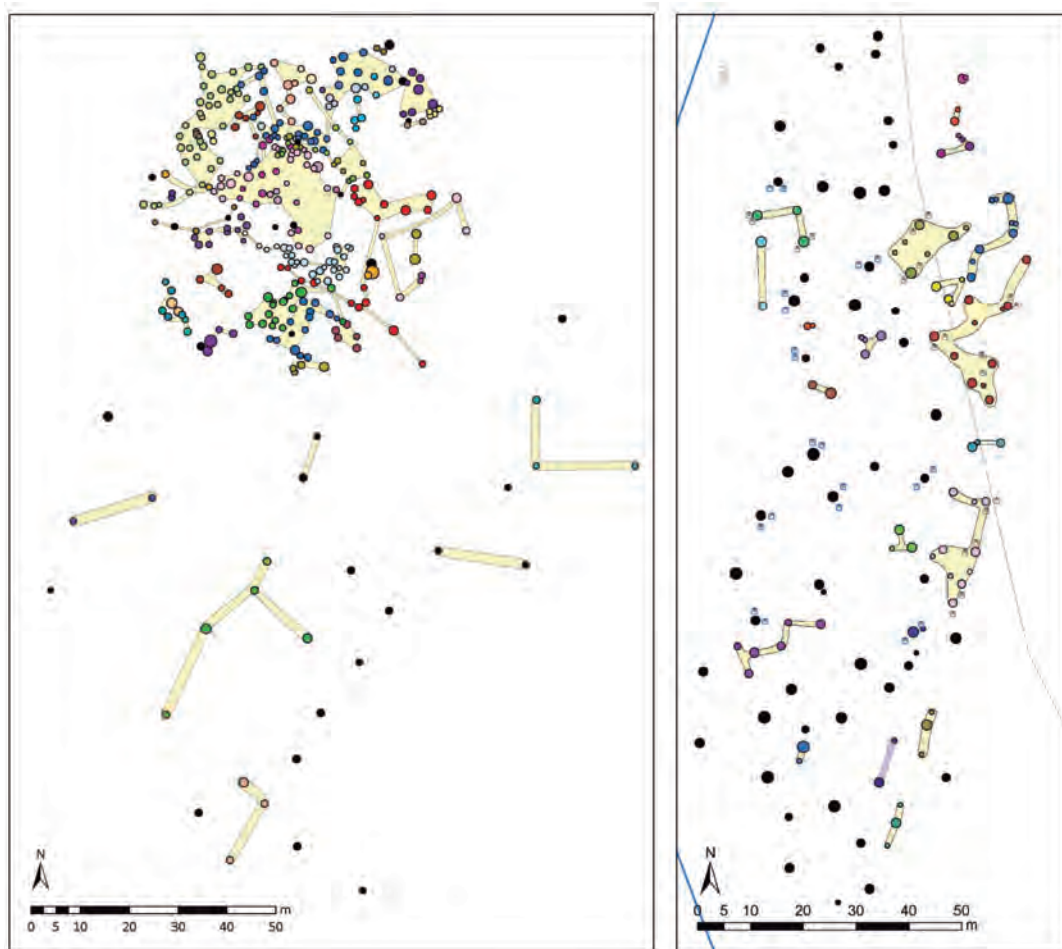


Figura 1. Delimitación clonal en el monte bajo de La Calanchera (izquierda) y en el monte hueco de El Brezoso (derecha). En la Calanchera se observa la zona Norte muestreada con mayor intensidad. Los pies analizados en el resto de la superficie de la parcela son resalvos (identificados por sus mayores diámetros y alturas). A la derecha se observa la parcela de muestreo intenso del monte hueco de El Brezoso, analizada en el proyecto anterior. En ambas parcelas, los círculos negros representan GU y los pies pertenecientes a cepas se representan del mismo color. Además, en la parcela de El Brezoso, se localizan los colectores de semillas.

Figure 1. Clonal distributions in the coppiced stand of La Calanchera (left) and in El Brezoso open woodland (right). The northern area in La Calanchera was more intensively sampled; in the southern area, sampled stems are standard trees identified by their bigger diameters and heights. El Brezoso stand (right) was intensively sampled and analysed in the former project; seed traps installed for the present project are represented by blue and grey squares. In both stands, black circles represent trees with unique genotypes (GU) and stems bearing the same multilocus lineages (clonal clumps) are represented with the same colour.

derivado de la inclusión de todos los individuos muestreados (CHUNG y EPPERSON, 1999). Para los análisis de la SGS (construcción de autocorrelogramas) se han considerado además todos los genotipos repetidos por los diversos *ramet* de un mismo *genet*, para evaluar el efecto de la propagación vegetativa sobre la SGS.

Diversidad genética

Mediante el *software* SpaGeDi 1.2 (HARDY y VEKEMANS, 2002) se han calculado diversos estadísticos relacionados con la diversidad genética (A, número de variables alélicas; He, heterocigosidad; F_{IS} niveles de endogamia) para cada po-

blación, teniendo en cuenta todos los linajes (MLL) detectados, para lo que se seleccionó el genotipo representado por un mayor número de pies, o en caso de igualdad, por el pie de mayor diámetro. Para comparar adecuadamente la riqueza alélica entre ambas poblaciones con distintos tamaños muestrales, se ha realizado un procedimiento de rarefacción mediante el *software* HP-Rare (KALINOWSKI, 2005). Considerando los linajes presentes, y a fin de comparar los valores de diversidad genética en cada tipo de estructura forestal estudiada se ha calculado la densidad de alelos y de linajes por hectárea.

Riqueza genotípica (contribución clonal)

La riqueza genotípica (R) (DORKEN y ECKERT, 2001) refleja el número de genotipos distintos (en términos de linajes multilocus, MLL) en función del número de pies presentes en una población (N) [$R = \text{MLL} - 1 / N - 1$]. El opuesto de este valor (1-R) expresa la contribución del rebrote vegetativo en una muestra determinada. La heterogeneidad clonal es un aspecto fundamental que determina la ecología y la evolución de las poblaciones (ARNAUD-HAOND *et al.*, 2007), de manera que la diversidad genotípica y la heterogeneidad de los clones constituyen dos aspectos que condicionan la diversidad genética global. En este estudio se ha estimado la proporción de genotipos únicos (GU) frente a las cepas formadas por más de un pie con el fin de reflejar adecuadamente la contribución de la reproducción clonal y valorar el estado de vigor o degradación de los individuos en cada población.

Estructura genética espacial

La estructura genética intrapoblacional ha sido determinada para todos los árboles y para los clones (cepas, genotipos) de ambas poblaciones de estudio. Para ello, se han utilizado técnicas de correlación espacial. La relación genética entre pares de individuos dentro de cada población y en función de la distancia que los separa ha sido calculada mediante el estimador de parentesco F_{ij} desarrollado en LOISELLE *et al.* (1995) y que corrige para alelos a bajas frecuencias (o para ta-

maños poblacionales pequeños). Este coeficiente de parentesco mide el co-ancestro entre pares de individuos (i y j) considerando la probabilidad de identidad en estado (*identity by state*, IBS) de los genes muestreados al azar dentro del genoma y relativa a las frecuencias alélicas de una población de referencia. Este coeficiente ha sido calculado para todos los pares de individuos (pies) y de genotipos situados en intervalos de distancia de 10 m para lo que se han utilizado las coordenadas de los pies individuales y las coordenadas centrales de cada clon.

