

**VI. LA CONSERVACIÓN GENÉTICA
DE LAS ESPECIES VEGETALES
AMENAZADAS**

Pedro Sosa, Francisco J. Batista, Miguel Á. González y Nieves Bouza

1. INTRODUCCIÓN

Paralelamente al incremento en importancia que están adquiriendo los programas de conservación biológica y los planes de recuperación de especies amenazadas, se ha generado una gran controversia respecto al peso específico que cada una de las disciplinas implicadas deben tener en los esfuerzos de conservación. Con respecto al área de la Genética, diversos autores (FALK & HOLSINGER, 1991) sugieren que la distribución de la variabilidad genética en las especies vegetales es un aspecto clave y fundamental en las estrategias de conservación, mientras que otros (HOLSINGER & GOTTLIEB, 1991; LANDE, 1988) consideran que esa importancia es relativa sobretudo en poblaciones de gran tamaño y donde el manejo activo de las mismas considerando la estructura genética requeriría un enorme esfuerzo, elevados costes y gran experiencia para poder llevarse a cabo.

No es objetivo del presente capítulo aumentar y avivar esta discusión, ya que se han argumentado abundantemente las principales razones por las cuales la conservación genética sigue siendo un aspecto considerablemente importante en la Biología de la conservación de especies amenazadas (FRANKEL et al., 1995; AVISE & HAMRICK, 1996; FRANCISCO-ORTEGA et al., 2000; SOSA, 2001). Indiscutiblemente la variabilidad genética, como componente de la diversidad biológica, debe gozar y disponer de las mismas razones e importancia a la hora de promover estudios y actuaciones encaminados a su conservación. Además, es la variabilidad genética la que le confiere eficacia biológica a la especie, y le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Por lo tanto, es un recurso biológico que debe conservarse con el fin de mantener la especie a largo plazo. También existen razones evolutivas: la existencia de variabilidad genética permite actuar a la Selección Natural, y por lo tanto se alza como la materia prima sobre la cual se producen los procesos evolutivos. Finalmente, existen razones económicas: Una pequeña fracción de los genes constituyen un recurso potencial en la mejora de la productividad de otras poblaciones o especies.

2. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES NATURALES

Una de las características universales que presentan las poblaciones naturales de los organismos es la diferenciación fenotípica y morfológica respecto a los distintos caracteres. Medir y caracterizar la diversidad genética a través de las variantes morfológicas, aunque es factible, presenta el principal inconveniente de que el fenotipo es el resultado de la acción conjunta del genotipo y el medio ambiente, por lo que en muchos casos desconocemos en que medida la variedad observable en la especie se debe a factores genéticos y no ambientales. Así, organismos con idéntico genotipo, en distintas condiciones ambientales, pueden presen-

tar diferente fenotipo, y viceversa, organismos con diferente genotipo, en las mismas condiciones ambientales, pueden presentar el mismo fenotipo para un determinado carácter.

Asimismo, la determinación y estudio del genotipo a través de la observación y el análisis de variantes morfológicas es un proceso que requiere cruces controlados bajo condiciones ambientales homogéneas y estrictas, al mismo tiempo que demanda la caracterización de la descendencia resultante y la determinación del mecanismo de herencia de los caracteres en estudio. Además, no siempre es factible realizar tales cruces controlados y en ocasiones, sobre todo en especies arbóreas, la obtención de descendencia necesita un período de tiempo extremadamente largo. Así, por ejemplo en la palmera canaria *Phoenix canariensis* los individuos no presentan su primera floración hasta los cuatro años, y alcanzar un estadio adulto puede requerir periodos de tiempo mucho más prolongados. Además, muchas de las variaciones fenotípicas observadas en las poblaciones naturales no presentan una segregación Mendeliana simple, debido a las influencias medioambientales, las cuales pueden ser suficientemente fuertes como para enmascarar la segregación genética. A ello se une el hecho de que la mayoría de los caracteres morfológicos están controlados por múltiples genes (poligénica) por lo que su estudio resulta extremadamente complejo, con escasas posibilidades de determinar los efectos separadamente.

Finalmente, la variación de la mayoría de los caracteres morfológicos aparece como diversidad fenotípica continua, más que como clases fenotípicas discretas. En otras palabras, la variación es cuantitativa y, por lo tanto, la medición del grado de variación genética se debe abordar con metodologías diferentes.

Otra forma de analizar e incluso medir la diversidad genética de los individuos, poblaciones y especies es a través de las técnicas moleculares. Estas permiten determinar directamente la variación genética que se produce a nivel de ADN pudiéndose llegar a observar, describir y analizar las diferencias existentes en las secuencia de nucleótidos. Sin embargo, varían en la forma en que resuelven las diferencias genéticas, en el tipo de datos que generan según los niveles taxonómicos que son más adecuados de aplicar, y en sus requerimientos técnicos y económicos.

La aplicación de los marcadores moleculares en la resolución de los problemas genéticos es un campo en auge permanente que se ha desarrollado y acelerado en los últimos años gracias a la tecnología de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Un marcador molecular ideal para establecer estudios de genética de poblaciones debe cumplir con un conjunto de requisitos. En primer lugar debe ser polimórfico, es decir variable, de forma que podamos detectar diversidad entre los individuos y las poblaciones comparadas ya que la igualdad o inexistencia de variación impediría establecer análisis genético alguno. En segundo lugar, debe ser codominante, de tal forma que todos los alelos de un gen puedan ser detectables, evitándose así los enmascaramientos producidos por la dominancia. También, debe distribuirse ampliamente a lo largo del genoma del organismo en cuestión, de manera que su análisis y variabilidad sean representativos de todo el genoma de la especie. Además, es importante que su detección y aplicación sea rápida, eficaz y no excesivamente costosa. Desafortunadamente, y debido sobre todo a la amplitud y complejidad del genoma de los organismos vegetales, actualmente no existe un marcador molecular que cumpla con todos y cada uno de estos condicionantes. En el presente capítulo profundizaremos exclusiva

mente en dos de las técnicas moleculares que empleamos con más asiduidad en nuestro laboratorio para caracterizar la variabilidad genética de especies amenazadas: las isoenzimas y el análisis de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

2.1. ISOENZIMAS

Fueron descritas por primera vez por MARKERT & MÖLLER (1959) quienes la definieron como las múltiples formas que dispone una enzima con la misma actividad catalítica específica pero con diferentes propiedades cinéticas, estructurales y por tanto, con diferente coeficiente de migración en un campo eléctrico. El análisis isoenzimático se realiza a través de las técnicas de electroforesis, las cuales consisten en la separación de las proteínas existentes en un mismo individuo o tejido debido a la diferente relación carga/masa de las mismas. Desde entonces, el término isoenzima ha sido utilizado con diferentes sentidos, tanto para referirse al número total de bandas observadas, sin ninguna interpretación genética, como para asignar los productos de diferentes loci exclusivamente. Actualmente, se utiliza el término isoenzima para referirse a las diferentes formas de una enzima producidas por diferentes loci, mientras que el término aloenzima se refiere a las diferentes formas enzimáticas consecuencia de las variantes alélicas de un mismo locus (PRAKASH et al., 1969; KEPHART, 1990).

El análisis isoenzimático en genética de poblaciones es una técnica clásica, que aunque en cierta forma ha sido sustituida por nuevas técnicas de análisis, aún mantiene un papel muy relevante en la caracterización genética de las poblaciones naturales vegetales. De hecho, en una reciente revisión de la literatura científica de mayor índice de impacto de los últimos dos años se encuentran más de 300 artículos que han empleado la electroforesis isoenzimática para caracterizar la variabilidad genética de poblaciones vegetales (MATOLWENI et al., 2000; HANNAN & ORICK, 2000; PREMOLI et al., 2000; SZALANSKI et al., 2001).

Existen diversos tratados, manuales y libros dedicados exclusivamente a la aplicación de estas técnicas en vegetales describiendo la infraestructura necesaria, la forma de proceder, los productos a utilizar, así como sus ventajas y desventajas en el análisis genético (TANKSLEY & ORTON, 1983; SOLTIS & SOLTIS, 1989; HOELZEL, 1992; HILLIS et al., 1996). Por ello y en nuestro caso nos limitaremos a describir brevemente algunas consideraciones relevantes, dirigiendo al lector a estos manuales.

Uno de los pasos más importantes en el uso de la electroforesis isoenzimática en vegetales es la extracción de las proteínas de la muestra biológica. Para ello, se debe partir de tejidos frescos, lo cual limita considerablemente el alcance del muestreo. Obviamente, la capacidad de mantener individuos vivos depende de las instalaciones disponibles. En nuestro laboratorio y debido a la carencia de tales instalaciones las muestras recogidas el mismo día son almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin observarse degradación enzimática por largos períodos de tiempo, lo cual nos permite disponer de las mismas hasta un año después de su recolección. En este sentido, el almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en general nos ha proporcionado pobres resultados, ya que la pérdida de actividad enzimática es en muchas ocasiones dramática. Por otro lado, en especies con tejidos poco hidratados (como las hojas de palmera), las proteínas se mantienen casi inalterables cuando se almacenan a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y sin congelación, por tiempo superior a 5 días.

Sin embargo, pocas generalidades deben hacerse con respecto al almacenamiento de las muestras, ya que el proceso más óptimo debe determinarse de manera empírica para cada especie.

