**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

# CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LAS POBLACIONES NATURALES DE "GELIDIUM CANARIENSE" (RHODOPHYTA) DESDE UNA PERSPECTIVA GENÉTICA Y DEMOGRÁFICA

**NIEVES BOUZA CARRELO**

Las Palmas de Gran Canaria, julio de 2002

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

84/2001-02

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de SOBRESALIENTE CUM LAUDE

Las Palmas de Gran Canaria, a 20 de septiembre de 2002.

El/a Presidente/a: Dr.D. Ángel Luque Escalona,

El/a Secretario/a: Dra.Dña. Pilar García Jiménez,

El/a Vocal: Dr~~a~~.D~~ña~~. Juli Caujapé Castells

El/a Vocal: Dr.D. José Manuel Rico Ordas,

El/a Vocal: Dr.D. Rui Orlando Pimenta Santos,

La Doctoranda: Dª. Nieves Bouza Carrelo,

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
BIBLIOTECA
DE
CIENCIAS
BASICAS

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Doctorado en Biología
Departamento de Biología
Programa de Ecosistemas Litorales

# Contribución al conocimiento de las poblaciones naturales de *Gelidium canariense* (Rhodophyta) desde una perspectiva genética y demográfica.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tesis Doctoral presentada por Dña. Nieves Bouza Carrelo
Dirigida por el Dr. Pedro Sosa Henríquez

U.L.P.G.C.
Ciencias Básicas
Biblioteca
Nº D.
Nº C.

El Director,

El Doctorando,

Las Palmas de Gran Canaria, a 4 de Julio de 2002.

A mi pequeña pero gran familia,
en especial a Yoyo.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincera gratitud a esta maravillosa tierra y a toda su gente, pues desde que llegué aquí para realizar mis estudios universitarios, su hospitalidad y amabilidad han permitido que me sintiera integrada en todo momento.

De manera especial, quiero agradecer a mi Director de Tesis, Dr. Pedro Sosa Henríquez, su amistad, la dirección de este trabajo y la confianza y apoyo depositada en mí día tras día, sin dejar de insistir y creer en mí.

A todos los miembros del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por su colaboración en este trabajo, y de forma muy especial a los becarios de antes y de ahora, por tantos momentos compartidos.

A la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por sus becas y ayudas de investigación tan necesarias, para todas aquellas personas, que como yo, decidimos seguir esta trayectoria. También quiero agradecer a la Comisión Europea por la concesión del proyecto *Biodiversity and Genetics of Algal Populations* (BIOGAP) dentro del Programa MAST III, que me facilitó una beca durante los tres primeros años.

Aos profesores Rui Santos e João M. Leitão da Universidade do Algarve (Faro, Portugal) por dar-me a oportunidade de *mergulhar* no mundo da Genética e de conhecer um país cheio de encanto.

A todos os membros do Laboratório de Genética e Melhoramento da Universidade do Algarve por passar uns meses inesquecíveis, fazendo-me sentir como em casa, especialmente a Paulo Elisiário e Filipe Alberto que gastaron ciência e paciência para tansformar em genetista uma oceanógrafa.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

To Annelie Lindgren and Per Aberg for training me on demography, specially Annelie who shared with me energetic waves on the North coast of Gran Canaria.

A todos los alumnos de Ciencias del Mar que participaron en las inolvidables campañas de muestreo, cuya colaboración, amistad y sobretodo entusiasmo ayudaron a sobrellevar los agotadores *tours* por las islas, la lucha contra el oleaje siempre rebelde y las interminables horas limpiando epifitos. Gracias a ellos, las campañas de muestreo y los riesgos compartidos perdieron parte de su dureza. Cada uno de *vosotros* tiene una parte en este trabajo. Especialmente quiero mencionar a Tino Agustí, por su vitalidad y entusiasmo. Siempre serás un dulce recuerdo en mi memoria.

A mis compañeros de grupo de investigación de antes y de ahora, por su amistad y su compañerismo y por tantos y tantos momentos compartidos, especialmente a Juli Caujapé-Castells por aquellos meses tan intensos donde batimos los récords de RAPD con las féminas y en el que las enseñanzas fueron muchas.

A Pilar García por su amable y generosa disposición para realizar el estudio de microscopía y por la sencillez que trasmite.

A Nieves González por su desinteresada ayuda tanto en la identificación de los gametofitos masculinos, como en el asesoramiento biológico y ecológico de *Gelidium canariense*.

A Fernando Tuya, por su siempre buena disposición a asesorar sobre el mundo de la ecología y de la estadística.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

A mi familia, porque a pesar de la distancia os he sentido muy cerca, apoyándome sin condiciones y alentándome siempre a perseguir los sueños. De manera especial a Yoyo, por tener siempre la complicidad a punto.

A mis amigos/as de aquí que con vuestro cariño, comprensión y ánimos habéis hecho que los momentos buenos se intensificasen y los momentos en que no todo sale como una quisiera fuesen más dulces, especialmente a mis compañero/as de piso, Natalia, Nuria y Gregorio. Han sido muchos los momentos especiales.

Y por último y no menos importante, a Chus, Elda, Celia, e Inma, que a pesar de la distancia, me habéis apoyado y animado constantemente.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

CUIDE EL LIBRO
NO LO SUBRAYE

# INDICE DE CONTENIDOS

**I.- INTRODUCCION GENERAL.....1**

**II- INTRODUCCIÓN.....7**

2.1. *Gelidium canariense*.....9

**2.1.1. Distribución geográfica de la especie.....10**

**2.1.2. Autoecología.....13**

**2.1.3. Características oceanográficas del área de estudio.....15**

2.2. Introducción a la técnica de PCR.....18

2.3. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD).....20

2.4. Aplicación de RAPDs en genética de poblaciones.....24

2.5. Extracción y purificación de ADN.....25

2.6. Amplificación de ADN en macroalgas marinas.....28

2.7. Reproducibilidad de patrones de RAPD.....29

2.8. Metodología de *bulks* poblacionales.....31

2.9. Niveles de diversidad genética.....33

**2.9.1. Indices de diversidad genética.....35**

**2.9.2. Indices de similitud.....36**

2.10. Diferenciación genética entre poblaciones.....37

**2.10.1. Indice de Shannon.....38**

**2.10.2. Análisis de la varianza molecular.....39**

2.11. Estructuración genética intrapoblacional.....40

2.12. Estudios demográficos en macroalgas marinas.....42

**III.- MATERIAL Y METODOS.....51**

3.1. ANALISIS GENETICO.....53

**3.1.1. Muestreo.....53**

3.1.1.1. Diseño de recogida de muestras.....53

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.1.1.2. Descripción de las poblaciones. ..... 58
3.1.1.3.Tratamiento y almacenamiento de las muestras. ..... 62
**3.1.2. Caracterización de gametofitos masculinos. ..... 62**
**3.1.3. Extracción y purificación de ADN. ..... 75**
3.1.3.1. Optimización de extracción de ADN. ..... 75
3.1.3.2. Optimización purificación de ADN. ..... 76
3.1.3.2.1. Tratamiento con el enzima ARNasa. ..... 76
3.1.3.2.2. Limpieza con hidroxiapatito. ..... 77
3.1.3.2.3. Purificación con el sistema clean up de ADN ..... 78
3.1.3.3. Extracción y purificación de ADN en los análisis poblacional (*bulks*) e individual. ..... 79
3.1.3.4. Determinación de la concentración de ADN. ..... 80
3.1.3.5. Almacenamiento de las muestras de ADN. ..... 80
**3.1.4. Amplificación al azar de ADN polimórficos (RAPD). ..... 81**
3.1.4.1. Pruebas de dilución para PCR. ..... 82
3.1.4.2. Elaboración de las reacciones de amplificación. ..... 82
3.1.4.3. Selección de cebadores. ..... 84
**3.1.5. Separación e interpretación de los patrones de ADN. ..... 87**
3.1.5.1. Elaboración de geles de agarosa y carga de las muestras. ..... 87
3.1.5.2. Separación en geles de agarosa. ..... 88
3.1.5.3. Tinción y visualización de los fragmentos de ADN. ..... 88
3.1.5.4. Reproducibilidad de patrones de RAPD. ..... 88
3.1.5.4.1. Reproducibilidad entre distintas amplificaciones. ..... 89
3.1.5.4.2. Reproducibilidad entre electroforesis. ..... 89
3.1.5.4.3. Reproducibilidad entre reacciones realizadas dentro de una misma PCR. ..... 89
3.1.5.4.4. Reproducibilidad entre diferentes extracciones de ADN. ..... 90
**3.1.6. Estudios realizados. ..... 90**
3.1.6.1. Análisis poblacional (*bulks*). ..... 90
3.1.6.2. Caracterización molecular

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

de las fases haploide y diploide. ..... 91
3.1.6.3. Análisis de la fase haploide. ..... 92
3.1.6.4. Análisis comparativo de *bulks* poblacionales e individuos haploides..... 93
**3.1.7. Análisis estadístico de datos. ..... 93**
3.1.7.1. Matriz de datos. ..... 93
3.1.7.2. Indices de similitud genética. ..... 94
3.1.7.3. Marcadores diagnostico. ..... 95
3.1.7.4. Indices de diversidad genética ..... 95
3.1.7.5. Análisis de la varianza molecular..... 97
3.1.7.6. Coeficiente de diferenciación genética ($F_{ST}$)..... 98
3.1.7.7. Arboles de similitud genética y Análisis de Componentes Principales. ..... 99
3.1.7.8. Análisis de autocorrelación espacial. ..... 99

3.2. ANALISIS DEMOGRAFICO. ..... 100

**3.2.1. Descripción de las poblaciones..... 100**
**3.2.2. Diseño experimental. ..... 101**
3.2.2.1. Muestreo destructivo. ..... 101
3.2.2.2. Muestreo no destructivo. ..... 102
**3.2.3. Estudio piloto de marcaje de individuos. ..... 108**
**3.2.4. Análisis estadístico de datos. ..... 109**

**IV.- RESULTADOS..... 115**

4.1. ANALISIS GENETICO..... 117

**4.1.1. Muestreo general. ..... 117**
**4.1.2. Extracción y purificación del ADN..... 117**
**4.1.3. Amplificación del ADN..... 123**
**4.1.4. Reproducibilidad de patrones de ADN..... 123**
**4.1.5. Análisis de *bulks* poblacionales. ..... 128**
4.1.5.1. Niveles de diversidad genética. ..... 128

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

4.1.5.2. Estructuración genética de las poblaciones. ..... 135
**4.1.6. Caracterización molecular de fase haploide y fase diploide. 140**
4.1.6.1. Niveles de diversidad genética.....140
4.1.6.2. Estructuración genética de las poblaciones.....146
**4.1.7. Caracterización de gametofitos masculinos..... 150**
**4.1.8. Análisis de la fase haploide..... 151**
4.1.8.1. Niveles de diversidad genética..... 151
4.1.8.1.1. Niveles de diversidad genética por población..... 151
4.1.8.1.2. Niveles de diversidad genética por islas..... 160
4.1.8.1.3. Robustez de los datos. ..... 163
4.1.8.2. Diferenciación genética entre poblaciones..... 164
4.1.8.2.1. Análisis de la varianza molecular e
Indice de Shannon..... 164
4.1.8.2.2. Dendrograma UPGMA..... 166
4.1.8.2.3. Análisis de Componentes Principales..... 167
4.1.8.2.4. Aislamiento por distancia..... 173
4.1.8.2.5. Flujo genético entre poblaciones. ..... 174
4.1.8.3. Estructuración intrapoblacional. ..... 177
**4.1.9. Análisis comparativo de *bulks* poblacionales e individuos haploides.....186**
4.1.9.1. Nivel de polimorfismo..... 186
4.1.9.2. Patrones de similitud genética. ..... 188

4.2. ANALISIS DEMOGRAFICO..... 190

**4.2.1. Muestreo destructivo. ..... 190**
**4.2.2. Muestreo no destructivo..... 194**
4.2.2.1. Biomasa individual. ..... 194
4.2.2.2. Biomasa cosechable y densidad..... 200
4.2.2.3. Estadios del ciclo de vida..... 201
4.2.2.4. Supervivencia y reclutamiento. ..... 203

**V.- DISCUSIÓN.....205**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

5.1. ANALISIS GENETICO.....207

**5.1.1. Optimización de la técnica RAPDs.....207**

**5.1.2. Análisis de *bulks* poblacionales.....209**

**5.1.3. Análisis comparativo de *bulks* poblacionales e individuos haploides. .....211**

**5.1.4. Análisis de la fase haploide. .....212**

5.1.4.1. Niveles de variabilidad genética. .....212

5.1.4.2. Estructuración genética poblacional. .....219

5.2. ANALISIS DE DEMOGRAFICO.....227

**VI.- CONCLUSIONES.....239**

**VII.- ANEXOS.....245**

**VIII.- BIBLIOGRAFIA.....251**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo reproductivo de *Gelidium canariense*.

Figura 2. Distribución de *Gelidium canariense* en el intermareal inferior.

Figura 3. Mapa de las islas Canarias mostrando la localización de las poblaciones muestreadas en las diferentes islas.

Figura 4. Diseño experimental utilizado en el análisis genético de *Gelidium canariense*.

Figura 5. Localización y fotografías de las poblaciones analizadas en la isla de Gran Canaria.

Figura 6. Localización y fotografías de las poblaciones analizadas en la isla de Tenerife.

Figura 7. Localización y fotografías de las poblaciones analizadas en la isla de La Palma y La Gomera.

Figura 8. Diferentes tipos de talos utilizados en histología. A: Talo esporofítico, B: Detalle del esporangio. C: Talo gametofito femenino, D: Detalle de carpoesporangio maduros.

Figura 9. Diferentes tipos de talos utilizados en histología. A: Talo infértil, B: Detalle de ápices blancos. C: Talo con zonas decoloradas, D: Detalle de las estructuras blanquecinas.

Figura 10. Diferentes tipos de talos utilizados en histología. A: Talo con ápices decolorados, B: Detalle de estructuras globulares.

Figura 11. Esquema de los ciclos utilizados en la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).

Figura 12. Localización de la Playa de Bocabarranco (Gáldar).

Figura 13. Diseño experimental del estudio demográfico.

Figura 14. Poblaciones de *Gelidium canariense* analizadas en Bocabarranco (Gáldar).

Figura 15. Poblaciones y parcelas en la localidad de Bocabarranco (Gáldar) en marea baja. A) Población 1 y parcelas estudiadas (P1

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

y P2). B) Parcela 1 de la población 2. C) Parcela 2 de la población 2.

Figura 16. A) Individuo de *Gelidium canariense* marcado con tres etiquetas (flecha). B) Detalle de un fronde de *Gelidium canariense* con la etiqueta en la parte basal.

Figura 17. Proporción de individuos observados según el estado reproductor para el análisis genético por población.

Figura 18. Cuantificación de ADN genómico de *G. canariense* de la población de Bocabarranco.

Figura 19. Amplificación RAPD de *bulks* de ADN de poblaciones de *G. canariense* (negro) y G. arbuscula (rojo) con el cebador OPM 20 y OPK 4.

Figura 20. Variación de la distancia genética (D=1-S) en relación a la distancia geográfica en las poblaciones de *G. canariense*.

Figura 21. Dendrograma UPGMA basado en el coeficiente de Dice obtenido con *bulks* poblacionales.

Figura 22. Patrones de amplificación RAPD con el cebador OPM 7.

Figura 23. Matriz de los valores del coeficiente de Dice debajo de la diagonal y del coeficiente SM arriba de la diagonal entre los diferentes individuos analizados.

Figura 24. Dendrograma UPGMA basado en el coeficiente Dice. * : Gametofitos femeninos.

Figura 25. A: Sección longitudinal de un fragmento de talo de *G. canariense*, soportando tetraesporofitos (Flecha).

Figura 26. Frecuencias de haplotipos totales para cada cebador estudiado en *Gelidium canariense*.

Figura 27. Variación del número medio de haplotipos frente al tamaño poblacional.

Figura 28. Primera parte del dendrograma UPGMA.

Figura 29. Segunda parte del dendrograma UPGMA.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Figura 30. Análisis de componentes principales de las poblaciones analizadas en *Gelidium canariense*.

Figura 31. Variación de la distancia genética en relación a la distancia geográfica.

Figura 32. Dendrograma Neighbour-Joining basado en el coeficiente de diferenciación $F_{ST}$.

Figura 33. Análisis de autocorrelación espacial de la población de AP3.

Figura 34. Análisis de autocorrelación espacial de la población de PCP3.

Figura 35. Análisis de autocorrelación espacial de la población de FP1.

Figura 36. Análisis de autocorrelación espacial de la población de BBS1.

Figura 37. Análisis de autocorrelación espacial de la población de BBS2.

Figura 38. Análisis de autocorrelación espacial de la población de GAS2P1.

Figura 39. Dendrograma UPGMA basado en el coeficiente de Dice obtenido en el análisis de individuos haploides de *Gelidium canariense*.

Figura 40. Dendrograma UPGMA basado en el coeficiente de Dice obtenido en el análisis de *bulks* poblacionales (BBS1, AP3, PCP3) de *Gelidium canariense*.

Figura 41. Relación entre el peso seco y el volumen (LC2) individual en las poblaciones analizadas de *Gelidium canariense*.

Figura 42. Individuos de *Gelidium canariense* pertenecientes a las diferentes clases de talla.

Figura 43. Estructura de clases de tallas en *Gelidium canariense* para la Población 1.

Figura 44. Estructura de clases de tallas en *Gelidium canariense* para la Población 2.

Figura 45. Proporción de individuos gametofitos femeninos, esporofitos y desconocidos.

Figura 46. Proporción de individuos gametofitos femeninos y esporofitos en 1996.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Categorías jerárquicas y distancias en el muestreo genético de *Gelidium canariense*.

Tabla 2. Parámetros ensayados en la optimización de la amplificación de ADN.

Tabla 3. Listado de cebadores ensayados en la selección inicial de cebadores en *G. canariense* y *G. arbuscula*.

Tabla 4. Poblaciones e individuos estudiados en el análisis de marcadores genéticos para las fases haploide y diploide.

Tabla 5. Ecuaciones de los modelos de los diferentes ANOVAs.

Tabla 6. Poblaciones e individuos muestreados en las distintas jerarquías consideradas para el análisis genético.

Tabla 7. Distribución y reproducibilidad de los marcadores RAPD clasificados según intensidad de la banda en los distintos estudios de reproducibilidad.

Tabla 8. Cebadores y sus secuencias utilizadas en el test inicial. +: Amplificación positiva.

Tabla 9. Número de cebadores, número de fragmentos producidos (NF), número de fragmentos polimórficos (PF) y porcentaje de polimorfismo (%P) obtenidos en cada especie.

Tabla 10. Cebadores empleados, secuencias de los cebadores, peso molecular, número de fragmentos obtenidos (NF) y número de fragmentos polimórficos (PF) en el análisis de *bulks* en *G. canariense* y *G. arbuscula*.

Tabla 11. Lista de marcadores RAPD específicos en las poblaciones de *G. canariense*.

Tabla 12. Matriz de valores de similitud entre las poblaciones analizadas de *G. canariense* y *G. arbuscula* basados en el coeficiente de Dice (debajo de la diagonal) y con el coeficiente SM (arriba de la diagonal).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 13. Descriptores básicos de la variabilidad genética asociada a los 15 cebadores utilizados en el análisis fase haploide y diploide de *Gelidium canariense.*

Tabla 14. Descriptores básicos de la variabilidad genética por población asociada a los 15 cebadores en el análisis fase haploide y diploide de *G. canariense.*

Tabla 15. Parámetros básicos de la variabilidad genética asociada a gametofitos (fase haploide) y esporofitos (fase diploide) obtenidos con 15 cebadores.

Tabla 16. Descriptores básicos de la variabilidad genética asociada a los 13 cebadores utilizados para el análisis de las poblaciones de *Gelidium canariense.*

Tabla 17. Diversidad genética media por locus de cada población ($H'_j$) incluyendo los monomórficos, $H''_{pop}$: diversidad genética media por locus y por población. $H''_{SP}$ : diversidad genética media por locus para la especie.

Tabla 18. Número de bandas totales obtenidas (NF), número de fragmentos polimórficos (PF), porcentaje de marcadores polimórficos (% P), diversidad genética media ($H'_j$) por marcador dentro de cada una de las poblaciones analizadas de *G. canariense.*

Tabla 19. Secuencia de cebadores, número de bandas polimórficas (PF), tamaño de los marcadores (pb) y valores de diversidad genética (Lynch & Milligan 1994) por cebador y población.

Tabla 20. Número total de haplotipos y número medio de haplotipos por cebador y población.

Tabla 21. Porcentaje de polimorfismo, diversidad genética (DG), diversidad genética ($H'_j$) y número de haplotipos por islas en *Gelidium canariense.*

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 22. AMOVA de la variabilidad de RAPD en los distintos niveles jerárquicos considerados en las poblaciones de *Gelidium canariense.*

Tabla 23. Repartición de la variabilidad genética estimada con el Indice de Shannon entre los componentes intra ($H'_{POP}/H'_{SP}$) e interpoblacional (($H'_{SP}-H'_{POP}$) $/H'_{SP}$ ) en las poblaciones de *G. canariense* analizadas.

Tabla 24. Diferenciación genética ($F_{ST}$ valores) entre las siete poblaciones de *G. canariense* los valores por debajo de la diagonal.

Tabla 25. Cebadores empleados, peso molecular, número de fragmentos obtenidos (NF), número de fragmentos polimórficos (PF), porcentaje de polimorfismo (%P) y porcentaje de similitud de marcadores (%S) en el análisis comparativo de *bulks* poblacionales e individuos haploides en *G. canariense*.

Tabla 26. Lista de marcadores RAPD exclusivos obtenidos en el análisis comparativo de *bulks* poblacionales e individuos haploides en *G. canariense.*

Tabla 27. Coeficiente Dice entre poblaciones. Azul: Valores medios del coeficiente de Dice obtenidos en el análisis de *bulks* poblacionales. Negro: Valores del coeficiente de Dice obtenidos en el análisis de individuos haploides.

Tabla 28. Número total de individuos, peso húmedo medio ($g/m^2$) y porcentaje de gametofitos femeninos, esporofitos y desconocidos recogidos en las dos poblaciones durante el muestreo destructivo.

Tabla 29. ANOVA para el peso seco individual a partir de los datos del muestreo destructivo en *Gelidium canariense*.

Tabla 30. Análisis de ANOVA para la densidad a partir de los datos del muestreo destructivo en *Gelidium canariense*.

Tabla 31. ANOVA para la biomasa cosechable a partir de los datos del muestreo destructivo en *Gelidium canariense.*

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 32. ANOVA del peso seco individual en *Gelidium canariense*. Datos transformados con $log_e$ para obtener la homogeneidad de varianzas.

Tabla 33. ANOVA del peso seco individual después del agrupamiento de componentes post hoc.

Tabla 34. ANOVA de la biomasa cosechable en los poblaciones de Gelidium canariense.

Tabla 35. ANOVA de la densidad (nº de plantas/m2) en los poblaciones de Gelidium canariense.

Tabla 36. ANOVA de la proporción de gametofitos femeninos y esporofitos en 1996.

Tabla 37. ANOVA de la tasa de supervivencia de individuos en *Gelidium canariense.*

Tabla 38. ANOVA del reclutamiento de individuos en *Gelidium canariense*.

Tabla 39. ANOVA del reclutamiento de individuos de *Gelidium canariense* después del post hoc pooling del factor Parcela (Población).

Tabla 1. Anexo. Frecuencia de bandas por población obtenidas con los 13 cebadores analizados en el análisis haploide.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# I. INTRODUCCION GENERAL

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

*Gelidium canariense* (Grunow) Seoane-Camba *ex* Haroun, Gil-Rodríguez, Díaz de Castro *et* Prud'homme van Reine es una de las especies agarofitas (productoras de agar) que alcanza un cierto desarrollo en el archipiélago canario por lo que se considera un recurso potencial para la obtención de agar. Por ello, ha sido estudiada previamente tanto desde el punto de vista de la dinámica poblacional (Betancort-Villalba & González-Henríquez 1991; González-Henríquez & Betancort-Villalba 1997), calidad de ficocoloides (Freile-Pelegrín *et al.* 1995; Freile-Pelegrín 1996), genética de poblaciones (Sosa 1991; Sosa & García-Reina 1993; Sosa *et al.* 1998), como desde el punto de vista experimental mediante cultivo en laboratorio (Robaina 1988; Robledo-Ramírez 1993; García-Jiménez *et al.* 1999), desde el punto de vista fisiológico (Marián *et al.* 2000) y ecológico (Mercado *et al.* 2001).

Los principales motivos que hacen que *Gelidium* sea un género importante dentro de las algas rojas son de índole biológico y económico. En primer lugar, las especies de este género son dominantes en diversos habitats litorales y sublitorales de amplias áreas geográficas y como principales productores primarios juegan un papel crítico en el ecosistema (Gorostiaga 1990). En segundo lugar, diversas especies de *Gelidium* son explotadas como materia prima de su principal polisacárido (agar) en diversas partes del mundo. McHugh (1991) sostiene que el 50% del mercado mundial de agar procede del género *Gelidium*. Melo (1998) cita un notable incremento en el Noreste del Atlántico entre 1990-1996, aunque no cuantificable debido a la falta de bases de datos actualizadas y al auge de las agarofitas del género *Gracilaria* en el mercado mundial. Ambos aspectos hacen que todos aquellos estudios dirigidos a conocer aspectos genéticos, demográficos y de utilización de las diversas especies del género sean de gran interés.

Las algas bentónicas incluida *Gelidium*, son las únicas especies que presentan una amplia variedad de diferentes ciclos de vida, los cuáles incluyen individuos haploides, diploides y haplo-diploides de vida libre (Bell 1994; De Wreede & Klinger 1988). Los efectos de los ciclos de vida complejos con o sin reproducción sexual y la capacidad de dispersión determinan la estructura

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

geográfica y el flujo genético a diferentes escalas espaciales. La diferenciación genética es mas extensiva en especies autógamas que en las especies alógamas. De hecho, muchos trabajos han tenido como objetivo las correlaciones entre los rasgos del ciclo de vida y la diferenciación genética espacial en poblaciones naturales (Brown *et al.* 1990b; Hamrick & Godt 1996) o la subestructuración espacial dentro de las poblaciones (Epperson 1990; Heywood 1991). Aunque se sabe, que la estructura espacial genética, la distribución espacial de plantas haploides y diploides y la escala del flujo genético son esenciales para la modelización de los procesos evolutivos que generan diversidad genética, estos componentes son menos conocidos en mayoría de las algas marinas bentónicas.

El uso de técnicas moleculares como herramienta para aportar nuevas visiones sobre aspectos de la ecología, evolución, comportamiento, conservación y biología de las poblaciones ha motivado el nacimiento de la ecología molecular. Son muchos los marcadores de ADN que se han generado gracias al avance de las técnicas de Biología Molecular. Entre ellos los marcadores RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA: Amplificación al azar de ADN polimórfico) han alcanzado una notable popularidad, principalmente porque no requieren un conocimiento previo de genoma a estudiar y han sido utilizados para caracterizar clones e híbridos, analizar la variación genética entre y dentro de poblaciones naturales, análisis de paternidad, etc. (Weising *et al.* 1995, Hadrys *et al.* 1992; Parker *et al.* 1998).

La mayor parte de los trabajos efectuados sobre variabilidad genética entre poblaciones de una misma especie han sido realizados en plantas superiores, siendo muy reducido el número de trabajos realizados en macroalgas. La electroforesis isoenzimática, aunque ha sido utilizada para analizar la estructura genética de muchos organismos de manera exitosa, no es la herramienta ideal en macroalgas debido al bajo número de loci disponibles y al bajo nivel de polimorfismo encontrado (Sosa & Lindstrom 1999, Valero *et al.* 2001). Para llevar a cabo estudios genéticos de mayor resolución se han desarrollado nuevas herramientas moleculares en varias especies de algas: microsatélites en el alga roja *Gracilaria gracilis* (Wattier *et al.* 1997; Engel

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

*et al.* 1999; Luo *et al.* 1999) y en *Laminaria digitata* (Billot *et al.* 1998), amplificación de fragmentos de ADN polimórfico (AFLP) en *Alaria marginata* (Kusumo & Druehl 2000); amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) en diferentes especies de algas rojas (Alberto *et al.* 1997, 1999; Wright *et al.* 2000, Meneses 2001, Faugeron *et al.* 2001) y algas pardas (Coyer *et al.* 1997; Miller *et al.* 2000; Engelen *et al.* 2001) y recientemente el análisis de ADN del cloroplasto (Zuccarello *et al.* 2000).

Los atributos demográficos y genéticos de una especie afectan a la capacidad de migración o dispersión tanto espacial como temporalmente, a la vez que guardan relación con el ciclo de vida y otros parámetros poblacionales. Miller *et al.* (2000) y Billot *et al.* (en revisión) señalan la importancia del conocimiento de la dinámica poblacional desde una perspectiva genética y demográfica para conocer la fragilidad y la tolerancia de las poblaciones de macrófitos marinos. Las tasas vitales de los genotipos son expresiones de su eficacia biológica. Los genotipos con éxito dominaran la población y la interacción con los factores ambientales determinan a su vez aspectos de su evolución. Según Lande (1988) en poblaciones de reducido tamaño, los factores demográficos, tienen una mayor probabilidad de causar la extinción de la población que las pérdidas de variación genética, de ahí la importancia que tienen este tipos de estudios en especies endémicas, como *Gelidium canariense*. Las tasas vitales de fecundidad, reclutamiento, supervivencia y crecimiento obtenidos en los estudios demográficos son la base de los modelos matemáticos, los cuáles a su vez constituyen herramientas muy importantes para conocer las dinámicas intrínsecas de las poblaciones. La aplicación de estos modelos a problemas concretos de manejo de recursos, tales como la optimización de estrategias de explotación, son esenciales para el manejo racional de las poblaciones de especies con interés comercial.

*Gelidium canariense* es una alga roja (Rhodophyta, Gelidiales) con un alto contenido de agar, pero que actualmente no se explota. Estudios previos realizados con isoenzimas en poblaciones naturales de *Gelidium canariense* sugerían que esta especie se caracterizaba por presentar una reproducción asexual mayoritaria, además de estar sujeta a deriva genética (Sosa 1991;

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Sosa & García-Reina 1993). La distribución de los individuos de *Gelidium canariense* es continua, excepto para interrupciones debidas a la topografía del sustrato, característica inherente a las costas rocosas o a la ausencia de fuerte hidrodinamia. No existe ninguna estimación de la distribución de dispersión efectivas de los gametos, esporas o zigotos por lo que es difícil hacer una predicción del patrón de distribución de la diversidad genética dentro de las poblaciones y no se espera una subestructuración espacial significante dentro de los poblaciones.