El modelo de aislamiento por distancia (IBD) de WRIGHT (1943) establece que la diferenciación genética de los individuos de una población (SGS) tiene lugar fundamentalmente debido a la restricción en la dispersión de los propágulos (semillas y polen). Bajo este modelo, y dentro de un rango de distancias determinado, el parentesco entre pares de individuos situados en un espacio bidimensional decae de manera aproximadamente lineal con el logaritmo de la distancia (ROUSSET, 1997, 2000; HARDY y VEKEMANS, 1999; HARDY, 2003). Por tanto, la extensión de la estructura genética espacial intrapoblacional (SGS) puede ser estimada a través de la pendiente de la regresión (b) del coeficiente de co-ancestro (F_{ij}) sobre el logaritmo de la distancia. Sin embargo, $b\text{-log}$ es un parámetro sensible al esquema de muestreo realizado, ya que depende de la configuración de la población y las particularidades del muestro (FENSTER *et al.*, 2003; VEKEMANS y HARDY, 2004), por lo que VEKEMANS y HARDY (2004) desarrollaron un estadístico $Sp = -b / 1 - F_1$, donde F_1 es el co-ancestro del vecindario, que reduce el sesgo del muestreo debido a la endogamia de los individuos adyacentes. El estadístico Sp permite, por tanto, comparar la intensidad de la estructura genética espacial entre las poblaciones de *Q. pyrenaica* con distintas densidades (estructuras forestales en monte bajo y monte hueco). Los cálculos de F_{ij} , $b\text{-log}$ y Sp han sido realizados mediante el *software* SPAGeDi (HARDY y VEKEMANS, 2002). Asimismo, la significación de F_{ij} se ha obtenido mediante 10.000 permutaciones de las coordenadas espaciales de los individuos; los intervalos de confianza aproximados de Sp se han construido a partir de los errores estándar de $b\text{-log}$, calcula-

dos mediante un procedimiento de remuestreo (*jackknife*) de los loci, usando el mencionado *software* (VALBUENA-CARABAÑA *et al.*, 2007).

Cálculo de la dispersión histórica sigma

El estadístico S_p , bajo ciertas premisas, equivale a $1/N_b$ (HARDY *et al.*, 2006), el inverso del tamaño de vecindario de WRIGHT (1943) que es una medida sintética del equilibrio entre los procesos de deriva y flujo genéticos. Bajo las asunciones del modelo de aislamiento por distancia –que supone la existencia de un equilibrio entre mutación, migración y deriva genética así como una dispersión isotrópica de los propágulos– el decrecimiento del parentesco con la distancia es inversamente proporcional al producto $D_e \sigma^2$, donde D_e es la densidad efectiva de la población y σ^2 es la distancia axial media al cuadrado de la dispersión parental– regenerado (ROUSSET, 1997). Así, el producto $D_e \sigma^2$ expresa el equilibrio entre la deriva genética y la dispersión, pues para una estructura genética espacial dada, los dos parámetros están inversamente relacionados (ROUSSET, 2004; HARDY *et al.*, 2006). Dentro de un rango de distancias adecuado el producto $D_e \sigma^2$ puede ser inferido mediante la estructura genética espacial (ROUSSET 2001). En el caso de los marcadores microsatélites, y dada su tasa de mutación ($\mu=10^{-3}$ por gameto y generación, véase HEUERTZ *et al.*, 2003), la estimación del producto $D_e \sigma^2$ ha de hacerse entre $\sigma-20\sigma$ (ROUSSET 1997, 2000). Para el cálculo del flujo genético histórico (σ) a partir de *b-log*, se requiere una estimación independiente de la densidad efectiva de la población. Sin embargo, la estimación de D_e ofrece ciertas dificultades ya que no es únicamente el valor de la densidad poblacional (D), sino que depende también de la varianza en el éxito reproductivo de los adultos a lo largo de toda su existencia [$D_e \approx D(N_e/N)$ según VEKEMANS & HARDY (2004)]. Para el cálculo de la dispersión histórica en ambas poblaciones, se han asumido varios valores de densidad efectiva, basados en N_e/N ratios entre 0,1-0,9. La dispersión genética histórica (σ) se estimó mediante un proceso iterativo siguiendo a HEUERTZ *et al.* (2003) a partir de la regresión de la pendiente en toda la extensión muestreada ($b\text{-log}_{TOT}$) que ofrece un valor de dis-

persión inicial (σ'). Posteriormente se calcula *b-log* entre σ' y $20 \sigma'$ que ofrece un nuevo valor de σ' , el cual es utilizado para el cálculo de un nuevo *b-log* que proporciona otro valor de σ' . Este proceso se repite hasta que se consigue la convergencia del parámetro σ' , que proporciona el valor de la dispersión efectiva histórica responsable de la formación de la estructura genética encontrada en la actualidad. Estos cálculos han sido realizados mediante el *software* SPAGeDi (HARDY y VEKEMANS, 2002).

RESULTADOS

Caracterización clonal

El análisis genético de los 81 nuevos árboles de la parcela pequeña (muestreo intensivo) en La Calanchera ha dado como resultado la agrupación de pies en distintos clones, alguno de los cuales no se había detectado en el proyecto anterior (VALBUENA-CARABAÑA y GIL, 2011). La asignación de los diversos pies a una determinada cepa se ha establecido con una elevada confianza estadística (en el peor de los casos, $P_{sex} = 10^{-14}$). La ampliación del muestreo en esta parcela ha ayudado a delimitar las cepas, obteniéndose una visión más precisa del alcance espacial de los clones detectados (Figura 1), alguno de los cuales destaca por su morfología alargada y un intrincado solapamiento espacial. Ambos montes de estudio presentan notables estructuras clonales y una importante heterogeneidad clonal al presentar genotipos formados por un número muy variable de pies que ocupan superficies muy contrastadas. En la Tabla 1 se muestran las dimensiones de las cepas en la parcela de muestreo intensivo de La Calanchera y en la parcela de El Brezoso en función del número medio de pies que presentan (y sus rangos de variación), de la superficie (m^2) que ocupan en el nivel del suelo y de las distancias lineales máximas de separación entre los pies de una misma cepa. En general, las cepas de La Calanchera están formadas por un número mayor de árboles que en El Brezoso. Sin embargo, en lo que respecta a las superficies medias y a las distancias de separación máxima entre pies de la misma cepa, estas diferencias no son tan acusadas.

	Nº medio pies /cepa (rangos)	S ² (m ²)	S ² máx. (m ²)	Dist máx. lineal
La Calanchera (monte bajo)	8,00 (2-34)	30,8	201,1	38,5
El Brezoso (monte hueco)	3,38 (2-8)	25,4	110,7	27,4

Tabla 1. Dimensiones de las cepas. Para cada población se muestran las dimensiones de las cepas en función del número medio de pies (> 5 cm *dbh*) que presentan (y sus rangos de variación), de la superficie (m²) que ocupan en el nivel del suelo y de las distancias lineales máximas de separación entre los pies de una misma cepa.

Table 1. Clonal clumps (stools) characteristics. Measurements of stools in terms of mean number of stems (> 5 cm *dbh*), mean surface at ground level (m²) and maximal lineal distance between stems of the same stool.

Diversidad genotípica y genética

En la Tabla 2 se muestra los parámetros de la diversidad genotípica y genética calculados para cada población, así como una estimación de la densidad de genotipos y alelos. La magnitud del rebrote vegetativo (87% en La Calanchera vs 32% en El Brezoso) y el porcentaje de genotipos únicos (15% en La Calanchera vs 69% en El Brezoso) evidencian las diferencias en la estructura y heterogeneidad clonales entre ambas poblaciones, las cuales se reflejan también en la densidad de genotipos de uno y otro tipo (GU/ha y cepas/ha) en cada parcela (Tabla 2). Así, en el monte hueco de El Brezoso, hay menos cepas que en el monte bajo de La Calanchera, lo que podría indicar mayores niveles de diversidad genética. Sin embargo, teniendo en cuenta la densidad de genotipos totales en una y otra, el monte bajo presenta mayores niveles de diversidad que el monte hueco.