La complejidad del tampón de extracción empleado para obtener las enzimas dependerá directamente de la cantidad de metabolitos secundarios e inhibidores enzimáticos que la especie en cuestión disponga. La existencia de metabolitos secundarios en vegetales es un hecho común descrito en multitud de especies (SOLTIS & SOLTIS, 1989). Estos compuestos entran en contacto con las enzimas cuando se produce la ruptura del tejido en la homogeneización, uniéndose fuertemente al centro activo de las mismas, inhibiendo su actividad y generando artefactos. Los fenoles especialmente, pero también terpenos, pectinas, resinas, cumarinas e incluso pigmentos carotenoides pueden interferir en la actividad enzimática durante el proceso de extracción. Los mecanismos por los cuales se produce dicha interferencia han sido descritos y discutidos por muchos autores (ANDERSON, 1968; LOOMIS, 1969, 1974; KING, 1971; KELLEY & ADAMS, 1977). Estos compuestos aparecen gradualmente durante el desarrollo de los vegetales y, por lo tanto su concentración en los estadios jóvenes es considerablemente menor.

Así, de manera general, los individuos jóvenes (o en estadio de plántula) constituyen un material generalmente más recomendable en la obtención de isoenzimas que los individuos adultos. Por ejemplo, un análisis isoenzimático realizado con el endemismo gomero *Echium acanthocarpum* en el Parque Nacional de Garajonay tuvo que establecerse a partir de plántulas, ya que con hojas procedentes de individuos adultos se obtuvo actividad en sólo dos sistemas enzimáticos de 24 ensayados (BAÑARES, et al. 2001)

El uso de los tampones de gel y electrodos en la electroforesis isoenzimática varía de una especie a otra, por lo que la determinación del tipo de tampón empleado en cada especie para los diferentes sistemas enzimáticos estudiados es también una cuestión totalmente empírica. Así, por ejemplo en la palmera canaria hemos observado que en el sistema de tampones Morfolín-Citrato pH 6,1 se resuelven bien más de cinco sistemas enzimáticos diferentes (málico deshidrogenasa, enzima málica, siquimato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y 6-fosfogluconato deshidrogenasa entre otros), mientras que fosfoglucoisomerasa (PGI) o aconitasa (ACO) presentan mayor actividad cuando se separan en el sistema de tampones Tris-Citrato pH 7,9. Sin embargo, en otras especies como *Echium acanthocarpum* y *Viola palmensis* los sistemas de tampones en los que se obtienen mejores resultados son el Tris-Citrato-Histidina pH 7,0 y el Morfolin-Citrato pH 6,5, respectivamente. En general, es suficiente ensayar 8 ó 10 sistemas de tampones diferentes para obtener con resolución las enzimas más comúnmente empleadas en genética de poblaciones de vegetales.

Al contrario que los sistemas de extracción y separación, los protocolos de tinción enzimática están muy estandarizados y varían escasamente entre una especie u otra, por lo que en líneas generales la mayoría de los autores utilizan prácticamente las mismas recetas con ligeras modificaciones (VALLEJOS, 1983; WENDEL & WEEDEN, 1989; MAY, 1992; SOSA & GARCÍA-REINA, 1993; MURPHY et al., 1996)

La interpretación del patrón de bandas obtenido (zimograma) en términos de genes (loci) y alelos depende de un conjunto de variables. La ploidía del organismo analizado es el primer punto que se debe tener en cuenta ya que obviamente cuanto mayor sea el número cromosómico de la especie analizada, mayor número de alelos contiene, y por ende, mayor

número de bandas diferentes puede presentar el zimograma. Otro aspecto importante lo constituye la estructura cuaternaria y el número de loci que presentan las enzimas de las especies vegetales. En este sentido, se conoce bastante bien la estructura cuaternaria de las diferentes enzimas en los vegetales, la cual, en general, se encuentra conservada de una especie a otra. Así mismo, el número de genes que codifica para un determinado sistema enzimático permanece también más o menos invariable entre las especies. Por ejemplo, la fosfoglucoisomerasa (PGI) está descrita como un dímero codificado por dos loci en la mayoría de las especies, encontrándose localizada en el citoplasma y los cloroplastos (WEEDEN & WENDEL, 1989; KEPHART, 1990). De igual forma, la enzima málica (ME) es un tetrámero con un solo locus (GOTTLIEB, 1981), mientras que la malato deshidrogenasa (MDH) es un dímero codificado por un número variable de loci según la especie (WEEDEN & WENDEL, 1989; Kephart, 1990) (tabla 1).

Sin embargo, la duplicación de genes en una especie puede distorsionar el patrón de bandas obtenido. Así, por ejemplo en el zimograma de la fosfoglucoisomerasa obtenido para *Pho-*

Tabla 1. Número de loci (N) y estructura cuaternaria (E.C.) de las isoenzimas comúnmente utilizadas en el análisis isoenzimático de vegetales.

Sigla	Enzima	N	E.C.
AAT (GOT)	Aspartato aminotransferasa	2-4	D
ACO	Aconitasa	1-3	M
ACP	Fosfatasa ácida	2-4	M, D
ADH	Alcohol deshidrogenasa	1-3	D
ADK	Adenilato quinasa	1-2	M
ALD	Aldolasa	2	T
AMP	Aminopeptidasas	2-3	M
CAT	Catalasa	1	T
DIA	Diaforasa	1-4	M, D, T
EST	Esterasas	2-10	M, D
FUM	Fumarasa	1	T
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	2	D
GDH	Glutamato deshidrogenasa	1	H
G3PDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	3	T
HX	Hexoquinasa	2-3	M
IDH	Isocitrato deshidrogenasa	1(2)	D
LDH	Lactato deshidrogenasa	1	T
MDH	Malato deshidrogenasa	3	D
ME	Enzima málica	1	T
PRX	Peroxidasa	2-13	M, D
PGI (GPI)	Fosfoglucoisomerasa	2	D
6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa	2	D
PGM	Fosfoglucomutasa	2	M
SKD	Shiquimato deshidrogenasa	1-2	M
SOD	Superoxido dismutasa	1-2	D, T
TPI	Triosa fosfato isomerasa	2	D

M: Monómero; D: Dímero; T: Tetrámero; H: Hexámero. Adaptado de KEPHART (1990)

enix canariensis hemos identificado dos regiones de actividad enzimática, una de las cuales se corresponde con un locus simple (Pgi-1), mientras que la otra región presenta un patrón de bandas que no concuerda con lo esperado para una enzima dimérica. Este bandeo sólo se puede interpretar si asumimos la existencia de una duplicación en este locus (Pgi-2 y Pgi-3). Resultados similares se han descrito para otras especies (GOTTLIEB, 1983).

Finalmente, las consideraciones descritas se suman a la presencia de alelos nulos, la aparición de artefactos propios de la técnica y otros factores que pueden dificultar la interpretación genética del patrón de bandas.

Una vez interpretado el zimograma en términos genéticos se elabora una base de datos constituida por todos los individuos analizados y sus correspondientes genotipos.

A partir de esta base de datos podemos obtener los estadísticos genéticos básicos, tales como las frecuencias génicas y genotípicas, así como los parámetros e índices que nos van a caracterizar y cuantificar genéticamente las poblaciones analizadas (Apartado 2.3).

2.2. RAPD

Los RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA; Amplificación al Azar de ADN polimórfico*) fueron descritos por primera vez WILLIAMS et al. (1990). Consisten en la amplificación de fragmentos de ADN al azar mediante el uso de cebadores arbitrarios y aplicando la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores o «*primers*», son pequeñas cadenas de ADN monocatenario (8-10 pb) de secuencia variable que se unen en diferentes regiones del ADN nuclear de los organismos, generando fragmentos de tamaño variable susceptibles de ser separados mediante electroforesis. Cada cebador genera un número casi ilimitado de bandas de diferentes pesos moleculares, consecuencia de las elevadas tasas de mutación en los sitios de anclaje del mismo al ADN molde, o por las inserciones o deleciones en el fragmento a amplificar, obteniéndose así una huella genómica (*fingerprint*) característica que generalmente es específica para cada cebador y molde empleado.

En genética de poblaciones, y con el fin de analizar la mayor parte del genoma del organismo en cuestión, se debe combinar el análisis de varios cebadores conjuntamente. Después de realizar los análisis preliminares con el mayor número posible de cebadores, se eligen aquellos que presentan patrones de bandas polimórficas, reproducibles y con alta resolución. En general, se ensayan tantos *primers* como sea posible, y el número definitivo de cebadores utilizados finalmente dependerá del polimorfismo y la resolución de éstos. Como término medio se analizan 10-12 cebadores, aunque el rango empleado en la literatura de poblaciones vegetales varía desde 2 (STWEART & PORTER, 1995) a 38 (SULAIMAN & HASNAIN, 1996).

La técnica RAPD dispone de ventajas considerables respecto a otros marcadores moleculares. Por un lado proporciona un número ilimitado de loci (fragmentos) y el nivel de polimorfismo es considerable. Además, requiere muy poca cantidad de material biológico, por lo que es una técnica no destructiva, ideal en estudios de especies amenazadas, y puede secarse en gel de sílice después de su recogida en el campo, lo cual la convierte en una técnica muy versátil. No requiere conocimientos previos del genoma de la especie estudiada, y aunque la naturaleza de las secuencias de ADN amplificadas mediante esta técnica se desconoce, la ma-

por parte de los fragmentos parecen corresponder a regiones no codificantes, por lo que probablemente son marcadores neutrales (WILLIAMS et al., 1990). Finalmente, es una técnica rápida, relativamente barata y sencilla de aplicar.