Este es el primer estudio que integra datos genéticos y datos de dinámica poblacional en especies de *Gelidium*, cuyo propósito general es contribuir al conocimiento de la estructura y la dinámica genética y demográfica de algas rojas en general y de especies agarofitas del genero *Gelidium* en particular.

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- Determinar la variabilidad, el grado de diferenciación y el nivel de estructuración genética en las poblaciones naturales de *Gelidium canariense* a diferentes escalas espaciales mediante el análisis de marcadores moleculares (RAPD).
- Investigar la variación espacial y temporal de los parámetros demográficos en las poblaciones naturales de *Gelidium canariense* de Gran Canaria.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# II. INTRODUCCION

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

## 2.1. *Gelidium canariense*

*Gelidium canariense* es una especie perteneciente a la Familia Gelidiaceae, Orden Gelidiales. Presenta un color rojo-negruzco y ramificación irregular (dística) con tendencia a una estructura corimbiforme sin diferencias especialmente marcadas entre el eje principal y las ramas (Seoane-Camba 1979). Los talos, cartilaginosos, son generalmente, cilíndricos y fijados al sustrato por rizoides.

Al igual que otras especies de *Gelidium*, *G. canariense* es una especie perenne, con un tipo de construcción modular en el que los frondes erectos se desarrollan a partir de un sistema basal de ejes postrados que están adheridos al sustrato por rizoides. Esta especie crece en zonas rocosas con alta hidrodinamia, desde el límite inferior del intermareal, donde presenta una estructura en mosaico mezclado con G. *arbuscula* y otras algas, hasta 5 ó 10 m en la zona submareal donde presenta una distribución más continua. Sauvageau (1912) hizo una descripción llamativa de las poblaciones de *Gelidium canariense:* "Le *Cystoseira Abies-marina* habite les rochers battus de la zone inférieure. Quand il croit sur une paroi verticale opposée à la mer, on observe toujours la succession suivante, si nette qu'on la distingue à distance: une bordure jaune, formee par lui, de 20-40 cm de hauter: immé diatement au-dessous, une autre bande d'un beau rose violacé de *Gelidium arbuscula* Bory; au-dessous de celui-ci, et se prolongeant dans la partie non accessible et non visible, une plus large bande sombre, presque noire de *Gelidium cartilagineum* Gaill ». *(C. Abies-marina* habita las zonas batidas de la zona inferior .....forma una zona amarilla de 20-40 cm de altura, inmediatamente debajo existe una zona rosa-violácea formada por *G. arbuscula* y debajo de ésta, en la zona nunca accesible ni visible, aparece una zona extensa, oscura y casi negra de *G. canariense* (antes *G. cartilagineum*).

Al igual que el resto de los representantes de la familia, ambas especies presentan un ciclo con alternancia de generaciones trigenético (tipo *Polysiphonia*). Este ciclo consta de tres fases coexistentes: esporofito, gametofito y carpoesporofito, siendo las dos primeras fases isomórficas,

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

macroscópicas (Figura 1) (Dixon 1959; Fan 1961). Además, presenta reproducción vegetativa por crecimiento de nuevos frondes a partir del eje postrado o por fragmentación de frondes. La identificación de esporofitos y gametofitos femeninos se puede realizar en el campo, los gametofitos femeninos se caracterizan por presentar la fase carpoesporofítica epifita (cistocarpos) y los esporofitos por presentar esporangios (Figura 1). Sin embargo, los gametofitos masculinos (haploides) no se han podido caracterizar hasta el momento.

*G. canariense* presenta individuos fértiles durante todo el año. Los individuos esporofíticos de *G. canariense* son más abundantes que los gametofitos femeninos basado en la presencia de estructuras reproductoras (Lindgren *et al.* 1998; Sosa 1991; Sosa & García-Reina 1993). Los patrones de dominancia de fase están de acuerdo con lo que generalmente es observado en Gelidiaceae (Akatsuka 1986; Santelices 1988).

### 2.1.1. Distribución geográfica de la especie.

*Gelidium* es un género ampliamente distribuido a lo largo de las regiones cálido-templadas de ambos hemisferios, pudiendo encontrarse tanto en la zona intermareal como en la zona submareal. Sin embargo, en ambos extremos de temperaturas frías y calientes, los representantes de *Gelidium* son escasos (Dixon 1958a; Michanek 1983).

*Gelidium canariense* es una especie endémica de las Islas Canarias descrita sólo en las islas de Gran Canaria, Tenerife, La Palma y La Gomera (Haroun *et al.* 2002). Se encuentra distribuida sólo en la costa norte de las islas, asociada a habitats altamente expuestos. Esta especie se localiza en latitudes subtropicales por lo que el comportamiento de las poblaciones naturales probablemente será diferente al de otras especies del género de latitudes más altas ya estudiada en la Península Ibérica (Betancort-Villalba & González-Henríquez 1991).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

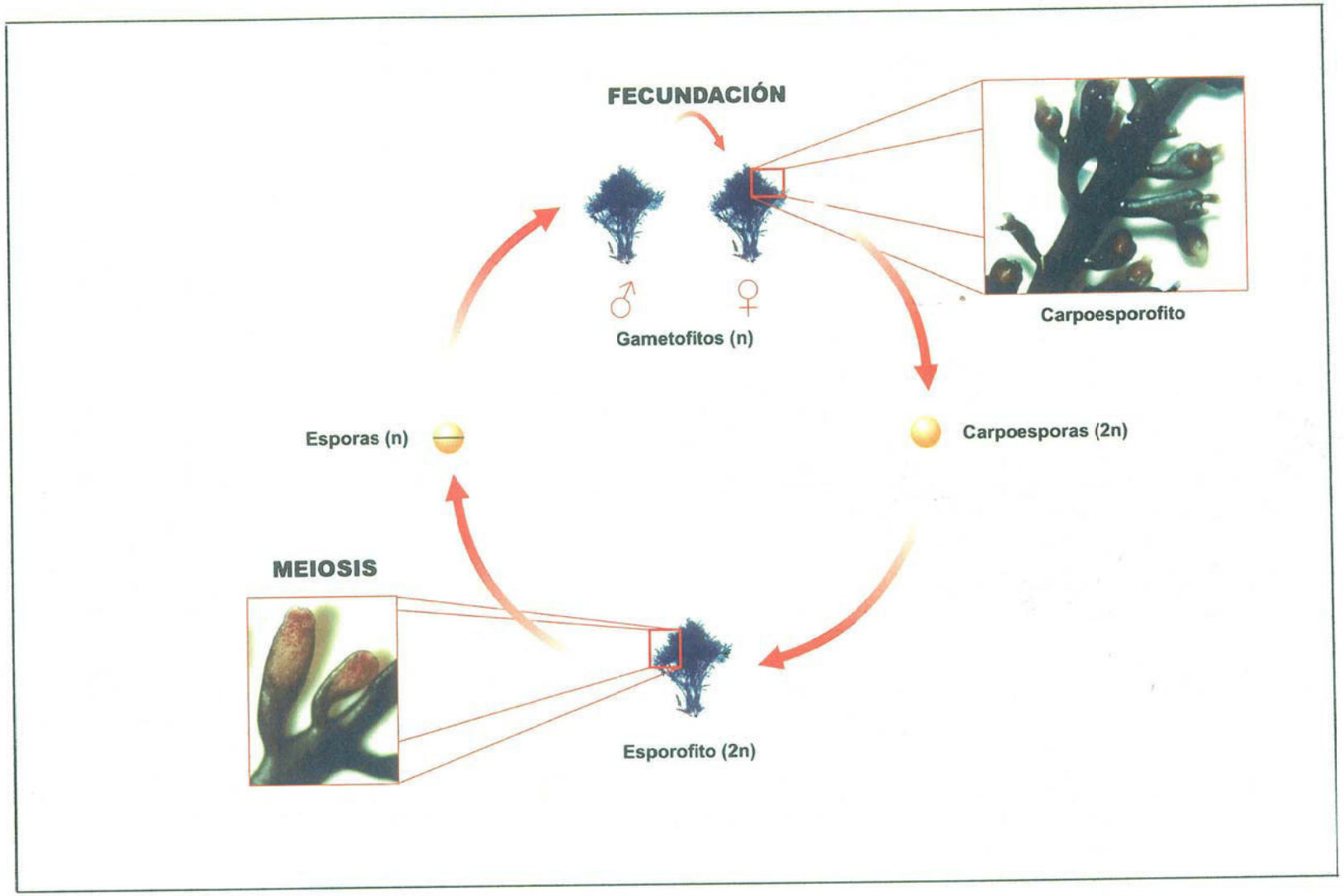



Figura 1.- Ciclo de vida de *Gelidium canariense*.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 2.1.2. Autoecología.

*Gelidium canariense* vive sobre sustratos rocosos estables en la zona intermareal inferior y sublitoral y siempre en tramos de costa expuestos a fuerte oleaje. Esta especie presenta una distribución espacial desigual. La porción de la población que crece en la parte inferior del intermareal está expuesta al aire en las bajamares máximas mensuales dos veces al día, durante una hora aproximadamente, aunque es continuamente salpicada por el oleaje. En muchas ocasiones presenta una distribución espacial en mosaico mezclada con otras algas, principalmente *G. arbuscula* y *Pterocladia sp* y algas coralináceas (Figura 1). En la parte submareal, por lo general, las poblaciones forman mantos continuos uniespecíficos. La distribución o zonación de una especie es debida a la heterogeneidad ambiental de factores bióticos y abióticos en la misma dirección (Lewis 1964; Hawkins & Hartnoll 1985). En el caso de Gelidiales, los factores medioambientales son los principales responsables de la distribución vertical (Santelices 1978; Oliger & Santelices 1981; Rico & Fredriksen 1995)

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**Figura 2.- Distribución de *Gelidium canariense* en el intermareal inferior.**

Mercado *et al.* (2001) han demostrado que la fotosíntesis en *G. canariense, G. arbuscula y Pterocladia capillacea* puede estar limitada por la luz incidente más que por la concentración de carbono inorgánico disponible en el hábitat natural. La presencia de especies del género en aguas agitadas, parece estar relacionada con el mayor transporte de nutrientes y difusión de gases que se produce en tales condiciones (Tseng & Sweeney 1946). El desarrollo de un fuerte sistema postrado de fijación y de un sistema de ejes erectos de consistencia fibrosa y elástica (ricinas) son importantes adaptaciones morfológicas que permiten a diversas especies de *Gelidium* vivir en condiciones de intenso hidrodinamismo. La presencia de hifas internas en los frondes de *Gelidium* ha sido sugerida también como una favorable adaptación al elevado hidrodinamismo (Feldmann & Hamel 1936). En un estudio de dinámica de fluidos relacionado con el flujo del agua de mar a través de las plantas de *G. nudifrons*, Anderson & Charters (1982) han encontrado que el sistema de ramificación de esta especie se encuentra especialmente adaptado para los intercambios de gases y solutos además de quedar favorecida la toma de nutrientes.

Especies del género *Gelidium* y *Pterocladia* parecen tener preferencia por los sustratos que presenten una cobertura alta de algas coralináceas (Santelices 1988). Existen dos tipos hipótesis que nos pueden ayudar a entender la asociación entre algas coralinas y estas especies: Primera, en condiciones ambientales desfavorables, la propagación vegetativa es un método frecuente de colonización y dispersión y la intensidad de luz es sabido que daña algunas especies. Una cobertura algal crustácea puede actuar como una pantalla a la luz y permitir la supervivencia del sistema basal, el cuál puede regenerarse más tarde y producir frondes erectos. Segunda, las algas coralinas y la familia Gelidiaceae tienen factores ecológicos óptimos similares (por ej: hidrodinamia), por eso ambos grupos tienden a ocurrir en un hábitat similar, compitiendo por luz y sustrato, pero si se dan condiciones extremas una de ellas se vera favorecida, resultando la otra desplazada. Los estudios de competencia interespecífica de estas especies son muy escasos y sugieren que una vez establecidas las poblaciones, estás son bastantes resistentes a las invasiones de otras especies algales. Esto es probablemente debido a la

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

capacidad de regeneración de los ejes rastreros y este efecto se incrementa cuando se combina con algas coralinas al aumentar la capacidad de sobrevivir y producir ejes erectos.

La topografía del sustrato es un factor que afecta a la distribución de las plantas de *Gelidium*, siendo mayor su abundancia en los salientes rocosos y superficies de gran inclinación que en las superficies planas (Tseng 1947; Barilotti 1980; Santos 1993). En el caso de *G. canariense*, también se ha podido comprobar este tipo de distribución. Según Barilotti (1980) la mayor presión de los herbívoros en las zonas planas puede ser la principal razón explicativa de esta situación. Además, suelen ser especies sensibles a la polución la cuál y en el caso de *G. robustum* le afecta disminuyendo considerablemente su crecimiento como lo demostró Barilotti (1980) al transplantar individuos a un área sometida a la influencia de vertidos urbanos. La progresiva contaminación de las aguas costeras en Japón ha incidido de forma negativa sobre los mantos comerciales de *Gelidium* (ITC 1981). En el caso de G. sesquipedale, se ha comprobado que la excesiva sedimentación afecta negativamente a esta especie (Palminha *et al.* 1982; Salina 1987; Santos 1993). Katada (1955), ha señalado el deterioro de plantas jóvenes de *G. amansii* motivado por la presencia de lodo y arena.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 2.1.3. Características oceanográficas del área de estudio.

Las Islas Canarias constituyen un archipiélago atlántico africano situado entre los paralelos 27°40' y 29° 25' N y los meridianos 13°25' N y 18°16' O al Norte del Trópico de Cáncer, a unos 115 Km de la costa de Marruecos.

La naturaleza volcánica del archipiélago canario se pone de manifiesto en la falta de plataformas insulares notables, ya que estas se elevan bruscamente desde el fondo oceánico, alcanzándose profundidades de aproximadamente de 3000 m entre algunas de ellas. Por eso, los 200 m se alcanzan a poca distancia de la costa, con un ancho máximo de 30 Km al suroeste de Fuerteventura, norte de Lanzarote y un mínimo de 100-200 m en

puntos del Hierro y La Palma (Bacallado *et al.* 1994). La acusada inclinación de los fondos hace que predominen los fondos duros. Las áreas de sedimento, principalmente arenas detríticas, arcillas y conchas, están bastante restringidas, siendo más abundantes en las islas orientales, haciendo más diversos y complejos los fondos del litoral canario. El sustrato rocoso, por consiguiente, está ampliamente difundido, siendo en general, irregular y abrupto, con numerosos roques, bajas, paredes, cuevas, etc. (Bacallado *et al.* 1993).

Las características oceanográficas de las Islas Canarias están condicionadas por la corriente de Canarias, los vientos alisios y la zona de afloramientos de la costa norteafricana. La corriente tiene una dirección predominante SSO y, al atravesar los canales que quedan entre islas, donde se alcanzan profundidades de hasta 3600 m, experimenta una aceleración que genera una serie de remolinos ciclónicos al suroeste y anticiclónicos al sureste de las islas (Pérez-Martell 1988; Sangrá 1995). Como resultado de este esquema general de circulación, las aguas que llegan a Canarias desde latitudes más septentrionales, generan un ambiente marino global más frío que el que cabría esperar en virtud de la latitud geográfica, con temperaturas de características cálido-templadas y sin grandes variaciones estacionales.

El régimen de vientos en la región de Canarias está dominado por el sistema de los alisios y sus variaciones estacionales. En primavera y verano los vientos son constantes y relativamente fuertes (30 Km/h) y provienen del noreste. En otoño e invierno, los vientos son generalmente más débiles y más variables en dirección (Medina 1995). Las condiciones atmosféricas y los movimientos de la capa de mezcla determinan la dinámica de las aguas superficiales (hasta 150 m de profundidad).

La temperatura superficial del agua oscila entre 17 °C en marzo- abril y 24 °C en septiembre- octubre (Medina 1995). Para una misma época del año se pueden encontrar diferencias de hasta 2 °C entre los extremos del Archipiélago, localizándose las aguas más frías en las islas orientales. Existen afloramientos locales asociados a zonas de mayor productividad, en torno a la

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

isla de Gran Canaria, Fuerteventura y el norte de La Palma (Arístegui 1990; Arístegui *et al.* 1997).

La presencia de la corriente y el viento, unida a la escarpada orografía de las islas determina una zona de calma (estela) a sotavento de las islas más montañosas, las islas centrales (Gran Canaria y Tenerife) y occidentales (La Palma, La Gomera y El Hierro) y la península de Jandía, en Fuerteventura (La Violette 1974; Medina 1995).

Las aguas oceánicas que rodean el archipiélago se consideran oligotróficas, como es característico en las latitudes subtropicales (Hernández-León 1988b; Arístegui *et al.* 1989) y existe un gradiente este-oeste debido al afloramiento en la costa africana (Braun *et al.* 1986; Arístegui 1990).

La distribución vertical de temperatura del agua en torno a Gran Canaria revela la presencia de una termoclina estacional, que se forma en junio y julio, entre los 50 y 120 m de profundidad (De León & Braun 1973; Arístegui *et al.* 1989). Las aguas superficiales se mezclan sólo durante el invierno, lo cuál origina un bloom de fitoplancton a finales del invierno y comienzo de la primavera, que es de corta duración debido a que los nutrientes se agotan rápidamente (De León & Braun 1973; Arístegui *et al.* 1989).

La salinidad oscila muy poco en los primeros metros de la columna de agua. Llinás et al (1993) observaron valores de salinidad que oscilan entre los 36,54 y 36,64 USP en los primeros 100 m.

Estudios realizados con boyas lagrangianas a 60 millas de costa durante un año para estudiar la circulación superficial en el área de Canarias (Villagarcía *et al.* 1999) han demostrado dos tendencias: cuando no soplan los alisios las boyas pasan a través de los canales entre islas y durante la época de fuerte alisios (Mayo-Junio) las boyas se desplazan en dirección oeste, evitando entrar entre en el archipiélago. La circulación superficial costera puede ser totalmente opuesta pero hasta el momento no existen estudios publicados.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Las mareas son semidiurnas, siendo el rango de mareas moderado, con niveles medios para marea alta de 2 m y para marea baja 0.8 m (Freile-Pelegrín 1996).

La conjunción de factores geomorfológicos y oceanográficos determinan una alta diversidad de organismos marinos y una relativamente baja biomasa (Aguilera-Klink *et al.* 1994).

## 2.2. Introducción a la técnica de PCR.

La técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) o reacción en cadena de la polimerasa (Mullis & Faloona 1987) se ha convertido en una herramienta imprescindible en el campo de la Biología molecular tanto en investigación básica, cómo en aplicaciones de interés médico y comercial, incluyendo el proyecto Genoma Humano y la secuenciación del genoma de muchos organismos, estudios de identidad genética, forenses, control industrial de calidad y diagnóstico *in vitro*..., citándose en más de 75.000 publicaciones científicas en los últimos años.

La técnica de la PCR consiste en la amplificación millones de veces de un molde (o fragmento) de ADN o ARN. Esta técnica requiere muy poco material de partida, por lo que cualquier molécula de ADN es susceptible de ser amplificada casi independientemente de su concentración en la célula o del tejido del cuál se obtenga. La química de la PCR se basa en la complementariedad de bases del ADN. Cuando una molécula de ADN se calienta suficientemente, los puentes de hidrógeno que estabilizan la doble hélice se rompen y sus dos cadenas se separan. A este proceso se le conoce como desnaturalización o fusión del ADN. Si la solución de ADN se deja enfriar, la doble hélice se restaura (renaturaliza) gracias a la complementariedad de sus bases.

A la especificidad del reconocimiento que proporciona la complementariedad de bases, la PCR añade la capacidad de replicación del ADN *in vitro*. Para ello es necesaria una enzima, la ADN-polimerasa, que en la

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

célula cataliza la replicación del ADN mediante la adición de nucleótidos complementarios de la hebra molde del ADN a un extremo 3' libre de la hebra naciente. Esta enzima requiere, además de un ADN molde, un cebador, que es un fragmento de ADN monocatenario que hibrida con el ADN molde, el cuál suministra el extremo 3' libre a partir del cuál ocurre la polimerización, y la incorporación de los dinucleótidos trifosfato (dNTPs).

En una reacción básica de PCR intervienen dos cebadores, que consisten en oligonucleótidos sintéticos cuya secuencia es complementaria de las regiones flanqueantes del ADN a amplificar. Cada uno de ellos híbrida con una hebra distinta, de forma que ambos presentan su extremo 3' hacia el interior de la región a amplificar.

En presencia de una polimerasa de ADN, dinucleótidos (dNTPs), magnesio y otros aditivos en un tampón apropiado, las dos hebras del ADN son copiadas partiendo de los cebadores. Como resultado, nacen dos productos mixtos con regiones de cadena doble y sencilla, que poseen en común un segmento de doble cadena, la región *diana* a amplificar. Si se repite el proceso en un segundo ciclo, nacen cuatro moléculas de ADN que también poseen en común la región diana. A partir de aquí en cada ciclo se duplica el número de copias de la región diana.

Se pueden encadenar más ciclos (30-40) de forma que las copias de la región diana actúan como un nuevo molde y por lo tanto aumentan la amplificación exponencialmente. Se calcula que después de 30 ciclos de PCR se puede producir 1.000 millones de copias del fragmento diana. Cada ciclo consta de tres fases:

1. Fusión ó desnaturalización de la doble hélice de ADN conteniendo la secuencia a amplificar. Esto se realiza simplemente calentando los viales entre 90-95ºC durante 30 a 60 segundos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

2. Hibridación con la pareja de cebadores específicos. Los cebadores no se pueden unir a las cadenas de ADN a elevadas temperaturas, por lo que los viales se enfrían a 55ºC. A esta nueva temperatura el cebador se alinea a las cadenas de ADN y se unen. Esto sucede en aproximadamente 20 segundos.

3. Elongación de las cadenas nacientes, por medio de la ADN-polimerasa. Tomando como molde el ADN existente, y a partir de los cebadores, la enzima es capaz de duplicar el segmento diana.

Los primeros desarrollos de la PCR requerían añadir polimerasa fresca después de cada ciclo, pues ésta se inactivaba por calor en la fase de fusión, que tiene lugar a 94ºC. La introducción ADN-polimerasas termoestables como la Taq- polimerasa de *Thermus aquaticus*, supuso un gran avance, ya que permite que toda la reacción transcurra en el mismo vial tras una única adición inicial de la enzima. Este microorganismo vive permanentemente en un ambiente de elevada temperatura, y por lo tanto su ADN-polimerasa es capaz de sintetizar ADN a temperaturas superiores a 75ºC. Su descubrimiento y aplicación a la técnica PCR ha constituido una mejora y automatización fundamental de la técnica.

## 2.3. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD).

La técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) o amplificación al azar de ADN polimórfico se basa exclusivamente en el uso de la reacción PCR (Williams *et al.* 1990). Esta técnica consiste en la amplificación al azar de fragmentos de ADN que se encuentran entre dos regiones flanqueantes. Los cebadores (*primers*) que se utilizan son cortos (de 9 a 10 pb), y por lo tanto la temperatura de hibridación es considerablemente baja (36º C aprox.). Dado el tamaño de los cebadores existe una gran probabilidad de que se encuentren varias regiones del ADN que sean complementarias a los mismos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

La obtención mediante esta técnica de un patrón de bandas característico del ADN objeto de estudio, nos permite conocer la existencia de diferencias y comparar genomas entre individuos, poblaciones y especies. Los principales polimorfismos RAPDs pueden ser originados de diferentes maneras:

a) Inserción de un fragmento grande de ADN entre los sitios de anclaje del cebador, de tal manera que el fragmento es demasiado grande para que amplifique y se produce la ausencia del fragmento.
b) Inserción de un fragmento pequeño de ADN entre los dos sitios de anclaje del cebador. Tiene lugar un cambio en el tamaño del fragmento amplificado y es difícilmente observable en la práctica.
c) Deleción de un fragmento que contiene uno de los sitios de anclaje del cebador originando la ausencia del fragmento.
d) Sustitución de un nucleótido en los sitios de anclaje del cebador. Origina la presencia o ausencia de un polimorfismo y/o el cambio de tamaño del marcador.

El estudio de los polimorfismos genéticos sirve para analizar la variabilidad y la estructura genética de las poblaciones, y teniendo en cuenta la actuación a su vez de los diferentes factores microevolutivos intenta establecer la historia evolutiva de la especie objeto de estudio. El polimorfismo obtenido a partir del análisis directo de los genes, es un estimador menos sesgado de la variabilidad genética que la variación detectada a nivel de sus productos por ej. isoenzimas (Stewart & Excoffier 1996).

La técnica de RAPD tiene ventajas considerables respecto a otros marcadores moleculares. Por un lado se obtiene simultáneamente un número virtualmente ilimitado de marcadores específicos para cada cebador y molde empleado, obteniéndose una huella genómica (*fingerprint*) característica y relativamente variable. La muestra genómica obtenida puede ser más representativa que la obtenida con otras técnicas moleculares (por ej. aloenzimas). Esta propiedad evita el problema potencial de muestreo de loci, que presentando historias evolutivas comunes, pueden producir diferentes

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

patrones polimórficos (Sunnucks 2000). Otras ventajas es que no necesita un conocimiento previo del genoma de la especie a estudiar y requiere poca cantidad de material biológico, por lo que es una técnica no destructiva, ideal en estudios de poblaciones de especies amenazadas (Gibbs *et al.* 1994, Rossetto *et al.* 1995; Neuffer 1996; Bouza *et al.* 2002). Además, tiene un relativamente bajo coste económico y es rápida, lo que permite comparar multitud de muestras diferentes y es por tanto, muy útil en genética de poblaciones (Williams *et al.* 1990; Hadrys *et al.* 1992; Hillis *et al.* 1996).

Poco se sabe de la naturaleza de la secuencias de ADN amplificadas mediante esta técnica, pero la mayor parte de los fragmentos parecen corresponder a regiones no codificadas, por lo que probablemente se constituyen como marcadores neutrales. Según Sunnuncks (2000) los marcadores moleculares neutrales pueden ser muy potentes en el análisis de la diferenciación genética existente. La carencia de segregación en los marcadores RAPD no es mucho mayor que en aloenzimas (Isabel *et al.* 1995) especialmente en cruces intraespecíficos (revisión en Jenczewski *et al.* 1997) Wu *et al.* (1999) en un estudio minucioso demostró que probablemente la mayoría de los marcadores RAPD derivan del ADN nuclear y por tanto, están sujetos a la herencia Mendeliana.

Sin embargo, el mayor problema asociado a esta técnica es la naturaleza dominante de los marcadores obtenidos, por lo que la variación detectada mediante los mismos no permite distinguir los genotipos de cada individuo, 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, debida a la baja especificidad de las reacciones como consecuencia de la baja temperatura de hibridación y el uso de cebadores cortos. El patrón de bandas obtenido en unas mismas condiciones no siempre es constante, sobre todo desde el punto de vista cuantitativo (Yu & Pauls 1992; Schierwater & Ender 1993). Este ha sido el hecho apuntado por van Oppen *et al.* (1996) como principal razón para el abandono de la técnica en muchos laboratorios. Sin embargo, actualmente los problemas iniciales de baja

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

reproducibilidad han sido encauzados adecuadamente y en la mayoría de los casos resueltos mediante mejoras en la técnica e interpretación del patrón de bandas (Nybom & Bartish 2000). Skroch & Nienhuis (1995) postularon que los valores de reproducibilidad son muy dependientes de la uniformidad de las condiciones de amplificación, así como de la intensidad relativa de la banda amplificada.

Otra problema potencial es la carencia de homología entre marcadores de igual peso molecular, de tal forma que aunque presenten la misma movilidad en el gel, estos pueden representar fragmentos distintos del genoma, de aquí que se recomiende analizar una gran cantidad de cebadores (Hadrys *et al.* 1992; Hillies *et al.* 1996). Pero numerosos estudios han demostrado que fragmentos co-migrantes son idénticos a nivel intraespecífico (Lánner-Herrera *et al.* 1996; Rieseberg 1996; Wu *et al.* 1999). Finalmente, los RAPD tienen el problema de interdependencia de marcadores, es decir que dos fragmentos con diferente peso molecular pueden proceder de la misma región del genoma, debido a una pequeña inserción de un fragmento de ADN (Stam *et al.* 1995).

Existe un inconveniente añadido en el análisis de especies que presenten individuos con distinta ploidía, debido a que la diferente ploidía puede influenciar los resultados (van Oppen *et al.* 1996; Alberto *et al.* 1997). Al comparar patrones RAPDs de individuos diploides se puede sobrestimar la similaridad entre estos, debido al carácter dominante de los marcadores RAPD, que imposibilita distinguir entre homocigóticos y heterocigóticos. Por otro lado, al comparar los individuos de diferente ploidía se puede originar una falsa variación relacionada con el equilibrio cebador y los sitios de reconocimiento del ADN. Los individuos esporofíticos (diploides) poseen potencialmente más sitios de reconocimiento con el cebador que los individuos gametofitos (haploides), este hecho puede originar que secuencias presentes en individuos haploides y diploides sean apenas amplificadas en los individuos haploides.

A pesar de estas inconvenientes, las ventajas de RAPDs pesan más que los desventajas y los marcadores RAPD se erigen cada vez más como una de las herramientas más útiles en el conocimiento de la variabilidad y

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

estructuración genética de las poblaciones naturales, revelando patrones y resultados generales similares a los obtenidos mediante las técnicas isoenzimáticas (Isabel *et al.* 1995; Aagaard *et al.* 1998; Buso *et al.* 1998; Lee *et al.* 2002).

## 2.4. Aplicación de RAPDs en genética de poblaciones.

La selección de una técnica depende de su capacidad de respuesta a diferentes cuestiones, además de su ejecución práctica. Pero a veces, la ejecución combinada de dos o más técnicas, puede determinar cuál es la más apropiada para el estudio de la variación genética en un nivel particular (van Oppen *et al.* 1994; Waycott 1995).

Los RAPD y el análisis de variabilidad isoenzimático, son claramente métodos rápidos y económicos en comparación con metodologías, requieren de protocolos largos y complejos. Este hecho, beneficia la selección de estas técnicas para los análisis de genética poblaciones, donde existe la necesidad de procesar un elevado número de muestras. Sin embargo, aunque las isoenzimas se han utilizado exitosamente para analizar la estructura genética de muchos organismos, estas no son las herramientas ideales debido al bajo número de loci disponibles y el escaso nivel de polimorfismo en las poblaciones algales (Sosa & Lindstrom 1999; Valero et al 2001), es decir que niveles bajos de polimorfismo entre individuos muy próximos pueden no ser identificados (Waycott 1995).