Por otro lado, la diversidad genética es elevada en ambas poblaciones y no existen diferencias marcadas en cuanto a los niveles de heterocigosidad. A pesar de que los niveles de endogamia son ligeramente superiores en El Brezoso, en ninguna de las poblaciones los valores de F_{IS} son significativos. Así, si bien el número de variables alélicas (A) detectado en El Brezoso es ligeramente superior, al realizar una comparación en función del tamaño muestral de cada parcela el número de variables distintas también es superior en el monte bajo (Tabla 2). Teniendo en cuenta las diferencias en densidad, la cantidad de

variables alélicas es muy superior en el monte bajo comparado con el monte hueco.

Estructura genética espacial (SGS)

En lo que respecta a la estructura genética espacial (SGS), la comparación de los dos tipos de montes (La Calanchera, monte bajo y El Brezoso, monte hueco; Figura 1) no ofrece apenas diferencias. En ambos, la SGS es similar en patrón y en magnitud y la presencia de clones incrementa las relaciones de parentesco hasta los 20 metros de distancia (Figura 2). De hecho, aunque en La Calanchera se encuentran más clones que GU, y muchos más que en El Brezoso, las distancias máximas entre pies con el mismo genotipo no son tan diferentes (Tabla 1, Figura 1). Al considerar únicamente los genotipos (MLL), la SGS de La Calanchera es ligeramente inferior a la de El Brezoso; a los 20 metros desaparecen las relaciones de parentesco (no son significativamente superiores a la media), mientras que en El Brezoso son significativamente mayores que la media.

Cálculo de S_p y de la dispersión genética histórica (σ)

Con objeto de comparar ambas poblaciones de estudio, la estructura genética intrapoblacional ha sido además estimada a través del estadístico S_p , que revela resultados muy similares a los proporcionados por los autocorrelogramas. La

Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013

	La Calanchera (monte bajo)	El Brezoso (monte hueco)
Diversidad genotípica		
N (pies > 5cm dbh)	262	99
MLL	34	68
GU	5	47
cepas (clones)	29	21
1-R	0,874	0,316
%GU	15	69
Diversidad genética		
He	0,825	0,813
F_{IS}	-0,008	-0,036
A	92	97
A_{RARE}	9,35	8,54
Densidad		
MLL/ha	108	88
GU/ha	16	61
cepas/ha	92	27
A/ha	260	125

Tabla 2. Diversidad genotípica (clonal) y genética de la cohorte adulta. Número de pies ($dbh \geq 5$ cm) por hectárea (ha), densidad de linajes genéticos (MLL), de pies constituidos por genotipos únicos (GU) y de cepas representadas por más de un pie en dicha cohorte. Contribución del rebrote vegetativo expresado como el opuesto de la riqueza clonal (R) y heterogeneidad clonal representada por la proporción de cepas con más de un pie frente a la de genotipos únicos (GU) en cada parcela. Parámetros de diversidad genética: Heterozigosidad de Nei (He); coeficiente de endogamia (F_{IS}) ($*p < 0.05$); número de alelos (A); número de alelos después de un proceso de rarefacción (A_{RARE}). Densidad de genotipos total (MLL/ha), de genotipos únicos (GU/ha), de cepas (cepas/ha) y de alelos (A/ha) por hectárea en cada monte de estudio.

Table 2. Clonal diversity of the adult cohort. Number of stems ($dbh \geq 5$ cm) per hectare (ha), density of multilocus lineages (MLL), density of genotypes represented by one stem (unique genotypes, GU), and density of stools. Contribution of vegetative resprouting in each population, expressed as the opposite of clonal richness (R), and clonal heterogeneity, expressed by the percentage of unique genotypes. Genetic diversity parameters: Nei's heterozygosity levels (He); inbreeding coefficients (F_{IS}) ($*p < 0.05$); allele numbers (A); number of alleles after a rarefaction procedure (A_{RARE}). Diversity levels in terms of density of total genotypes (MLL), unique genotypes (GU), clonal clumps and alleles per hectare.

mayor estructura genética espacial previamente observada en El Brezoso, queda aquí patente a través de los estadísticos Sp ($Sp_{BR} = 0,00961$), del mismo orden de magnitud en ambas poblaciones, pero ligeramente inferior en La Calanchera ($Sp_{CAL} = 0,00775$). Sin embargo, los intervalos de confianza aproximados, construidos a partir de los errores estándar de b tras un procedimiento de remuestreo (*jackknife*) de los loci, son amplios y solapan en sus valores, por lo que, podría de-

cirse, las diferencias en la magnitud de la estructura genética espacial no son significativas.

El cálculo del flujo genético histórico (estimado por σ) a partir de b -log (la pendiente de la regresión de los coeficientes de parentesco con el logaritmo natural de la distancia) se realizó mediante un procedimiento iterativo que requiere una estimación independiente de la densidad efectiva de la población, para la que se asumieron diversos

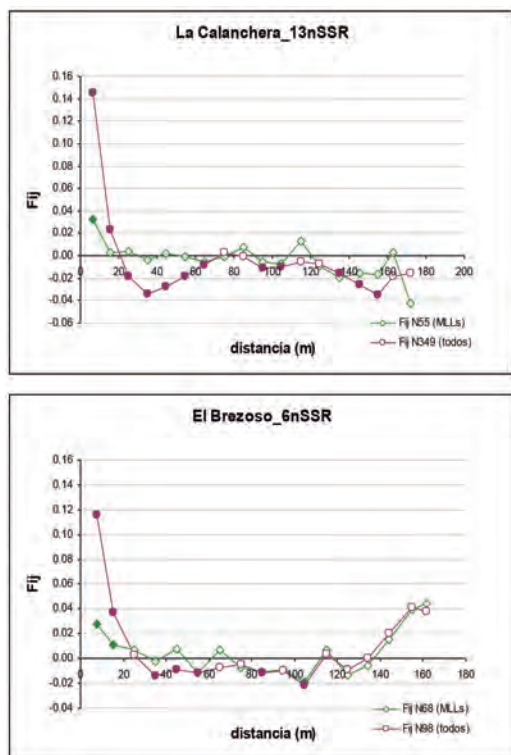


Figura 2. Estructura genética espacial (SGS) de la parcela de La Calanchera (analizada con 13 nSSR) y El Brezoso (analizada con 6 nSSR). En este análisis no se han incluido los datos de *QrZAG39*. Los datos de La Calanchera con 6 nSSR siguen el mismo patrón que el que aquí se representa. Se muestra la relación de los coeficientes de parentesco (F_{ij}) en función de la distancia (clases de 10 m). Las líneas moradas corresponden a todos los árboles analizados, las verdes representan los linajes genéticos (MLL), es decir sólo una copia de cada genotipo.