Sin embargo, los RAPD presentan dos grandes desventajas. Por un lado son marcadores que se heredan con naturaleza dominante, es decir, la variación detectada mediante los mismos no permite distinguir los alelos de cada gen, y consecuentemente existe una limitación en la información genética obtenida. Por otro lado, es necesario realizar diversos controles técnicos exhaustivos que permitan aumentar el grado de reproducibilidad de las bandas amplificadas. A pesar de estas desventajas, los RAPD se erigen cada vez más como una de las herramientas más útiles en el conocimiento de la variabilidad y estructuración genética de las poblaciones naturales, revelando incluso patrones y resultados similares a los obtenidos mediante las técnicas isoenzimáticas (JENCZEWSKI et al., 1999). Así, por ejemplo, de un total de 117 artículos publicados en la revista *Molecular Ecology* del año 1999, aproximadamente el 25% correspondían a análisis genéticos mediante RAPDs, lo que demuestra claramente el auge y la popularidad de esta técnica en los últimos años.

Las bandas obtenidas para cada individuo y cada primer analizado, se transforman en una matriz de datos de presencia-ausencia de bandas, que posteriormente es analizada mediante diferentes programas informáticos. Como consecuencia de su naturaleza dominante, no es posible calcular determinados parámetros estadísticos tales como los índices de diversidad genética o la riqueza alélica, por lo que se recurre a los índices de similaridad, que aunque informativos, son menos potentes que los anteriores. Diversos estudios hacen aproximaciones a datos genotípicos (LYNCH & MILLIGAN, 1994; MORDEN & LOEFFLER, 1999) considerando que cada locus es un sistema de dos alelos y sólo uno de ellos es amplificable. Pero estos autores asumen en el cálculo de las frecuencias génicas de los loci RAPD el equilibrio Hardy-Weinberg, y éste sólo se cumple con especies alógamas, por lo que no es válido para especies autógamas o con un sistema de reproducción mixto. Otro tipo de aproximación genotípica es la ofrecida por FERGUSON et al. (1998) y POWELL et al. (1996) en estudios con especies con una muy elevada tasa de autofecundación. Ellos consideran cada banda como un sistema de dos alelos y todos los loci homocigóticos.

El único índice de diversidad que se puede calcular al emplear RAPD es el Índice de Shannon (LEWONTIN, 1972), que se considera óptimo por ser insensible al sesgo producido por la indetección de los individuos heterocigotos (DAWSON et al., 1995). También el análisis molecular de la varianza (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992), a pesar de no estar diseñado para marcadores dominantes, es un análisis ampliamente utilizado en RAPD (HUFF et al., 1993; ROSSETTO et al., 1995; MARTÍN et al., 1997; PALACIOS & GONZÁLEZ-CANDELAS 1997a,b; CARDOSO et al., 1998), y que resulta muy útil cuando se realiza un muestreo jerarquizado de la poblaciones naturales (una especie distribuida en varias islas, dentro de cada isla en varias poblaciones y dentro de cada población en varias subpoblaciones o grupos). De esta forma, el análisis de AMOVA hace una repartición de la variación encontrada con los marcadores RAPD entre los distintos componentes jerárquicos del muestreo. Presenta la ventaja de que es el único análisis que realiza el test del nivel de significación en las distintas jerarquías (MORELL et al., 1995). Además nos permite el cálculo del coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) entre las poblaciones, el cual está directamente relacionado con el flujo genético que ha habido entre las mismas.

2.3. ANÁLISIS DE DATOS

Tanto para los resultados isoenzimáticos, los cuales son marcadores codominantes de loci independientes, como para los obtenidos mediante RAPD, marcadores dominantes multiloci, existe una gran diversidad de *softwares* y programas informáticos, muchos de los cuales pueden obtenerse gratuitamente por INTERNET, que calculan directamente los diversos índices y parámetros necesarios para caracterizar y cuantificar genéticamente las poblaciones naturales a partir de los genotipos obtenidos.

La complejidad de usos, el nivel de ayuda y el número de índices y parámetros estadísticos que cada programa puede calcular es igualmente diverso, por lo que la mayor parte de las veces es necesario utilizar un software diferente (o un conjunto de los mismos) para alcanzar los resultados esperados. Un listado de los *softwares* más utilizados en nuestro laboratorio se detallan en la tabla 2.

3. NIVEL DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES

La diversidad genética detectada mediante marcadores moleculares puede medirse empleando diversos índices de cuantificación. Los más utilizados son la riqueza alélica, el polimorfismo y la heterocigosidad esperada.

3.1. RIQUEZA ALÉLICA

Definida también como el número medio de alelos por locus (A), constituye una medida de la variabilidad genética que cuantifica el número total de alelos diferentes detectados en cada uno de los loci de una población. El número medio de alelos por locus analizado mediante isoenzimas suele variar considerablemente entre las poblaciones y especies. Este estadístico no puede emplearse con los RAPD dada la naturaleza dominante de este marcador molecular.

Las reducciones de variabilidad que se producen en las poblaciones como consecuencia del «efecto fundador» o «cuello de botella» (ver apartado 5.2) afectan fundamentalmente a aquellos alelos que están en baja frecuencia en la población (NEI et al., 1975; SYTSMA & SCHAAL, 1985), por lo que el número medio de alelos por locus es un estadístico de gran utilidad para medir estas reducciones y averiguar el efecto producido por la deriva genética.

3.2. POLIMORFISMO

Definido también como la proporción de loci polimórficos (P), cuantifica el número de loci variables en una población, y se calcula dividiendo el número de loci polimórficos de una población y el número total de loci analizados. Un locus se considera polimórfico según dos criterios arbitrarios: cuando la frecuencia del alelo más común es igual o menor que 0,99 o igual o menor a 0,95. En nuestro laboratorio, generalmente empleamos el segundo criterio. El polimorfismo puede aplicarse tanto en isoenzimas como en RAPD.

Tabla 2. Programas informáticos más utilizados en la caracterización genética de las poblaciones naturales de vegetales.

MARCADOR MOLECULAR	ANÁLISIS	PROGRAMA INFORMÁTICO	PÁGINA WEB
Isoenzimas	Índices de variabilidad, Distancias genéticas, <i>F</i> estadísticos, UPGMA	BIOSYS – 1 (Swofford y Selander, 1981)	ftp://lamar.cosolate.edu7pub/wcb4 (gratis)
Isoenzimas	Índices de variabilidad, Coeficientes de diferenciación, Distancias genéticas, <i>F</i> estadísticos, UPGMA	GENESTAT – PC 3.3 (Lewis, 1993)	http://darwin.eeb.uconn/eeb348/1999/soft (gratis)
Isoenzimas	Índices de variabilidad, Distancias genéticas, <i>F</i> estadísticos, UPGMA	GDA (Lewis and Zaykin, 1996)	http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/gda.html (gratis)
Isoenzimas	Frecuencias alélicas, <i>F</i> estadísticos, Flujo genético (<i>N_m</i>),	GENEPOP 3.1 (Raymond y Rousset, 1995)	Fftp://ftp.cefe.cnrs-mop.fr/pub/pc/msdos/genepop (gratis)
Isoenzimas	<i>F</i> estadísticos,	FSTAT (Goudet, 1995)	www.unil.ch/ize/software/fstat.html (gratis)
Isoenzimas	Coeficientes de diferenciación, Distancias genéticas, UPGMA	DISPAN (Ota, 1993)	ftp.bio.indiana.edu/molbio/ibmpc (gratis)
RAPDs Isoenzimas	Análisis de componentes principales, Coeficientes de similitud, UPGMA, Neighbour-Joining	NTSYS v 2.0 (Rohlf, 1993)	www.exetersoftware.com/can/cat/ntsyspc.html (Es necesario comprarlo)

Tabla 2. Programas informáticos más utilizados en la caracterización genética de las poblaciones naturales de vegetales. (*contin.*)

MARCADOR MOLECULAR	ÁNALISIS	PROGRAMA INFORMÁTICO	PÁGINA WEB
RAPDs	Índice de Shannon	POPGENE v 1.31 (Yeh et al. 1997)	www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm (gratis)
RAPDs	Análisis molecular de la varianza (Schneider et al. 2000)	ARLEQUÍN	http://anthro.unige.ch/arlequin (gratis)
RAPDs, Isoenzimas	Autocorrelación espacial	AUTOCORF v 1.0 (Oliver Hardy) SAAP (Wartenberg, 1989)	Pedir directamente al autor (gratis) E-mail: ohardy@ulb.ac.be

3.3. HETEROCIGOSIDAD ESPERADA

Una medida más completa para medir el nivel de variación genética en las poblaciones naturales lo constituye la heterocigosidad esperada o diversidad génica (NEI, 1987). Esta medida no depende de la arbitrariedad de la definición de polimorfismo y puede ser definida sin ambigüedad en términos de frecuencias alélicas.

Cuantifica la igualdad o equitabilidad de las frecuencias alélicas en los loci y aunque depende directamente del número de alelos detectado, también está fuertemente condicionado por el valor de sus frecuencias. La diversidad genética constituye la heterocigosidad que se esperaría en una población si ésta estuviese en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se calcula para cada locus según la fórmula:

$$He_i = 1 - \sum x_i^2$$

Siendo x_i la frecuencia alélica del locus i . La heterocigosidad esperada de una población es la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población.

Es importante destacar que los tres índices descritos analizan y cuantifican la diversidad genética considerando diferentes aspectos de la misma. Así, la riqueza alélica se centra en la diversidad de alelos, el polimorfismo en la diversidad de genes o loci y la heterocigosidad esperada en la igualdad de las frecuencias alélicas en una población.