Entre los diferentes métodos basados en el ADN, los marcadores derivados de PCR obtenidos con cebadores inespecíficos se han hecho notablemente populares en las estimaciones de variabilidad intraespecífica.
Los métodos en los que no se requiere información de la secuencia del genoma de las especies objeto de estudio, son métodos especialmente adecuados en situaciones donde los estudios de genética molecular son reducidos o inexistentes. Los marcadores RAPD han sido usados extensivamente para la identificación de híbridos (Elisiário *et al.* 1999; Kuehn *et al.* 1999; Neuffer *et al.* 1999) y recientemente han incrementado su popularidad

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

notablemente en estudios de poblaciones naturales (ver revisiones en: Bartish *et al.* 1999a; Bussell 1999; Nybom & Bartish, 2000). En Ficología, los RAPD se han utilizado para la identificación de especies, híbridos y diferentes morfotipos (Patwary *et al.* 1993, Dutcher & Kapraun 1994; Patwary & van der Meer 1994; Ho *et al.* 1995 a, b; González *et al.* 1996; Meneses 1996; Lin-Sheng *et al.* 1998; Park *et al.* 1998; Wang *et al.* 2000; Yeh 2000; Lim *et al.* 2001), ecotoxicidad (Atienzar *et al.* 2000), variación intraclonal (Meneses & Santelices 1999; Meneses *et al.* 1999), difrenciación ecotípica (Miller *et al.* 2000), análisis de paternidad (Billot *et al.* 1999), identificación de marcadores ligados al sexo (Martínez *et al.* 1999), estudios biogeográficos (van Oppen *et al.* 1994,1995b,1996; Pakker *et al.* 1996; Lindstrom *et al.* 1997; Alberto *et al.* 1999) y evaluación de niveles y/o estructuración de la variabilidad genética (Alberto *et al.* 1997; Coyer *et al.* 1997; Valatka *et al.* 2000; Wright *et al.* 2000; Yue *et al.* 2000; Engelen *et al.* 2001; Faugeron *et al.* 2001; Meneses 2001; Yang *et al.* 2001).

Aunque algunos autores (van Oppen *et al.* 1996, Coyer at al. 1997) discrepan en el uso de los RAPDS para estudios geográficos a pequeña escala otros autores han comprobado su eficacia (Wright *et al.* 2000).

## 2.5. Extracción y purificación de ADN.

Los principales problemas en la extracción de ADN en plantas en general y en algas en particular son debidos a la combinación de tres factores: presentar paredes celulares débiles pero muy resistentes, tener un alto contenido de polisacáridos en la pared celular, el cual es más notable en Faeofítas y Rodofitas (Saunders 1993) y presentar metabolitos secundarios tales como los polifenoles (Mayes *et al.* 1992).

Muestras de ADN purificadas con métodos simples (extracción orgánica) o con métodos más complejos (centrifugación en gradiente CsCl) han originado patrones de ADN reproducibles, sin embargo, en plantas y en animales (moluscos) con altas concentraciones de polisacáridos se hace necesario implementar nuevas formas de purificación para obtener una amplificación eficiente (Bowditch *et al.* 1993).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Debido al alto contenido de polisacáridos y polifenoles que presenta la mayoría de las macroalgas, los cuáles inhiben la ADN polimerasa, una variedad de métodos de purificación han sido utilizados: Ultracentrifugación en gradiente de densidad CsCl (Goff and Coleman 1988), electroforesis de agarosa (Saunders 1993) o cromatografía (Parsons *et al.* 1990) y más recientemente, métodos de precipitación selectiva con el detergente CTAB (Shivji *et al.* 1992, Patwary & van der Meer 1994) y con cloruro de litio (Hong *et al.* 1992) han sido utilizados con éxito. En las algas rojas es común la presencia de ficobiliproteinas en la fase acuosa junto con el ADN después de la rotura del tejido, por lo que es necesario la utilización solventes durante la extracción que prepurifican el extracto de ADN o la utilización de proteinasa K (Sosa & Oliveira 1992). Los solventes más utilizados son mezclas de fenol, cloroformo e isoamil alcohol. El fenol y el cloroformo desnaturalizan las proteínas, mientras que el isoamil alcohol reduce la espuma facilitando la separación de la fase acuosa y la fase orgánica.

Tanto la cantidad como la calidad del ADN es un factor muy importante a tener en cuenta en la amplificación del ADN y además la calidad del ADN está íntimamente ligada a la reproducibilidad de los patrones de RAPDs (Williams *et al.* 1993; Wolff *et al.* 1993).

Los ácidos nucleicos se unen al hidroxiapatito gracias a las interacciones entre los grupos fosfatos del esqueleto de polinucleótidos y los residuos de calcio de la resina. Los ácidos nucleicos unidos pueden ser recuperados con tampones de fosfato de elevada concentración a temperaturas de 60° C. Las cadena simples de ADN se unen más débilmente que las cadenas dobles y son extraídas a concentraciones de fosfato más bajas. Por esto la cromatografía en hidroxiapatito puede ser usada para separar cadenas simples de ADN de las cadenas dobles o de los híbridos ADN:ARN.

La absorción diferencial del hidroxiapatito y ADN ha sido utilizado en algas para purificar ADN de los polisacáridos por Parsons *et al.* (1990) y Villemur (1990). El principal inconveniente es concentrar los ácidos nucleicos

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

con tampones de fosfato de elevada fuerza iónica y utilizar una vez que los iones fosfatos hayan sido retirados de la solución.

El sistema *clean-up* de ADN (Wizard, Promega) es un sistema de purificación de ADN circular y lineal de tamaño comprendido entre 200 y 50000 bp. Este sistema elimina sales, mononucleótidos y las diversas proteínas como enzimas de restricción, incluyendo las estables a altas temperaturas, fosfatasas y quinasas, ADN polimerasas, exonucleasas y endonucleasas.

Este sistema presenta ventajas dado que es un método muy simple y efectivo. El tiempo de realización por muestra es de 15 minutos y además permite procesar un gran número de muestras a la vez, lo cuál es ideal en estudios de genética de poblaciones y sistemática que generalmente requieren analizar un gran número de individuos. Se ha demostrado que se recupera el 100 % de ADN (plásmidos de 3 kb) utilizando volúmenes de elución de 50 µl. Otra ventaja es la no utilización de solventes orgánicos altamente tóxicos (fenol, cloroformo, mercaptoetanol) ni tampoco la precipitación con etanol. La principal desventaja es el elevado coste.

La concentración de ADN de las muestras se puede determinar por fluorescencia inducida por UV en un gel de agarosa al 1 % o bien utilizando la técnica de espectrofotometría. En el primer método la intensidad de la fluorescencia inducida por luz ultravioleta y emitida por las muestras de ADN teñidas con bromuro de etidio, es proporcional a la masa total de ADN. Este método nos permite al mismo tiempo que, cuantificamos el ADN y observamos su estado (degradación), detectar la presencia del ARN (Sambrook *et al.* 1989). Por otro lado, aunque es menos preciso para la cuantificación de ADN puro que los métodos de espectrofotometría, se recomienda si las cantidades de ADN son del orden de nanogramos y éste está contaminado con proteínas o ARN.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

## 2.6. Amplificación de ADN en macroalgas marinas.

La síntesis de ADN *in vitro* depende del perfil de temperatura del termociclador (temperatura de desnaturalización, hibridación y elongación) y de la concentración de los componentes de la reacción de amplificación.

La concentración de ADN es una variable que se debe optimizar siempre comprobando el nivel de *background* y los cambios en los patrones de bandas, eligiendo el patrón más estable de marcadores (Weising *et al.* 1995). Weising *et al.* (1995) recomienda concentraciones de ADN entre 5 y 200 ng/25 µl.

Tanto la cantidad como la calidad del ADN objeto de estudio es muy importante. En cuanto a la calidad pueden existir agentes inhibidores en la muestra de ADN que inactivan la enzima ADN polimerasa responsable de la amplificación. Las algas tienen un alto contenido de polifenoles, los cuáles son altamente quelantes del cofactor ($Mg^{2+}$) de la ADN polimerasa. Además, este cofactor puede ser complejado por varios compuestos presentes en la reacción de amplificación: grupos $PO_4^{2-}$ de los deoxinucleótidos trifosfatos y el EDTA, procedente tampón de almacenamiento: TE 1X (10 mM Tris pH 7.3; 1mM EDTA). Por esta razón la concentración de $Mg^{2+}$ debe ser siempre mayor que la de dNTPs. Este parámetro puede variar incluso en la amplificación de una misma *región diana* del ADN con diferentes cebadores por lo que tiene una enorme influencia en la reacción de amplificación (Saiki 1989). La determinación empírica de la concentración de $Mg^{2+}$ es un método muy popular de optimización de la técnica de PCR.

Los RAPDs se caracterizan por baja especificidad originada por el uso de cebadores cortos (9-11pb) y temperaturas de hibridación bajas. La utilización de temperaturas de hibridación bajas tiene el inconveniente de que se originan emparejamientos cebador-ADN molde incompletos o incorrectos, que dan lugar a bandas artefacto en la amplificación. Esto se puede solventar eligiendo cebadores con un alto contenido de bases GC que admiten temperaturas de hibridación más elevadas, lo que se traduce en una

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

hibridación más específica cebador-ADN molde y en un mayor rendimiento de la amplificación.

Temperaturas de hibridación de 35 o 36 °C son las más utilizadas con cebadores de 9, 10 y 11 bases (Bowditch *et al.* 1993). En algas, la temperatura de hibridación de 36 ó 37 °C y entre 35 y 45 ciclos de amplificación (Patwary *et al.* 1994, Ho *et al.* 1995, van Oppen *et al.* 1996, Alberto *et al.* 1997, Lindstron *et al.* 1997, Park *et al.* 1998) son los valores más comunes para estas variables.

El primer paso de desnaturalización se requiere para una completa separación de la cadena de ADN. Cuánto mayor sea el contenido de G-C en la hebra de ADN, temperaturas mayores serán necesarias para su desnaturalización, sin embargo la *Taq* ADN polimerasa puede perder parcialmente su actividad.

Hillis *et al.* 1996 recomienda añadir aditivos (BSA, DMSO, gelatina, Tween-20, etc.) a la reacción de amplificación para mejorar la estabilidad de la enzima, reducir los problemas de estructura secundaria y favorecer la hibridación cebador- ADN molde.

Por otro lado, para establecer el número de cebadores a emplear en un estudio, es necesario hacer primero un estudio preliminar con un elevado número de cebadores. En este sondeo se eligen aquellos cebadores que presentan patrones con un elevado número de bandas polimórficas, reproducibles y con buena resolución. Se hizo una revisión bibliográfica del número de cebadores empleados en el estudio preliminar, encontrando valores entre 10 (James & Ashburner, 1997) y 140 (Nesbitt *et al.* 1995) y para el número de cebadores utilizados finalmente, valores entre 2 (Stewart & Porter 1995) y 38 (Sulaiman & Hasnain 1996).

## 2.7. Reproducibilidad de patrones de RAPD.

Los marcadores RAPD presentan problemas de reproducibilidad inherente a la técnica, dado que su fundamento se basa precisamente en la

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

baja especificidad de la hibridación originada por la utilización de cebadores cortos y temperaturas de hibridación bajas.

Los estudios de reproducibilidad de RAPDs (Welsh & McClelland 1990; Bassam *et al.* 1992; Devos & Gale 1992; Yu & Pauls 1992; Büscher *et al.* 1993; Ellsworth *et al.* 1993; Benter *et al.* 1995; Bielawski *et al.* 1995; Regli *et al.* 1995) consideraban la concentración de ADN, de cloruro de magnesio, de cebador y de *Taq* ADN polimerasa, así como el perfil de temperaturas y el número de ciclos los factores más importantes para la reproducibilidad de los patrones de RAPDs. Estudios posteriores han puesto en evidencia que la calidad del ADN (Mizukami *et al.* 1998; Micheli *et al.* 1994), así como los cebadores, la marca de *Taq* ADN polimerasa y la del termociclador también influyen en la reproducibilidad de los patrones de RAPD (Meunier & Grimont 1993; He *et al.* 1994). Estudios similares sobre el efecto de la concentración de ADN, los cebadores y los termocicladores han sido documentados por MacPherson *et al.* (1993) y Schierwater & Ender (1993). Otros factores, tales como el nivel de ARN, la inclusión de dimetil sulfóxido (DMSO) y de tetrametil amonio de cloro (TMAC) son también conocidos por su efecto en la amplificación en PCR (Shen & Hobn 1992; Vierling & Nguyen 1992; Pikaart & Villeponteau 1993).

Este problema se debe tener en consideración si se comparten datos entre laboratorios (Penner *et al.* 1993; Hoffman & Bregitzer 1996; Jones *et al.* 1997), si se comparan datos obtenidos a lo largo de un período de tiempo (Pérez *et al.* 1998) o si las reacciones de amplificación son elaboradas por distintos investigadores (McEwan *et al.* 1998). McEwan *et al.* (1998) señala el volumen final de las reacciones de amplificación, como un factor crítico en la amplificación. Estos autores realizaron un estudio de reproducibilidad de patrones de RAPD entre distintos investigadores y postularon que la falta de reproducibilidad de los patrones, es debida a la pequeña variación generada por la *técnica de pipeteo* de los diferentes investigadores, la cuál genera diferencias acumulativas en los distintos compuestos de la reacción de amplificación y recomiendan que la reacción de amplificación sea siempre realizada por el mismo investigador.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El problema de reproducibilidad se puede minimizar mediante una técnica experimental muy cuidadosa (Sun & Wong 2001) que implica estandarizar los experimentos al máximo, es decir, realizar cócteles de amplificación para cada cebador, realizar las reacciones duplicadas de manera simultánea y ser siempre el mismo investigador el que realiza las reacciones de amplificación.

Skroch & Nienhuis (1995) analizaron el impacto de la reproducibilidad de los patrones RAPD en las estimaciones de distancias genéticas y concluyeron que, aunque puedan existir diferencias físicas y estadísticas, estas no son lo suficientemente significativas para dar lugar a diferencias mayores en las distancias genéticas que las esperadas por azar. Los resultados de la comparación de las distancias genéticas basadas en datos no replicados, con las distancias genéticas obtenidas de datos replicados, fueron consistentes con la hipótesis de que las dos matrices de datos representaban muestras al azar de la misma población. Los fallos en la reproducibilidad de la distintas amplificaciones puede reflejar la sensibilidad de la amplificación a variaciones muy sútiles en el ambiente de la reacción y no la invalidez de los datos.

## 2.8. Metodología de *bulks* poblacionales.

Uno de los posibles métodos para realizar un análisis interpoblacional es comparar los patrones de RAPD entre un número definido de individuos de cada una de las poblaciones a estudiar. Yu & Pauls (1993) propuso un método más rápido y económico para el estudio mediante RAPDs de poblaciones heterogéneas de *Medicago sativa*. Estos autores utilizaron una mezcla o *pool* de muestras individuales de ADN (*bulked DNA*) de cada población como muestra representativa de las propiedades genéticas de cada población postulando que aunque se pierda una parte de información genética, los patrones de RAPDs obtenidos a partir de los *bulks* poblacionales, representan los atributos genéticos más comunes de las poblaciones.

La utilización de esta técnica en RAPDs presenta importantes ventajas, en cuanto al ahorro de tiempo y costes. En especies con ciclos haplo-diplontes,

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

presenta una ventaja añadida, porque evita los problemas derivados del análisis de individuos con diferente ploídia.

*Gelidium canariense* y *G. arbuscula* presentan un ciclo con alternancia de generaciones. La ploidía de los individuos sólo se puede distinguir cuando los individuos están fértiles a excepción de los gametofitos masculinos (haploides) que no se han podido caracterizar hasta el momento. Al comparar patrones RAPDs de individuos diploides se puede sobrestimar la similitud entre estos, debido al carácter dominante de los marcadores RAPD, que imposibilita distinguir entre homocigóticos y heterocigóticos (van Oppen *et al.* 1996). Además, las poblaciones presentan un bajo número de individuos haploides (gametofitos femeninos) y no permitió llevar a cabo inicialmente un análisis de variación genética entre gametofitos femeninos. Por otro lado, la comparación de individuos de diferente ploidía puede originar una falsa variación genética relacionada con el equilibrio cebador y los sitios de hibridación en el ADN. Los individuos esporofitos (diploides) tienen potencialmente más sitios de reconocimiento para el cebador que los individuos gametofitos (haploides), este hecho puede dar lugar a que secuencias presentes en ambos individuos, haploides y diploides, apenas sean amplificadas en los individuos haploides (Stam *et al.* 1995; Alberto *et al.* 1996). El elevado número de individuos clasificados como desconocidos (infértiles) junto con el carácter dominante de los RAPD, hace imposible distinguir si un fragmento de ADN es amplificado a partir de un locus homocigótico o heterocigótico (Willians *et al.* 1990; van Oppen *et al.* 1996).

El análisis de *bulks* poblacionales ha sido utilizado de manera exitosa para establecer las relaciones genéticas entre poblaciones vegetales de alfalfa (*Medicago sativa*) por Yu & Pauls (1993) y en el alga roja, *Gelidium sesquipedale* por Alberto *et al.* (1997,1999). Estos autores obtuvieron para diferentes *bulks* poblacionales formados con 15 individuos de una misma población de *G. sesquipedale*, distancias genéticas mucho más bajas, que las distancias genéticas obtenidas en *bulks* poblacionales de diferentes poblaciones. Estos autores sugieren que los *bulks* poblacionales formados por

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

15 individuos de *G. sesquipedale* se puede considerar como una muestra representativa de cada población.

De hecho, al comparar los marcadores más habituales para la mayoría de los individuos, con aquellos marcadores que sólo se encontraban presentes en unos pocos individuos, estos últimos no amplificaban, debido a que representan una pequeña proporción del total del ADN. Michelmore *et al.* (1991) encontró que los marcadores RAPD raros no pueden detectarse en los *bulks* poblacionales cuando la muestra de ADN de la que derivan representa menos de un 10% de la muestra total de ADN. Por lo tanto, la metodología de *bulks* sólo revela los marcadores poblacionales bien conservados, es decir, aquellos que mejor caracterizan las poblaciones. De esta manera, se reducen las bandas débiles, las cuáles presentan una menor reproducibilidad. A su vez, esto último, puede ser una ventaja porque las bandas débiles contribuyen al error de interpretación dado que enmascaran la señal de RAPDs a escalas geográficas muy cortas (van Oppen *et al.* 1996; Alberto *et al.* 1999).

En resumen, la metodología de *bulks* poblacionales presenta ventajas, ya que permite evaluar las propiedades genéticas más comunes de las poblaciones de una forma muy eficiente, rápida y económica, dado que en lugar de realizar 15 amplificaciones individuales para cada población a estudiar, solo se realiza una amplificación por población. Y en especies con ciclo de alternancia de generaciones, evita los problemas derivados de la comparación de individuos con distinta ploidía. Las principales desventajas, es la pérdida de información que genera, a la vez que sólo permite hacer análisis interpoblacionales.

## 2.9. Niveles de diversidad genética.

En los estudios iniciales realizados con marcadores RAPD y como consecuencia de la naturaleza dominante de éstos, se utilizaba únicamente índices de similaridad para comparar poblaciones o especies. Estos índices, aunque informativos, son menos potentes que los parámetros genéticos clásicos. Los intentos iniciales para distinguir heterocigóticos de homocigóticos

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

basándose en la intensidad de las bandas han sido abandonados y por eso, los marcadores RAPD se siguen considerando marcadores de herencia dominante (Nybom & Bartish 2000). Para solventar el problema de la dominancia se han hecho dos tipos de aproximaciones derivadas de dos interpretaciones distintas de los datos.

En primer lugar la aproximación multilocus mediante la cuál el perfil o patrón de bandas individual se considera el fenotipo multilocus del individuo en cuestión. Este tipo de aproximación ha derivado de la interpretación de datos mediante análisis de principales coordenadas y de cluster. Los estudios resultantes han sido muy informativos y las correlaciones entre distancias geográficas y genéticas son a veces mayores que los obtenidos con isoenzimas (Díaz *et al.* 1999) o con caracteres morfológicos (Brunell & Whitkus 1997). Faugeron et al (2001) en individuos haploides, considera el perfil de bandas de cada individuo como el genotipo multilocus, a partir del cuál calculan frecuencias genotípicas. Estos autores señalan que examinando la diversidad de un genotipo multilocus se puede analizar la importancia de la recombinación. En especies que presentan reproducción asexual exclusivamente, la diversidad genotípica es el resultado de los efectos combinados de mutación y migración, mientras que en especies alógamas la recombinación es al principal fuente de diversidad.

En segundo lugar es la aproximación monolocus en la cuál se considera cada marcador como un locus separadamente y cada uno con dos alelos (uno presente y otro ausente). En comparación con otros marcadores obtenidos mediante técnicas codominantes, los marcadores loci de RAPD sólo pueden ser bi-alélicos (una banda está presente o ausente).

En especies con un alto grado de autofecundación, el efecto de dominancia es mínimo y la aproximación monolocus es considerada apropiada para conocer la estructura genética de las poblaciones (Ferguson *et al.* 1998). En especies con reproducción cruzada, es necesario asumir el equilibrio Hardy-Weinberg para hacer este tipo de aproximación (Nybom & Bartish 2000).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Estudios isoenzimáticos previos en *Gelidium canariense* y en *Gelidium arbuscula* mostraron una variabilidad interpoblacional genética alta, mientras que dentro de las poblaciones fue baja (Sosa & García-Reina 1992, 1993). Estos autores sugirieron una reproducción asexual predominante y el efecto fundador como principales causas. Sin embargo, se ha observado que la diversidad genética en las poblaciones clonales de plantas superiores es grande, por lo que sugiere que en poblaciones bien establecidas una pequeña tasa de reproducción sexuada es suficiente para mantener la diversidad genética (Eriksson 1993).

La diversidad genética detectada mediante marcadores moleculares puede medirse empleando diversos índices de diversidad genética (polimorfismo, índice de Shannon y diversidad génica) e índices de similitud.

### 2.9.1. Indices de diversidad genética.

Polimorfismo

Constituye una aproximación multilocus, definido también como la proporción de marcadores o loci polimórficos (P), cuantifica el número de marcadores variables en una población, y se calcula dividiendo el número de marcadores polimórficos de una población y el número total de marcadores analizados.

Indice de Shannon.

El índice de Shannon fue originalmente propuesto como medida de la información contenida en un código (Shannon & Weaver 1949; Lewontin 1972). En el contexto de los marcadores RAPD, es una medida de la diversidad fenotípica presente en el conjunto de datos y es insensible al sesgo producido por la indetección de los individuos heterocigotos (Dawson *et al.* 1995). Este índice constituye un método alternativo (monolocus) para cuantificar y dividir la diversidad genética.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Diversidad génica.

La diversidad génica en diploides (Nei 1987), es la probabilidad de que dos alelos cogidos al azar en una población sean diferentes y en individuos haploides, es la probabilidad de que dos haplotipos cogidos al azar sean diferentes. La diversidad génica equivale a la heterocigosidad que se esperaría en una población si ésta estuviese en equilibrio de Hardy-Weinberg, es decir la heterocigosidad esperada. Se calcula para cada locus o marcador según la fórmula: $DG = 2pq$, siendo $p$ la frecuencia del alelo observado y $q$ la frecuencia del alelo invisible o nulo en la población. La heterocigosidad esperada de una población es la media de los valores obtenidos para cada cebador en dicha población.

### 2.9.2. Indices de similitud.

Los índices de similitud indican el grado de semejanza entre los entes a comparar. El coeficiente Jaccard (Jaccard 1908) y el coeficiente de Dice (Nei & Li 1979) consideran solo la presencia de bandas, mientras que el coeficiente SM ó *Simple Matching coefficient* (Sneath & Sokal 1973) tiene en cuenta como evidencia de similitud, tanto la presencia como la ausencia de bandas. Considerar la ausencia común de bandas como similitud, puede conducir a una sobreestimación de similaridad genética (Apóstol *et al.* 1993; Rossetto *et al.* 1995), aunque también puede existir algún margen de error cuando se considera la presencia de bandas como evidencia de secuencia semejante, dado que los marcadores RAPD comigrantes, no tienen porque tener secuencias homólogas. Este problema debe ser considerado especialmente cuando se analizan similaridades entre miembros de niveles taxonómicos elevados (Hadrys *et al.* 1992). En estudios recientes (Lannér-Herrera *et al.* 1996; Rieseberg 1996; Wu *et al.* 1999) han demostrado homología posicional de los marcadores a nivel intraespecífico.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

## 2.10. Diferenciación genética entre poblaciones.

El conocimiento del grado de variabilidad genética y su distribución es uno de los principales objetivos en genética de poblaciones. La mayoría de la diversidad genética de las especies en ambientes naturales tiene una estructura jerárquica (Avise 2000), dividida en componentes intrapoblacionales (dentro de la población) e interpoblacionales (entre poblaciones), a la vez que está relacionada con la cantidad de flujo genético (Slatkin 1987). El conocimiento de estos componentes 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 lo que no sólo es importante determinar el nivel total de la diversidad genética de una especie, sino conocer y analizar como esa variabilidad genética global de la especie se distribuye y se estructura entre las diferentes poblaciones naturales. Esto es fundamental en especies endémicas, especialmente en aquellas sujetas a programas de conservación (Sosa *et al.* en revisión) y en especies con un interés económico potencial.

El conocimiento de la estructura genética poblacional es esencial para el entendimiento de las escalas en las cuales la dispersión, la deriva genética y la selección actúan (Slatkin 1987). El mar es el ambiente continuo más grande del mundo, con un intercambio genético potencialmente ilimitado. De acuerdo con esto, muchas especies marinas bentónicas y sobretodo aquellas con estadios larvales planctónicos, pueden dispersarse en distancias muy grandes, dando lugar a pequeñas diferenciaciones poblacionales a grandes escalas espaciales (Palumbi 1992, 1994; Shulman 1998). Sin embargo, algunos aspectos hacen que el flujo genético entre poblaciones sea menor de lo esperado, por ejemplo las grandes profundidades (sistemas abisales) pueden ser auténticas barreras geográficas.

La capacidad de dispersión, las características del ciclo de vida (sistema reproductivo) y la distribución geográfica son generalmente buenos predictores de la estructura genética en un amplio rango de organismos (Ayre *et al.* 1991; Hunt 1993; Hellberg 1994, Doherty *et al.* 1995; Ayre *et al.* 1997a; McFadden

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1997; Murray-Jones & Ayre 1997; Ruckelshaus 1998). En los vegetales terrestres, las especies alógamas, no-clonales y perennes, de distribución amplia exhiben una variación intrapoblacional alta, mientras que la variación interpoblacional es baja (Loveless & Hamrick 1984; Hamrick & Godt 1996). La reproducción cruzada favorece el aumento de la variabilidad genética en la población, incrementándose el componente de diversidad genética intrapoblacional (Griffiths *et al.* 1993; Frankel *et al.* 1995). Además, el flujo genético entre individuos de diferentes poblaciones, provocaría la homogenización de los acervos genéticos de las mismas, disminuyendo la diversidad genética interpoblacional (Puertas 1992; Allphin *et al.* 1998; Hannan & Orick 2000; Sosa 2001). Los invertebrados y peces con una dispersión limitada suelen mostrar estructura genética a pequeña escala que varía desde unos pocos metros a unos Km (Grosberg 1991; Doherty *et al.* 1995; Hellberg 1994; Ruckelshaus 1998). Los rasgos biológicos de las algas marinas sugieren un patrón similar aunque la capacidad de dispersión de las algas marinas varía ampliamente en función del sistema de cruzamiento y las estrategias del ciclo de vida (Graham & Wilcox 2000).

Dada la naturaleza dominante de los RAPD, la estimación de los parámetros poblacionales convencionales, tales como F-estadísticos y $G_{ST}$, queda reducida a menos que se puedan hacer ciertas asunciones relativas a la autofecundación y frecuencia de homocigóticos nulos y su relación con la heterocigosidad (Clark & Lanigan 1993; Lynch & Milligan 1994). Otros métodos para conocer la distribución de la variación genética son el índice de Shannon y el AMOVA.

### 2.10.1. Indice de Shannon.

Este índice constituye un método alternativo para dividir la diversidad genética, en el que no es necesario asumir, ni se requieren estimaciones de heterocigosidad. Ha sido utilizado en plantas para dividir la variabilidad genética generada por diferentes tipos de marcadores como aloenzimas (Levin 1977; Brown & Weir 1983), rDNA (King & Schaal 1989; Gustafsson & Gustafsson 1994), AFLPs (Travis *et al.* 1996) y RAPDs (Chalmers *et al.* 1992;

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Monaghan & Halloran 1996; Martín *et al.* 1996) y en algas con RAPDs (Engelen *et al.* 2001). En algunos estudios se ha utilizado para comparar la distribución de la diversidad genética entre grupos de cepas agrícolas y cultivos (Russell *et al.* 1993; Dawson *et al.* 1995; Menkir *et al.* 1997) mientras que en otros, se ha utilizado para comparar los niveles de diversidad dentro y entre las poblaciones (Yeh *et al.* 1995; Cardoso *et al.* 1998). Sin embargo, el uso del índice no esta estandarizado, por lo que las comparaciones entre estudios son difíciles de realizar. El índice de Shannon que reconoce la naturaleza fenotípica locus por locus, es el método más adecuado para los análisis genéticos poblacionales basados en RAPD (revisado en Bussell 1999).

### 2.10.2. Análisis de la varianza molecular.

El análisis molecular de la varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992), es una aproximación multilocus, originalmente diseñado para haplotipos RFLPs pero ha sido modificado para el uso con marcadores dominantes (RAPDs) al considerar los fenotipos como haplotipos (Stewart & Excoffier 1996; Huff *et al.* 1993; Nesbitt *et al.* 1995; Tollefsrud *et al.* 1998; Martín *et al.* 1999).

El AMOVA, es básicamente una ampliación del clásico análisis de la varianza molecular (ANOVA) que utiliza como datos iniciales, las distancias entre las observaciones, en lugar de los datos directos (brutos). Este análisis calcula los componentes de la varianza molecular en los distintos niveles jerárquicos considerados y comprueba la significancia de los mismos bajo la hipótesis nula de que no existe estructuración genética en las poblaciones. La matriz de distancias puede ser de distancias fenotípicas, usada más comúnmente, o de distancias genotípicas. Las matrices de distancias fenotípicas más utilizadas se calculan a partir de la distancia Euclídea cuadrada, la distancia de Nei & Li o la distancia de Jaccard (Nybom & Bartish 2000). Los resultados obtenidos con los diferentes distancias son casi idénticos (Huff *et al.* 1993; Aide & Rivera 1998; Jenczewski *et al.* 1999). En algunos estudios, se han utilizado matrices de distancias genotípicas calculadas a partir de las frecuencias alélicas inferidas para corregir la naturaleza dominante de los marcadores RAPD (Stewart & Excoffier 1996; Jenczewski *et al.* 1999;

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Nebauer *et al.* 1999). Generalmente, los resultados obtenidos con las distancias fenotípicas o genotípicas producen valores de $F_{ST}$ altamente correlacionados (Palacios & González-Candelas 1997b; Jenczewski *et al.* 1999).