Figure 2. Spatial genetic structure (SGS) in La Calanchera (analysed by 13 nSSR) and El Brezoso (analysed by 6 nSSR) showing the relation of kinship coefficients (F_{ij}) with distance (10 m distance classes). Purple lines represent all stems analysed; green lines show multilocus lineages (MLL) represented by only one copy of each genotype. Both graphs lack data from primer *QrZAG39*, and La Calanchera shows the same pattern as analysed by 6 nSSR.

valores de densidad efectiva ($D_e=0,1D-0,9D$). En la mayoría de los casos, sobre todo para la parcela de La Calanchera, no se ha conseguido la convergencia del parámetro σ ; tan sólo para valores de D_e entre 0,15D y 0,25D, se han obtenido valores de σ de entre 11,75 m y 8,88 m. En El Brezoso, la con-

vergencia de σ se consiguió para un rango más amplio de valores de D_e (0,05D-0,75D). A fin de comparar resultados, para los mismos valores de D_e entre 0,15D y 0,25D se han obtenido estimaciones de σ entre 8,12 m y 5,77 m, es decir, menores que para La Calanchera. Esta mayor restricción en la dispersión de propágulos en El Brezoso habría producido menores solapamientos de «las sombras de semilla» individuales, produciendo una mayor estructuración espacial de la variabilidad genética en comparación con La Calanchera. No resulta evidente que las relativamente escasas diferencias en la SGS de ambas poblaciones puedan achacarse a las diferencias en la densidad (estructura de la masa) o a las diferencias en la densidad efectiva (capacidad de fructificación), máxime cuando se desconoce si ha habido cambios en la estructura forestal de ambas poblaciones a lo largo de la historia. La comparación con otras poblaciones de la especie podría servir para discutir estos aspectos.

Producción de bellota y polen en cepas y genotipos únicos en El Brezoso

En general, en los tres años de estudio, se ha colectado un número pequeño de bellotas (medias por árbol de 34,4, 38,7 y 93,3 en 2011, 2012 y 2013, respectivamente); cosechas destacables en comparación con las producidas en otros rebollares de *Quercus pyrenaica* del P.N. de Cabañeros aprovechados históricamente en monte bajo (p.ej. en las parcelas de La Calanchera), en donde la fructificación a lo largo de los tres años ha sido prácticamente nula (observaciones propias). A pesar de la existencia de bellotas, hay que destacar que muchas de ellas fueron atacadas por picaduras de insectos e infectadas por sus larvas (principalmente de los géneros *Curculio* y *Cydia*), especialmente en los años 2011 y 2012, donde la fructificación fue muy inferior al año 2013 (Figura 3, izquierda).

En general, la variación interanual en la fructificación fue elevada (Figura 3), especialmente al considerar la producción de 2013, la cual fue superior en un 171% a la de 2011, y en un 141% a la de 2012 (para los GU un 82% y un 115% superior; para los clones 291% y 161%). Asimismo, la pro-

Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013

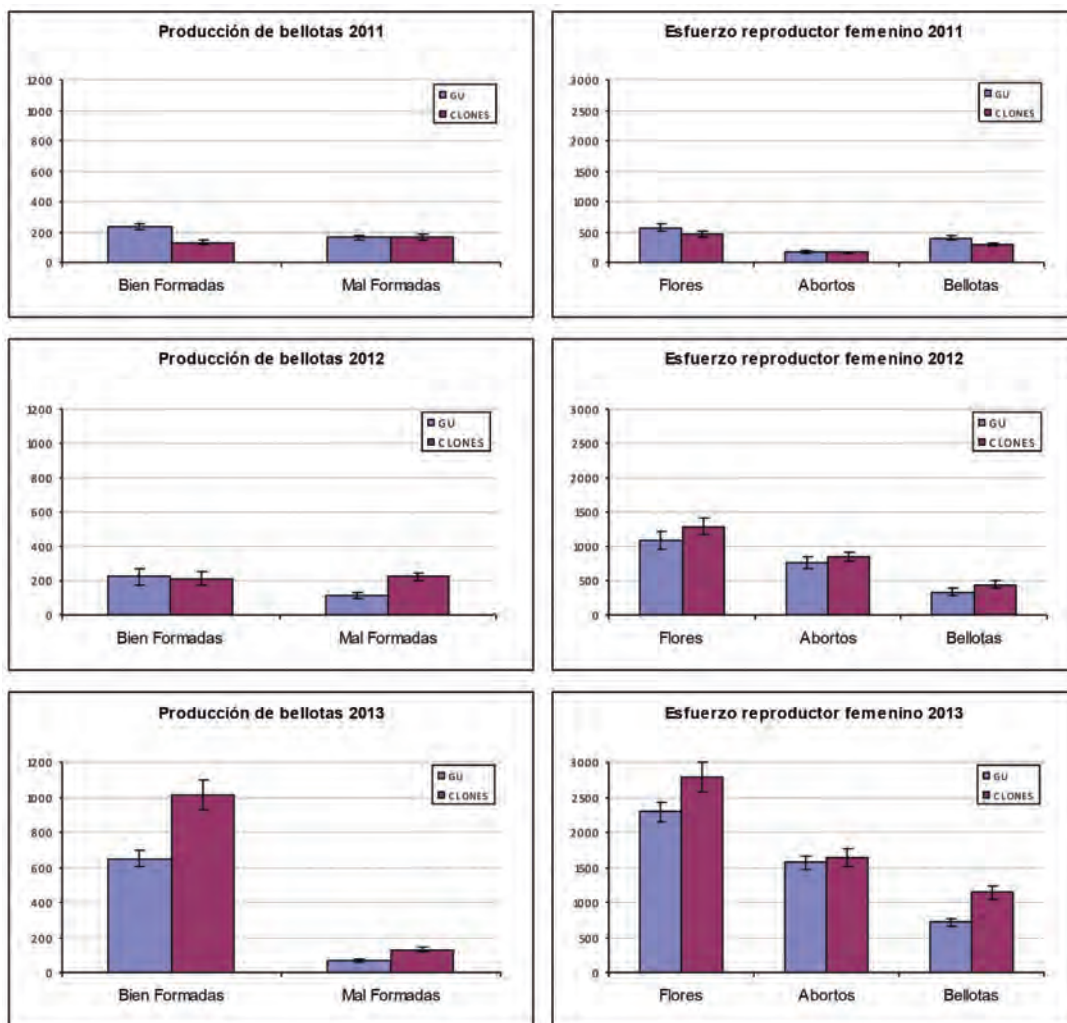


Figura 3. A la izquierda se muestra la producción de bellotas en función de su estado de desarrollo en los tres años de desarrollo del proyecto. Las bellotas mal formadas presentan en la mayoría de los casos evidencias de haber sido atacadas por insectos (principalmente de los géneros *Curculio* y *Cydia*). A la derecha se muestra la producción de frutos global (que engloba a las bellotas bien y mal formadas), la de abortos y la de flores (estimada como suma de las dos anteriores) en los mismos años.

Figure 3. Acorn production according to their development state along the three years of the project (left). Bad-formed acorns are damaged by insect infections (mainly *Curculio* and *Cydia* genus). Total acorn production including well and bad developed ones, total number of aborted seeds and total number of female flowers (estimated by the sum of the two formers in the same year) (right).

porción de abortos respecto del total de flores producidas también experimentó grandes variaciones interanuales (Figura 3, derecha).