Los índices descritos podrían equipararse a los empleados para medir la diversidad de un ecosistema. El nivel de diversidad de un ecosistema se puede establecer a partir del número de especies diferentes que alberga (equivalente al número de loci polimórficos), por el número de individuos existentes de cada especie (equivalente al número de alelos por locus), o por la equitabilidad del ecosistema (equivalente a la heterocigosidad esperada).

De esta forma se ha cuantificado el nivel de diversidad genética de cientos de especies vegetales de casi todos los grupos taxonómicos (GOTTLIEB, 1977; HAMRICK, 1978; BROWN, 1978; HAMRICK et al., 1979). Mediante el análisis de los índices descritos podemos comparar los niveles de diversidad genética de las diferentes poblaciones naturales de una especie, e incluso comparar entre diferentes especies. Ello nos permitirá establecer estrategias de conservación genética. Así, y atendiendo exclusivamente al grado de variabilidad genética, nuestros esfuerzos deben dirigirse principalmente a aquellas poblaciones que alberguen los mayores niveles de diversidad. En éste mismo sentido, también debemos averiguar qué factores han hecho que una población presente escasos niveles de diversidad genética y establecer mecanismos para incrementar dichos niveles. HAMRICK & GODT (1989) compararon el nivel de diversidad genética determinado por isoenzimas de hasta 450 taxa vegetales con múltiples variables y factores intrínsecos y extrínsecos a las especies, tales como el estatus taxonómico, la forma de vida, el rango geográfico de distribución, la distribución latitudinal, el estado de sucesión, los mecanismos de dispersión de semillas, o el sistema reproductivo de la especie.

Estos autores comprobaron que en general, existía correlación significativa entre la distribución geográfica de una especie y el nivel de diversidad genética, de tal forma que las especies con una amplia distribución geográfica exhibían mayor diversidad genética que aquellas especies con una distribución muy reducida, como es el caso de los endemismos o las especies aisladas (tabla 3).

Igualmente, aquellas especies perennes y de vida larga presentaban de mayores niveles de diversidad genética que las de vida corta, mientras que las que disponían mayoritariamente de sistemas de reproducción por autofecundación albergaban menor diversidad genética que las especies con reproducción cruzada. De hecho, el grado de diversidad genética de las primeras era menos de la mitad que el de las segundas (tabla 3).

Estos resultados ponen de manifiesto que la variación genética puede verse afectada de forma diferente por diversos procesos evolutivos según éstos actúen a nivel de poblaciones o a nivel de especie (HAMRICK & GODT, 1989). Igualmente, determinados aspectos intrínsecos de las especies como el tipo de reproducción o las formas de vida, también influyen en el nivel de diversidad genética.

Sin embargo, y a pesar de que las especies endémicas con una distribución restringida poseen unos niveles de diversidad genética bajos, las especies endémicas de Canarias suelen mostrar una diversidad genética considerablemente mayor que las especies endémicas de otros archipiélagos oceánicos, alcanzando incluso niveles similares a los detectados en especies continentales (FRANCISCO-ORTEGA et al., 2000) (tabla 4).

Diversas pueden ser las razones que expliquen estos resultados, pero las más reconocidas sean quizás la cercanía al continente africano, la cual ha podido permitir múltiples colo-

Tabla 3. Niveles de variabilidad genética medidos por isoenzimas en función de la distribución geográfica, formas de vida y tipo de reproducción, mayoritaria de las especies analizadas (HAMRICK & GODT, 1989).

	A	P	He
<i>Distribución geográfica</i>			
Endémica	1,39	26,3	0,063
Restringida	1,45	30,6	0,105
Regional	1,55	36,4	0,118
Amplia	1,72	43,0	0,159
<i>Formas de vida</i>			
Perenne de vida corta			
Herbácea	1,40	28,0	0,096
Arbustiva	1,55	31,3	0,094
Perenne de vida larga			
Herbácea	1,44	39,3	0,084
Arbustiva	1,79	50,0	0,149
<i>Sistema de cruzamiento</i>			
Autofecundación	1,31	20	0,07
Combinada-Animales	1,43	29	0,09
Combinada-Viento	1,99	54	0,20
Entrecruzamiento-animales	1,54	36	0,12
Entrecruzamiento-Viento	1,80	50	0,10
A: Riqueza; P: Polimorfismo; He: Heterocigosidad esperada			

Tabla 4. Diversidad genética en especies vegetales canarias.

Especie	A	P	He	Referencia
<i>Viola palmensis</i>	1,53	43,2	0,164	Sosa & Batista (1999)
<i>Cistus osbaeckiaefolius</i>	1,27	25,0	0,099	Batista et al., (2001)
<i>Cistus symphytifolius</i>	1,52	40,0	0,157	Batista et al., (2001)
<i>Cistus chinamadensis</i>	1,42	23,1	0,103	Batista et al., (2001)
<i>Phoenix canariensis</i>	1,79	55,0	0,209	González-Pérez et al., (1999)
<i>Phoenix dactylifera</i>	2,00	63,0	0,291	González-Pérez et al., (1999)
<i>Echium acanthocarpum</i>	1,39	38,9	0,174	Batista & Sosa (1998)
<i>Avena canariensis</i> (Fuerteventura)	1,76	23,5	0,226	Morikawa & Leggett (1990)
<i>Avena canariensis</i> (Lanzarote)	1,54	43,1	0,127	Morikawa & Leggett (1990)
<i>Lobularia canariensis</i>	2,38	73,7	0,278	Borgen (1996)
<i>Androcymbium psammophilum</i>	2,00	10,0	0,053	Pedrola-Monfort & Caujapé (1996)
<i>Androcymbium hierrensis</i>	2,00	20,0	0,055	Pedrola-Monfort & Caujapé (1996)
<i>Lolium canariense</i>	1,61	—	0,145	Oliveira et al., (1995)
<i>Chamaecytisus proliferus</i>	3,00	60,0	—	Francisco-Ortega et al., (1992)
<i>Sonchus</i>	1,32	28,9	—	Kim et al., (1999)
Especies endémicas	1,39	26,3	0,063	Hamrick & Godt (1989)

A: Riqueza alélica; P: Polimorfismo; He: heterocigosidad esperada.

nizaciones hacia las islas, junto con el posible carácter relíctico de muchos de los elementos de la flora de Canarias (ver FRANCISCO-ORTEGA et al., 2000 para una revisión).

4. DISTRIBUCIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

El grado de diversidad genética total existente en una especie se puede dividir en diferentes componentes: Por un lado en la diversidad presente dentro de cada población (intrapoblacional) y, por el otro en la diversidad genética existente entre las diversas poblaciones (interpoblacional).

La partición de la diversidad total de una especie en sus componentes intra- e interpoblacional nos permite conocer su organización en el espacio y, consecuentemente, sugerir modos de acción encaminados a preservar la mayor cantidad de diversidad genética posible.

Por todo ello, no sólo es importante determinar el nivel total de la diversidad genética de una especie, sino que es fundamental, sobre todo en los programas de conservación, conocer y analizar como esa variabilidad genética global de la especie se distribuye y se estructura entre las diferentes poblaciones naturales.

4.1. ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL

Ya hemos descrito que la diversidad genética contenida en una población consiste en los diferentes tipos de alelos y sus frecuencias presentes en la misma. Desde el punto de vista de

la conservación genética, interesa determinar de qué manera el nivel de dicha diversidad se distribuye en el espacio y en el tiempo dentro de la población natural.

Los alelos de una población pueden estar distribuidos al azar, o por el contrario presentar una distribución espacial consecuencia de la acción de diferentes fuerzas evolutivas, de factores ambientales o de propiedades intrínsecas de la población en cuestión. De esta forma, nos referimos a la existencia de estructuración genética cuando las frecuencias alélicas no se distribuyen al azar en el seno de la población, sino que siguen un determinado patrón o arquitectura, la cual puede ser espacial o temporal.

Dos de los métodos que nos permiten analizar el grado de estructuración genética intrapoblacional son a través de la existencia de autocorrelación espacial (SOKAL, 1979; GRIF-FITH, 1987) o mediante el coeficiente de endogamia de la población (F_{IS}) (WRIGHT, 1951).

4.1.1. Autocorrelación espacial

Este método calcula la correlación, a través del Índice de Moran (MORAN, 1948) existente entre las distancias genéticas detectadas entre los individuos de una población, y la distancia geográfica de los mismos. Para proceder al análisis de autocorrelación espacial se agrupan en clases de distancia los valores de distancia geográfica existente entre cada par de individuos, y se correlacionan con la distancia genética determinada entre el mismo par de individuos de la población. Posteriormente se grafica el coeficiente de correlación obtenido frente a las clases de distancia. Autocorrelaciones positivas ($I > 0$) obtenidas entre cada par de observaciones realizadas (geográfica-genética) indican que los individuos más próximos geográficamente son los que también presentan una mayor similitud genética, mientras que autocorrelaciones negativas ($I < 0$) indican lo contrario.

Siguiendo esta metodología se pudo determinar la existencia de estructuración genética en dos poblaciones naturales de *Dorycnium spectabile*, especie endémica de la isla de Tenerife (fig. 1). Esta especie, se encuentra fuertemente amenazada, existiendo en la actualidad sólo dos poblaciones, separadas 40 km, en Teno (con 24 individuos) y Güimar (con 46 individuos). *D. spectabile* es hermafrodita pero presenta altos niveles de autoincompatibilidad (CALERO & SANTOS, 1988). La floración tiene lugar desde mayo a julio, siendo los vectores de polinización los insectos (Hymenoptera y Lepidoptera) y estableciéndose la dispersión de las semillas por gravedad (Manuel Naranjo, Viceconsejería de Medio Ambiente del Gobierno de Canarias, com. pers.).