La mayor ventaja de este método radica en que las permutaciones realizadas en el test de significancia soslayan la asunción de normalidad necesaria en el ANOVA clásico. Sin embargo, asume que las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg, y esto no se puede determinar con marcadores RAPDs y por lo general, sólo las especies alógamas están en equilibrio.

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).

**2.11. Estructuración genética intrapoblacional.**

La existencia de estructura genética dentro de una población consiste en la distribución espacial o temporal no al azar de los genotipos en la misma, y es una consecuencia de los patrones de cruzamiento existentes y de la magnitud del intercambio génico inter- e intrapoblacional (Eanes & Kohen 1978; Weir 1996). Altas tasas de flujo génico interpoblacionales y una tendencia de cruzamientos al azar disminuirán el nivel de estructuración genética, mientras que una obstrucción al flujo génico debido a la baja dispersión de gametos, esporas y fragmentos vegetativos o la existencia de deriva génica generará diferenciación genética y una estructuración diferenciada (Wright 1943; Levin & Kerster 1974; Berg & Hamrick 1995). Por otro lado, una heterogeneidad ambiental y la adaptación a microambientes por medio de la selección natural puede forzar el desarrollo de pequeñas estructuras genéticas (Bradshaw 1972).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En plantas, las especies autofecundantes, presentan un mayor grado de diferenciación interpoblacional que las especies con cruzamiento al azar (Brown 1979; Hamrick *et al.* 1979; Hamrick & Godt 1990), mientras que muchas especies, anuales o perennes presentan diferenciación genética en pequeñas distancias espaciales (Levin 1977, 1978; Schaal 1974; Linhard 1974; Hamrick & Godt 1990).

En general, y en contraste con muchas especies de peces e invertebrados, las algas marinas no presentan grandes unidades panmíticas (área donde tiene lugar un cruzamiento al azar entre los individuos) sobre cientos a miles de kilómetros, pero presentan una subdivisión o estructuración genética a escalas espaciales más pequeñas, que van desde metros hasta decenas de kilómetros. En algas bentónicas se espera una subdivisión pronunciada y un tamaño de población efectivo bajo porque las semillas o las esporas se asientan a pocos metros de la planta madre (Denny & Shibata 1989; Orth *et al.* 1994) incluso en hábitats con régimes de corrientes fuertes.

La existencia de estructuras genética intrapoblacionales es un fenómeno muy común en las poblaciones vegetales terrestres (Linhart *et al.* 1981; Sokal & Watenberg 1983; Berg & Hamrick 1995; Takahashi *et al.* 2000; Bouza *et al.* 2002) y también se ha descrito en *Pelvetia fastigata* (Williams & Di Fiori 1996), en *Delisea pulcra* (Wright *et al.* 2000) y en *Caloglossa leprieurii* (Zuccarello *et al.* 2001).

Uno de los métodos que nos permite analizar la estructura genética intrapoblacional es la autocorrelación espacial. Este método nos permite identificar los modelos de distribución espacial (estructuras familiares) de la variabilidad genética dentro de las poblaciones (Epperson 1993) e inferir la capacidad de dispersión, la cuál afecta a la capacidad de migrar tanto espacialmente como temporalmente y está relacionado con el ciclo de vida y otros parámetros demográficos.

Para ello se calcula la distancia genética existente entre cada par de individuos y se compara con su separación física. De esta forma, aquellos

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

individuos que compartan uno o ambos padres tendrán una mayor relación genética entre sí que con otros individuos de la misma población que procedan de padres diferentes. Si además la dispersión de una especie es baja, los individuos emparentados genéticamente se distribuirán muy próximos en el espacio, y por lo tanto se podrá detectar una mayor correlación entre los individuos más próximos, los cuales se encuentran incluidos en las clases de distancia más pequeñas (Sokal 1979).

## 2.12. Estudios demográficos en macroalgas marinas.

En sentido estricto, una población es un grupo de plantas de una especie en particular viviendo en un determinado hábitat bien sea natural o artificial (Russell & Fielding 1981). En los estudios de dinámica poblacional y demografía, son dos fundamentalmente los aspectos estudiados: densidad y distribución de la especie. Los estudios de dinámica poblacional se centran en cambios de densidad de individuos, pudiendo definirse como "el estudio de los cambios en el número de organismos en las poblaciones y de los factores que influyen en dichos cambios; también incluye el estudio de las tasas de pérdidas, de reemplazamiento de los individuos y de cualquier proceso regulador que tienda a mantener estable dicho número o al menos impedir un cambio excesivo" (Solomon 1969; Harper 1977).

Factores de diversa índole: físicos (hidrodinamia, luz, temperatura, salinidad), químicos (nutrientes) y biológicos (competencia inter- e intraespecífica, pastoreo de herbívoros) pueden ser muy variables en la escala espacial y temporal y en consecuencia repercutir en mayor o menor grado en la estabilidad de las poblaciones. El conocimiento de aspectos tales como: biomasa, densidad, tasa de crecimiento, mecanismos de reproducción, fertilidad, natalidad y mortalidad, son básicos para adquirir un conocimiento adecuado de los principales aspectos que regulan el funcionamiento de la población.

Los estudios sobre dinámica poblacional, ofrecen un interés indudable para la adquisición de conocimientos sobre las tasas vitales de fecundidad,

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

reclutamiento, supervivencia y crecimiento y aportan una base sólida para el conocimiento de la estructura de la comunidad (Vadas & Norton 1982; Dayton *et al.* 1984; Dayton 1985) permitiendo diseñar modelos matemáticos, los cuáles constituyen herramientas muy importantes para conocer las dinámicas intrínsecas de las poblaciones. La aplicación de estos modelos a problemas concretos de manejo de recursos con interés económico, tales como la optimización de estrategias de explotación, son esenciales para el explotación racional de recursos en especies con interés comercial (Ang & De Wreede 1993; Chapman 1993; Santos & Nyman 1998; Aberg *et al.* en revisión). La modelización demográfica ha sido utilizada extensivamente en un número grande de animales y plantas. En Biología de conservación ha experimentado un desarrollo rápido debido al incremento del número de especies amenazadas, sin embargo y aunque los estudios de dinámica poblacional y demografía son fundamentales en los estudios de ecología, estos tópicos han sido menos tratados en macroalgas, aunque en los últimos años el interés por este tipo de análisis se haya incrementado notablemente (Ang *et al.* 1990; Aberg 1992 a,b; Ang & De Wreede 1993; Chapman 1993; Santos 1993; Santos & Nyman 1998; Engel *et al.* 2001; Aberg *et al.* en revisión).

Una de las características generales que presentan algunos vegetales es la capacidad de crecimiento clonal mediante diferentes estrategias. Por ello, en ocasiones es muy difícil definir un individuo y delimitar su separación en base a diferencias genéticas.

Muchas especies exhiben un crecimiento continuo y los individuos se presentan como una extensión continua, en la que es muy difícil determinar donde acaba un individuo y empieza el siguiente. En Biología vegetal se definen como plantas clonales aquellas que están formadas por unidades producidas vegetativamente las cuáles tienen capacidad de vivir independientemente si son separadas de la planta madre. Según Silvertown & Charlesworth (2001) la planta entera, cuando se desarrolla a partir de un simple zigoto o semilla es referida como clon diferente o distinto (*genet sensus* Harper 1977), la cuál será un único genotipo. Una parte generada clonalmente de una planta y con una existencia potencialmente independiente se le conoce como

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

módulo o *ramet* (Harper 1977; de Kroon & van Groenendall 1997), los cuáles en *Gelidium canariense* se corresponden con los frondes individuales. Por el contrario, las plantas no-clonales pueden carecer de las unidades (módulos o frondes) potencialmente independientes. En las plantas clonales la información de ambos niveles, es decir, la dinámica de clones diferentes y de frondes, contribuyen a definir las características ecológicas y el potencial evolutivo de la especie (Eriksson & Jerling 1990; Vuoriosalo *et al.* 1997). El nivel a estudiar (clones diferentes ó frondes) dependerá de las hipótesis a comprobar en los experimentos diseñados.

La dinámica de los clones diferentes en plantas clonales es mucho menos conocida que la dinámica de módulos o frondes, debido principalmente a la difícil identificación de los individuos en las poblaciones maduras y numerosas, a la larga vida de estos y a las posibles roturas de estos en fragmentos clonales, incluyendo cada uno, dos o más módulos (Eriksson & Jerling 1990; Eriksson 1993; Santos & Nyman 1998). Por el contrario, la dinámica de los módulos o frondes ha sido más estudiada debido a la fácil identificación y a la corta vida de estos (de Kroon 1993; Hara 1994; Scrosati & Serviére-Zaragoza 2000). Como ocurre normalmente, la dinámica de las algas ha sido menos estudiada que la dinámica de plantas, a pesar de su relevancia en ecología (Round 1981; Lobban *et al.* 1985). Los estudios de seguimiento de la dinámica de clones en algas rojas clonales se han llevado a cabo sólo cuando los diferentes clones han sido fácilmente identificables, es decir a densidades muy bajas (May 1986, Dyck & De Wreede 1995 y Scrosati 1998a) y sólo Dyck & De Wreede (1995) hacen un seguimiento simultáneo de frondes y clones distintos en reclutas de *Mazzaella splendens*. En *Gelidium canariense* se han realizado estudios preliminares de crecimiento basados en la elongación de frondes (Betancort-Villalba & González-Henríquez 1991). Otros estudios demográficos realizados en algas rojas están basados en la longitud del fronde y el número de dicotomías de *Chondrus crispus* (Bhattacharya, 1985; Chopin *et al.* 1992) y en la longitud y/o el peso del fronde (*Chondrus crispus*: Fernández & Menéndez 1990; *Gelidium sesquipedale*: Santos 1995; *Mazzaella cornucopiae*: Scrosati & DeWreede 1997; *Pterocladiella capillacea*: Scrosati & Serviére-Zaragoza 2000).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En *Gelidium canariense* se pueden definir los individuos como las distintas matas o grupos de frondes que se encuentran físicamente separados de otros. Inicialmente existen argumentos para considerarlos como clones diferentes. Por un lado, no se han observado estructuras esporofíticas y gametofíticas juntas en los distintos frondes de lo que se considera un clon. Por otro lado, no existen diferencias en los patrones isoenzimáticos de frondes de una misma planta (P.A. Sosa resultados sin publicar). Resultados similares fueron obtenidos en *Gracilaria gracilis* por Engel *et al.* (1999) con microsatélites, confirmando que los frondes pertenecientes al mismo estolón eran genéticamente idénticos, mientras que los frondes de diferentes estolones son distintos en términos genéticos. El método del volumen ($LC^2$, L= longitud, C=circunferencia Aberg 1990) utilizado en este estudio, presenta la ventaja de que abarca toda la dinámica del *genet*, mientras que los métodos de los estudios anteriores analizan frondes y no nos permiten conocer la dinámica completa del *genet*. Este método ha sido utilizado de manera exitosa por Aberg (1990) en *Ascophyllum nodosum*.

La mayor parte de las poblaciones de algas rojas consisten en individuos vegetativos (ej. May 1986; McLachlan *et al.* 1988; De Wreede & Green 1990; Santelices 1990). La identificación de esporofitos y gametofitos femeninos se puede realizar en el campo por medio de la identificación de las estructuras reproductivas respectivas. Sin embargo, la identificación de los gametofitos masculinos no siempre es posible y a diferencia de las carragenofitas, en las agarofitas, no existen métodos químicos que nos permitan identificar el estado de ploídia (Garbary & De Wreede, 1988).

Los gametofitos bisexuales no son comunes en las Gelidiales (Hommersand & Fredericq 1988), tan sólo existen nueve especies de cuatro géneros diferentes que presentan gametofitos bisexuales (Rico & Guiry 1997a). Dentro del género *Gelidium* han sido descritas como monoicas: *Gelidium vagum* (Renfrew *et al.* 1989), *G. howeii, G. pluma, G. japonicum* (Santelices & Flores 1995) y *G. maggsiae* (Rico & Guiry 1997a). La extensión real de la bisexualidad en las Gelidiales queda incierta debido a la escasez de trabajos sobre las plantas

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

espermatangiales (Renfrew *et al.* 1989; Santelices & Flores 1995). Según Santelices & Flores (1995), las especies mencionadas anteriormente, presentan los soros espermatangiales en frondes con soros carpoesporofíticos jóvenes lo que podría justificar las escasas citas de soros masculinos en los estudios hechos previamente. Por el contrario, las especies *G. maggsiae* y *G. vagum* han sido descritas como monoicas protándricas (Rico & Guiry 1997a).

Según Hawkes (1990) la mayoría de las especies de algas rojas monoicas son autocompatibles. Santelices & Flores (1995) sugieren que algunas especies (por ej: *G. japonicum)* pueden ser monoicas o diocas en diferentes ambientes o que el momento de maduración de los gametos sea distinto en los talos monoicos, sin embargo es necesario llevar a cabo estudios más detallados para esclarecer estas cuestiones.

La identificación de gametofitos masculinos fértiles en *Gelidium* requiere de una caracterización microscópica en la mayoría de los casos (Akatsuka 1970, 1973, 1979, Santelices & Flores 1995) pero ésta, es una práctica infrecuente en los trabajos de campo. En *Gelidum pristoides* (Carter 1985) se han caracterizado macroscópicamente como manchas superficiales decoloradas en los frondes fértiles y en *Gelidum pulchrum* (Fan 1961) como manchas irregulares punteadas presentes en los ejes principales y laterales. También Santelices (1988), describe las áreas de los espermatocistes como áreas decoloradas en la que la formación de las células madre del espermatociste tiene lugar a partir del alargamiento y decoloración de las células corticales del área fértil.

*Gelidium canariense*, presenta un ciclo con alternancia de generaciones de plantas biesporofíticas (Rico & Guiry 1997b) y plantas gametofíticas diocas, las cuáles son morfológicamente similares. La identificación de esporofitos y gametofitos femeninos se puede realizar por medio de las estructuras reproductivas respectivas en el campo. Así, el esporofito se caracteriza por presentar los ápices de los frondes elongados, planos y de color rojo claro (soros esporangiales). El gametofito femenino se caracteriza por presentar epífita la fase carpoesporofítica (soro carpoesporangial) la cuál aparece como

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

una bulto oblongo en los ápices de los frondes. En el caso de los gametofitos masculinos, Gil Rodríguez (comun. pers.) los ha descrito como manchas blanquecinas superficiales en los ápices de los frondes centrales.

En el caso de aquellos individuos en los que la identificación morfológica no sea posible, es muy difícil distinguir entre individuos haploides y diploides, o entre gametofitos femeninos y masculinos. Los cromosomas en *Gelidium canariense* son muy difíciles de observar, y mediante técnicas isoenzimáticas no se han encontrado diferencias entre gametofitos y esporofitos (Sosa 1991; Sosa & García-Reina 1993). Según nuestros conocimientos, las técnicas moleculares (RAPD) ha sido utilizadas de manera exitosa para identificar gametofitos masculinos y femeninos en *Gracilaria gracilis* (Martínez *et al.* 1999).

En algas con un ciclo de alternancia de generaciones, el desequilibrio en el ratio de ploidía se ha relacionado con factores físicos (altura de costa), ecológicos (herbívoros) y biológicos (reproducción asexual) (Aberg *et al.* en revisión). La selección puede actuar originando diferencias ecológicas, entre las fases alternantes. La observación de diferencias ecológicas entre las fases que presentan alternancia de generaciones isomórficas varía entre taxones (Dyck & De Wreede 1995). En *Gelidium sesquipedale* se ha encontrado una mayor capacidad de adhesión al sustrato de talos esporofíticos (Salinas 1991; Juanes & Puente 1993). Muchos autores han atribuido el desequilibrio entre las dos fases a diferencias fisiológicas ocasionadas por diferencias de luz, temperatura, nutrientes, etc. (Allender 1977; Hannach & Santelices 1985; Luxoro & Santelices 1989; Destombe *et al.* 1993; Zucarrello *et al.* 2001) en el caso de *Gelidium canariense* no se han encontrado diferencias significativas medidas en nueve parámetros fisiológicos entre las generaciones haploides y diploides (Sosa *et al.* 1993).

Hasta el momento, y dado que no existen métodos químicos disponibles para determinar los diferentes estadios del ciclo de vida de *Gelidium canariense* en particular y de *Gelidium* en general como ocurre en las especies carragenofitas (Garbary & De Wreede 1988), otra posibles técnicas a tener en

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

cuenta en la caracterización de los gametofitos masculinos, son la citometría de flujo y la microespectrofluorometría.

Posiblemente, los diferentes métodos para realizar el seguimiento de los individuos en poblaciones algales y su aplicabilidad es función de la estructura y la densidad de la especie (Alveal *et al.* 1995). Las evaluaciones no destructivas, especialmente las relacionadas con las mediciones *in situ* del crecimiento y la supervivencia, necesariamente involucran la reubicación de áreas e individuos experimentales para evaluaciones posteriores y por un periodo determinado de tiempo. A pesar de la gran variedad de formas y tamaños en la naturaleza, la mayoría de los métodos de marcaje han sido desarrollados para grandes feofitas p. ej. *Macrocystis, Laminaria, Lessonia* (Alveal *et al.* 1995).

En especies de gran porte como *Ascophyllum nosodum* o *Gelidium sesquipedale* es posible utilizar cables de plástico con etiquetas (Aberg 1990) sin embargo, el uso de marcas para la identificación y reubicación de plantas pequeñas y filamentosas han tenido poco éxito. Sharp & Tremblay (1985) utilizaron hilos pequeños con etiquetas para *Chondrus crispus* y obtuvieron una longevidad media de los frondes etiquetados de 75 días, por lo que solo es óptima para estudios realizados en periodos cortos. El principal inconveniente de este método es que solo se puede usar en el seguimiento de un único fronde, pero no es posible etiquetar parches de frondes, por lo que en especies que presentan una morfología de numerosos frondes a partir de un estolón y con un crecimiento tipo césped, esta metodología puede afectar a la mortalidad de la planta.

El proceso de reclutamiento tiene consecuencias ecológicas y evolutivas importantes, pues las estrategias poblacionales están expresadas por individuos con un mismo genotipo (control del reclutamiento, crecimiento y mortalidad) (Shcmid 1990; Eriksson 1993). Los genotipos que son competitivamente superiores pueden monopolizar las poblaciones, haciendo así disminuir la variabilidad genética intrapoblacional, aumentando por otro lado, la diferenciación genética interpoblacional. Este hecho puede tener

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

consecuencias importantes en las respuestas ecofisiológicas de las poblaciones y en los patrones de producción de biomasa y de agar (cantidad y calidad).

La fuente demográfica permite un profundo conocimiento de las características de los procesos de dispersión de las especies y este es un proceso relevante en la microevolución de las poblaciones. La buena salud entre los atributos demográficos y genéticos de una especie afecta a la capacidad de migración o dispersión tanto espacialmente como temporalmente y está relacionado con el ciclo de vida y otros parámetros poblacionales. Las tasas vitales de los genotipos son las expresiones de su eficacia biológica. Según Lande (1988) en poblaciones de reducido tamaño, los factores demográficos, tienen una mayor probabilidad de causar la extinción de la población que las pérdidas de variación genética, de ahí la importancia que tienen este tipo de estudios en especies endémicas, como *Gelidium canariense*. Los trabajos que consideran ambas disciplinas son reducidos, aunque es la nueva tendencia en Biología de la conservación (Goodell *et al.* 1997; Oostermeijer *et al.* 1995; Auge *et al.* 2001).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# III. MATERIAL Y METODOS

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

## 3.1. ANALISIS GENETICO.

### 3.1.1. Muestreo.

Se llevaron a cabo varias campañas de recogida de muestras a lo largo del archipiélago Canario entre octubre del 1996 y febrero de 1999, las cuáles abarcaron la mayoría de las poblaciones descritas para *Gelidium canariense*. En estas campañas se recogieron un total de 949 individuos.

El diseño del muestreo se hizo teniendo en cuenta la distribución geográfica de *G. canariense* en las Islas Canarias. Esta especie no está descrita en las islas orientales (Fuerteventura y Lanzarote), por esta razón el muestreo jerarquizado y estratificado se llevó a cabo en Gran Canaria, Tenerife, La Palma y La Gomera (Figura 3).

#### 3.1.1.1. Diseño de recogida de muestras.

La recogida de individuos en el análisis genético de las poblaciones naturales de *G. canariense*, se analizó mediante un muestreo jerárquico y estratificado en el que se consideraron cinco niveles espaciales (Tabla 1, Figura 4).

| Nivel | Categoría | Distancia |
|---|---|---|
| 1 | Islas | 50-220 Km |
| 2 | Localidades | 1-20 Km |
| 3 | Poblaciones | 500 m |
| 4 | Parcelas | 20-50 m |
| 5 | Individuos | < 50 cm |

**Tabla 1.- Categorías jerárquicas y distancias en el muestreo genético de *Gelidium canariense*.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En todos las parcelas se procedió a recoger tanto individuos haploides (gametofitos) como diploides (esporofitos) identificados mediante sus estructuras reproductoras.

Las poblaciones naturales de ambas especies son visibles sólo en las bajamares mensuales, coincidente con el plenilunio de cada mes, por lo que los muestreos sólo se llevaron a cabo en estos períodos. Las zonas y el tiempo de muestreo estuvieron limitados por el régimen de mareas y por el estado de la mar. En general, las poblaciones están asociadas a zonas de fuerte oleaje y como consecuencia, el tiempo que permanece la marea baja es menor y restringe el área de muestreo a la zona superior de la población, haciendo el muestreo en algunos casos muy difícil y peligroso.

Los individuos se recolectaron de poblaciones donde abundan ambas especies, en áreas (4-10 $m^2$) de varios decenas de metros cuadrados en periodo siempre de bajamar máxima mensual.

La recolección se realizó totalmente al azar, exceptuando la discriminación de individuos de bajo grado de epifitismo y sin deterioro observable. Las algas se arrancaron manualmente, procurando recoger todo el individuo, desde las estructuras de fijación hasta el ápice del talo. Una vez arrancadas se median la longitud y circunferencia máxima de cada individuo (Aberg 1990), se anotaba las coordenadas de campo y el estado reproductor (gametofito femenino y esporofito) mediante la observación de sus estructuras reproductoras. Cuando éstas no se pudieron distinguir se clasificaba como desconocido.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**Figura 3. Mapa de las islas Canarias mostrando la localización de las poblaciones muestreadas en las diferentes islas.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

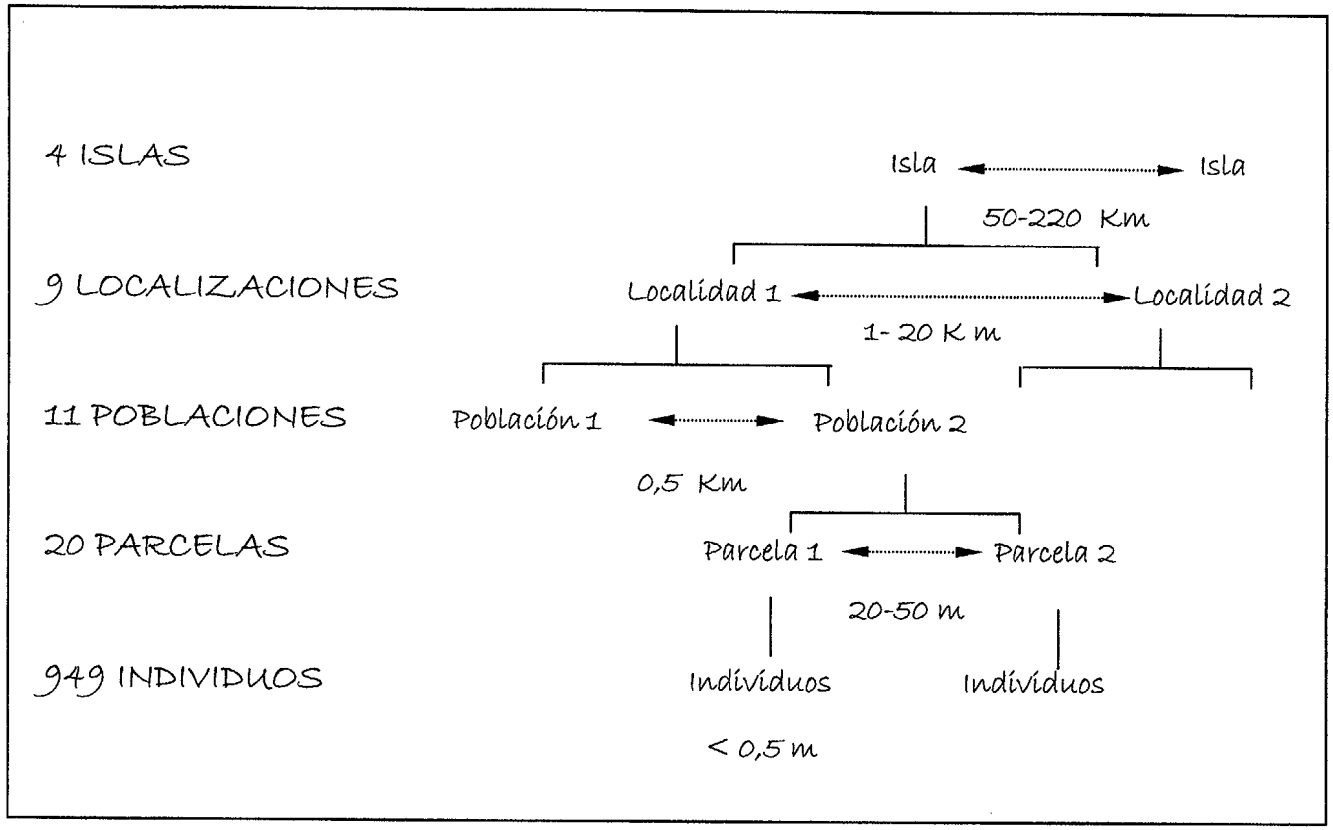



**Figura 4.- Diseño experimental utilizado en el análisis genético de *Gelidium canariense*.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Para obtener las coordenadas de los individuos en cada una de las poblaciones se utilizó el método de puntos fijos. Este consiste en medir la distancia desde el centro de cada uno de los individuos a dos puntos fijos (A y B) establecidos previamente dentro del área de muestreo. Los puntos fijos se asignaban a accidentes naturales notables existentes en la zona o mediante la fijación de clavos.

Posteriormente se realizaron muestreos dirigidos con el objetivo a aumentar el número de individuos gametofitos femeninos analizados en cada población, los cuales se incorporaban a los mapas ó croquis previos.

### 3.1.1.2. Descripción de las poblaciones.

*Gelidium canariense* fue recolectada de poblaciones localizadas en las islas de Gran Canaria, Tenerife, La Gomera y La Palma, mientras que *Gelidium arbuscula* se recolectó sólo en dos poblaciones de Gran Canaria.

**Gran Canaria.**

- Agaete. Playa de Las Salinas. (28º 6' 26" N, 15º 42' 42" W). Localizada en el noroeste de la isla de Gran Canaria, en la Villa de Agaete, cerca de la playa de Las Nieves (Figura 5). Al igual que en Bocabarranco, las muestras fueron recogidas en zonas donde también cohabitan ambas especies.

- Sardina. Playa de Punta de Sardina (28º 10' 52" N, 15º 42' 33" W). Localizada en el noroeste de la isla de Gran Canaria, en la localidad de Sardina dentro del municipio de Gáldar (Figura 5).

- Gáldar. Playa de Bocabarranco. (28º 9' 37" N, 15º 39' 57" W) Situada en el norte de la isla de Gran Canaria, a 1,5 kilómetros de la

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

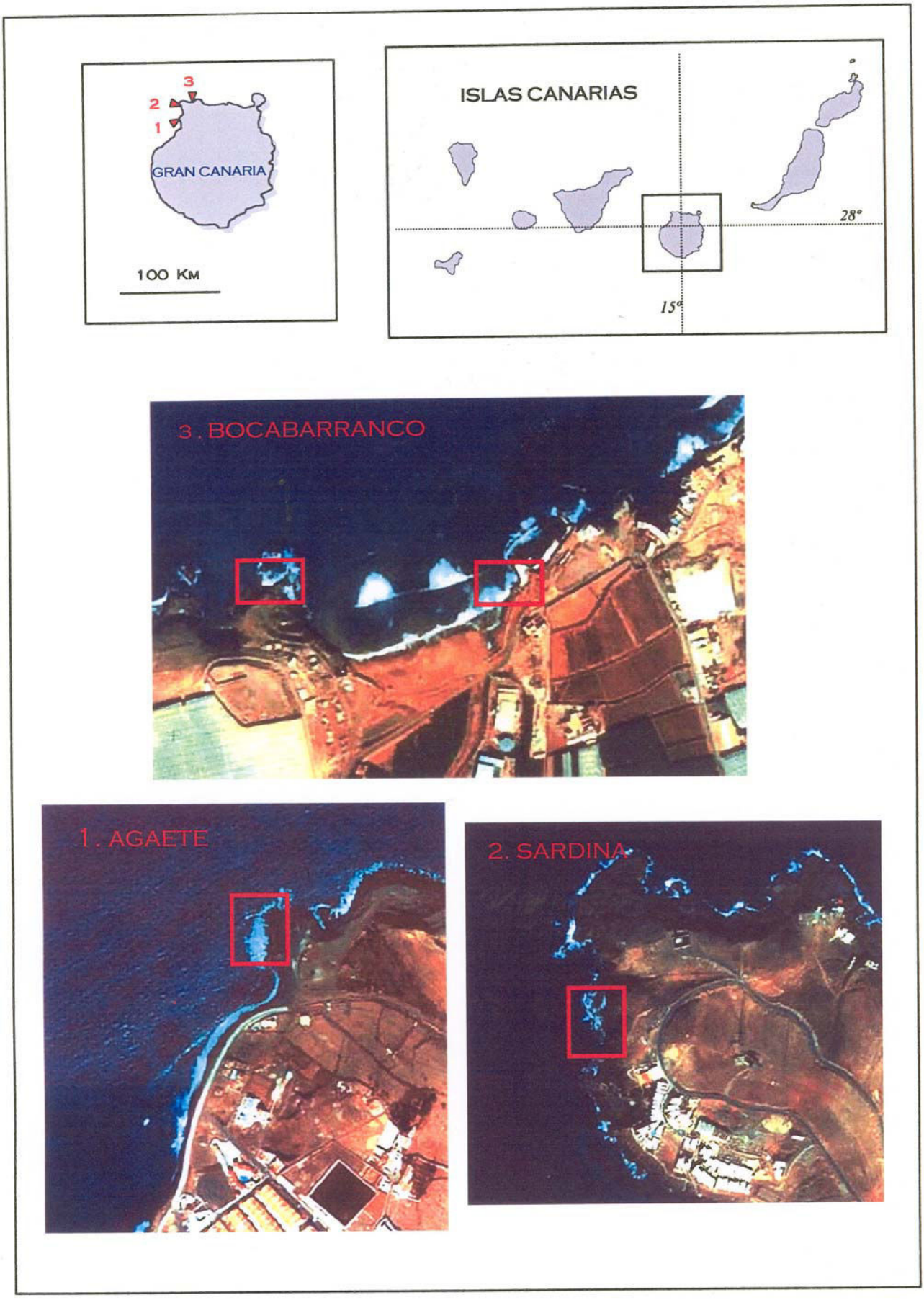



**Figura 5.- Localización y fotografías de las poblaciones en la isla de Gran Canaria.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

ciudad de Gáldar y a 30 kilómetros de Las Palmas de Gran Canaria (Figura 5). Las poblaciones muestreadas se encuentran a ambos lados de la Playa de Bocabarranco y en la población del margen derecho se recogieron las dos especies de *Gelidium*.