Además, la variación entre los distintos árboles analizados es también elevada, tanto más cuanto

mayor es la producción, es decir, mayor en 2013 que en 2012, y en 2011 (Figura 4). Si bien, muchos de los árboles estudiados se han comportado como buenos y malos productores todos los años (Br18, Br44, Br16, Br96, Br66 fructificaron siempre por encima de la media; Br50, Br59, Br63,

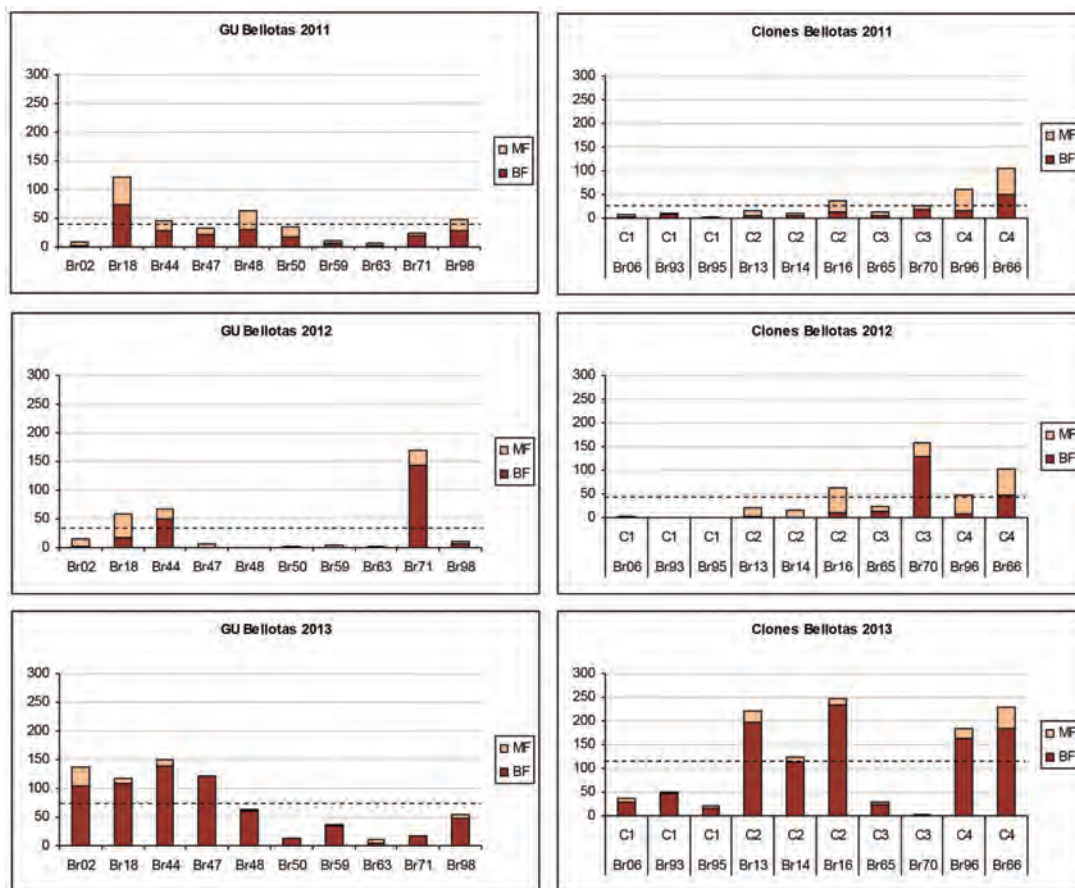


Figura 4. Producción individual de bellotas (en color naranja las bien formadas (BF) y en marrón las mal formadas (MF)) en los tres años de estudio para el grupo de árboles portadores de genotipos únicos (GU) (izquierda) y el grupo perteneciente a los cuatro clones estudiados (C1, C2, C3, C4) (derecha). Se muestra la media por categoría y año (línea horizontal discontinua).

Figure 4. Individual acorn production by tree (orange colour represent well-developed acorns (BF), brown colour show bad-developed ones (MF)) along the three years of the project and for each group of trees (those bearing unique genotypes (GU) (left) and those belonging to four different clonal assemblies (C1, C2, C3, C4) (right). Horizontal lines represent the mean value for each tree group and year.

Br06, Br93, Br95, Br65 por debajo), otros variaron su patrón anual, por lo que, de forma conjunta, no se han podido establecer diferencias en el esfuerzo reproductor femenino de cepas y pies de semilla en esta parcela. Considerando el número total de bellotas, en 2011, los pies portadores de GU mostraron una producción significativamente superior (en un 36%) a la de los pies pertenecientes a cepas; en 2012 las diferencias entre grupos no fueron significativas; y en 2013 el patrón de producción se invirtió, siendo los pies

pertenecientes a cepas mucho más productivos (58%) que los pies de GU (Figura 4, derecha).

Por otro lado, en lo que respecta a la producción de amentos masculinos, la cual no fue estimada en 2011, encontramos un patrón diferenciador (estadísticamente significativo) entre los árboles pertenecientes a cepas y aquellos que presentan GU. Estos últimos produjeron alrededor de un 16% más de amentos ($238 \pm 12g$ en peso seco) que los pies que pertenecen a cepas ($204 \pm 14g$ en

peso seco) en 2012, y un 14% más en 2013 ($477 \pm 11g$ vs $418 \pm 14g$) (Figura 5). En ambos casos, el patrón individual del esfuerzo reproductor masculino fue más homogéneo que el femenino, siendo además la variabilidad entre los pies del mismo clon menor que en el caso de la producción de semillas. Resulta destacable que los pies del Clon 3 tengan un patrón opuesto en el esfuerzo reproductor femenino y masculino.

DISCUSIÓN

Caracterización clonal y diversidad genotípica y genética

La ampliación de la parcela pequeña de La Calanchera ha permitido delimitar las cepas presentes con detalle, obteniéndose una visión más precisa del alcance espacial de los clones detec-

tados (Figura 1), alguno de los cuales destaca por su morfología alargada y un gran solapamiento entre ellos, lo que podría responder al crecimiento de tipo estolonífero de las raíces de *Quercus pyrenaica*, como ya había sido observado en otras parcelas de la especie (VALBUENA-CARABAÑA y GIL, 2013a, b). El entramado de raíces respondería a la intensa historia de aprovechamientos en esta zona, es decir, a numerosos episodios de cortas y rebrotes sobre los mismos individuos, cuyos sistemas radicales alcanzarían edades muy elevadas. Cabe destacar que, entre las catorce parcelas de la especie analizadas por el grupo en la península Ibérica –en el marco de estos y otros proyectos– (VALBUENA-CARABAÑA y GIL, 2013a, b), la de La Calanchera presenta el mayor solapamiento entre cepas y las morfologías más intrincadas. Por otro lado, la tasa de mutación somaclonal en esta parcela es la más elevada de las estudiadas (si bien el número



Figura 5. Producción individual de polen (en mg de peso seco) en dos años (2012 y 2013) para el grupo de árboles portadores de genotipos únicos (GU) (izquierda) y el grupo perteneciente a los cuatro clones estudiados (C1, C2, C3, C4) (derecha). Se muestra la media por categoría y año (línea horizontal discontinua).

Figure 5. Individual pollen production by tree (in mg of dried weight) in two different years (2012 and 2013) produced by trees with unique genotypes (GU) (left) and trees belonging to the four clonal assemblies surveyed (C1, C2, C3, C4) (right). Horizontal lines represent the mean value for each tree group and year.

de marcadores se ha duplicado respecto a otras estudiadas), lo que también es indicativo de la elevada edad de sus cepas. En general, las cepas de La Calanchera ocupan mayores extensiones y están formadas por un número mayor de árboles que en El Brezoso, lo que indica una mayor intensidad de los aprovechamientos en esta parcela (mayor incidencia de cortas a matarrasa) (Tabla 1). Sin embargo, dado que las superficies medias y las distancias de separación máxima entre pies de la misma cepa no son muy distintas en ambas poblaciones, y que la densidad de pies es muy superior en La Calanchera, los niveles de diversidad genotípica (MLL/ha) y genética (A/ha) son mayores en el monte bajo que en el monte adhesionado (Tabla 2).