El análisis de autocorrelación espacial en ambas poblaciones presentó una curva con una disminución generalizada en el Índice de Moran con respecto a las clases de distancias, siendo el coeficiente de correlación positivo y altamente significativo en la primera clase (fig. 1). Además, a medida que aumentaba la distancia física entre los individuos, disminuía considerablemente la similitud genética entre los mismos.

Estos resultados sugieren que en ambas poblaciones de *Dorycnium spectabile* existe estructuración genética consecuencia de una baja dispersión de las semillas, lo que hace que probablemente los descendientes se dispongan próximos a los padres dando lugar a una estructuración en familia. Precisamente, el punto de corte de la curva con el eje x nos indica la

distancia a la cual desaparece la estructuración familiar (fig. 1), por lo que la estructuración en familia en ésta especie alcanza un radio de 16 m en la población de Güímar, mientras que en la de Teno se reduce a 8 m aproximadamente.

Otra hipótesis, aunque menos plausible, para explicar la diferente distribución intrapoblacional de la variabilidad genética en *Dorycnium* es la existencia de diferenciación ecológica en microhábitats dentro de las poblaciones. Sin embargo, es difícil establecer la relación entre los marcadores moleculares considerados y la adaptabilidad de una especie a microambientes.

A tenor de estos resultados y desde el punto de vista de la gestión y conservación de las poblaciones naturales de esta especie, la recolección de semillas debe realizarse de individuos separados más de 8 y 16 metros en las poblaciones de Teno y Güímar, respectivamente, con el fin de asegurar que las semillas recolectadas proceden de diferentes líneas familiares conservando así la mayor diversidad genética posible existente en la población.

4.1.2. Análisis del coeficiente de endogamia

Uno de los principios en los que se basa el análisis genético de las poblaciones naturales es la Ley de Hardy-Weinberg. Esta ley indica que en ausencia de factores que modifiquen las frecuencias alélicas de una población, las frecuencias genotípicas de esa población no varían de una generación a otra, alcanzando el equilibrio.

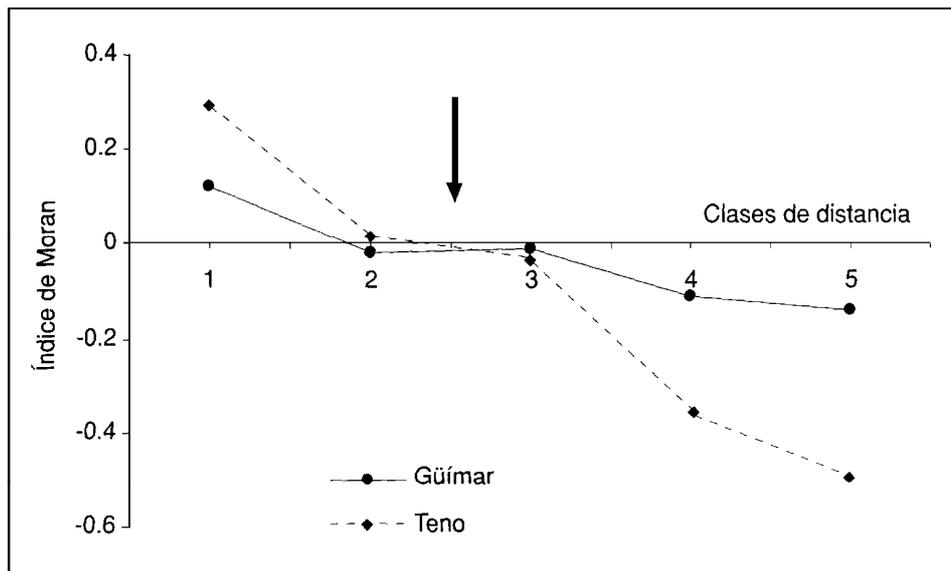


Fig. 1. Análisis de autocorrelación espacial de las poblaciones de Güímar y Teno de *Dorycnium spectabile* para cinco clases de distancia. El radio del área homogénea se corresponde con el punto de corte con el eje de abscisas, el cual es de aproximadamente 8 m en Teno y 16 m en Güímar.

Aunque en la realidad existen multitud de factores y fuerzas evolutivas que pueden hacer variar las frecuencias alélicas de una población (mutaciones, selección natural, flujo genético, autofecundación) el principio de Hardy-Weinberg es aplicable a las poblaciones naturales.

De esta forma podemos averiguar si una población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg e inferir las causas o fuerzas que han podido originar el cambio de las frecuencias alélicas, comparando el nivel de heterocigosidad observada en la población con el nivel de heterocigosidad esperado en el equilibrio de Hardy-Weinberg. Así, calculamos el coeficiente de endogamia F_{IS} , (WRIGHT, 1951), el cuál relaciona ambas medidas de heterocigosidad (observada y esperada).

$$F_{IS} = 1 - (H_o/H_e)$$

Valores de F_{IS} menores de cero indican un exceso de individuos heterocigóticos en la población con respecto al esperado en el equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que valores mayores de cero señalan un defecto de heterocigóticos con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg. Obviamente si $F_{IS} = 0$ la población se encuentra en equilibrio y por lo tanto se comporta como una unidad panmíctica. Es decir, como una población en la que todos los individuos tienen la misma probabilidad de cruzamiento, y estos cruzamientos se producen al azar. Para conocer el área en la cual una población es panmíctica se realiza una agrupación jerarquizada. Es decir, se reúnen los individuos en función de niveles jerárquicos ya sea por rango de distancias (20 metros, 30 metros, 100 metros, 1 kilómetro de diámetro, etc.) o por categorías (población, localidad, sub-región, región, etc.) y se estima la variación de F_{IS} desde un nivel a otro.

De esta forma en diversas poblaciones naturales de *Phoenix canariensis* los valores de F_{IS} de individuos separados aproximadamente 40 metros no son significativamente diferentes de cero. Sin embargo, al agrupar individuos separados más de 40 metros se observa que el valor de F_{IS} aumenta significativamente. Por lo tanto por debajo de 40 m, los individuos comprendidos en esa área se comportan como una unidad panmíctica, están en equilibrio de Hardy-Weinberg y no presentan estructuración genética espacial. Sin embargo, al agrupar los individuos separados más de 40 m estamos en realidad considerando especímenes pertenecientes a más de una población y, por lo tanto, se observa un defecto de heterocigóticos, dando lugar a un aumento significativo de F_{IS} . Este fenómeno se conoce como efecto Wahlund (HARTL & CLARK, 1997).

De esta forma y a través de un muestreo jerarquizado podemos detectar no sólo la existencia o ausencia de estructuración genética en la población, sino que podemos identificar el área geográfica en la cual todos los individuos tienen la misma probabilidad de cruzarse, es decir, podemos determinar e identificar la población panmíctica, y establecer la presencia o ausencia de poblaciones separadas genéticamente.

Al igual que con la autocorrelación espacial, la detección de las unidades panmícticas tiene una gran relevancia en conservación. La gestión de las poblaciones naturales de especies amenazadas debe establecerse en función de la existencia de distintas unidades panmícticas identificadas, ya que éstas están actuando como una única unidad reproductiva, independiente de otras adyacentes. Por lo tanto, y con el fin de evitar la ruptura genética existente, sería necesario tratar y gestionar cada unidad independientemente.

4.2. ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA INTERPOBLACIONAL

Las especies rara vez existen como una única unidad panmíctica en las que sus individuos se cruzan al azar. En vez de esto, suelen estar distribuidas en poblaciones diversas y discretas más o menos separadas geográficamente y entre las cuales existen diferencias genéticas. Es decir, existe algún nivel de diferenciación genética interpoblacional. El grado de diferenciación genética entre poblaciones naturales se puede cuantificar a través del coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) (SLATKIN, 1985; 1987; 1994; HARTL & CLARK, 1997).

Para un locus con dos alelos, F_{ST} es la varianza (σ^2) en las frecuencias alélicas entre dos poblaciones normalizada por la frecuencia alélica media (p), $F_{ST} = \sigma^2 / p(1-p)$, y varía de 0 a 1. Un valor de cero indica que las frecuencias alélicas son idénticas en las poblaciones analizadas, mientras que un valor de 1 señala que las frecuencias alélicas están fijadas y son completamente diferentes entre las poblaciones analizadas. Sin embargo, y aunque teóricamente F_{ST} puede alcanzar valores de 1, en la realidad suelen ser considerablemente inferiores, aunque muy indicativos del grado de diferenciación interpoblacional existente. Así, valores de F_{ST} menores a 0,15 indican una escasa diferenciación genética entre las poblaciones. Valores comprendidos entre 0,15 y 0,25 señalan que las poblaciones se encuentran considerablemente diferenciadas, en tanto que valores superiores a 0,25 son un indicativo de que las poblaciones comparadas se encuentran fuertemente diferenciadas genéticamente (HARTL & CLARK, 1997). Además, F_{ST} constituye una medida indirecta del flujo genético entre las poblaciones como discutiremos posteriormente.

Se ha calculado el grado de diferenciación genética entre las poblaciones naturales de más de una veintena de especies vegetales endémicas canarias (tabla 5) muchas de las cuales están catalogadas con algún grado de amenaza. Los resultados de la tabla muestran claramente que el grado de diferenciación genética interpoblacional varía ampliamente entre las especies, no existiendo correlación con el tamaño poblacional, la distribución geográfica o el rango taxonómico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por HAMRICK & GODT (1989) al analizar un centenar de especies vegetales, detectando que el rango de distribución geográfica no se encuentra relacionado con la distribución de la variabilidad genética interpoblacional, lo que demuestra que otros factores (tales como la capacidad de migración de la especie, o la existencia de barreras geográficas o ecológicas) son las principales responsables de la diferenciación genética entre las poblaciones.

El coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) y el coeficiente de endogamia (F_{IS}) están relacionados mediante la fórmula

$$(1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) = 1 - F_{IT}$$

donde F_{IT} es la medida de la desviación de la panmixia en el total de la población, o lo que es lo mismo, es la correlación entre pares de genes homólogos en la unión de gametos con respecto a la población en su globalidad (WRIGHT, 1951).

F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} , se conocen como los F -estadísticos.

Tabla 5. Coeficientes de diferenciación genética detectados entre poblaciones naturales de especies en Canarias.

Especie	Técnica	NP	F _{ST}	Isla
<i>Viola palmensis</i>	Iso	8	0,100	La Palma
<i>Cistus osbaeckiaefolius</i>	Iso	4	0,372	Tenerife
<i>C. symphytifolius</i>	Iso	4	0,224	Varias
<i>C. chinamadensis</i>	Iso	2	0,569	Gomera-Tenerife
<i>Phoenix canariensis</i>	Iso	12	0,128	Varias
<i>Phoenix dactylifera</i>	Iso	6	0,193	Varias
<i>Echium acanthocarpum</i>	Iso	2	0,004	Gomera
<i>Dorycnium spectabile</i>	RAPD	2	0,264	Tenerife
<i>Isoplexis chalcantha</i>	RAPD	2	0,141	Gran Canaria
<i>Myrica rivas-martinezii</i>	RAPD	9	0,487	Varias
<i>Sideritis discolor</i>	RAPD	3	0,149	Gran Canaria

Iso: Isoenzimas; NP: Número de poblaciones.

5. FUERZAS EVOLUTIVAS QUE INTERVIENEN EN LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES NATURALES

Los factores o fuerzas evolutivas responsables de la variabilidad y estructuración genética de las poblaciones vegetales naturales pueden ser intrínsecos de la especie (tales como la deriva, el tamaño poblacional, los sistemas de cruzamiento, la capacidad de migración, y la historia de la propia especie), o extrínsecos (como los factores abióticos o los factores de interacción con otras especies). Todos ellos pueden influir en mayor o menor medida en la composición y distribución genética de las poblaciones naturales y por ello, en la mayoría de las ocasiones, es extremadamente difícil discernir el nivel de importancia e influencia de cada factor separadamente.

5.1. DERIVA GENÉTICA

Se entiende por deriva genética el cambio producido en las frecuencias alélicas consecuencia del muestreo, generación tras generación, y el tamaño finito de las poblaciones. Realmente la figura relevante en el proceso de deriva es el *tamaño efectivo de la población*, N_e , que se define como el tamaño de una población ideal cuya constitución genética es afectada por la deriva con el mismo grado que la constitución genética de la población real, o lo que es lo mismo, es el tamaño de una población ideal en la cual todos los individuos contribuyen con el mismo nivel al pool gamético de la misma. El tamaño efectivo se puede estimar considerando el número real de individuos reproductivos, cuando se conoce el sistema de cruzamiento, la relación de sexos, y la variación en la fertilidad. Alternativamente el tamaño efectivo de la población se puede inferir de la variación anual de las frecuencias alélicas de los loci neutrales (MONTGOMERY et al., 2000).

Así, las poblaciones más pequeñas se encuentran mucho más afectadas por la deriva genética que las más grandes, y una disminución considerable del tamaño poblacional afectará profundamente la variabilidad genética de la misma. Por un lado existen menos individuos que pueden participar en la fecundación y por lo tanto, se producirá una reducción de la variación genética, la cual estará directamente relacionada con la reducción en el tamaño de la población. Diferentes autores han documentado la relación existente entre la variación genética y el tamaño poblacional (ELLSTRAND & ELLAM, 1993; OOSTERMEIJER, 1996; YOUNG et al., 1996), ya sea a través del polimorfismo (YOUNG et al., 1999) (fig. 2) como a través de la heterocigosidad esperada (OOSTERMEIJER, 2000). Pero además, la deriva tiene consecuencias importantes en la diferenciación genética existente entre dos poblaciones, de tal forma que incrementa las diferencias interpoblacionales. Por lo tanto, la deriva genética tiende a disminuir la diversidad genética intrapoblacional, sobre todo en lo que al número de alelos diferentes se refiere, y a aumentar las diferencias genéticas entre las poblaciones, lo cual se traduce en un incremento en el coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}). En definitiva, la deriva genética produce un aumento de la homocigosidad y un incremento de la varianza entre las poblaciones.

5.2. EFECTO FUNDADOR Y CUELLO DE BOTELLA

El efecto fundador es un tipo de deriva genética que se produce cuando un número escaso de individuos forman o constituyen una nueva población después de un proceso de migración. Cuanto menor sea el número de colonizadores, mayor es el efecto de la deriva y, por lo

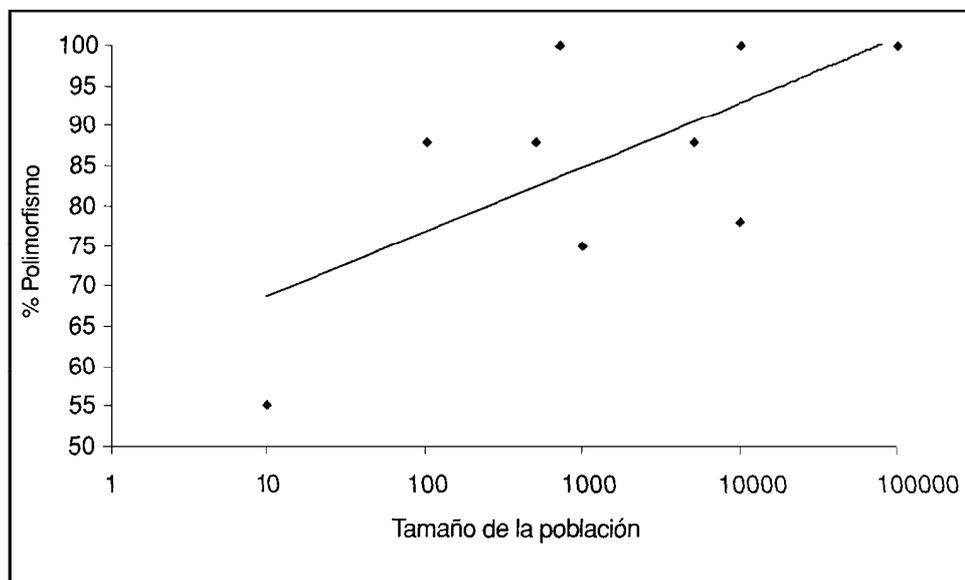


Fig. 2. Correlación entre el tamaño de la población y polimorfismo en *Rutidosis leptorrhynchoides* (YOUNG et al., 1999).

tanto, menor es el grado de diversidad genética de las nuevas poblaciones. Esta drástica disminución de los niveles de diversidad genética fue denominada efecto fundador por MAYR (1942).

Puede existir también una fuerte reducción del número de efectivos en una población sin que exista migración, como consecuencia de la acción de un acontecimiento estocástico importante en la misma (por ejemplo, una catástrofe). En éste caso la población ha pasado por un cuello de botella el cual tiene en líneas generales las mismas consecuencias que el efecto fundador.

El efecto fundador o el cuello de botella se ha argumentado como una de las causas principales que explican los escasos niveles de diversidad genética que en general presentan las especies endémicas y aisladas. Así, por ejemplo la especie *Limonium cavanillesii* (PALACIOS & GONZÁLEZ-CANDELAS, 1997b) se creía extinguida del Mediterráneo, pero recientemente se redescubrió una población con 29 individuos. El análisis genético mediante RAPDs con 11 primers diferentes de esa población dio lugar a 131 bandas las cuales eran idénticas en todos los individuos, lo que supone la menor diversidad genética detectada en plantas mediante RAPDs. Probablemente el tipo de sistema reproductivo de la especie (apomixia) combinado con los acontecimientos históricos acaecidos en la especie, que incluyen el paso por un fuerte cuello de botella en épocas recientes, explicarían la inexistencia de variabilidad genética detectada.

De manera similar, se ha constatado que el endemismo tinerfeño *Cistus osbaeckiaefolius* presenta unos escasos niveles de variación genética (tabla 4). Sólo se conocen cinco poblaciones de este endemismo de Tenerife, todas las cuales salvo una (Tágara), se localizan en hábitats de alta montaña, con tamaños de población inferiores a 200 individuos por población (MARRERO et al., 1999). Las poblaciones de esta especie localizadas en hábitats de alta montaña han sido expuestas al pastoreo intensivo, principalmente por cabras y conejos, durante cientos de años (BAÑARES et al., 1993; MARRERO et al., 1999). Este factor hace factible que hayan sufrido diferentes cuellos de botella, relativamente recientes, pudiendo haber causado una severa fragmentación de sus poblaciones. La consecuencia de ello es una pérdida sustancial de diversidad genética, que se evidencia por la escasa riqueza alélica detectada (tabla 4). Además, la fragmentación del hábitat y la pérdida de individuos han hecho aumentar la diferenciación genética entre las poblaciones a pesar de estar localizadas en un área geográfica reducida (BATISTA et al., 2001). En este sentido los altos valores de F_{ST} detectados en esta especie (con una media de $F_{ST} = 0,299$) hacen pensar en la acción de un fuerte proceso de deriva genética. Posiblemente la acción antrópica y de herbívoros presentes en el Parque Nacional del Teide no sólo han fragmentado las poblaciones de este endemismo, sino que han aumentado (consecuencia de la deriva) las diferencias genéticas entre sus poblaciones.