**Tenerife.**

- Puerto de La Cruz. Playa del Charco (28º 25' 9" N, 16º 32' 48" W). Localizada en el norte de la isla de Tenerife, en la capital del municipio de Puerto de La Cruz (Figura 6).

- Punta Brava (28º 24' 49" N, 16º 34' 1" W). Localizada en el norte de la isla de Tenerife, dentro del municipio de Puerto de La Cruz, a 5 km de la capital del municipio (Figura 6).

- Garachico (28º 22' 38" N, 16º 45' 54" W). Localizada en el noroeste de la isla de Tenerife dentro del municipio de Garachico (Figura 6). Se muestrearon dos poblaciones separadas 500 m.

**La Palma.**

- Faro de Punta Cumplida (28º 50' 28" N, 17º 46' 51" W). Localizada en el este de la isla de La Palma (Figura 7) dentro del municipio de Barlovento.

- Puerto Talavera (28º 49' 57" N, 17º 46' 39" W). Localizada en el este de la isla de La Palma dentro del municipio de Barlovento y a un 1 Km de la población de Faro de Punta Cumplida (Figura 7).

**La Gomera.**

- Hermigua (Playa de Hermigua: 28º 10' 50" N, 17º 10' 27" W). Localizada en el norte de la isla de La Gomera dentro del municipio

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

de Hermigua (Figura 7). La zona muestreada se encuentra a 400 m aproximadamente de la Playa de Hermigua.

#### 3.1.1.3.Tratamiento y almacenamiento de las muestras.

En el laboratorio las muestras se limpiaban una a una de epífitos, se les eliminaba la zona de fijación (generalmente muy epifitada) y se comprobaba el estado reproductor a simple vista o utilizando una lupa binocular.

Para eliminar las posibles formas microepífitas (microorganismos), las algas se lavaron con una solución de detergente (SDS 0.5 %) seguido de un lavado con agua bidestilada. Finalmente, se eliminaba el exceso de agua con papel secante y se disponían en bolsas individuales cubiertas con silica gel durante 12 horas. Para conseguir una completa deshidratación de las muestras, se cambiaba el silica gel y se dejaba actuar durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se hacia el recambio nuevamente del silica gel y se almacenaba con una pequeña cantidad de desecante. En este estado, se podían mantener durante meses (incluso años) siempre y cuando el gel de sílice se mostrara de color azul.

### 3.1.2. Caracterización de gametofitos masculinos.

Según Candelaria-Gil (comun. pers.) los gametofitos masculinos en *G. canariense* se pueden identificar mediante la aparición de estructuras blanquecinas en los ápices de los frondes, las cuáles constituyen los espermatangios. Durante los sucesivos muestreos demográficos se recogieron individuos clasificados como desconocidos y se trasladaron al laboratorio para

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

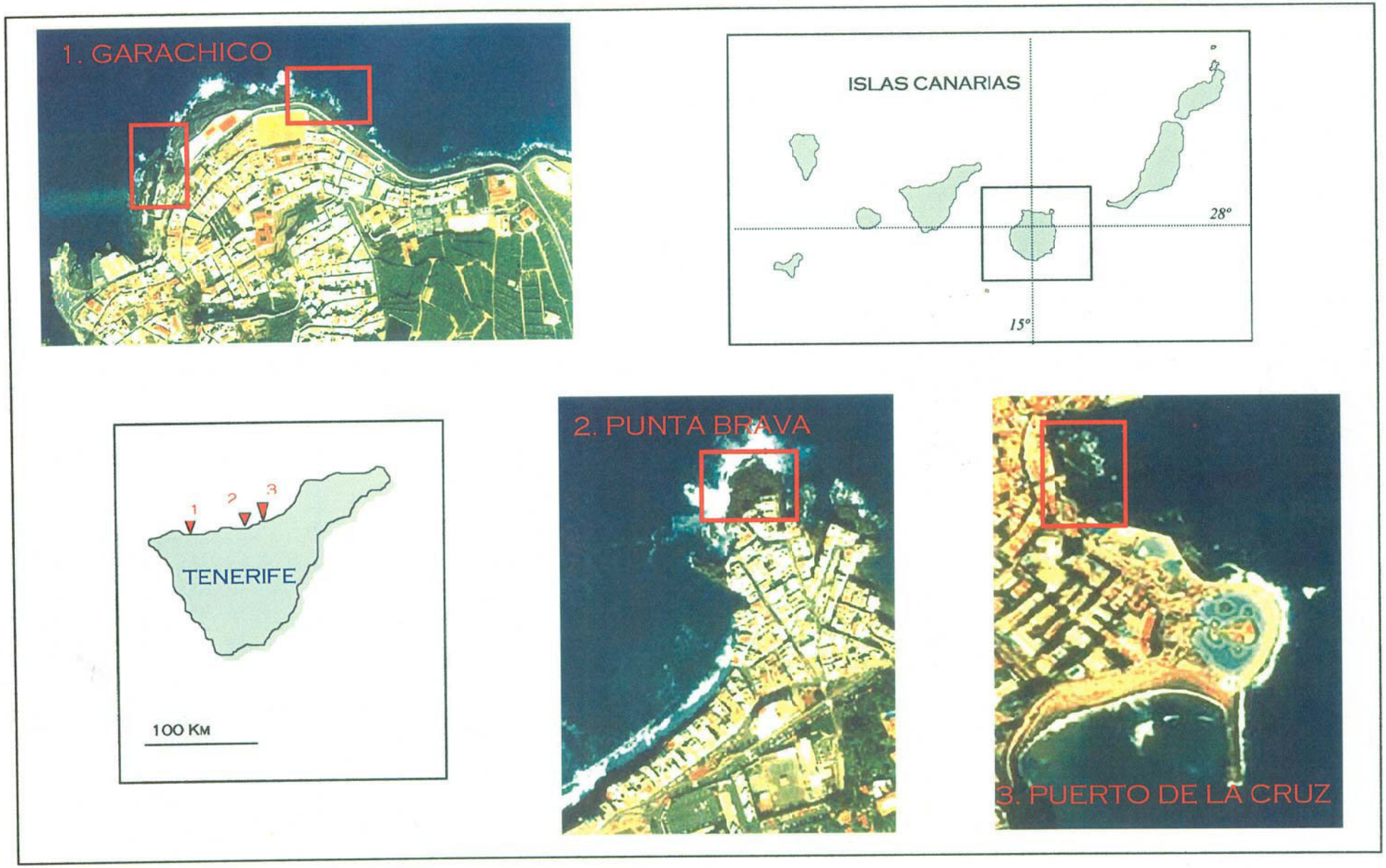



**Figura 6.- Localización y fotografías de las poblaciones en la isla de Tenerife.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

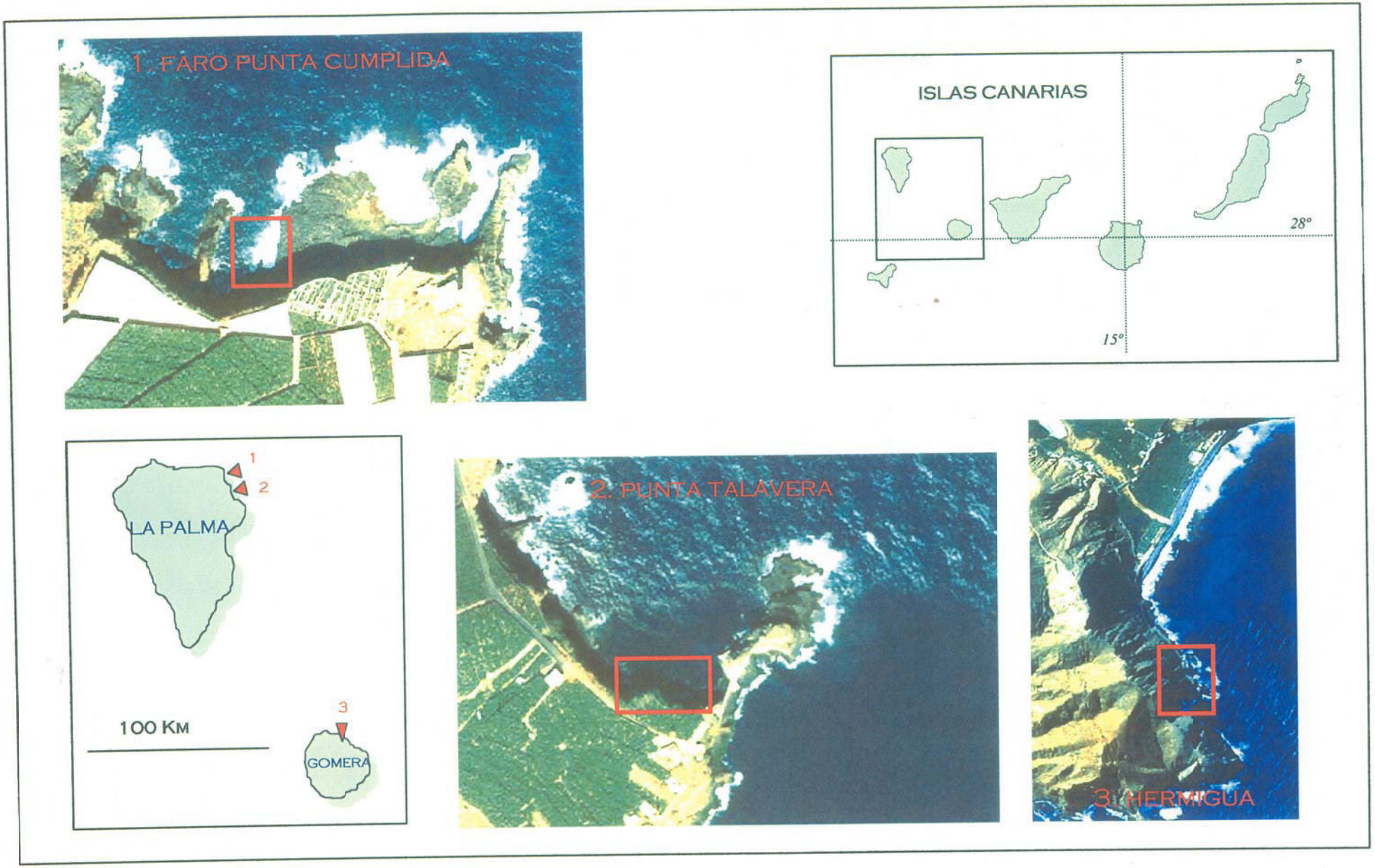



**Figura 7.- Localización y fotografías de las poblaciones de las islas de La Palma y La Gomera.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

tratar de identificar las estructuras reproductoras utilizando diferentes metodologías:

- **Caracterización macroscópica.**

Se evaluaron alrededor de 100 plantas desconocidas, con lupa binocular, tratando de identificar las estructuras blanquecinas en los ápices de las plantas.

- **Caracterización microscópica.**

Los sori esporofíticos son producidos en las partes terminales de los ejes principales y ramificaciones o en frondes exclusivos para la reproducción.

Para identificar microscópicamente los gametofitos machos de *Gelidium canariense*, se utilizaron fragmentos pertenecientes a las partes apicales (0.5-1 cm) de cuatro tipo de individuos:

Gametofitos femeninos jóvenes

Se correspondían con fragmentos de talo que presentaban cistocarpos bien definidos, algunos maduros y otros sin madurar (Figura 8 C,D).

Esporofitos

Talos procedentes de plantas frutificadas de diferente tamaño (Figura 8 A, B).

Plantas infértiles

Talos de 6,5 – 7 cm de longitud con ápices y algunas yemas laterales de color blanquecino. Las yemas presentaban igual grosor al talo (Figura 9 A;B).

Plantas con los ápices decolorados (blanquecinos).

Se analizaron dos tipos de talos:

.- Fragmentos de talos que en lugar de cistocarpos bien definidos presentaban zonas decoloradas (blanquecinas) (Figura 9 C,D).

.- Talos con ápices globulares: Los talos, pertenecientes a pies de planta pequeños de aproximadamente 7 cm, presentan estructuras globulares (aparentemente más gruesas que el resto del talo) en los ápices (Figura 10).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Se realizaron cortes histológicos seriados para la observación de la morfología general del talo y el estado de los núcleos de 20 individuos elegidos al azar en cada tipo de fragmento.

Los fragmentos pertenecientes a las distintas clases de talos fueron fijados sumergiéndolos, durante 4 h. a temperatura ambiente, en una disolución al 5% de glutaraldehído (v/v) en tampón cacodilato sódico 0.1 M y 0.25 M de sacarosa a pH 7.4. A continuación, se procedió a realizar cuatro lavados, de 30 min de duración cada uno y agitación periódica, en soluciones tamponadas de concentración decreciente en sacarosa (0.25M, 0.125M, 0.0625M, 0M).

La solución de preinfiltración se preparó disolviendo 0.5 g de activador en 50 ml de Basic Resin (Historesin MR embedding kit). El material, sumergido en esta disolución, se trató durante 10 min con vacío y se mantuvo en el desecador durante toda la noche a temperatura ambiente.

El material fue incluido posteriormente en glicol metacrilado (GMA, Historesin MR). La solución polimerizó a los 60-70 min a 60 ºC.

Para su observación al microscopio óptico, se obtuvieron secciones seriadas de 5 µm de grosor cortadas con cuchilla de tungsteno en un microtomo (Reichert-Jung, modelo 2050). Los cortes se depositaron en una baño de agua destilada para su estiramiento y se recogieron en portas desengrasados, manteniéndose a 60 ºC durante 20 min. Una vez adheridos, los cortes se tiñeron con azul de toluidina para revelar el estado general del tejido.

La tinción con azul de toluidina se preparó con azul de toluidina al 1% en bórax al 1%. Las secciones se tiñeron durante 1 min. y se lavaron con abundante agua destilada.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

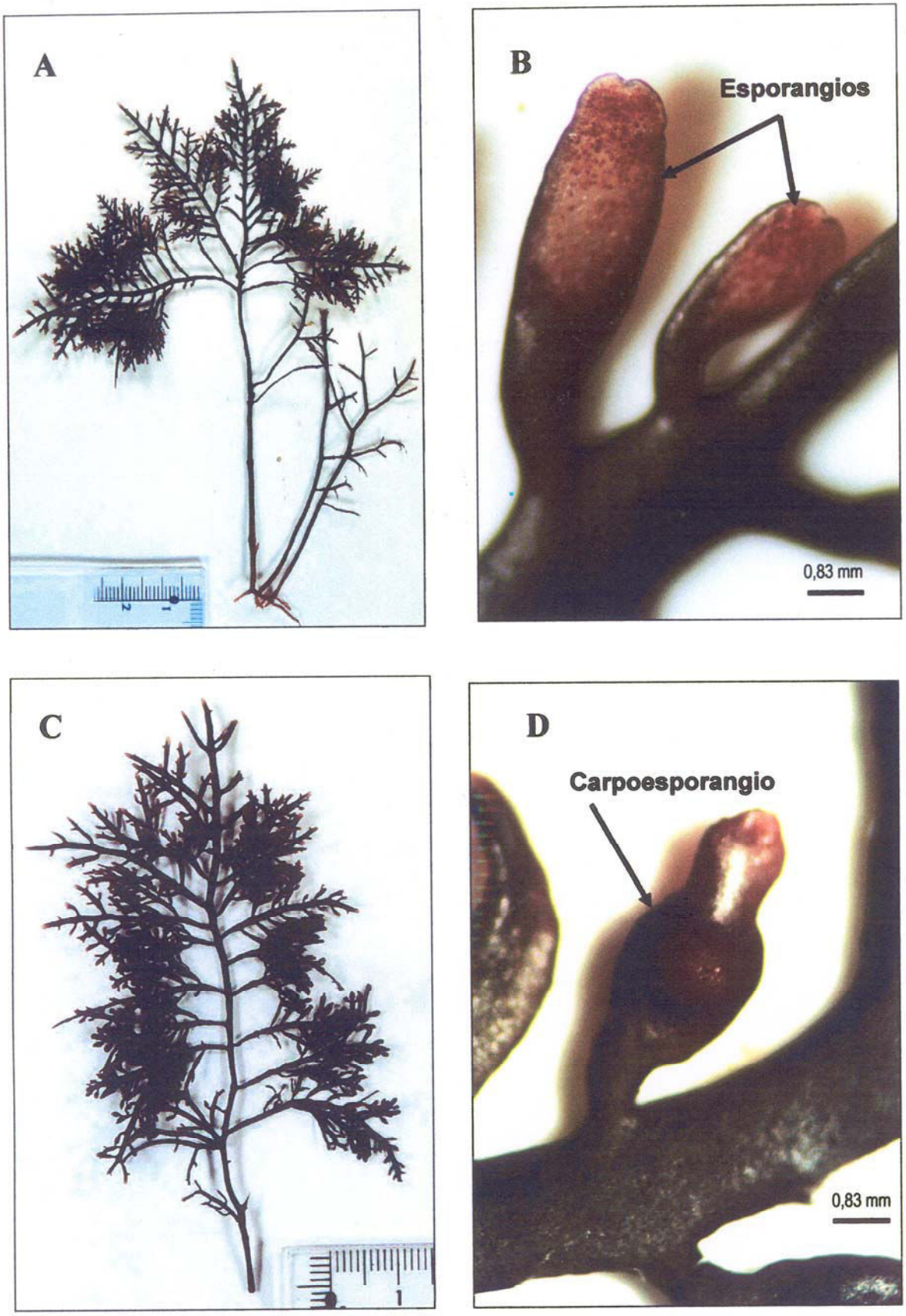



**Figura 8.- Diferentes tipos de talos utilizados en histología. A: Talo esporofítico, B: Detalle del esporangio. C: Talo gametofito femenino. D: Detalle de carpoesporangio maduro.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

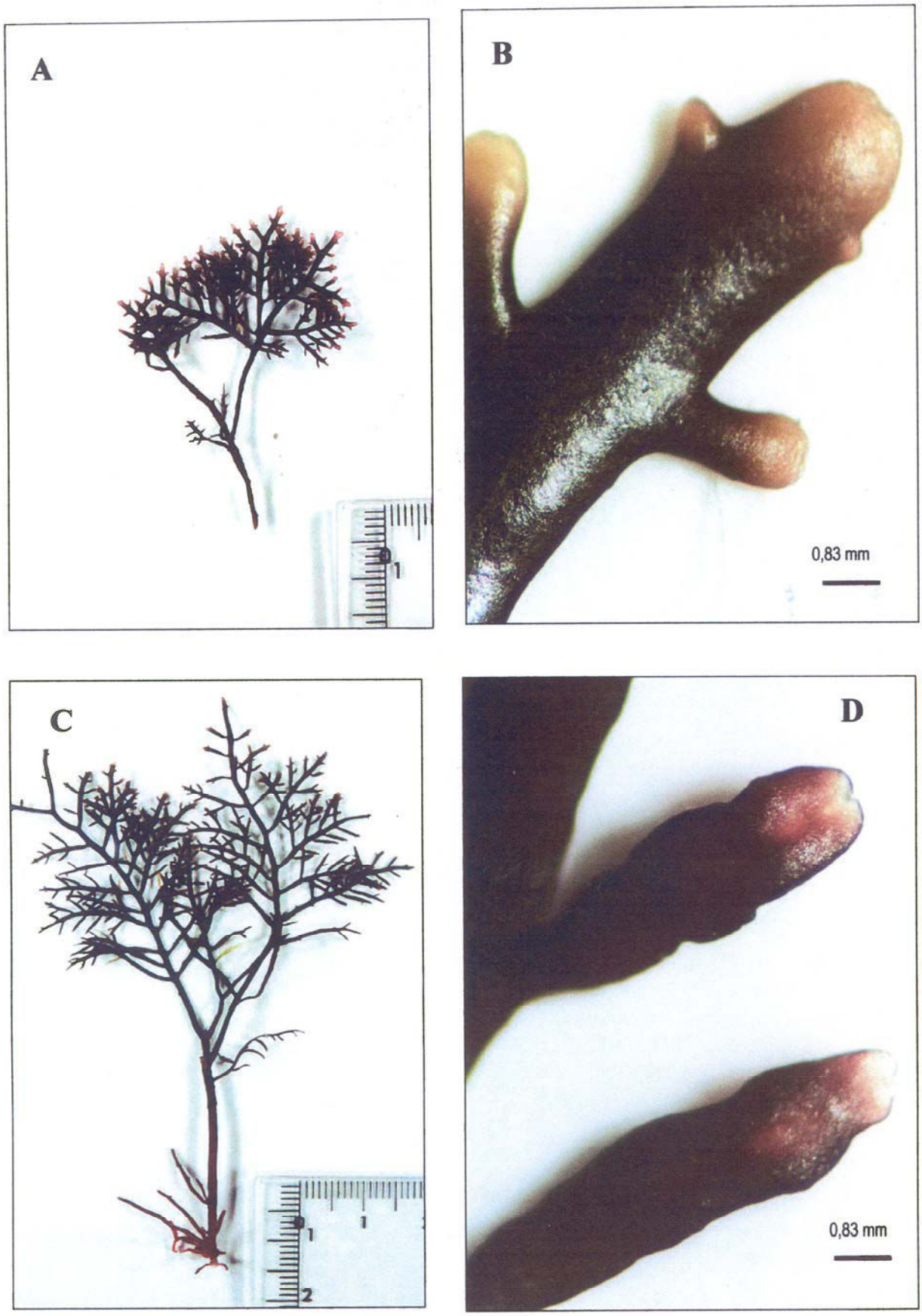



**Figura 9.- Diferentes tipos de talos utilizados en histología. A: Talo infértil, B: Detalle de ápices blancos. C: Talo con zonas decoloradas, D: Detalle de estructuras blanquecinas.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

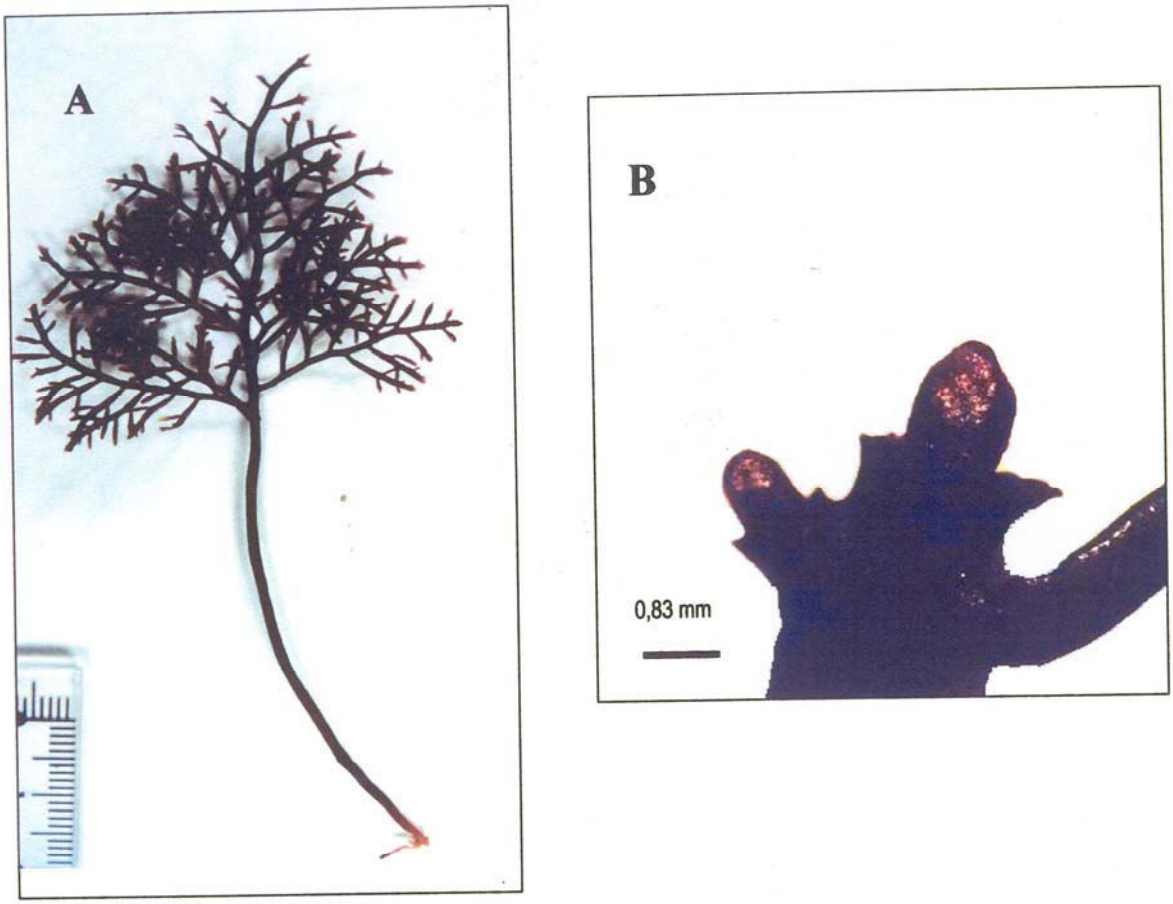



**Figura 10.- Diferentes tipos de talos utilizados en histología. A: Talo con ápices decolorados, B: Detalle de estructuras globulares.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 3.1.3. Extracción y purificación de ADN.

#### 3.1.3.1. Optimización de extracción de ADN.

En la extracción de ADN se utilizó la parte apical de los frondes porque ambas especies presentan un crecimiento apical y esta zona es la que presenta un menor recubrimiento de epibiontes en *G. canariense,* de esta manera disminuíamos el riesgo de contaminación.

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo de Cenis (1992) adaptado para algas rojas por Alberto *et al.* (1997) con modificaciones. Se machacaron entre 0,15 y 0,20 g de alga seca con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana esterilizado con lejía y calor (180 ºC/90 min), hasta que quedaba transformada en polvo fino a continuación las muestras pulverizadas se introducían en tubos de 2 ml al que se le añadia 1200 µl de tampón de extracción (200 mM Tris pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA y 0.5 % SDS), posteriormente se homogenizaba por inversión.

Se ensayaron dos condiciones:

.- Manteniéndolas en la oscuridad durante 10 minutos.

.- Incubándolas en un baño termostático a 65 ºC durante 20 minutos.

A continuación se añadieron 600 µl de acetato de sodio y se homogenizaron por inversión para después dejarlas en el congelador a –20 ºC durante 10 minutos.

Se centrifugaron a 13.000 rpm durante10 minutos y se retiraron 750 µl del sobrenadante de cada una de las muestras consiguiendo asi la precipitación de las proteinas, el SDS y el ARN.

Se realizó una segunda centrifugación a 13.000 rpm durante10 minutos y se retiraron 700 µl de sobrenadante de cada una de las muestras.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

A los sobrenadantes se le añadió un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (CIA, 24:1 v/v), se homogenizaron por inversión y posteriormente se retiraron los sobrenadantes. En las algas rojas es común que algunas ficobiliproteínas aparezcan en la fase acuosa junto con el ADN, si estas no han sido digeridas previamente con proteinasa K (Sosa & Oliveira 1992). Por eso, es necesario utilizar una fase orgánica en la que el cloroformo desnaturaliza las proteínas y el isoamil alcohol reduce la espuma facilitando la separación de las dos fases: orgánica y acuosa.

Posteriormente, a los sobrenadantes se le añadió un volumen igual de isopropanol y se dejó actuar 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos para precipitar el ADN.

Se decantó el isopropanol y se añadió un volumen igual de etanol frío al 80 % y a continuación se repitió la decantación y la centrifugación anterior y posteriormente se secaron en la estufa a 32 °C durante 10 minutos.

Por último, se resuspendió en 50 µl de tampón TE 1X (10 mM Tris pH 7.3;1mM EDTA), conservándose las muestras se conservaron a –20 °C (Sambrook *et al.* 1989).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

#### 3.1.3.2. Optimización purificación de ADN.

Se ensayaron tres tratamientos de purificación del ADN:

##### 3.1.3.2.1. Tratamiento con el enzima ARNasa.

Se llevo a cabo siguiendo el siguiente protocolo:

a.- Se añadió a la muestra la enzima ARNasa (10:1) previamente calentada a 98 °C durante 10 minutos y se dejó actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

b.- A continuación, se añadió 1 volumen de CIA (24:1) y a continuación se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos, recogiéndose el sobrenadante.

c.- Se realizó una precipitación con etanol, añadiendo 1 % de acetato de sodio y 3 volúmenes de etanol al 100 %.

d.- Se recogió el precipitado y se almacenó a –20 ºC durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos.

e.- Se añadió un volumen de etanol 70 % frió y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos.

**3.1.3.2.2. Limpieza con hidroxiapatito.**

El protocolo utilizado se detalla a continuación:

a.- Se rehidrató con 0,5 g de hidroxiapatito con 3 ml de tampón fosfato 10 mM pH 6.8, agitándolo levemente. Esperar 10 minutos y decantar el sobrenadante.

b.- Se añadió de nuevo 6 ml de tampón de fosfato 10 mM pH 6.8 a la solución y esperó 10 minutos, posteriormente decantó el sobrenadante.

c.- Se resuspendió con 6 ml de tampón de fosfato 10 mM pH 6.8.

d.- Se puso en un tubo eppendorf 10 µl de ADN, 200 µl de agua bidestilada y 3 gotas de hidroxiapatito rehidratado y agitarlo durante 15 minutos.