SGS (autocorrelogramas, Sp, σ)

La comparación de los autocorrelogramas obtenidos en los dos tipos de montes (Figura 2) no ofrece apenas diferencias. En general, los valores del índice de co-ancestro dependen de la muestra y de la escala de muestreo, y es el patrón de decrecimiento del co-ancestro en función de la distancia la característica relevante en la descripción de la estructura genética (HARDY y VEKEMANS, 1999; FENSTER *et al.*, 2003). Las especies anemófilas no presentan en general grandes restricciones en el flujo de polen, el cual constituye el principal factor de homogenización genética entre poblaciones y contrarresta los efectos de la deriva genética y las adaptaciones locales (ENNOS, 1994). A escala local, un decrecimiento pronunciado del co-ancestro a distancias cortas tiene lugar cuando las curvas de dispersión genética siguen una distribución leptokúrtica (HEUERTZ *et al.*, 2003). Este patrón se produce también cuando existen diferencias acusadas en la contribución relativa del polen y la semilla en la dispersión genética, como pueda ser el caso de las especies de roble donde las diferencias en las tasas de dispersión entre poblaciones de uno y otra han sido estimadas en 200:1 (ENNOS, 1994).

Las ligeras diferencias entre La Calanchera y El Brezoso podrían relacionarse con las diferencias en la densidad de individuos (118 genotipos/ha *vs.* 88 genotipos/ha; 832 pies/ha *vs.* 127 pies/ha;

estimaciones a partir de los datos de la parcela de muestreo intensivo), las cuales condicionarían la dispersión de las bellotas, reduciéndose esas distancias en la parcela más densa en comparación con la menos densa. Sin embargo, la larga e intensa historia de aprovechamientos de estos montes (evidenciada por la presencia de clones en el monte hueco, y el notable solapamiento de las cepas y la pertenencia de varios resalvos al mismo clon en el monte bajo; Figura 1) y el gran obstáculo que supone el modo de reproducción vegetativa de *Q. pyrenaica* en la determinación del origen de sus individuos (las cohortes de edad y diámtricas no están necesariamente relacionadas) dificulta la interpretación de la situación en la que tuvo lugar la regeneración sexual (germinación de la bellota) de los genotipos que hoy en día observamos.

La dispersión efectiva de las bellotas de *Q. pyrenaica*, muchas veces mediada por animales, es heterogénea y dependiente de las características del hábitat (GÓMEZ *et al.*, 2003; VALBUENA-CARABAÑA *et al.*, 2005; PEREA *et al.*, 2011). En Montejo, monte hueco con escasa densidad de adultos (<10/ha) el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) constituye el mayor movilizador y consumidor de bellotas, pero también el mayor facilitador de la regeneración efectiva al abandonar un porcentaje notable de las despensas enterradas (PEREA *et al.*, 2011). Mediante el marcaje y seguimiento de bellotas se ha comprobado que son responsables de movilizaciones de hasta 132 m (PEREA *et al.*, 2011), pudiéndoseles también achacar distancias de dispersión efectivas de más de 350 m detectadas mediante análisis de parentesco (VALBUENA-CARABAÑA *et al.*, 2005). En esta misma población, aunque se detectaron pocos eventos de dispersión primaria efectiva atribuibles al movimiento de las bellotas desde las copas de los árboles sin mediación de agentes dispersores (VALBUENA-CARABAÑA *et al.*, 2005), las distancias medias de dispersión efectiva para *Q. pyrenaica* fueron relativamente cortas (14 m). La estructura de la masa puede condicionar la dispersión de las semillas al afectar el comportamiento de los dispersores. La variación de dicha estructura en el tiempo condicionaría cambios en los flujos genéticos de una manera imposible de precisar.

Las escasas diferencias en la estructura genética espacial en los dos tipos de montes se evidencian al comparar los estadísticos Sp ($Sp_{BR}=0,00961$; $Sp_{CAL}=0,00775$), los cuales no son significativamente diferentes entre sí a pesar del contraste entre sus estructuras forestales actuales. Al comparar estos valores con los de otras dos poblaciones de la especie localizadas en el Sistema Central y manejadas durante siglos como dehesas boyales a muy bajas densidades, las diferencias en el estadístico Sp ($Sp_{MONTEJO}=0,01268$; $Sp_{SOMOSIERRA}=0,01355$) podrían achacarse a las diferencias en la densidad de adultos (VEKEMANS y HARDY, 2004; HARDY *et al.*, 2006; VALBUENA-CARABAÑA *et al.*, 2008). En este sentido, el mayor contraste entre las dos dehesas boyales del Sistema Central respecto al monte hueco y el monte bajo de Cabañeros podría indicar la existencia en el pasado de estructuras forestales más similares para ambas poblaciones que la que se observan en la actualidad. Es decir, estos resultados podrían apuntar a una evolución del monte hueco de El Brezoso desde una estructura más densa y cerrada a la actual, similar a la que presenta La Calanchera. La presencia de clones en El Brezoso evidencia la incidencia de cortas a matarrasa en la historia reciente de la población, lo que apoyaría el posible origen de la masa desde un monte bajo. La escasa documentación histórica disponible podría apuntar en este sentido (véase Anexo en VALBUENA-CARABAÑA *et al.*, 2011).

Por otro lado, como ha sido previamente apuntado, es la densidad efectiva de adultos reproductores (y no la densidad total, VEKEMANS y HARDY, 2004) el factor que determina las características del tamaño del vecindario. Para una SGS determinada, y considerando los mismos ratios D_e/D en ambas poblaciones (entre 0,15 y 0,25), los valores del parámetro σ que explicarían la SGS en cada población serían mayores en La Calanchera (σ entre 11,75 m y 8,88 m) que en El Brezoso (8,12 m y 5,77 m). Si las densidades observadas hoy en día fueran similares o proporcionales a las históricas, una mayor restricción en la dispersión en El Brezoso habría producido menores solapamientos de «las sombras de semilla» individuales, explicándose así la mayor estructuración espacial de la variabilidad genética en comparación con La Calanchera. Sin embargo, unas tasas de fructificación

histórica similares a las actuales (nula en La Calanchera en comparación con El Brezoso) no podrían explicar las diferencias encontradas en sus SGSs, pues la D_e de El Brezoso sería muy superior a la de La Calanchera y, por tanto, se habría encontrado una SGS mucho menor en comparación. Este rasgo podría estar indicando asimismo la incidencia de cambios históricos en las tasas de reproducción en ambas poblaciones, las cuales podrían haber sido más similares entre sí que las que se observan actualmente. Por tanto, estos resultados también son consistentes con unas estructuras forestales originales más similares entre sí que las observadas en la actualidad, es decir, también apuntan a un origen desde una estructura en monte bajo para la población de El Brezoso.

No obstante, las diferencias en el esfuerzo reproductor de los individuos (varianza entre individuos) de una población también contribuye a reducir el tamaño poblacional efectivo, y por tanto la D_e (VEKEMANS y HARDY, 2004), por lo que la presencia de un número reducido de individuos reproductores podría ser el causante de la reducida SGS observada en el monte bajo de La Calanchera. En este sentido, a pesar del tratamiento en monte bajo de La Calanchera (su habitual estructura densa y la escasez de individuos formadores de semillas), la elevada diversidad genotípica (en densidad de genotipos distintos por hectárea) de La Calanchera (y de otros montes bajos) así como las diferencias en la superficie que ocupan los clones podrían explicarse por la incorporación ocasional pero frecuente de nuevos efectivos en la población. La aportación de semillas desde algún resalvo más o menos distante y de forma continuada a lo largo de la historia de los montes bajos explicaría por un lado la gran densidad de genotipos/ha encontrada generalmente en los montes bajos de la especie (VALBUENA-CARABAÑA y GIL, 2013a) y por otro la escasa estructura genética espacial de la población de La Calanchera.