5.3. FLUJO GENÉTICO

El flujo genético se define como el movimiento de genes existente entre las poblaciones de una especie a través del movimiento de migrantes, ya sean estos propágulos, semillas, polen o por los propios individuos. Para que exista flujo genético o migración entre poblaciones de una misma especie no sólo es preciso que exista dispersión de los individuos

o gametos, sino que también se produzca cruzamiento entre los mismos y la generación de nueva progenie.

En ausencia de selección natural, el flujo genético constituye el primer determinante de la diferenciación genética entre las poblaciones. Así, y a través del coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) podemos inferir el grado de migración existente entre las poblaciones. De hecho un concepto clave en genética de poblaciones es la relación existente entre F_{ST} y el número de migrantes (WRIGHT, 1978), la cual se determina mediante la fórmula: $F_{ST} = 1/(1+4N_e m)$, donde N_e es el tamaño efectivo de la población, m es la proporción de individuos que son inmigrantes, y por lo tanto, $N_e m$ es el número de migrantes. Así, ésta ecuación establece que, en ausencia de selección, y con un equilibrio entre la deriva y el flujo genético, la diferenciación genética entre las poblaciones es inversamente proporcional a la tasa de flujo genético existente entre las mismas. Cuando existe flujo genético, las poblaciones tienden a homogeneizar sus acervos genéticos, eliminando diferencias locales. Consecuentemente, el flujo genético es una fuerza que retrasa, e incluso detiene la diferenciación interpoblacional. Precisamente, los sistemas de cruzamiento y la capacidad de dispersión de propágulos de las especies vegetales influyen decididamente en el nivel de flujo genético (ver apartado 5.4).

Bajos valores de F_{ST} consecuencia probablemente de un elevado flujo genético, se han detectado en poblaciones de *Echium acanthocarpum* en el Parque Nacional de Garajonay (La Gomera), entre poblaciones de *Viola palmensis* de las cumbres de La Palma, y entre poblaciones de *Phoenix canariensis* (tabla 5).

En el caso de *Viola palmensis* (violeta de la cumbre), raro endemismo localizado en las cumbres del Parque Nacional de La Caldera de Taburiente en La Palma, se encontró que la mayor parte de la variabilidad genética detectada se localizaba dentro de cada una de las 8 poblaciones analizadas. De hecho, entre el 85,5 y el 96,6% del total detectado es debido a la variación existente dentro de las poblaciones. Además, cerca del 86% de los valores de diferenciación genética fueron inferiores a 0,15 estableciéndose la media en 0,10 (tabla 6).

Dado los bajos valores de F_{ST} detectados, es plausible la existencia de un flujo genético considerable entre las poblaciones naturales de la violeta. Por un lado la distancia geográfica entre las mismas es relativamente baja (menos de 20 km), aunque es cierto que en ocasiones se encuentran separadas por profundos barrancos que se alzarían como importantes barreras geográficas. Por otro lado, se ha constatado que los conejos y las cabras localizadas en las cumbres de la isla frecuentan las poblaciones de esta especie, alimentándose de ellas (A. Palomares. Parque Nacional de la Caldera de Taburiente *com. pers.*). Paradójicamente, a pesar de constituir una amenaza para su supervivencia, pueden comportarse como agentes dispersores. Además, el ciclo de floración y fructificación de *V. palmensis* es en primavera, coincidiendo con un movimiento destacado de estos animales hacia la zona de cumbres, estando en múltiples ocasiones los frutos comidos en esa época del año. La capacidad de movimiento, transporte y migración de estas especies herbívoras en un rango de pocos kilómetros de distancia es considerable, pudiendo recorrerlas en un solo día. Además, la afluencia de turistas y visitantes a las zonas de crecimiento de la violeta en las épocas de floración y fructificación podrían sin duda contribuir al movimiento de efectivos de unas localidades a otras, y por lo tanto favorecer el flujo genético entre las mismas. Posiblemente la acción de estos agentes dispersores potenciales explique los bajos niveles de diferenciación detectados. Precisamente, y en concordancia con ello se observó la inexistencia de correlación entre el coeficiente de di-

ferenciación genética y la distancia geográfica, lo cual demuestra que precisamente la distancia entre las poblaciones no condiciona la diferenciación genética detectada. O lo que es lo mismo, no existe aislamiento por distancia y otros factores o barreras físicas están determinando y condicionando la diferenciación genética interpoblacional detectada, existiendo incluso mayor diferenciación genética entre poblaciones adyacentes. De hecho, los valores más bajos de F_{ST} se encuentran entre poblaciones distanciadas más de 4 km, mientras que poblaciones separadas menos de 2 km presentan los niveles más elevados de diferenciación genética (tabla 6).

A pesar de que la existencia de un flujo genético considerable explicaría los resultados obtenidos, no podemos descartar la posibilidad de que las poblaciones actuales de la violeta de La Palma constituyan un conjunto de subpoblaciones fragmentadas y relictuales de una gran población que se extendía en épocas pretéritas de forma continua por la cumbre. La fuerte presión ejercida en los últimos cientos de años por parte del hombre y los herbívoros introducidos pudo haber extirpado gran parte de esa «gran población» produciendo la distribución desigual observada hoy en día. Así, basándonos en los resultados obtenidos, la especie aún mantendría unos niveles de diferenciación genética bajos, reflejo de la existencia pretérita de una única población en la que las diferencias genéticas entre zonas adyacentes fueran escasas. Posiblemente, el mantenimiento de unos elevados tamaños de población en el tiempo ha contrarrestado la acción de la deriva genética sobre la composición genética de los individuos y, por consiguiente, ha frenado la diferenciación genética de las poblaciones.

5.4. SISTEMAS DE CRUZAMIENTO

Los sistemas de cruzamiento y la biología reproductiva de la especie constituyen factores cruciales en el establecimiento de una adecuada estrategia de conservación biológica. En general, los sistemas de cruzamiento que presentan las diferentes especies vegetales influyen decididamente en la variabilidad genética de las poblaciones, tanto en lo que al grado de diversidad genética se refiere, como en la forma en la que se estructura esa diversidad genética (HAMRICK & GODT, 1989). Así, las especies con autofecundación, presentan en general bajos niveles de diversidad genética, consecuencia de un aumento de la consanguinidad de los individuos, así como un escaso flujo genético interpoblacional y consiguientemente una ele-

Tabla 6. Coeficientes de diferenciación genética entre las poblaciones naturales de *Viola palmensis* del Parque Nacional de la Caldera de Taburiente. Valor medio de $F_{ST} = 0,100$. (SOSA & BATISTA, 1999)

	Grajas	F. Nueva 1	F. Nueva 2	Guanches	Rivero	Vizcaíno	Mejorana
F. Nueva 1	0,100						
F. Nueva 2	0,010	0,026					
Guanches	0,050	0,170	0,006				
Rivero	0,030	0,097	0,017	0,090			
Vizcaíno	0,170	0,039	0,100	0,140	0,150		
Mejorana	0,050	0,019	0,040	0,090	0,050	0,370	
Franceses	0,120	0,123	0,146	0,060	0,240	0,159	0,120

vada diferenciación genética entre las mismas. Por ello, en las especies mayoritariamente autógamas la mayor parte de la diversidad genética se encuentra entre las poblaciones, es decir presentan elevados valores de F_{ST} .

Contrariamente, las especies alógamas, en las que se da una tendencia al cruzamiento entre individuos no relacionados genéticamente, presentan en general mayores niveles de diversidad genética, así como un mayor flujo genético entre las poblaciones y por tanto una escasa diferenciación genética interpoblacional. Debido a esto, en las especies que presentan fecundación cruzada la mayor parte de la diversidad genética se encuentra contenida dentro de las poblaciones, es decir presentan bajos valores de F_{ST} .

6. IMPLICACIONES EN CONSERVACIÓN

Desde el punto de vista de la conservación genética exclusivamente, diversos son los aspectos a considerar y como se ha tratado a lo largo del presente capítulo, incluyen por un lado el mantenimiento, y en ocasiones el incremento, del nivel de variabilidad genética de la especie y sus poblaciones naturales y el respeto y mantenimiento de la estructura genética existente, tanto intra como interpoblacional por el otro, con el fin de evitar la ruptura de adaptaciones establecidas. Además, las poblaciones pequeñas se ven más afectadas por los factores evolutivos tales como deriva y flujo genético que las grandes, por lo que las consideraciones genéticas en las poblaciones con un escaso número de individuos deben tomarse mucho más en cuenta si cabe.