Primer lavado: Añadir tampón de fosfato 100 mM a 60 ºC, agitar durante 5 minutos y centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos.

e.- Se retiró el sobrenadante y se cuantificó en el espectrofotómetro. Cuantificamos el ssADN porque el ssADN se une más débilmente a los iones $Ca^{2+}$ de la resina y se eluyen a concentraciones de fosfatos menores.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
BIBLIOTECA DE CIENCIAS BASICAS

Segundo lavado: Se añadió tampón de fosfato 250 mM a 60 °C, agitar durante 5 minutos y centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos.

f.- Se retiró el sobrenadante y cuantificó en el espectrofotómetro. Cuantificamos el dsADN porque el dsADN esta más fuertemente ligado a los iones $Ca^{2+}$.

g.- Se precipitó del ADN: añadimos 3 volúmenes de etanol 100 % a los sobrenadantes y le dejamos actuar durante 3 horas.

h.- Se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se decantó el sobrenadante. Se retiró el resto de etanol en una campana de vacío durante 15 minutos.

i.- Se resuspendió el ADN con 50 µl de TE 1X (10 mM Tris pH 7,3; 1mM EDTA).

Posteriormente se hizo una cuantificación en gel de agarosa para analizar la calidad del ADN.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 3.1.3.2.3. Purificación con el sistema *clean up* de ADN

Se realizó primeramente el tratamiento con ARNasa, según se describió anteriormente para degradar el ARN presente en las muestras. Pero posteriormente, se observó que durante la extracción al calentar el tampón de extracción a 60 °C durante 20 minutos se favorecía la acción de las RNasas celulares disminuyendo considerablemente la concentración de ARN en las muestras, por lo que en extracciones sucesivas se obvió este paso. A continuación se detalla el procedimiento seguido:

a.- Se calentó la resina *clean up* de ADN de Wizard a 37 °C durante diez minutos para disolver los agregados cristalinos que presenta, enfriando posteriormente a 30 °C antes de añadirla a la muestra.

b.- Se preparo el multisistema de vacío (Vacum Manifold. Promega) con las correspondientes resinas y jeringas.

c.- Se añadió 1 ml de la resina a 50-500 µl de muestra y se homogeneizó por inversión.

d.- Se añadió la mezcla resina-muestra en las jeringas-resina colocadas en el multisistema de vacío y se abrió este.

f.- Una vez que toda la muestra había pasado a través de la resina, se añadió 2 ml de isopropanol 80 % a las jeringas, para lavar las columnas y de nuevo se abría el vacío.

g.- Se secó la resina aplicando el vacío durante 30 segundos, después de que la solución de isopropanol hubiese pasado a través de la columna.

h.- Se retiró el isopropanol residual centrifugando las minicolumnas en tubos eppendorf de 1,5 ml a 13000 rpm durante 2 minutos.

i.- Se transfirieron las minicolumnas a nuevos tubos eppendorf y se añadió 50 µl de TE 1X (10 mM Tris pH 7,3; 1mM EDTA) a 80 ºC. Se esperó 1 minuto y se centrifugó las minicolumnas durante 20 segundos a 13.000 rpm para extraer el ADN de doble cadena. Un aumento de la temperatura del eluyente favorece la elución del ADN de alto peso molecular (>20 kb) obteniéndose así, un mayor rendimiento. Las muestras de ADN purificado se guardaron en tubos eppendorf en frío (-20 ºC).

### 3.1.3.3. Extracción y purificación de ADN en los análisis poblacional (*bulks*) e individual.

Para el estudio a nivel poblacional se utilizó el método de *bulks*, formado por 15 individuos, como muestra representativa de cada población y se realizó de la siguiente manera. Primero se realizó la extracción y cuantificación de 20

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

individuos que presentaban una distribución homogénea en la población y pertenecientes a las tres categorías: gametofito femenino, esporofito y desconocido. Se eligieron 15 individuos que presentaban mayor cantidad y calidad de ADN y se retiró igual cantidad de ADN de cada uno de ellos para hacer dos *bulks* en cada población. Se utilizaron dos *bulks* para disminuir la probabilidad de error debido al mal funcionamiento de las resinas. Una vez hechos los dos *bulks* se realizó el tratamiento de purificación con el *clean up* de ADN (Wizard, Promega).

En el último paso, recuperación del ADN de las resinas, las dos resinas que contenían el ADN de los dos *bulks* para una misma población se colocaban en el mismo tubo eppendorf, de este modo obteníamos un solo *bulk* por población. Una vez hechos los *bulks* se hacía una cuantificación en geles de agarosa, para determinar la concentración de ADN.

En el análisis individual se realizó la extracción y purificación de ADN de manera individual para cada individuo.

#### 3.1.3.4. Determinación de la concentración de ADN.

La concentración de ADN fué determinada comparando la intensidad de fluorescencia emitida por 10 μl de cada una de las muestras de ADN con cuatro patrones de ADN de timo de ternera de concentración conocida: 2,5, 1, 0,5 y 0,1 μg/μl.

#### 3.1.3.5. Almacenamiento de las muestras de ADN.

Una vez completados los procesos de extracción y purificación de ADN en los individuos de ambas especies, así como la determinación y preparación de las diluciones de trabajo, los extractos de ADN originales o *soluciones stock* se almacenaron en TE 1X en el congelador (-20 °C) hasta su posterior utilización. Las diluciones de trabajo con las cuales se llevaría a cabo todas las

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

amplificaciones necesarias se almacenaron en la nevera (4 °C), para evitar la degradación del ADN por sucesivas congelaciones y descongelaciones.

### 3.1.4. Amplificación al azar de ADN polimórficos (RAPD).

Se utilizó 37 °C como temperatura de hibridación y para aumentar la intensidad de las bandas se realizaron ensayos a distintas concentraciones de $Cl_2Mg$ y de temperatura inicial de desnaturalización (Tabla 2). También, se hicieron ensayos con 35 y 45 ciclos de amplificación.

Los experimentos se realizaron con tres muestras replicadas de poblaciones (*bulks*) y cuatro cebadores que presentaban buenos patrones de amplificación (OPM 15, OPN 2, OPK 16, OPL 7). Las concentraciones utilizadas de $Cl_2Mg$ fueron: 1,5 mM, 1,8 mM y 2,1 mM con dos pasos iniciales de desnaturalización: 94 °C/1,5 min. y 90 °C/5 min. También, se ensayaron concentraciones de 0,1 %, 0,5 %, 1 % de BSA en dos muestras poblacionales (*bulks*) replicadas (Tabla 2).

| [$Cl_2Mg$] | Tª / t | | Nº CICLOS | | BSA | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 94º/ 1,5 min. | 90/ 5 min. | 35 | 45 | 0,1 | 0,5 | 1,0 |
| 1,5 mM | √ | x | - | - | - | - | - |
| 1,8 mM | X | x | - | - | - | - | - |
| 2,1 mM | X | x | - | - | - | - | - |
| 94 °C/1,5 min. | - | - | √ | x | x | x | x |

**Tabla 2.- Parámetros ensayados en la optimización de la amplificación de ADN. [$Cl_2Mg$]: Concentración de $Cl_2Mg$, Tª: Temperatura de desnaturalización, t: tiempo, √: Amplificación óptima, x: Amplificación no óptima, -: No se realizó ensayo.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 3.1.4.1. Pruebas de dilución para PCR.

Una vez completados los procesos de extracción y purificación de ADN en los individuos de ambas especies, se procedió a la determinación y preparación de las diluciones de trabajo. Se ensayó un rango de diluciones (1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1/50) para determinar cuál de ellas producía una mejor amplificación. Los extractos de ADN originales o soluciones *stock* se almacenaron en el congelador (-20 °C) para su posterior utilización.

Las diluciones de trabajo con las cuales se llevaría a cabo las amplificaciones se almacenaron en la nevera (4 °C), para evitar la degradación del ADN en las sucesivas congelaciones y descongelaciones.

### 3.1.4.2. Elaboración de las reacciones de amplificación.

Cada una de las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en placas de 96 pocillos (Eppendorf) o en microtubos en cadena (Perkin Elmer), con capacidad para 200 µl.

Dados los problemas de reproducibilidad que presenta esta técnica se hace necesario uniformizar lo máximo posible las condiciones de PCR. Con el fin de que las reacciones de amplificación fuesen lo más homogéneas posibles se elaboró un cóctel de amplificación formado por todos los componentes necesarios para la amplificación, excepto la muestra de ADN, de esta manera nos asegurábamos condiciones uniformes en todas las reacciones. Todos los productos se almacenaron en frío a –20 °C y se descongelaron sobre hielo en escamas.

A la hora de elaborar el *cóctel* de amplificación se tuvo en cuenta que la *Taq* polimerasa debe ser el último compuesto en agregarse para evitar su desnaturalización y la muestra de ADN se debe agregar a la reacción de amplificación independientemente del *cóctel* de amplificación para evitar la interacción del ADN molde y de la enzima ADN polimerasa.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El cóctel de amplificación se realizó en un tubo eppendorf de 1,5 ml en el que se iban añadiendo los compuestos necesarios siguiendo este orden:

.- 18,4 µl de agua ultrapura mili-Q y filtrada con filtros 0,22 µm (Millipore).

.- 2,5 µl de 10X tampón PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM, KCl).

.- 1,5 µl de $Cl_2Mg$ 15 mM.

.- 0,4 µl de deoxinucléotidos trifosfatos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP).

.- 0,1 µl de cebador (1X)

.- 0,2 µl de Ampli-*Taq* polimerasa.

El cóctel de amplificación se homogeneizaba en el agitador de tubos y posteriormente se distribuía en los microtubos, a los cuáles se les había añadido previamente 1 µl de ADN. En todas las reacciones se realizaron controles negativos.

Se utilizaron volúmenes de amplificación de 25 µl con una concentración de 25 ng de ADN en cada reacción. La solución de amplificación que contiene los elementos y factores necesarios para realizar la amplificación del ADN, consistió en 2.5 µl 10X de tampón PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl); 1.5 mM $Cl_2Mg$; 160 µM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos: dATP, dGTP, dCTP y dTTP; 1 unidad de Ampli*Taq* polimerasa (Perkin Elmer) y 0.4 µM de cebador (Operon Technologies Inc.).

La amplificación en todos los estudios se realizó con Ampli*Taq* ADN polimerasa (Perkin Elmer), excepto el análisis a nivel poblacional que se realizo con *Taq* ADN polimerasa (Pharmacia Biotech).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp System 2400 (Perkin Elmer) con capacidad para 24 muestras y la amplificación a nivel individual en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) con capacidad para 96 muestras.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Las condiciones de amplificación se determinaron después de diversos ensayos empíricos obteniéndose como condiciones óptimas para la amplificación las siguientes: una etapa de desnaturalización de 94 °C durante

1,5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 36 °C, 1 minuto a 72 °C, y un ciclo de elongación final de 10 minutos a 72 °C (Figura 11).

### 3.1.4.3. Selección de cebadores.

En ambas especies se realizo un test inicial con 80 cebadores de 10 pares de bases y un 60 % en GC (kit K, L, M, N, Operon Technologies Inc.). Este test inicial se realizó a partir de los *bulks* poblacionales, los cuales se constituían con igual cantidad de ADN procedente de 15 individuos de la población respectiva. Para cada *bulk* representativo de la especie se utilizó igual cantidad de ADN de las diferentes poblaciones analizadas en cada especie. Los cebadores ensayados, su secuencia nucleótica, así como la capacidad de amplificación obtenida en cada especie se describe con detalles en la Tabla 3.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

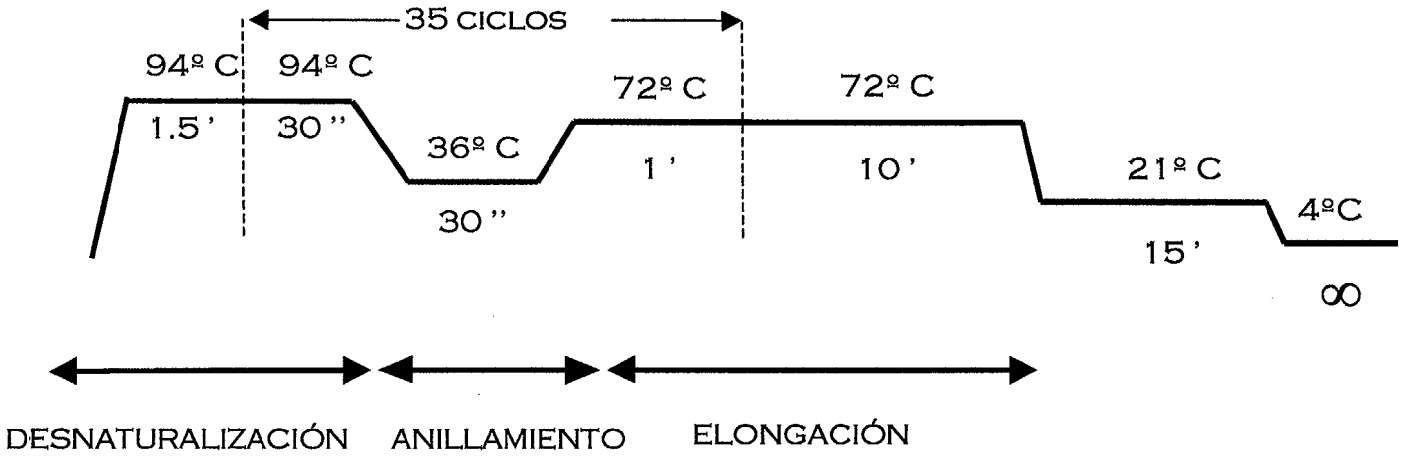



**Figura 11. Esquema de los ciclos utilizados en la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| CEBADOR | SECUENCIA 5'-3' | CEBADOR | SECUENCIA 5'-3' |
|---|---|---|---|
| OPM 1 | GTTGGTGGCT | OPL 1 | GGCATGACCT |
| OPM 2 | ACAACGCCTC | OPL 2 | TGGGCGTCAA |
| OPM 3 | GGGGGATGAG | OPL 3 | CCAGCAGCTT |
| OPM 4 | GGCGGTTGTC | OPL 4 | GACTGCACAC |
| OPM 5 | GGGAACGTGT | OPL 5 | ACGCAGGCAC |
| OPM 6 | CTGGGCAACT | OPL 6 | GAGGGAAGAG |
| OPM 7 | CCGTGACTCA | OPL 7 | AGGCGGGAAC |
| OPM 8 | TCTGTTCCCC | OPL 8 | AGCAGGTGGA |
| OPM 9 | GTCTTGCGGA | OPL 9 | TGCGAGAGTC |
| OPM 10 | TCTGGCGCAC | OPL 10 | TGGGAGATGG |
| OPM 11 | GTCCACTGTG | OPL 11 | ACGATGAGCC |
| OPM 12 | GGGACGTTGG | OPL 12 | GGGCGGTACT |
| OPM 13 | GGTGGTCAAG | OPL 13 | ACCGCCTGCT |
| OPM 14 | AGGGTCGTTC | OPL 14 | GTGACAGGCT |
| OPM 15 | GACCTACCAC | OPL 15 | AAGAGAGGGG |
| OPM 16 | TCAGTCCGGG | OPL 16 | AGGTTGCAGG |
| OPM 17 | CACCATCCGT | OPL 17 | AGCCTGAGCC |
| OPM 18 | CCTTCAGGCA | OPL 18 | ACCACCCACC |
| OPM 19 | CCTTCAGGCA | OPL 19 | GAGTGGTGAC |
| OPM 20 | AGGTCTTGGG | OPL 20 | TGGTGGACCA |
| OPK 1 | CATTCGAGCC | OPN 1 | CTCACGTTGG |
| OPK 2 | GTCTCCGCAA | OPN 2 | ACCAGGGGCA |
| OPK 3 | CCAGCTTAGG | OPN 3 | GGTACTCCCC |
| OPK 4 | CCGCCCAAAC | OPN 4 | GACCGACCCA |
| OPK 5 | TCTGTCGAGG | OPN 5 | ACTGAACGCC |
| OPK 6 | CACCTTTCCC | OPN 6 | GAGACGCACA |
| OPK 7 | AGCGAGCAAG | OPN 7 | CAGCCCAGAG |
| OPK 8 | GAACACTGGG | OPN 8 | ACCTCAGCTC |
| OPK 9 | CCCTACCGAC | OPN 9 | TGCCGGCTTG |
| OPK 10 | GTGCAACGTG | OPN 10 | ACAACTGGGG |
| OPK 11 | AATGCCCCAG | OPN 11 | TCGCCGCAAA |
| OPK 12 | TGGCCCTCAC | OPN 12 | CACAGACACC |
| OPK 13 | GGTTGTACCC | OPN 13 | AGCGTCACTC |
| OPK 14 | CCCGCTACAC | OPN 14 | TCGTGCGGGT |
| OPK 15 | CTCCTGCCAA | OPN 15 | CAGCGACTGT |
| OPK 16 | GAGCGTCGAA | OPN 16 | AAGCGACCTG |
| OPK 17 | CCCAGCTGTG | OPN 17 | CATTGGGGAG |
| OPK 18 | CCTAGTCGAG | OPN 18 | GGTGAGGTCA |
| OPK 19 | CACAGGCGGA | OPN 19 | GTCCGTACTG |
| OPK 20 | GTGTCGCGAG | OPN 20 | GGTGCTCCGT |

**Tabla 3.- Listado de cebadores ensayados en la selección inicial de cebadores en *G. canariense* y *G. arbuscula.* Se muestra la secuencia de nucleótidos de los mismos (5-3'). A: Adenina, C:Citosina, G:Guanina, T: Timina.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 3.1.5. Separación e interpretación de los patrones de ADN.

#### 3.1.5.1. Elaboración de geles de agarosa y carga de las muestras.

En todas las electroforesis se utilizaron geles de agarosa con concentraciones de 0,8 y 1,8 % de agarosa en tampón TBE 1X (Tris-borato EDTA). Para su elaboración se añadió la cantidad exacta de agarosa en un erlen-meyer y posteriormente se añadía el volumen necesario de TBE 1X. A continuación se ponía a hervir en una placa agitador-calentador hasta que obteníamos una solución homogénea transparente y sin grumos. Posteriormente, se enfriaba al baño maría hasta alcanzar 60 °C luego se vertía en los moldes, previamente nivelados, y si se observaban burbujas en el interior del gel, se eliminaban inmediatamente con una pequeña espátula. A continuación se colocaba el peine y se dejaba enfriar, aproximadamente 20 minutos, hasta que alcanzaba un color opaco para después sumergirlo en el tampón de electrodo (TBE 1X) en la cubeta de electroforesis.

Para cargar las muestras en el gel de agarosa es necesario añadir a las muestras un tampón de carga (30% glicerol y 0,25 % azul bromofenol). La cantidad de tampón de carga añadido a cada muestra es aproximadamente de 1/5, así en la electroforesis de cuantificación de ADN se añadieron 3 µl a cada muestra. En la electroforesis de los fragmentos de ADN se añadió 5 µl al volumen resultante de la PCR (25 µl), se homogeneizaba sin sacar la punta del microtubo y se cargaban 15 µl en cada pocillo del gel de agarosa. La mezcla restante de ADN amplificado y tampón de carga (15 µl) se guardaba en el congelador de –20 °C para posteriores análisis o comprobaciones.

En la electroforesis de cuantificación se cargaron además 3 patrones de ADN de referencia (ver apartado 3.1.3.4) y en la electroforesis de los productos de ADN se utilizó un marcador (Ladder 100 pb. Pharmacia).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 3.1.5.2. Separación en geles de agarosa.

Para la separación del ADN se emplearon tres tipos de cubetas: GNA 200 (Pharmacia Biotech), Grande (Ecogen) y HE 33 (Hoefer) con capacidades 3 l, 2 l y 250 ml respectivamente, utilizando siempre TBE 1X como tampón de electrodo. Las condiciones de electroforesis variaron según la cubeta utilizada, así en la cubeta Ecogen se aplico un voltaje inicial de 121 V /80 mA durante 10 minutos elevando posteriormente la tensión a 200 V, 60 mA durante 3,5 horas (4.3 V/cm). Para la cubeta GNA 200 se aplicaba al principio 60 V, 40 mA durante 10 minutos y después 95 V, 62 mA durante 3.5 horas (3.3 V/cm). Por último la cubeta HE 33 se utilizaban 35 V, 20 mA durante 10 minutos pasando luego a 60 V, 35 mA, durante 2 horas (2.4 V/cm).

### 3.1.5.3. Tinción y visualización de los fragmentos de ADN.

Una vez finalizada la electroforesis el gel se tiño con una solución de bromuro de etidio (0,5 µl/ml) en oscuridad durante 20 minutos. Posteriormente se lavaba el gel y se procedía a la visualización de los fragmentos de ADN en un transiluminador de rayos UV (TM-20PE. UVP) a una longitud de onda de 302 nm. Finalmente se fotografiaban los geles con una cámara de fotos digital (Kodak DC40) y se almacenaban en ficheros de seguridad para su posterior interpretación y análisis. Las imágenes se visualizaron con el programa informático proporcionado por *Kodak Digital Science* (Kds1D).

### 3.1.5.4. Reproducibilidad de patrones de RAPD.

Estos cuatro experimentos representan una serie de estudios en los que las condiciones entre las replicaciones se fueron homogeneizando progresivamente lo que favoreció la reproducibilidad de los patrones de ADN. Los estudios realizados para analizar la reproducibilidad de los patrones de RAPD se realizó con la metodología del interpoblacional (*bulks*). Para los marcadores RAPD interpretados en las dos réplicas se determinó el porcentaje de reproducibilidad de los diferentes tipos o categorías de bandas consideradas

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

en función de la intensidad de la banda. Las categorías consideradas fueron: débil, media y fuerte.

#### 3.1.5.4.1. Reproducibilidad entre distintas amplificaciones.

Las reacciones de amplificación con 11 *bulks* poblacionales para cada uno de los siete cebadores (OPM 3, OPM 5, OPM 12, OPM 15, OPK 16, OPL 16, OPN 4) se realizaron en diferentes días y por consiguiente los cócteles de amplificación con los componentes de las reacciones de amplificación para cada cebador fueron independientes unas de otras. Los productos de amplificación se separaron en electroforesis distintas.

#### 3.1.5.4.2. Reproducibilidad entre electroforesis.

Las reacciones de amplificación con 4 *bulks* poblacionales para los 14 cebadores (OPM 2, OPM 3, OPM 4, OPM 5, OPM 6, OPM 7, OPM11, OPM 14, OPM 15, OPM 17, OPM 18, OPM 20, OPK 4, OPK 6) analizados se realizaron en un mismo tubo de microcentrifuga para cada cebador, de esta manera se eliminaban las diferencias entre las amplificaciones debido al pipeteo o a la mezcla de los diferentes componentes del cóctel de amplificación. Los productos de amplificación de cada cebador se obtuvieron en la misma reacción de amplificación pero fueron separados en electroforesis de gel de agarosa diferentes.

#### 3.1.5.4.3. Reproducibilidad entre reacciones realizadas dentro de una misma PCR.

Este análisis se realizo con 4 *bulks* poblacionales. Los cócteles de amplificación para cada uno de los 12 cebadores (OPM 2, OPM 3, OPM 4, OPM 5, OPM 6, OPM 7, OPM 12, OPM 14, OPM 15, OPM 17, OPM18, OPM 20) incluyendo *Taq* polimerasa, tampón, dNTPs, $Cl_2Mg$ y cebador se obtuvieron de las mismas soluciones stock y se realizaron en el mismo tubo de microcentrifuga de tal manera que no existen diferencias entre las replicaciones debido al pipeteo o mezcla de los diferentes componentes del cóctel de

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

amplificación. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo el mismo día, una al lado de otra en la misma placa de amplificación, para descartar las diferencias de temperatura ambiente entre las reacciones. Los productos de amplificación fueron separados en el mismo gel de agarosa colocando las réplicas de cada *bulk* poblacional para los diferentes cebadores una al lado de otra.

#### 3.1.5.4.4. Reproducibilidad entre diferentes extracciones de ADN.

Este estudio se realizó con tres *bulks* poblacionales y tres cebadores (OPM 2, OPN 9, OPN 13). Los cócteles de amplificación para cada una de las extracciones incluyendo *Taq* polimerasa, tampón, dNTPs, $Cl_2Mg$ y cebador se obtuvieron de las mismas soluciones stock y se realizaron en el mismo tubo de microcentrifuga de tal manera que no existen diferencias entre las réplicas debido al pipeteo o mezcla de los diferentes componentes del cóctel de amplificación. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo una al lado de otra en la misma placa de amplificación. Los productos de amplificación fueron separados en el mismo gel de agarosa colocando las réplicas de cada extracción para los tres cebadores una al lado de otra.

### 3.1.6. Estudios realizados.

#### 3.1.6.1. Análisis poblacional (*bulks*).

Este estudio se llevó a cabo con dos especies de *Gelidium*: *Gelidium canariense* y *G. arbuscula*. En *G. canariense* se utilizaron tres poblaciones de Gran Canaria: Bocabarranco, Agaete y Sardina y una población de Tenerife: Puerto de la Cruz y para *G. arbuscula* se utilizaron dos poblaciones de Gran Canaria: Agaete y Bocabarranco. Esto nos permitió analizar la variabilidad genética a distintas escalas que van desde cientos de kilómetros (distancia entre islas) hasta decenas de Km (distancia entre poblaciones).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Este análisis fue llevado a cabo sin realizar ningún tipo de reproducibilidad y considerando todas los marcadores presentes en el gel de agarosa.

### 3.1.6.2. Caracterización molecular de las fases haploide y diploide.

Este estudio, además de facilitarnos la identificación de marcadores para la fase haploide y diploide nos permitió comparar la variabilidad genética a diferentes escalas (desde 50 m hasta 100 km) aún conociendo los problemas derivados del análisis conjunto de individuos de distinta ploídia.

El estudio se realizo en 22 individuos fértiles de distinta ploídia de poblaciones pertenecientes a las islas de Tenerife y La Palma separadas 100 Km aproximadamente (Tabla 4). En la población de Punta Brava (PB) se analizaron 5 y 6 individuos pertenecientes a las parcelas PPB1 y PPB2 respectivamente, separadas aproximadamente 50 m, mientras que en la población de Talavera los 11 individuos pertenecían a la misma parcela (TLVP1). Se eligieron individuos distribuidos homogéneamente en las poblaciones.

Este análisis se realizó llevando a cabo reacciones duplicadas para cada reacción en la misma PCR y fueron separados en la misma electroforesis. Para
construir la matriz de datos solo se consideraron las bandas que fueron reproducibles en ambas amplificaciones.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | Población | Parcela | G | S | N |
|---|---|---|---|---|---|
| **TENERIFE** | Punta Brava | 1 | PB 9 | PB 16, PB 20 PB 39, PB 43 | 5 |
| | Punta Brava | 2 | PB 31, PB 45 PB 48 | PB 8, PB 11 PB 30 | 6 |
| *Subtotal Tenerife* | | | 4 | 7 | 11 |
| **LA PALMA** | Talavera | 1 | TLV 16 TLV 18 | TLV 1, TLV 7, TLV 9, TLV 10, TLV 14, TLV 19, TLV 23, TLV 35, TLV 49 | 11 |
| *Subtotal La Palma* | | | 2 | 9 | 11 |
| **Total** | | | **6** | **15** | **22** |

**Tabla 4.- Poblaciones e individuos estudiados en el análisis de marcadores genéticos para las fases haploide y diploide. G: Individuos gametofitos femeninos (haploide), S: Individuos esporofitos (diploide). N: Número total de individuos analizados.**

### 3.1.6.3. Análisis de la fase haploide.

Para el estudio genético, nuestro esfuerzo se centró principalmente en el análisis de la fase haploide para evitar la naturaleza dominante de los polimorfismos resultantes obtenidos mediante RAPDs.

Este nos permitió analizar la variabilidad genética a distintas escalas que van desde cientos de kilómetros (distancia entre islas) hasta decenas de centímetros (distancia entre individuos).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Se analizaron un total de 252 individuos haploides. El número de individuos haploides en cada población fue aproximadamente de 30, excepto para la población de Hermigua en la cuál solo se encontraron 12 individuos gametofitos haploides.

En este estudio no se realizaron muestras replicadas, dado el elevado número de muestras analizadas. Se construyó la matriz de datos para posteriores análisis considerando sólo aquellas bandas con una frecuencia menor del 95% para los fenotipos de presencia y ausencia

#### 3.1.6.4. Análisis comparativo de *bulks* poblacionales e individuos haploides.

En este análisis se compararon los patrones de RAPDs obtenidos con doce cebadores en tres bulks poblacionales de Bocabarranco (BBS1), Agaete (AP3) y Puerto de la Cruz (PCP3) y los patrones generados por 15 individuos haploides de cada una de las poblaciones mencionadas anteriormente.

El estudio de comparación se realizó considerando todos los marcadores obtenidos en ambos análisis, dado que la matriz final obtenida en el análisis de *bulks* poblacionales estaba formada por sólo tres muestras y al realizarle el filtro, se eliminaban todos los marcadores.

### 3.1.7. Análisis estadístico de datos.

#### 3.1.7.1. Matriz de datos.

La interpretación de las bandas obtenidas se hizo a partir de las fotos de archivo, codificando como 0 y 1 la ausencia y presencia de banda respectivamente, tras lo cual se construyo una matriz de datos de doble entrada formada por los individuos analizados y los marcadores encontrados. Para cada cebador, los marcadores fueron asignados y ordenados siguiendo el orden alfabético y de acuerdo a su movilidad desde el origen del gel hacia el ánodo de este modo cada marcador, quedaba determinado mediante el patrón

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

(Ladder 100pb, Pharmacia) y se etiquetaba con el nombre del cebador y el peso molecular que presentaba la banda considerada.

En el análisis de *bulks* poblacionales se consideraron todas las bandas para la construcción de la matriz de datos mientras que en el análisis de fase haploide sólo se consideraron las bandas fuertes y se realizó un filtro o criba que consistió en eliminar las bandas con una frecuencia inferior al 5%. Aunque la exclusión de marcadores monomórficos puede originar sesgo en la matriz de distancias o similaridades genéticas estos no generan información adicional en el AMOVA.

### 3.1.7.2. Indices de similitud genética.

Las similitudes genéticas entre todos los pares de individuos o poblaciones analizadas fueron computadas a partir de la matriz de ausencia-presencia de bandas amplificadas usando el coeficiente de Dice (Rohlf 1993) y el coeficiente Jaccard (Jaccard 1908) y el SM (*Simple Matching coefficient*; Sneath & Sokal, 1973). El coeficiente de Dice y el coeficiente de Jaccard consideran únicamente la presencia de bandas y se calculan mediante la fórmula:

$$S = \frac{2Nab}{Na + Nb}$$ *Coeficiente Dice*

$$J = \frac{Nab}{N - Nd}$$ *Coeficiente Jaccard*

Donde *Na* es el número de bandas amplificadas por el individuo a, *Nb* es el número de bandas amplificadas por el individuo b, *Nd* es el número de bandas ausentes en ambos individuos y *Nab* el número de bandas amplificadas comunes en los dos individuos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Sin embargo, el Coeficiente *SM* utiliza tanto la presencia como la ausencia de bandas para calcular la similaridad y se calcula mediante la fórmula:

$$SM = \frac{M}{N} \qquad \text{Coeficiente } SM$$

Donde *M* es el número de bandas presentes y ausentes compartidas por las dos poblaciones y *N* es el número total de posiciones de bandas en todos los individuos.