Esfuerzo reproductor de cepas y pies con GU

La variación interanual e interindividual en la fructificación de los pies pertenecientes a cepas y los portadores de genotipos únicos (GU) fue ele-

vada a lo largo de los tres años de estudio (Figura 3). Distintas condiciones meteorológicas podrían haber contribuido a las diferencias interanuales en la fructificación total, como se ha mostrado en otros estudios del género (PÉREZ-RAMOS *et al.*, 2010). Sin embargo, la ausencia de un patrón interindividual condiciona el carácter insuficiente de los resultados de este trabajo, mediante el que se pretendía establecer las posibles diferencias en el esfuerzo reproductor femenino de cepas y pies de semilla. En este sentido, unos análisis realizados en 2013 sobre el contenido en azúcares no estructurales (TNC) (glucosa y almidón) de los ramillos de cada árbol no mostraron ninguna diferencia significativa entre los dos grupos de árboles, ni tampoco mostraron correlación con la fructificación individual para ese año (datos no mostrados). Tampoco otras características individuales como el diámetro del tronco o la superficie de proyección de las copas mostraron correlación con la producción individual en ninguno de los tres años de estudio (datos no mostrados). Todos estos datos sugieren la necesidad de ampliar el número de campañas para evaluar correctamente la posible existencia de un patrón diferenciador entre unos y otros. La existencia de un compromiso (*trade-off*) entre la reproducción asexual y sexual puede ser muy difícil de evaluar cuando ambos fenómenos no se producen de forma natural, sino que son dependientes del manejo forestal. La disponibilidad de recursos dentro de cada monte podría ser el factor determinante de las diferencias en la fructificación. Estudios recientes en un monte bajo muestran que el tamaño de las cepas tiene una influencia destacada en el crecimiento en diámetro de los pies que la componen: los pies de cepas más grandes

crecen menos (SALOMÓN *et al.*, 2013); y también en el coste respiratorio de los sistemas radicales: consumen más las raíces de los árboles pertenecientes a cepas más grandes (SALOMÓN *et al.*, *en preparación*). Estos resultados apuntan a un desequilibrio causado por un alto coste de mantenimiento de unos sistemas radicales desproporcionados respecto a las partes aéreas fotosintetizadoras que los sustentan, lo que podría explicar la degradación generalizada de estas masas en términos de crecimiento y producción de frutos.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer la colaboración de todo el personal del Parque Nacional de Cabañeros, en especial a Ángel Gómez Manzaneque por su buena disposición y colaboración siempre que ha sido necesaria. Agradecemos especialmente a Elena Zafra las labores de análisis genéticos en el laboratorio y el esfuerzo realizado en el conteo de bellotas y amentos. A Jesús Alonso, Paloma Gallego, Guillermo González, Roberto Salomón, Juan, Duna y Noa Valbuena, Mario Zabal y Elena Zafra por su ayuda en la recolección de bellotas y amentos en campo. Además a Paula Guzmán, Matías Milleron, César Otero, Aida Rodríguez, Mario Zabal y Elena Zafra por el montaje e instalación de los colectores de semillas y otros trabajos de campo, como el muestreo de TNC. Este trabajo ha contado con la financiación del Organismo Autónomo de Parques Nacionales, dependiente del Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente a través de los proyectos 030/2007 y 047/2010.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNAUD-HAOND, S. & BELKHIR, K. 2007. Genclone 1.0: a new program to analyse genetics data on clonal organisms. *Molecular Ecology Notes* 7: 15-17.
- ARNAUD-HAOND, S., DUARTE, C.M., ALBERTO, F. & SERRÃO, E.A. 2007. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology* 16: 5115-5139.
- BARRENECHE, T., BODENES, C., LEXER, C., TRONTIN, J.-F., FLUCH, S., STREIFF, R., PLOMION, C., ROUSSEL, G., STEINKELLNER H., BURG, K., FAVRE, J.-M., GLÖSSL, J. & KREMER, A. 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1090-1103.

Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013

- BRAVO, J.A., ROIG, S. & SERRADA, R. 2008. Selvicultura en montes bajos y medios de *Q. ilex* L., *Q. pyrenaica* Willd. y *Q. faginea* Lam. En: R. Serrada, G. Montero & J.A. Reque (eds.) Compendio de Selvicultura Aplicada en España. pp 657-744. INIA y FUCOVASA. Madrid.
- BURCZYK, J., ADAMS, W.T. & SHIMIZU, J.Y. 1996. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon.) stand. *Heredity* 77: 251-260.
- BURCZYK, J., ADAMS, W.T., MORAN, G.F. & GRIFFINS, A.R. 2002. Complex patterns of mating revealed in *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. *Molecular Ecology* 11: 2379-2391.
- CHUNG, M.G. & EPPERSON, B.K. 1999. Spatial genetic structure of clonal and sexual reproduction in populations of *Adenophora grandiflora* (*Campanulaceae*). *Evolution* 53: 1068-1078.
- CHUNG, M.Y., CHUNG, G.M., CHUNG, M.G. & EPPERSON, B.K. 1998. Spatial genetic structure in populations of *Cymbidium goeringii* (*Orchidaceae*). *Genes and Genetic Systems* 73: 281-285.
- DÍAZ, M., ALONSO, C.L., BEAMONTE, E., FERNÁNDEZ, M. & SMIT, C. 2011. Desarrollo de un protocolo de seguimiento a largo plazo de los organismos clave para el funcionamiento de los bosques mediterráneos. En: L. Ramírez & B. Asensio (eds.) *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales: 2007-2010*. pp 47-75. OAPN, Madrid. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, Madrid.
- DORKEN, M.E. & ECKERT, C.G. 2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (*Lythraceae*). *Journal of Ecology* 89: 339-350.
- DOW, B.D. & ASHLEY, M.V. 1998. Factors influencing male success in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *New Forest* 15: 161-180.
- DUCOUSSO, A., MICHAUD, H. & LUMARET, R. 1993. Mating system and gene flow in oak species. *Annales des Sciences Forestières* 50: 91s-106s.
- EL-KASABBY, Y.A. & JAQUISH, B. 1996. Population density and mating mating patten in western larch. *Journal of Heredity* 87: 438-443.
- EL-KASABBY, Y.A., DUNSWORTH, B.G. & KRAKOWSKI, J. 2003. Genetic evaluation of alternative silvicultural systems in coastal montane forest: western hemlock and amabilis fir. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 598-610.
- ENNOS, R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250-259.
- EPPERSON, B.K. 1990. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. En: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir (eds.) *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. pp. 229-253. Sinauer Associates Inc. Sunderland MA.
- EPPERSON, B.K. 1992. Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. *New Forests* 6: 257-278.
- FENSTER, C.B., VEKEMANS, X. & HARDY, O.J. 2003. Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (*Leguminosae*). *Evolution* 57: 995-1007.
- GÉRARD, P.R., KLEIN, E.K., AUSTERLITZ, F., FERNÁNDEZ-MANJARRÉS, J.F. & FRASCARIA-LACOSTE, N. 2006. Assortative mating and differential male mating success in an ash hybrid zone population. *BMC Evolutionary Biology* 6: 96.
- GÓMEZ, J.M., GARCÍA, D. & ZAMORA, R. 2003. Impact of vertebrate acorn- and seedling predators on a Mediterranean *Quercus pyrenaica* forest. *Forest Ecology and Management* 180: 125-134.
- HANDEL, S.N. 1985. The intrusion of clonal growth patterns on plant breeding systems. *American Naturalist* 125: 367-384.
- HARDY, O.J. 2003. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology* 12: 1577-1588.
- HARDY, O.J. & VEKEMANS, X. 1999. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation and population genetics models. *Heredity* 83: 145-154.
- HARDY, O.J. & VEKEMANS, X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618-120.