Respecto al primer punto, los programas de conservación deben establecerse de tal forma que procuren mantener tanto el mayor número posible de alelos detectados como el grado de heterocigosidad presente. HAMRICK (1983) sugirió conservar el 99% de todos los alelos detectados en las poblaciones naturales de una especie. Obviamente, el número de poblaciones a conservar para garantizar este nivel depende del grado de diferenciación genética entre las mismas. Así, y en aquellas especies mayoritariamente alógamas, bastaba con conservar un reducido número de poblaciones ya que la mayor parte de la diversidad genética se concentra dentro de éstas. Sin embargo, en aquellas especies con elevados niveles de diferenciación interpoblacional, es necesario conservar un mayor número de poblaciones. Sin embargo, BROWN & BRIGGS (1991), consideran que la conservación genética de las poblaciones naturales se debe centrar en los alelos comunes, es decir en aquellos con una frecuencia superior a 0,05-0,10 tal y como se ha establecido en las especies cultivadas (MARSHALL & BROWN, 1975). De ésta manera, los autores argumentan que se capturaría al menos una copia de los alelos más comunes con una probabilidad de 0,90-0,95 si se realiza un muestreo al azar de entre 50 y 100 individuos (BROWN & BRIGGS, 1991). Así por ejemplo, en el análisis genético realizado en las 8 poblaciones naturales de *Viola palmensis*, la preservación de tan sólo dos de ellas (localizadas en el Barranco Vizcaíno y Fuente Mejorana) conservarían el 95% de la variación alélica detectada en la especie. Si además incorporamos la población localizada en el Barranco de Las Grajas, la conservación de la riqueza alélica de la especie se incrementaría hasta el 100% de la detectada. Por el contrario, y dado el mayor grado de diferenciación genética interpoblacional detectado entre las 5 poblaciones de *Cistus osbaeckiaefolius* del Parque Nacional del Teide (BATISTA et al., 2001), sería necesario conservar al menos dos de sus cinco poblaciones para mantener el 99% de la variación alélica.

No obstante, concentrándonos exclusivamente en la riqueza alélica de las poblaciones lograríamos cubrir nuestro objetivo sólo parcialmente, dado que la disminución de los niveles de heterocigosidad lleva consigo una reducción de la aptitud individual, y por ende, un aumento en la inviabilidad de la población a largo plazo, decreciendo su habilidad para adaptarse ante una selección cambiante. Por lo tanto, y en la medida de lo posible se debe contemplar conjuntamente los niveles de riqueza alélica y de heterocigosidad, de tal manera que se priorize la preservación de aquellas poblaciones donde ambos parámetros son superiores.

El establecimiento de «cifras mágicas» para conservar y mantener la diversidad genética de cualquier especie es extremadamente arriesgado, ya que la estrategia de muestreo dependerá sobretodo del grado de amenaza y de los efectivos poblacionales de la especie. Así, y al menos en Canarias, cerca de 40 especies amenazadas presentan menos de 50 individuos por población (con menos de 10 poblaciones) y 300 plantas en total (FRANCISCO-ORTEGA et al., 2000), por lo que éstas especies deberían ser prioritarias en los programas de conservación, al mismo tiempo que no debería ser difícil obtener una muestra de todas y cada una de las poblaciones e incluso de todos los individuos existentes, asegurando la captura del 100% de la diversidad genética existente en las mismas.

Otra de las estrategias de conservación se ha centrado en la determinación del Mínimo Viable Poblacional (MVP) el cual surge con el fin de establecer el tamaño de una población por debajo del cual aumenta la probabilidad de pérdida de diversidad genética. Diversas, son también las definiciones de este término, y aunque todas tienen en común la consideración del tamaño de población necesario para la supervivencia de la especie, su consenso respecto al propio tamaño y tiempo de supervivencia es variable. Muchas son además las variables que intervienen en la estimación del MVP, por lo que se postula que el tamaño real es un valor fluctuante ligado a las condiciones biológicas, ecológicas y ambientales de la población. Como bien señalan FRANCISCO-ORTEGA et al. (2000), la mejor forma de abordar el MVP es incidiendo y determinando los factores implicados en la disminución del tamaño de las poblaciones. No obstante, dirigimos al lector a otros artículos y referencias donde se profundiza y discute sobre estas consideraciones (FRANKEL et al., 1995).

El segundo de los aspectos claves que debe contemplarse en los programas de conservación genética es el grado de diferenciación genética interpoblacional, el cual y como ya se ha discutido, está íntimamente relacionado con el nivel de flujo genético entre las poblaciones. Actualmente, y a través de los marcadores moleculares podemos determinar e inferir los niveles de migración interpoblacional siguiendo el modelo de SLATKIN (1987) y midiendo el coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) ya discutido.

Así, la inexistencia o escasez de flujo genético incrementa las diferencias entre las poblaciones, mientras que su presencia elimina y homogeniza los acervos genéticos interpoblacionales. El flujo genético puede ser beneficioso ya que repone e incrementa la variación genética después de un proceso de deriva, pero también puede ser perjudicial si lo que hace es añadir genes mal adaptados a la población receptora.

Bajo estas premisas, y si el grado de diferenciación genética interpoblacional es considerable y significativo, se debe evitar el transplante de individuos o semillas de una población a otra, es decir el flujo genético artificial, ya que ello puede conllevar riesgos en el mante-

nimiento de los niveles de variabilidad genética. Las consecuencias de ese flujo artificial podrían incluir una alteración en el contenido de alelos y sus frecuencias, un cambio en la heterocigosidad poblacional, al mismo tiempo que rupturas de complejos coadaptados (LEBERG, 1993; ELLSTRAM & ELAM, 1993; STORFER, 1999; FRANCISCO-ORTEGA et al., 2000; MONTALVO & ELLSTRAND, 2001). Además, muchas especies (particularmente las especies endémicas canarias) parecen seguir un patrón de variación ecogeográfico a modo de mosaico que podría verse alterado si la migración artificial excede las tasas de flujo natural (FRANCISCO-ORTEGA et al., 2000).

En este punto la polémica y las discusiones son considerables. Dos fenómenos contrapuestos pueden operar durante el manejo de las poblaciones. Por un lado, algunos autores consideran que en aquellas poblaciones que disponen de un escaso número de efectivos (como generalmente sucede en las especies vegetales amenazadas) o presenta exiguos niveles de diversidad genética y es necesario actuar, se deben establecer las restituciones o reintroducciones a partir de muestras heterogéneas procedentes de varios lugares (AVISE & HAMRICK, 1996). De esta manera se evita correr el riesgo de generar procesos de erosión genética a través de deriva, y por lo tanto procesos de depresión por endogamia. El empleo de muestras procedentes de diversas poblaciones podría proporcionar vigor híbrido desde la heterosis como consecuencia del aumento de la variabilidad genética de la población, disminuyendo el riesgo de depresión por consanguinidad. Pero, por otro lado, un número considerable de estudios han demostrado una ventaja en la eficacia de las reintroducciones locales frente a los establecidos desde poblaciones localizadas a grandes distancias. Este fenómeno se conoce como depresión por cruzamiento (*outbreeding depression*).

La depresión por cruzamiento hace referencia a la reducción en la eficacia y viabilidad que aparece después de un proceso de hibridación intraespecífica de individuos procedentes de poblaciones muy separadas genéticamente. Aunque aún se desconoce la naturaleza de esta depresión, se han propuesto dos mecanismos no excluyentes para explicar el mismo. Por un lado, si las líneas parentales presentes en cada población están adaptadas a diferentes ambientes, la hibridación de estas conduciría a una «dilución» al 50% del genoma localmente adaptado, y por lo tanto se genera una pérdida de viabilidad y eficacia. Por otro lado, la combinación de diferentes procesos evolutivos ha hecho divergir la arquitectura genética global de los individuos de cada población, por lo que la hibridación entre los mismos rompe con estas estructuras armonizadas y la progenie sufre una reducción de su eficacia biológica (ROFF, 1997; MONTALVO & ELLSTRAND, 2001). Cualquiera que sea la razón ha tenido y aún tiene, consecuencias muy importantes en el manejo de poblaciones naturales.

PRICE & WASER (1979) sugirieron que en aquellas especies con dispersión génica limitada y heterogeneidad local de sus poblaciones podría existir una distancia óptima de cruzamiento en la cual disminuirían los procesos de depresión por endogamia o por cruzamiento. Es decir, los cruzamientos entre individuos próximos sufrirían de la depresión por consanguinidad debido al parentesco de los mismos, mientras que los cruces de individuos procedentes de localidades muy distantes sufrirían de depresión por entrecruzamiento. Sin embargo, los cruces establecidos a una distancia intermedia resultarían en una descendencia con mayor eficacia. No obstante, la mayoría de los estudios experimentales no han podido demostrar o detectar la existencia de esa distancia óptima. De hecho, algunos autores han demostrado que la distancia geográfica no es el principal condicionante de la depresión por cru-

zamiento, sino las diferencias genéticas y ecológicas existentes entre las poblaciones (MONTALVO & ELLSTRAND, 2001).

Si la depresión por cruzamiento es un fenómeno general en los vegetales, lo cual está aún por demostrar, se justifica plenamente las restricciones de trasplantes y restitución de material entre poblaciones. De lo contrario, se podrían establecer ensayos controlados en los que se empleen muestras heterogéneas procedentes de diversas poblaciones y ensayar en condiciones controladas el grado de depresión de las mismas, o el incremento en el nivel de diversidad genética de la población. No obstante y en éste sentido, hay que ser muy prudentes ya que demostrar la inexistencia de depresión por cruzamiento es una labor extremadamente compleja y tediosa. En general, coincidimos con FRANCISCO-ORTEGA et al. (2000) que la mejor estrategia para realizar programas de reforzamiento es la multiplicación íntegra de la población mediante reproducción vegetativa o a partir de semillas de plantas individualizadas y perfectamente etiquetadas. A ello se podría unir que las primeras medidas en conservación *in situ* deben dirigirse a la eliminación de los factores externos que inciden negativamente en la población tales como especies foráneas e invasoras, herbívoros e incluso la presión humana.

Finalmente, es necesario reiterar que las conclusiones extraídas se basan exclusivamente en el análisis de la variación genética mediante marcadores moleculares (RAPD e isoenzimas), cuya variación a menudo infravalora los niveles de diferenciación génica interpoblacional de los rasgos adaptativos, críticos para la supervivencia y reproducción de la especie, por lo que es recomendable el establecimiento de otros estudios de la biología de la especie que nos permitirán establecer óptimos programas de conservación.