Todos los índices se calcularon mediante el programa de análisis genético
NTSYS-pc (Rohlf 1993) y fueron estimados en el análisis de *bulks* poblacionales y en el análisis individual.

### 3.1.7.3. Marcadores diagnostico.

Se analizó el grado de validez de los fragmentos detectados como un elemento identificativo o marcador de la población. Así, el grado de exclusividad de la banda dependerá de la frecuencia con que aparece en la población, de tal forma que un fragmento exclusivo es aquel que aparece en el 100% de los individuos de la población y sólo en ella. Sin embargo, la solidez identificativa disminuirá proporcionalmente con la disminución de su frecuencia.

### 3.1.7.4. Indices de diversidad genética.

Una aproximación al grado de diversidad genética de las poblaciones se realizó analizando el polimorfismo de las bandas detectadas. En este sentido, se consideraba una banda polimórfica en una población, si su presencia es variable entre los individuos de la misma. Por el contrario, un fragmento es monomórfico o invariable, si este aparece en todos y cada uno de los individuos analizados de la población dada.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

La diversidad genética de cada población se midió utilizando el índice de diversidad de Shannon (Lewontin 1972), el cuál es adecuado para el análisis de los datos de RAPD debido a su insensibilidad al sesgo producido por la naturaleza dominante de estos marcadores (Maki & Hore 1999). Para calcular este índice se consideró cada marcador un sistema bi-alélico, donde cada locus tiene un alelo presente (1) y uno ausente (0). Este índice se calculó según Bussell (1999) siguiendo la fórmula:

$$H'_j = - \Sigma p_i \log_2 p_i$$

Donde $p_i$ es la frecuencia de presencia o ausencia de un fragmento o locus dado en la población. Los valores de $H'_j$ medios por cebador ($H_{POP}$) fueron promediados a través de todas las poblaciones para facilitar la comparación de los niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones detectada por diferentes cebadores (Chalmers *et al.* 1992). Además, se calcularon los valores de $H'_j$ medios por población ($H''_{POP}$) y especie ($H''_{SP}$) a través de todos los marcadores. La diversidad total de la especie ($H_{SP}$) se calculó con la misma fórmula, pero siendo $p_i$, la frecuencia de presencias o ausencias en la muestra total (252 individuos). Estos valores estandarizados facilitan la comparación con otros estudios, en los que se han utilizado un número diferente de cebadores y de marcadores.

Para cada cebador se calculó la componente de diversidad genética dentro de la población ($H'_{POP}/H'_{SP}$) y la componente entre poblaciones ($H'_{SP}$-$H'_{POP}/H'_{SP}$) (Chalmers *et al.* 1992). Esta última medida es equivalente a la heterogeneidad entre poblaciones, $G'_{ST}$ (Nei 1973), para obtener un valor estándar, se calculó también a partir de $H''_{SP}$ y $H''_{POP}$.

Además de los citados índices, se calculó la diversidad génica de Lynch & Milligan (1994) partir de una aproximación monolocus. La diversidad génica para datos haploides se define como la probabilidad de que dos individuos cogidos al azar en una población sean diferentes (Nei 1987) y es equivalente a la heterocigosidad esperada en el equilibrio Hardy-Weinberg Estos autores

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

consideran que cada marcador es un sistema di-alélico con un alelo presente y un alelo *invisible* o nulo. Para llevar a cabo el cálculo de la diversidad genética fue necesario hacer una criba de la matriz de datos aplicando el criterio 3/N a la frecuencia del alelo nulo, siendo N el tamaño poblacional.

En el análisis individual de individuos haploides, se considero los diferentes fenotipos de un patrón de amplificación de un cebador, como los diferentes haplotipos o alelos. Se realizaron estimaciones del número medio de haplotipos o número medio de alelos por cebador y se representaron frente al tamaño muestral para conocer la robustez de los datos.

El porcentaje de polimorfismo, así como los índices derivados de la aproximación genotípica monolocus (índice de Shannon y diversidad génica) se calcularon utilizando el programa Microsoft Excel 5.0a (Microsoft Corporation, USA, 1985-1994). La diversidad genética (Nei 1987) se calculó utilizando el programa de análisis genético ARLEQUIN v 2.0 (Schneider *et al.* 2000).

### 3.1.7.5. Análisis de la varianza molecular.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) se basa en el clásico análisis de la varianza (ANOVA) y mide la distribución de la variación genética a escala espacial, en los diferentes niveles de jerarquía considerados (islas, localidades, poblaciones). A su vez, este análisis calcula los índices de fijación (estadísticos $\Phi$) análogos a los estadísticos F a partir de una matriz de distancias Euclídeas. Para comprobar la significación de los mismos, se realiza un test de permutaciones, bajo la hipótesis nula, de que no existe estructuración genética en las poblaciones. Las matrices Euclídeas, los estadísticos $\Phi_{ST}$ y el de test de significación en el que se compara el resultado observado con el resultado de 1000 permutaciones al azar se realizó con el programa de análisis genético ARLEQUIN v 2.0 (Schneider *et al.* 2000). Este análisis se llevó a cabo en el estudio de fase haploide.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En este estudio se realizaron tres AMOVA jerárquicos para estimar los componentes de la varianza de los haplotipos RAPDs, dividiendo la varianza genética total en los niveles jerárquicos considerados. Los análisis realizados fueron los siguientes:

Análisis jerárquico de archipiélago: Se determinaron las componentes de la varianza genética atribuibles a las diferencias entre islas, entre poblaciones dentro de las islas y dentro de las poblaciones. Se agruparon las dos poblaciones de una localidad dado que la población era el nivel que más no interesaba.

Análisis jerárquico de islas: Se realizaron análisis separados para cada isla y se determinaron las componentes de la varianza genética atribuibles a las diferencias entre localidades y dentro de las localidades para cada isla.

Análisis jerárquico de localidad: Se realizó un análisis dentro de la localidad Bocabarranco para determinar las componentes de la varianza genética atribuibles a las diferencias entre poblaciones y dentro de las poblaciones.

### 3.1.7.6. Coeficiente de diferenciación genética ($F_{ST}$).

Las distancias genéticas entre las poblaciones consideradas se calcularon a través del coeficiente de diferenciación genética ($F_{ST}$). $F_{ST}$ mide la varianza en la distribución de los fenotipos entre las poblaciones, y constituye una medida indirecta del flujo genético entre las mismas. $F_{ST}$ tiene un mínimo teórico de 0 (cuando no existe divergencia entre las poblaciones) y un máximo de 1 (máxima divergencia entre las poblaciones). Sin embargo, los máximos observados son generalmente mucho menores que 1. Con el fin de analizar las relaciones genéticas de las mismas en su globalidad, los valores de $F_{ST}$ se usaron como matriz de datos para la construcción de un dendrograma Neighbor-Joining entre las poblaciones.

Para el cálculo del coeficiente de diferenciación genética se utilizo el programa de análisis de datos genéticos ARLEQUIN v 2.0 (Schneider *et al.* 2000) y se calculó sólo en el análisis de la fase haploide.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 3.1.7.7. Arboles de similitud genética y Análisis de Componentes Principales.

La comparación de todos los individuos o poblaciones genera una matriz de similitud o distancia genética de doble entrada que se empleó para construir dendrogramas Neighbour-Joining ó UPGMA (Unweighted Paired-Group Meted with Arithmetic Mean) para analizar y comprobar la relación genética entre individuos y poblaciones analizadas.

El dendrograma UPGMA asume que la tasa de divergencia entre poblaciones es constante para todos los marcadores, y los cálculos se hacen a partir de grupos. El dendrograma Neighbour-Joining asume una tasa de divergencia entre poblaciones variable para todos los marcadores.

Los dendrogramas se calcularon utilizando el programa de análisis genético NTSYS-pc (Rohlf, 1993) y se obtuvieron para ambos análisis.

Para llevar a cabo el análisis de componentes principales se introdujeron las frecuencias de los marcadores de las poblaciones analizadas, como variables, en el programa de tratamiento estadístico SPSS 6.1.3 (SPSS Inc. Chicago, IL). Este tratamiento consiste en reducir el número de variables a un numero menor de componentes (combinaciones lineales de las variables originales) que posteriormente pueden ser representados en una gráfica 2D ó 3D.

### 3.1.7.8. Análisis de autocorrelación espacial.

Este análisis consiste en correlacionar la matriz de distancias genéticas y la matriz de distancias geográficas. La matriz de distancias genéticas se construyó a partir de la matriz de presencias y ausencias obtenida previamente. La matriz de distancias geográficas entre los individuos se construyó a partir de las coordenadas cartesianas de los mismos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Se utilizo la I de Moran (Moran 1948) como coeficiente de autocorrelación espacial. Este índice esta basado en la covarianza de los valores yuxtapuestos en el mapa, y varía entre –1 y 1, con un valor esperado de E(I)=-1/(n-1) (Oden 1984), donde n es el tamaño de la muestra. Cuando el valor de I es mayor que cero para una determinada variable, indica la existencia de autocorrelación espacial positiva, lo que indica que los individuos más próximos geográficamente presentan una mayor similitud genética. Sin embargo, cuando el valor de I es menor que cero, la variable presenta autocorrelación espacial negativa, y por tanto los individuos están menos relacionados que lo esperado en una asociación al azar. La línea de intersección con el eje x se corresponde con la distancia que alcanza el radio del área de la población panmítica (Sokal 1979). Las matrices de distancia geográfica entre pares de individuos, la desviación del valor esperado de la I de Moran para cada una de las cinco clases de distancia y el grado de significación de los correlogramas fueron calculados con el software de análisis estadístico SAAP ver 3.4 (Wartenberg 1983).

El análisis de autocorrelación espacial solo se realizó en seis poblaciones para el análisis haploide porque los mapas del resto de las poblaciones no estuvieron disponibles.

## 3.2. ANALISIS DEMOGRAFICO.

### 3.2.1. Descripción de las poblaciones.

El estudio demográfico se llevó a cabo durante el mes de julio y agosto de los años 1996 y 1997 en la Playa de Bocabarranco situada en Gáldar (Gran Canaria), coincidiendo con las mareas vivas mensuales.

La Playa de Bocabarranco (28º 9' 37" N, 15º 39' 57" W) es una playa de arena abierta y expuesta a fuerte hidrodinamia, flanqueada a ambos lados por formaciones rocosas donde se asientan las poblaciones de *G. canariense* en la zona intermareal baja (Figura 12).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

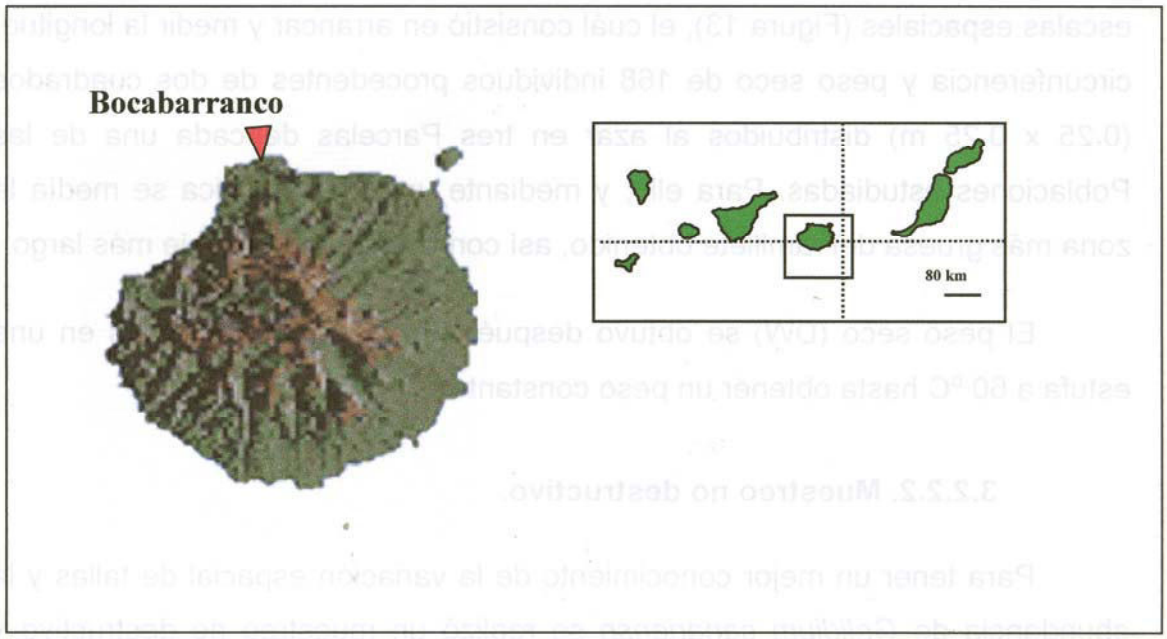



**Figura 12.- Localización de la Playa de Bocabarranco (Gáldar).**

El trabajo se restringió a las partes superiores de la población debido a que las poblaciones están asociadas a un fuerte oleaje que impide y hace muy peligroso el trabajar en el resto de la población.

### 3.2.2. Diseño experimental.

#### 3.2.2.1. Muestreo destructivo.

En el análisis demográfico se siguió la metodología descrita por Aberg (1990) mediante la cual se analiza la correlación existente entre el volumen de un individuo (medido como $V=LC^2$, donde L es la longitud máxima y C la circunferencia máxima) y el peso seco del mismo. Así, si existe correlación positiva de las medidas de L y C tomadas en el campo y el peso seco de los individuos, estas se pueden utilizar como estimadores de la talla de los individuos (Aberg 1990). Esto nos permitirá determinar la biomasa (peso seco) de cada individuo en los sucesivos muestreos no destructivos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Primeramente se realizó un muestreo destructivo y jerárquico en tres escalas espaciales (Figura 13), el cuál consistió en arrancar y medir la longitud, circunferencia y peso seco de 168 individuos procedentes de dos cuadrados (0.25 x 0.25 m) distribuidos al azar en tres Parcelas de cada una de las Poblaciones estudiadas. Para ello, y mediante una cinta métrica se medía la zona más gruesa del ramillete obtenido, así como la longitud del eje más largo.

El peso seco (DW) se obtuvo después de secar los individuos en una estufa a 60 °C hasta obtener un peso constante.

#### 3.2.2.2. Muestreo no destructivo.

Para tener un mejor conocimiento de la variación espacial de tallas y la abundancia de *Gelidium canariense* se realizó un muestreo no destructivo y jerárquico en tres escalas espaciales (Figura 13, 14 y 15) iguales a las consideradas en el análisis genético. Las categorías consideradas fueron:

- Poblaciones: Se consideraron dos zonas con una distribución continua de *Gelidium canariense,* separadas 500 m.

- Parcelas: Dentro de cada Población se consideraron dos áreas (2 x 5 m) y separados entre 20 y 50 m.

- Cuadrados: Se realizaron entre ocho y trece Cuadrados dentro de cada Parcela siendo la separación entre ellos menos de 3 m.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

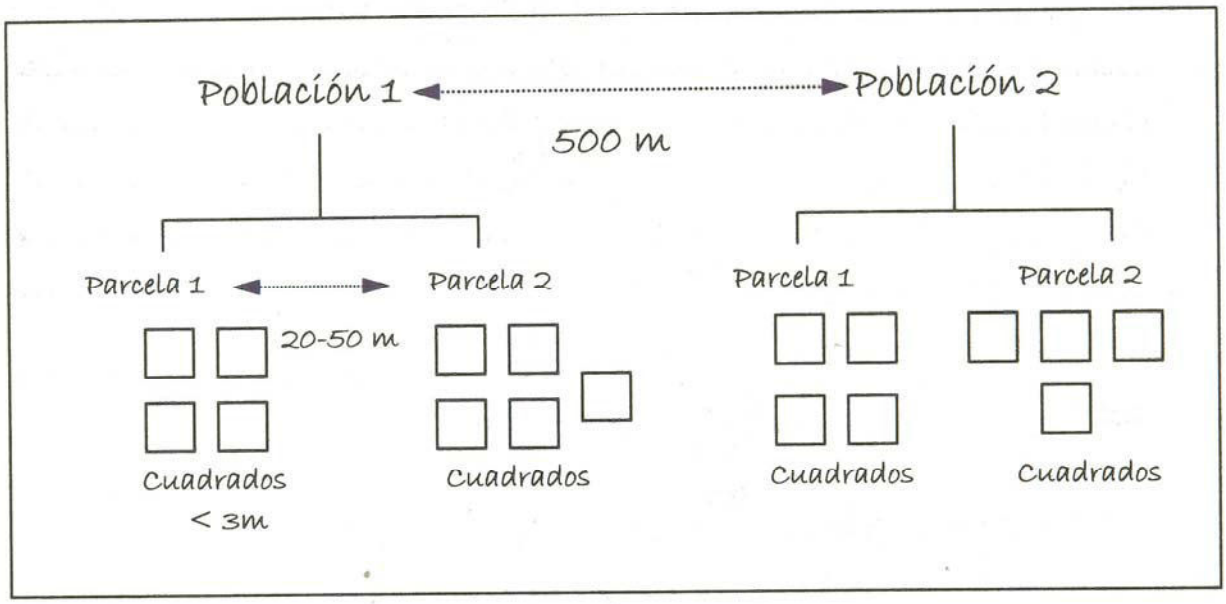



**Figura 13.- Diseño experimental del estudio.**

**Figura 14.- Poblaciones de *Gelidium canariense* analizadas en Bocabarranco (Gáldar).**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**Figura 15. Poblaciones y parcelas en la localidad de Bocabarranco (Gáldar) en marea baja. A) Población 1 y parcelas estudiadas (P1 y P2). B) Parcela 1 de la población 2. C) Parcela 2 de la población 2.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

La parte de las poblaciones de *Gelidium canariense* donde se realizó el muestreo presentan una estructura espacial en mosaico y los Cuadrados, de dimensiones 0.25 x 0.25 m, se colocaron al azar en los parches para analizar el mayor número de individuos posibles. Se analizaron aproximadamente 100 individuos en cada Parcela. Dado que los Cuadrados se colocaron al azar en los parches donde *G. canariense* estaba presente los valores calculados de biomasa cosechable y densidad son medidas de biomasa y abundancia para los poblaciones de *G. canariense* analizados y no para la población entera.

Para facilitar la identificación de los Cuadrados en los sucesivos años, se utilizó el método de los puntos fijos que consiste en medir la distancia desde dos extremos del Cuadrado a dos puntos fijos previamente establecidos. Además, se realizaron croquis con la situación de los Cuadrados en el área de estudio y se tomaron fotos de cada uno de ellos.

Dentro de cada Cuadrado, primero se identificaban los individuos, y posteriormente se medía su circunferencia y longitud máxima. Luego se identificaba el estado reproductivo de su ciclo vital y se realizaba un croquis en el que se indicaba la posición relativa del individuo en el Cuadrado. Los individuos se clasificaron en tres categorías según su estado reproductivo: 1.- Esporofito, 2.- Gametofito y 3: Desconocido, cuando no fue posible distinguir ninguna estructura reproductora.

La medición de la longitud se llevó a cabo mediante la utilización de una cinta métrica milimetrada, disponiendo ésta desde la parte basal hasta el ápice del eje principal. Debido a que las irregularidades del substrato pueden afectar la precisión de la medida se buscaba con cuidado el eje más largo.

A partir de los croquis de los individuos en cada Cuadrado se pudo determinar la tasa de supervivencia y el reclutamiento dado que estos fueron analizados nuevamente en los años posteriores.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El peso seco (DW) de los individuos se obtuvo introduciendo los valores de L y C máximos medidos cada año, en la fórmula de regresión que se había obtenido en el muestreo destructivo.

Para conocer la estructura demográfica de la población se realizo una clasificación de los individuos en clases de tallas. Según Harper (1977) el crecimiento de los *genets* se puede tratar como un proceso exponencial, por lo que la clasificación en tallas se hizo a partir de los datos transformados con $log_e$ lo que nos permitió elegir clases de talla de igual amplitud.

### 3.2.3. Estudio piloto de marcaje de individuos.

Este estudio se llevó a cabo paralelamente con el objetivo de facilitar la relocalización de los individuos en los sucesivos registros.

Para el marcado de los individuos se utilizaron etiquetas que consistían en tubos de goma (spaguetti tags) (3 x 0,2 cm) de diferentes colores y numerados, sujetados con hilos finos de nylon al individuo (Figura 16). Se etiquetaron 3 frondes en cada individuo, en dos cuadrados con alta densidad en cada parcela.

Para el marcado se utilizaron frondes robustos y de un porte considerable, evitando los frondes muy pequeños, debilitados o fragmentados. Las etiquetas se colocaron en la parte basal de los ejes seleccionados, ya que al ser ésta la parte más robusta, la probabilidad de permanencia de la etiqueta en el fronde era mayor (Figura XB). Además, *Gelidium canariense* posee un tipo de crecimiento apical y la colocación de la etiqueta en la zona basal de los frondes no producía ningún efecto en la elongación de los mismos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

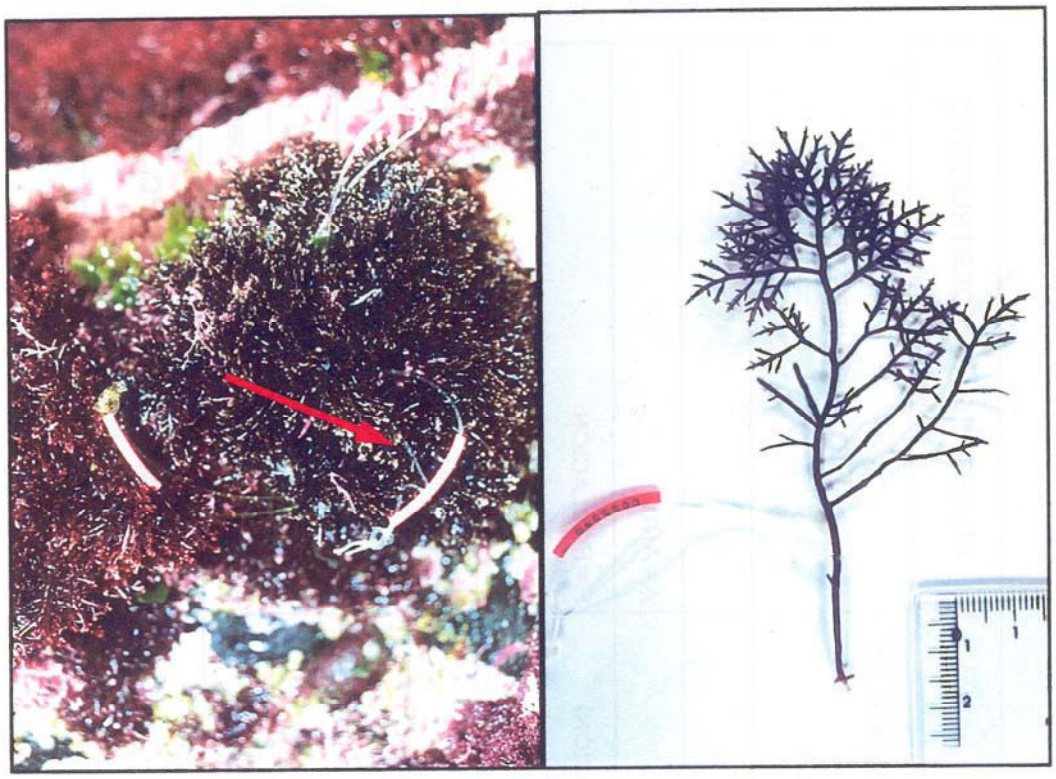


**Figura 16.- A) Individuo de *Gelidium canariense* marcado con tres etiquetas (flecha). B) Detalle de fronde con etiqueta en la parte basal.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

### 3.2.4. Análisis estadístico de datos.

En el muestreo destructivo se realizó una regresión entre el peso seco y el volumen ($LC^2$) de los individuos mediante el programa Microsoft Excel 5.0a (Microsoft Corporation, US, 1985-1994).

La variabilidad espacial y temporal se analizó mediante análisis de la varianza anidados y semi-anidados utilizando el programa SuperANOVA (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, 1989). En este análisis el factor Año se consideró fijo y las factores Población, Parcela y Cuadrado aleatorios. En el análisis de las fases del ciclo de vida, el factor Fase se considero fijo. Los factores y ecuaciones de los modelos utilizados en los ANOVAs de los distintos parámetros demográficos se detallan en la Tabla 5.

| | Muestreo destructivo | | Muestreo NO destructivo |
|---|---|---|---|
| | Biomasa individual | Biomasa cosechable y Densidad | Biomasa individual |
| | | | |
| 1.- F | S=Población | S=Población | A=Año |
| 2.- R | P=Parcela (Población) | P=Parcela (Población) | S=Población |
| 3.- R | C=Cuadrado (Parcela, Población) | | P=Parcela (Población) |
| 4.- R | | | C=Cuadrado (Parcela, Población) |
| 5.- R | | | A*S=Año* Población |
| 6.- R | | | A*P=Año* Parcela (Población) |
| 7.- R | | | A*C=Año*Cuadrado(Parcela,Poblaci |
| Ecuación del modelo | $X_{ijkm} = \mu + S_i + P_{j(i)} + C_{m(j,i)} + e_{ijkm}$ | $X_{ijkm} = \mu + S_i + P_{j(i)} + e_{ijkm}$ | $X_{ijklm} = \mu + S_i + P_{j(i)} + A*S_{il} + A*P_{ij(l)} + A*C_{lm(j,i)} + e_{ijklm}$ |

**Tabla 5.- Ecuaciones de los modelos de los diferentes ANOVAs. F: Factor fijo, R: Factor aleatorio, e: varianza residual.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | MUESTREO NO DESTRUCTIVO | | |
|---|---|---|---|
| | BIOMASA COSECHABLE Y DENSIDAD | CICLO DE VIDA | SUPERVIVENCIA Y RECLUTAMIENTO |
| 1.- F | A=AÑO | E=ESTADÍO | |
| 2.- R | S=POBLACIÓN | S=POBLACIÓN | S=POBLACIÓN |
| 3.- R | P=PARCELA (POBLACIÓN) | P=PARCELA (POBLACIÓN) | P=PARCELA (POBLACIÓN) |
| 4.- R | A*S=AÑO* POBLACIÓN | E*S=ESTADÍO* POBLACIÓN | |
| 5.- R | A*P=AÑO* PARCELA (POBLACIÓN) | E*P=ESTADÍO* PARCELA (POBLACIÓN) | |
| ECUACIÓN DEL MODELO | $X_{ijkl} = \mu + S_i + P_{j(i)} + A*S_{il} + A*P_{ij(i)} + e_{ijkl}$ | $X_{ijkl} = \mu + S_i + P_{j(i)} + E*S_{il} + E*P_{ij(i)} + e_{ijkl}$ | $X_{ijk} = \mu + S_i + P_{j(i)} + e_{ijk}$ |

**Tabla 5 continuación. Ecuaciones de los modelos de los diferentes ANOVAs F: Factor fijo, R: Factor aleatorio, e: varianza residual.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Donde:

$\mu$ : Media general

$S_i$ : Variabilidad poblacional

$P_{j(i)}$: Variabilidad entre las Parcelas *j* de la Población

Cm(j,i):Variabilidad del peso seco entre los Cuadrados m de la Parcela j dentro de la Población i

$e_{ijkm}$, $e_{ijkl}$, $e_{ijk}$: Variabilidad entre los individuos

$A*S_{li}$: Interacción del Factor Año y Población

$A*P_{lj(i)}$ :Interacción del Factor Año y Parcela dentro de cada Población

$E*S_{li}$: Interacción del Factor Estadio y Población

$E*P_{lj(i)}$: Interacción del Factor Estadio y Parcela dentro de cada Población

En el análisis de la varianza es necesario tener muestras simétricas, por lo que se hizo necesario considerar subgrupos del conjunto total de datos elegidos al azar, para ello se utilizaron tablas aleatorias.

En el ANOVA de biomasa individual dentro de cada Cuadrado se eligieron 3 individuos y dentro de cada Parcela se eligieron 5 Cuadrados.

Para el ANOVA de biomasa cosechable y densidad se eligieron 5 Cuadrados en cada Parcela y por último, en el análisis de la proporción de los estadíos se consideraron 8 Cuadrados en cada Parcela.

Si no existe variación entre las unidades de muestreo a pesar de la posibilidad inicial, estos términos se pueden agrupar de tal manera que se aumenta la potencia del test estadístico (Underwood 1997). A este agrupamiento se le denomina de agrupamiento de componentes *post hoc* (*Post hoc pooling*). Se realizaron agrupamientos *post hoc* en todos los ANOVAs del muestreo no destructivo.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Para comprobar la homogeneidad de varianzas se utilizó el test de Cochran (Winer *et al.*, 1991) y cuando estas eran heterogéneas se transformaron con $log_e$ (biomasa cosechable) o con $log_e$ (x+1) en el caso de proporción de gametofitos.

El intervalo de las clases de talla se calculó con la siguiente fórmula:

$$L = \frac{DW\max - DW\min}{5}$$

donde:

L: Intervalo, $DW\max$: Peso seco máximo y $DW\min$: Peso seco mínimo.

Los valores medios citados en el texto se obtuvieron después de realizar las transformaciones inversas respectivas. En todos los análisis el nivel de significación considerado fue de 0.05.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# IV. RESULTADOS

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

## 4.1. ANALISIS GENETICO.

### 4.1.1. Muestreo general.

Un total de 949 individuos que constituyen una colección de material seco. En las primeras recolecciones realizadas el número de individuos identificados como gametofitos femeninos fue considerablemente bajo (<10) por lo que fue necesario establecer un segundo muestreo dirigido, con el fin de muestrear alrededor de 30 individuos para cada una de las poblaciones. La imposibilidad de encontrar individuos gametofitos femeninos hizo que el análisis se limitara a nueve poblaciones. El número de individuos desconocidos fue considerablemente alto en todas las poblaciones (Tabla 6, Figura 17).

Los individuos de las distintas categorías (gametofitos femeninos y tetraesporofitos) que fueron muestreados en las distintas jerarquías y en muestreos consecutivos se detallan en la Tabla 6.

### 4.1.2. Extracción y purificación del ADN.

La extracción de ADN en *Gelidium canariense* y *G. arbuscula* se llevó a cabo mediante el método de extracción rápida de ADN (Cenis 1992; Alberto *et al.* 1997) con modificaciones.