- HARDY, O.J., MAGGIA, L., BANDO, E., BREYNE, P., CARON, H., CHEVALLIER, M.-H., DOLIGEZ, A., DUTECH, C., KREMER, A., LATOUCHE-HALLÉ, C., TROISPOUX, V., VERON, V. & DEGEN, B. 2006. Fine scale genetic structure and gene dispersal inferences in ten neotropical tree species. *Molecular Ecology* 15: 559-571.
- HEUERTZ, M., VEKEMANS, X., HAUSMAN, J.-F., PALADA, M. & HARDY, O.J. 2003. Estimating seed versus pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Molecular Ecology* 12: 2483-2495.
- HEYWOOD, J.S. 1991. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 335-355.
- JORDANO, P. & HERRERA, C.M. 1995. Shuffling the offspring: uncoupling and spatial discordance of multiple stages in vertebrate seed dispersal. *Ecoscience* 2: 230-237.
- KALINOWSKI, S.T. 2005. HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes* 5:187-189.
- LOISELLE, B.A., SORK, V.L., NASON, J. & GRAHAM, C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82: 1420-1425.
- MALÉCOT, G. 1950. Quelques schémas probabilistes sur la variabilité des populations naturelles. *Annales de l'Université de Lyon A*, 13: 37-60.
- MURAWSKI, D.A., GUNATILLEKE, I.A.U.N. & BAWA, K.S. 1994. The effect of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. *Conservation Biology* 8: 1002.
- O'CONNELL, L.M., RUSSELL, J. & RITLAND, K. 2004. Fine-scale estimation of outcrossing in western redcedar with microsatellite assay of bulked DNA. *Heredity* 93: 443-449.
- O'CONNELL, L.M., MOSSELER, A. & RAJORA, O.P. 2006. Impacts of forest fragmentation on the mating systems and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97:418-426.
- PARKS, J.C. & WERTH, C.R. 1993. A study of spatial features of clones in a population of Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany* 80: 537-544.
- PEREA, R., SAN MIGUEL, A. & GIL, L. 2011. Acorn dispersal by rodents: the importance of re-dispersal and distance to shelter. *Basic and Applied Ecology* 12: 432-439.
- PEREA, R., SAN MIGUEL, A. & GIL, L. 2014. Interacciones planta-animal en la regeneración de *Quercus pyrenaica*: ecología y gestión. *Ecosistemas* 23: 18-26.
- PÉREZ-RAMOS, I.M., OURCIVAL, J.M., LIMOUSIN, J.M. & RAMBAL, S. 2010. Mast seeding under increasing drought: results from a long-term data set and from a rainfall exclusion experiment. *Ecology* 91: 3057-3068.
- PULIDO, F.J. & DÍAZ, M. 2005. Regeneration of a Mediterranean oak: a whole-cycle approach. *Ecoscience* 12: 92-102.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J., ALÍA, R. & GIL, L. 2004. Increased delving and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Molecular Ecology* 13: 2567-2577.
- ROUSSET, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.
- ROUSSET, F. 2000. Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 58-62.
- ROUSSET, F. 2001. Inference from spatial population genetics. En: D. Balding, M. Bishop, C. Cannings (eds.) *Handbook of Statistical Genetics*. pp. 239-269. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- ROUSSET, F. 2004. *Genetic Structure and Selection in Subdivided Populations*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 288 pp.

Proyectos de investigación en parques nacionales: 2010-2013

- RUIZ DE LA TORRE, J. 2006. Flora Mayor. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Dirección General para la Biodiversidad. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid. 1756 pp.
- SALOMÓN, R., VALBUENA-CARABAÑA, M., GIL, L. & GONZÁLEZ-DONCEL, I. 2013. Clonal structure influences stem growth in *Quercus pyrenaica* coppices: bigger is less vigorous. *Forest Ecology and Management* 296: 108-118.
- SALOMÓN, R., VALBUENA-CARABAÑA, M., RODRÍGUEZ-CALCERRADA, J., GIL, L. & GONZÁLEZ-DONCEL, I. Xilem CO₂ fluxes in root sprouted oak stems: the effect of clonal size in a sub-Mediterranean abandoned coppice, *en preparación*.
- SAN MIGUEL, A., PEREA, R., ROIG, S. & FERNÁNDEZ-OLALLA, M. 2011. Capítulo 6. Bosque y matorral mediterráneo continental. En: Montes, C.; Santos, F.; Benayas, J. (Coord.). La Evaluación de los Ecosistemas del Milenio de España. Síntesis de resultados. pp. 236-239. Fundación Biodiversidad. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino.
- SERRADA, R., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ, C., MARCHAL, B., SAN MIGUEL, A. & TOLOSANA, E. 1994. Dasometric classification and alternative silvopastoral uses of rebollo oak (*Quercus pyrenaica* Willd.) stands in Madrid. Design of a pilot project. *Investigación Agraria Sistemas y Recursos Forestales. Fuera de Serie* 3: 79-88.
- VALBUENA-CARABAÑA, 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.
- VALBUENA-CARABAÑA, M., GONZÁLEZ MARTÍNEZ, S.C., HARDY, O.J. & GIL, L. 2007. Fine-scale spatial genetic structure in mixed oak stands with different levels of hybridization. *Molecular Ecology* 16: 1207-1219.
- VALBUENA-CARABAÑA, M., GONZÁLEZ MARTÍNEZ, S.C. & GIL, L. 2008. Coppice forests and genetic diversity: A case study in *Quercus pyrenaica* Willd. from Central Spain. *Forest Ecology and Management* 254: 225-232.
- VALBUENA-CARABAÑA, M. & GIL, L. 2011. Evaluación de la estructura genética de poblaciones marginales de *Quercus pyrenaica* Willd. y su evolución. Implicaciones para la conservación de sus recursos genéticos. En: L. Ramírez & B. Asensio (eds.) *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales: 2007-2010*. pp 175-204. OAPN, Madrid. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, Madrid.
- VALBUENA-CARABAÑA, M. & GIL, L. 2013a. ¿Reduce el aprovechamiento en monte bajo de *Quercus pyrenaica* Willd. sus niveles de diversidad genética?. En: *Actas 6º Congreso Forestal Español*. Ref: 01-244.
- VALBUENA-CARABAÑA, M. & GIL, L. 2013b. Genetic resilience in a historically profited root sprouting oak (*Quercus pyrenaica* Willd.) at its southern boundary. *Tree Genetics and Genomes* 9: 1129-1142.
- VALBUENA-CARABAÑA, M. & GIL, L. 2014. Efectos de la gestión selvícola pasada y presente sobre la diversidad genética actual y futura de *Quercus pyrenaica* Willd. en Sierra Nevada. *Ecosistemas* 23: 90-98.
- VEKEMANS, X. & HARDY, O.J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 13: 921-935.
- VERDÚ, M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C., MONTILLA, A.I., MATEU, I. & PANNELL, J.R. 2006. Ovule discounting in an outcrossing, cryptically dioecious tree. *Evolution* 60: 2056-2063.
- WELLS, G.P. & YOUNG, A.G. 2002. Effects of seed dispersal on spatial genetic structure in populations of *Rutidosis leptorrhychoides* with different levels of correlated paternity. *Genetical Research* 79: 219-226.
- WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- ZHANG, Y. & ZHANG, D. 2007. Asexual and sexual reproductive strategies in clonal plants. *Frontiers of Biology in China* 2: 256-262.