De las diferentes modificaciones ensayadas se seleccionó la incubación de las muestras en un baño termostático a 65 ºC durante 20 minutos porque de esta manera se activaban las ARNasas celulares y se favorecía la degradación del ARN celular como se puede observar en la Figura 18. Esta modificación se traducía en una considerable reducción de tiempo y costes económicos en la fase de purificación de ADN genómico posterior.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| Isla | Localidad | Población | Parcela | Código | S | G | D | S+G+D | N |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **GRAN CANARIA** | **Bocabarranco*** | 1 | 1 | BBS1 | 27 | 38 | 11 | 76 | 31 |
| | | | 2 | BBS1P2 | 29 | 7 | 7 | 43 | - |
| | | 2 | 1 | BBS2 | 30 | 38 | 10 | 78 | 32 |
| | | | 2 | BBS2P2 | 27 | 8 | 10 | 45 | - |
| | **Agaete** | 1 | 1 | AP1 | 7 | 2 | 11 | 20 | - |
| | | | 2 | AP2 | 19 | 1 | 33 | 23 | - |
| | | | 3 | AP3 | 24 | 32 | 11 | 67 | 29 |
| | **Sardina** | 1 | 1 | SP1 | 18 | 0 | 14 | 32 | - |
| *Subtotal Gran Canaria* | | | | | *181* | *126* | *77* | *384* | *92* |
| **TENERIFE** | **Puerto de la Cruz** | **1** | **1** | **PCP1** | **22** | **6** | **16** | **44** | **-** |
| | | | 2 | PCP2 | 10 | 2 | 14 | 26 | - |
| | | | 3 | PCP3 | 17 | 30 | 10 | 57 | 27 |
| | **Punta Brava** | 1 | 1 | PPB1 | 26 | 32 | 23 | 81 | 31 |
| | | | 2 | PPB2 | 14 | 6 | 19 | 39 | - |
| | **Garachico** | 1 | 1 | GAS1P1 | 12 | 2 | 8 | 22 | - |
| | | | 2 | GAS1P2 | 16 | 3 | 7 | 26 | - |
| | | 2 | 1 | GAS2P1 | 15 | 34 | 7 | 56 | 29 |
| | | | 2 | GAS2P1 | 10 | 4 | 5 | 19 | - |
| *Subtotal Tenerife* | | | | | *142* | *119* | *109* | *370* | *87* |
| **LA PALMA** | **Talavera** | **1** | **1** | **TLVP1** | **15** | **34** | **30** | **80** | **31** |
| | **Faro** | 1 | 1 | FP1 | 10 | 35 | 32 | 76 | 30 |
| *Subtotal La Palma* | | | | | *25* | *69* | *62* | *156* | *61* |
| **LA GOMERA** | **Hermigua** | **1** | **1** | **HP1** | **0** | **12** | **27** | **39** | **12** |
| *Subtotal La Gomera* | | | | | *0* | *12* | *27* | *39* | *12* |
| **TOTAL** | | | | | **348** | **300** | **275** | **949** | **252** |

**Tabla 6.- Poblaciones e individuos muestreados en las distintas jerarquías consideradas para el análisis genético. *: Población estudiada en el análisis demográfico. S: Individuos esporofitos (diploide). G: Individuos gametofitos femeninos (haploide). D: Individuos desconocidos. S+G+D: Número total de individuos recolectados. N: Número de individuos estudiados en el análisis de la fase haploide.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

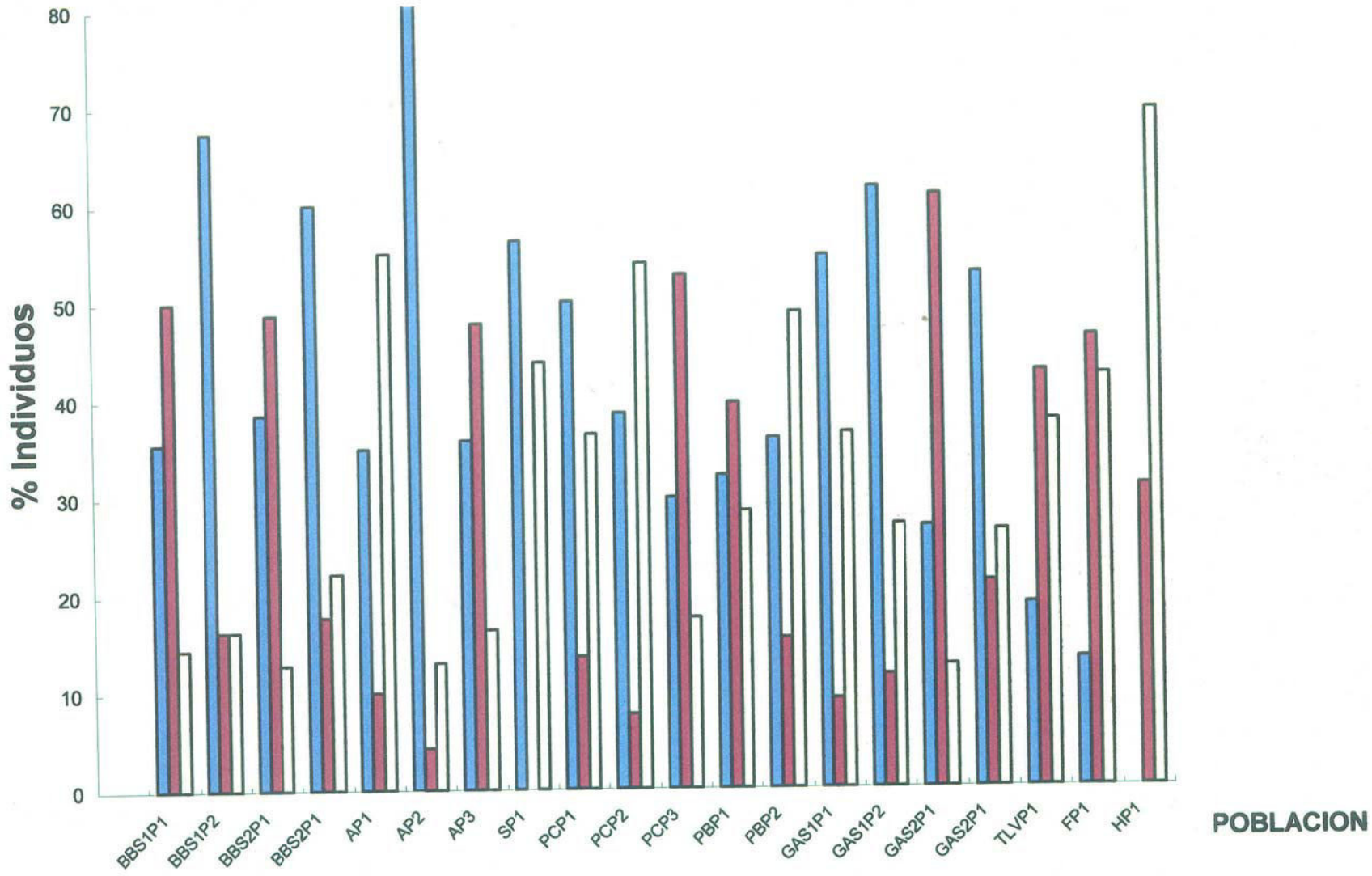



**Figura 17.- Proporción de individuos observados según el estado reproductor para el análisis genético por población.**

**: Esporofito, : Gametofito femenino, : Desconocido.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

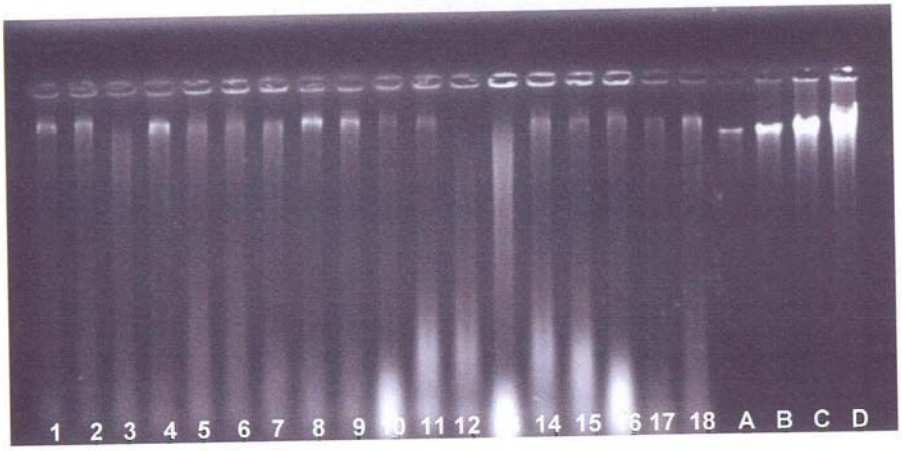



**Figura 18.- Cuantificación de ADN genómico de *G. canariense* de la población de Bocabarranco. 1-9:Muestras calentadas a 60 ºC durante 20 min. 10-18: Muestras sin calentar. A,B,C,D: Patrones de 0,01, 0,05, 0,1 y 0,25 µg/µl de ADN respectivamente.**

El rendimiento de ADN obtenido mediante éste método estuvo comprendido entre 0,5 y 12,5 µg a partir de 120 mg de material seco, es decir entre 0,0004 y 0,10 µg/mg.

De los diferentes tratamientos de purificación ensayados se seleccionó el sistema de *clean up* de ADN de Wizard (Promega) dado que este fue el único sistema que originaba ADN de suficiente calidad para su posterior amplificación.

De las dos especies estudiadas, el ADN de *G. arbuscula* amplificaba sin ser necesario llevar a cabo la purificación, sin embargo, se optó por purificarlo para obtener ADN de mayor calidad y mejorar la eficiencia de la amplificación.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.1.3. Amplificación del ADN.

De las diferentes variables ensayadas para la fase de amplificación ([$Cl_2Mg$ ], [ADN], nº de ciclos y Tª) se obtuvieron los mejores resultados aplicando las siguientes condiciones: 1,5 mM de $Cl_2Mg$, 25 ng de ADN molde, 35 ciclos y una temperatura de desnaturalización de 94 ºC debido a que la combinación de los diferentes parámetros seleccionados originaba patrones de amplificación con mayor resolución.

### 4.1.4. Reproducibilidad de patrones de ADN.

A continuación se exponen los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados para analizar la reproducibilidad de los patrones de amplificación del ADN. Las condiciones entre los diferentes ensayos se fueron homogeneizando progresivamente lo que favoreció la reproducibilidad de los patrones de ADN.

Para los marcadores RAPD interpretados en las dos réplicas se determinó el porcentaje de reproducibilidad de los diferentes tipos o categorías de bandas consideradas en función de la intensidad de la banda. Las categorías consideradas fueron: débil, media y fuerte.

*Reproducibilidad entre distintas amplificaciones*

Las reacciones de amplificación para cada uno de los cuatro cebadores se realizaron en diferentes días y por consiguiente los cócteles de amplificación fueron independientes unos de otros. Además, los productos de amplificación se separaron en electroforesis distintas. Se determinó el porcentaje de reproducibilidad de las diferentes categorías de bandas consideradas en función de la intensidad de la banda.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

La Tabla 7 muestra la distribución y reproducibilidad de los marcadores clasificados en función de su intensidad. Se encontraron diferencias en el número de marcadores RAPDs aparecidos entre la primera y la segunda réplica realizadas con siete cebadores en 11 *bulks* poblacionales. En la primera se observaron 33 bandas mientras que en la segunda se observaron 17.

| | | Nº bandas sólo en 1 | Nº bandas sólo en 2 | Nº bandas comunes a 1 y 2 | TOTAL | % R |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Entre Réplicas | BF | 2 | 0 | 11 | 13 | 85 |
| | MF | 3 | 0 | 3 | 6 | 50 |
| | DF | 11 | 0 | 3 | 14 | 21 |
| | TOTAL | 16 | 0 | 17 | 33 | 52 |
| Entre Electroforesis | | Nº bandas sólo en 1 | Nº bandas sólo 2 | Nº bandas comunes a 1 y 2 | TOTAL | % R |
| | BF | 2 | 0 | 17 | 19 | 89 |
| | MF | 3 | 0 | 1 | 4 | 25 |
| | DF | 19 | 0 | 16 | 35 | 46 |
| | TOTAL | 24 | 0 | 34 | 58 | 59 |
| Entre PCR | | Nº bandas sólo en 1 | Nº bandas sólo en 2 | Nº bandas comunes a 1 y 2 | TOTAL | % R |
| | BF | 0 | 0 | 17 | 17 | 100 |
| | MF | 1 | 0 | 12 | 13 | 93 |
| | DF | 3 | 0 | 23 | 26 | 89 |
| | TOTAL | 4 | 0 | 52 | 56 | 93 |

**Tabla 7.- Distribución y reproducibilidad de los marcadores RAPD clasificados según intensidad de la banda en los distintos estudios de reproducibilidad. BF: Marcadores de intensidad fuerte, MF: Marcadores de intensidad media, DF: Marcadores de intensidad débil, %R: Porcentaje de reproducibilidad.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Un total de 17 marcadores aparecieron en ambas réplicas, de los que 16 fueron exclusivos de la primera replica mientras que en la segunda réplica no apareció ningún fragmento nuevo.

La mayor diferencia en el número de bandas exclusivas entre las dos réplicas fue debido al número de bandas débiles interpretadas en la réplica 1. El número de bandas de la categoría media fue de 3 y en la categoría de bandas fuerte fue 2.

La reproducibilidad total fue de 52% lo que indica que el 52% de las bandas interpretadas en la primera réplica también fueron interpretadas en la segunda réplica. La reproducibilidad observada en las diferentes categorías fue de 85, 50 y 21% para los marcadores fuertes, medio y débiles respectivamente.

*Reproducibilidad entre electroforesis*

Las reacciones de amplificación para los 14 cebadores analizados se realizaron en el mismo tubo de microcentrífuga para cada cebador de esta manera se eliminaban las diferencias entre las diferentes amplificaciones debido al *pipeteo* o a la mezcla de los diferentes componentes del cóctel de amplificación. Los productos de amplificación de cada cebador se obtuvieron en la misma amplificación pero fueron separados en electroforesis de gel de agarosa diferentes.

La tabla 7 muestra la distribución y reproducibilidad de los marcadores RAPDs clasificados en función de la intensidad de las bandas. Se observó variación del número de marcadores RAPDs interpretados en las dos réplicas de electroforesis realizadas con 14 cebadores, en la primera electroforesis se interpretaron 58 marcadores y en la segunda electroforesis 34 marcadores.

Se consideró un total de 58 marcadores, de los cuales 24 fueron exclusivos de la primera electroforesis mientras que en la segunda electroforesis no aparecieron ningún fragmento nuevo y 34 bandas estuvieron presentes en ambas electroforesis.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

La mayor diferencia entre el número de bandas exclusivas de la electroforesis 1 y la electroforesis 2 fue debido al mayor número de bandas de intensidad débil (19) interpretadas en la electroforesis 1. Para el resto de categorías, el número de bandas de la categoría media fue de 3 y el número de bandas de la categoría fuerte fue de 2.

La reproducibilidad encontrada para las distintas categorías fue de 89, 25 y 46% para los marcadores fuertes, medio y débiles respectivamente. La reproducibilidad total fue de 59% lo que indica que el 59 de las bandas interpretadas en la primera electroforesis fueron también interpretadas en la segunda electroforesis.

*Reproducibilidad entre reacciones de amplificación dentro de una misma PCR.*

Los cócteles de amplificación para cada uno de los 12 cebadores incluyendo *Taq* polimerasa, tampón, dNTPs, $Cl_2Mg$ y cebador se obtuvieron de las mismas soluciones stock y se realizaron en el mismo tubo de microcentrifuga de tal manera que no existen diferencias entre las réplicaciones debido al pipeteo o mezcla de los diferentes componentes del cóctel de amplificación. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo el mismo día, una al lado de otra en la misma placa de amplificación, para descartar las diferencias de temperatura ambiente entre las reacciones. Los productos de amplificación fueron separados en el mismo gel de agarosa colocando las réplicas de cada *bulk* poblacional para los diferentes cebadores una al lado de otra.

La variación en cuanto al número de bandas de RAPDs interpretadas en las dos amplificaciones realizadas con 26 cebadores fue muy bajo (Tabla 7) siendo la diferencia tan sólo de 4 marcadores.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Un total de 56 marcadores fueron considerados, de los cuáles 4 fragmentos aparecieron sólo en la amplificación 1, en la segunda amplificación no apareció ninguno nuevo y 52 bandas fueron comunes a ambas amplificaciones. De los 4 marcadores que no fueron comunes a ambas réplicas, 3 fueron bandas débiles y una banda fuerte, por tanto la diferencia entre el número de bandas interpretadas sólo en la amplificación 1 y el número de bandas interpretadas sólo en al amplificación 2 fue debido al mayor número de bandas interpretadas de la categoría débil en la amplificación 1.

La reproducibilidad fue de 100, 92,3 y 88,5 % para las bandas fuertes, media y débiles respectivamente. La reproducibilidad total fue de 93% lo que indica que cerca del 93% de las bandas interpretadas en una amplificación también fueron interpretadas en la segunda amplificación.

*Reproducibilidad entre diferentes extracciones de ADN.*

Individuos extraídos en diferentes extracciones que fueron amplificados y separados en idénticas condiciones de amplificación y electroforesis dieron lugar a patrones de ADN idénticos. Los cócteles de amplificación para cada una de las extracciones incluyendo *Taq* polimerasa, tampón, dNTPs, $Cl_2Mg$ y cebador se obtuvieron de las mismas soluciones stock y se realizaron en el mismo tubo de microcentrifuga de tal manera que no existen diferencias entre las réplicas debido al pipeteo o mezcla de los diferentes componentes del cóctel de amplificación. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo una al lado de otra en la misma placa de amplificación. Los productos de amplificación fueron separados en el mismo gel de agarosa colocando las réplicas de cada extracción para los tres cebadores una al lado de otra.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.1.5. Análisis de *bulks* poblacionales.

#### 4.1.5.1. Niveles de diversidad genética.

De los 80 cebadores decámeros (Kit M, N, K, L. Operon Technologies Inc.) utilizados en el test inicial, 43 de ellos originaron productos de amplificación con buena resolución y nitidez (Tabla 8).

Sin embargo y para el caso de los *bulks* poblacionales, de estos 43 cebadores seleccionados inicialmente, aproximadamente la mitad (21) amplificaron en todas las poblaciones de *G. canariense* y *G. arbuscula*. Además dos cebadores (OPM 4 y OPK 6) amplificaron sólo en las poblaciones de *G. canariense* y 3 cebadores (OPM 11, OPK 12 y OPK 19) amplificaron exclusivamente en las poblaciones de *G. arbuscula* (Tabla 10).

En el análisis individual, se analizaron 23 y 24 cebadores para *G. canariense* y *G. arbuscula* respectivamente, obteniéndose un polimorfismo de 60 % en *G. canariense* y 31 % para *G. arbuscula* (Tabla 9). Las diferencias en el polimorfismo son debidas posiblemente a que se analizó un menor número de poblaciones en *G. arbuscula*.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | | | ESPECIE | |
|---|---|---|---|---|
| | CEBADOR | SECUENCIA 5'-3' | *G. canariense* | *G. arbuscula* |
| KIT M | OPM 1 | GTTGGTGGCT | + | + |
| | OPM 2 | ACAACGCCTC | + | + |
| | OPM 3 | GGGGGATGAG | + | + |
| | OPM 4 | GGCGGTTGTC | + | + |
| | OPM 5 | GGGAACGTGT | + | + |
| | OPM 6 | CTGGGCAACT | + | + |
| | OPM 7 | CCGTGACTCA | + | + |
| | OPM 8 | TCTGTTCCCC | | |
| | OPM 9 | GTCTTGCGGA | + | + |
| | OPM 10 | TCTGGCGCAC | | |
| | OPM 11 | GTCCACTGTG | + | + |
| | OPM 12 | GGGACGTTGG | + | + |
| | OPM 13 | GGTGGTCAAG | + | + |
| | OPM 14 | AGGGTCGTTC | + | + |
| | OPM 15 | GACCTACCAC | + | + |
| | OPM 16 | TCAGTCCGGG | + | + |
| | OPM 17 | CACCATCCGT | + | + |
| | OPM 18 | CCTTCAGGCA | + | + |
| | OPM 19 | CCTTCAGGCA | | |
| | OPM 20 | AGGTCTTGGG | + | + |
| KIT K | OPK 1 | CATTCGAGCC | + | + |
| | OPK 2 | GTCTCCGCAA | | |
| | OPK 3 | CCAGCTTAGG | | |
| | OPK 4 | CCGCCCAAAC | + | + |
| | OPK 5 | TCTGTCGAGG | | |
| | OPK 6 | CACCTTTCCC | + | + |
| | OPK 7 | AGCGAGCAAG | + | + |
| | OPK 8 | GAACACTGGG | + | + |
| | OPK 9 | CCCTACCGAC | | |
| | OPK 10 | GTGCAACGTG | + | + |
| | OPK 11 | AATGCCCCAG | | |
| | OPK 12 | TGGCCCTCAC | + | + |
| | OPK 13 | GGTTGTACCC | | |
| | OPK 14 | CCCGCTACAC | | |
| | OPK 15 | CTCCTGCCAA | | |
| | OPK 16 | GAGCGTCGAA | + | + |
| | OPK 17 | CCCAGCTGTG | + | + |
| | OPK 18 | CCTAGTCGAG | | |
| | OPK 19 | CACAGGCGGA | + | + |
| | OPK 20 | GTGTCGCGAG | + | + |

**Tabla 8.- Cebadores y sus secuencias utilizadas en el test inicial. +: Amplificación positiva.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | | | ESPECIE | |
|---|---|---|---|---|
| | PRIMER | SECUENCIA 5'-3' | *Gelidium canariense* | *Gelidium arbuscula* |
| KIT L | OPL 1 | GGCATGACCT | | |
| | OPL 2 | TGGGCGTCAA | | |
| | OPL 3 | CCAGCAGCTT | | |
| | OPL 4 | GACTGCACAC | | |
| | OPL 5 | ACGCAGGCAC | | |
| | OPL 6 | GAGGGAAGAG | | |
| | OPL 7 | AGGCGGGAAC | + | + |
| | OPL 8 | AGCAGGTGGA | | |
| | OPL 9 | TGCGAGAGTC | | |
| | OPL 10 | TGGGAGATGG | | |
| | OPL 11 | ACGATGAGCC | | |
| | OPL 12 | GGGCGGTACT | + | + |
| | OPL 13 | ACCGCCTGCT | | |
| | OPL 14 | GTGACAGGCT | + | + |
| | OPL 15 | AAGAGAGGGG | | |
| | OPL 16 | AGGTTGCAGG | + | + |
| | OPL 17 | AGCCTGAGCC | + | + |
| | OPL 18 | ACCACCCACC | | |
| | OPL 19 | GAGTGGTGAC | | |
| | OPL 20 | TGGTGGACCA | | |
| KIT N | OPN 1 | CTCACGTTGG | + | + |
| | OPN 2 | ACCAGGGGCA | + | + |
| | OPN 3 | GGTACTCCCC | + | + |
| | OPN 4 | GACCGACCCA | + | + |
| | OPN 5 | ACTGAACGCC | | |
| | OPN 6 | GAGACGCACA | | |
| | OPN 7 | CAGCCCAGAG | | |
| | OPN 8 | ACCTCAGCTC | + | + |
| | OPN 9 | TGCCGGCTTG | + | + |
| | OPN 10 | ACAACTGGGG | + | + |
| | OPN 11 | TCGCCGCAAA | + | + |
| | OPN 12 | CACAGACACC | + | + |
| | OPN 13 | AGCGTCACTC | + | + |
| | OPN 14 | TCGTGCGGGT | | |
| | OPN 15 | CAGCGACTGT | | |
| | OPN 16 | AAGCGACCTG | | |
| | OPN 17 | CATTGGGGAG | | |
| | OPN 18 | GGTGAGGTCA | | |
| | OPN 19 | GTCCGTACTG | | |
| | OPN 20 | GGTGCTCCGT | | |

**Tabla 8 Continuación.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| ESPECIE | Nº CEBADORES | NF | PF | %P |
|---|---|---|---|---|
| 1.- *G. canariense* | 23 | 147 | 84 | 57 |
| 2.- *G. arbuscula* | 24 | 115 | 36 | 31 |

**Tabla 9.- Número de cebadores, número de fragmentos producidos (NF), número de fragmentos polimórficos (PF) y porcentaje de polimorfismo (%P) obtenidos en cada especie.**

En *G. canariense*, el número de bandas producido por cebador varió entre 1 para el cebador OPK 6 y 12 para los cebadores OPM 20 y OPK 4, siendo el número medio de bandas por cebador de 6,4 (Tabla 10). En *G. arbuscula,* el número de bandas producido por cebador también varió entre 1 para los cebadores OPM 11, OPK 12 y 12 para los cebadores OPM 14 y OPK 4 siendo el número medio de bandas por marcador de 4,8.

En *G. canariense,* el porcentaje de polimorfismo por cebador estuvo comprendido entre el 0 % para el cebador OPK 6 y el 86 % para los cebadores OPM 3 y OPN 9, mientras que en *G. arbuscula* varió entre el 0 % para OPM 2, OPM 3, OPM 7, OPM 11, OPM 12, OPK 8, OPK 12, OPK 19, OPL 7, OPN 2 y OPN 4 y 75 % para OPM 14 (Tabla 10).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | | | *G. canariense* | | | *G. arbuscula* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Cebador** | **Secuencia** | **Tamaño (pb)** | **NF** | **PF** | **%P** | **NF** | **PF** | **%P** |
| **OPM 2** | ACAACGCCTC | 600-1600 | 6 | 2 | 33 | 2 | 0 | 0 |
| **OPM 3** | GGGGGATGAG | 400-2000 | 7 | 6 | 86 | 2 | 0 | 0 |
| **OPM 4** | GGCGGTTGTC | 400-1900 | 4 | 3 | 75 | - | - | - |
| **OPM 7** | CCGTGACTCA | 500-800 | 2 | 1 | 50 | 2 | 0 | 0 |
| **OPM 11** | GTCCACTGTG | 1100 | - | - | - | 1 | 0 | 0 |
| **OPM 12** | TCAGTCCGGG | 300-1800 | 7 | 3 | 43 | 3 | 0 | 0 |
| **OPM 14** | AGGGTCGTTC | 300-2000 | 11 | 8 | 73 | 12 | 9 | 75 |
| **OPM 15** | GACCTACCAC | 500-2000 | 8 | 5 | 63 | 7 | 4 | 57 |
| **OPM 18** | CACCATCCGT | 450-2000 | 4 | 2 | 50 | 6 | 3 | 50 |
| **OPM 20** | AGGTCTTGGG | 400-2000 | 12 | 8 | 66 | 9 | 1 | 11 |
| **OPK 4** | CCGCCCAAAC | 400-2000 | 12 | 9 | 75 | 12 | 3 | 25 |
| **OPK 6** | CACCTTTCCC | 1100 | 1 | 0 | 0 | - | - | - |
| **OPK 7** | AGCGAGCAAG | 400-2000 | 10 | 5 | 50 | 8 | 2 | 25 |
| **OPK 8** | GAACACTGGG | 750-1100 | 3 | 1 | 33 | 2 | 0 | 0 |
| **OPK 10** | GTGCAACGTG | 550-2200 | 5 | 2 | 40 | 5 | 2 | 40 |
| **OPK 12** | TGGCCCTCAC | 1400 | - | - | - | 1 | 0 | 0 |
| **OPK 16** | GAGCGTCGAA | 600-1600 | 7 | 4 | 57 | 5 | 1 | 20 |
| **OPK 19** | CACAGGCGGA | 400-1800 | - | - | - | 5 | 0 | 0 |
| **OPL 7** | AGGCGGGAAC | 500-2000 | 5 | 2 | 40 | 3 | 0 | 0 |
| **OPL14** | GTGACAGGCT | 700-1100 | 3 | 1 | 33 | 3 | 1 | 33 |
| **OPL16** | AGGTTGCAGG | 450-2100 | 8 | 4 | 50 | 7 | 5 | 71 |
| **OPN 2** | ACCAGGGGCA | 600-1600 | 6 | 2 | 33 | 4 | 0 | 0 |
| **OPN 4** | GACCGACCCA | 300-1800 | 6 | 4 | 67 | 4 | 0 | 0 |
| **OPN 8** | ACCTCAGCTC | 500-1000 | 3 | 2 | 67 | 2 | 1 | 50 |
| **OPN 9** | TGCCGGCTTG | 300-900 | 7 | 6 | 86 | 6 | 3 | 50 |
| **OPN 13** | AGCGTCACTC | 800-1500 | 10 | 8 | 80 | 4 | 1 | 25 |
| **Total** | | | **147** | **88** | **60** | **115** | **36** | **31** |
| **Media** | | | **6.4** | **3.8** | | **4.8** | **1.5** | |

**Tabla 10. Cebadores empleados, secuencias de los cebadores, peso molecular, número de fragmentos obtenidos (NF) y número de fragmentos polimórficos (PF) en el análisis de *bulks* en *G. canariense* y *G. arbuscula*.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Para *G. canariense*, se identificaron marcadores específicos de una población (Tabla 11, Figura 19). Se encontraron 18, 8 y 7 marcadores específicos para las poblaciones de Puerto de la Cruz, Agaete y Bocabarranco respectivamente. El número de marcadores específicos fue el doble en la población de Puerto de la Cruz de Tenerife, respecto a las poblaciones de Agaete (8) y Bocabarranco (7).

| Puerto de la Cruz | | Agaete | | Bocabarranco | |
|---|---|---|---|---|---|
| Cebador | Tamaño | Cebador | Tamaño | Cebador | Tamaño |
| OPM 3 | 900 | OPM 3 | 1300 | OPM 2 | 550 |
| OPM 12 | 450 | OPM 20 | 2000 | OPM 4 | 500 |
| | 300 | | 500 | | 1700 |
| OPM 14 | 1100 | OPN 9 | 850 | OPK 10 | 2100 |
| | 1200 | | 550 | OPN 4 | 700 |
| OPM 18 | 600 | | 400 | OPN 13 | 850 |
| OPM 20 | 650 | OPN 13 | 1000 | | 1300 |
| OPK 4 | 1600 | | 900 | | |
| | 1100 | | | | |
| | 800 | | | | |
| | 450 | | | | |
| OPK 7 | 1100 | | | | |
| | 1000 | | | | |
| OPK 16 | 1300 | | | | |
| | 900 | | | | |
| OPL 16 | 450 | | | | |
| OPN 4 | 300 | | | | |
| OPN 9 | 500 | | | | |

**Tabla 11.- Lista de marcadores RAPD específicos en las poblaciones de *G. canariense*. Para cada marcador se indica el cebador que lo genera y el peso molecular (pb) de la banda.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

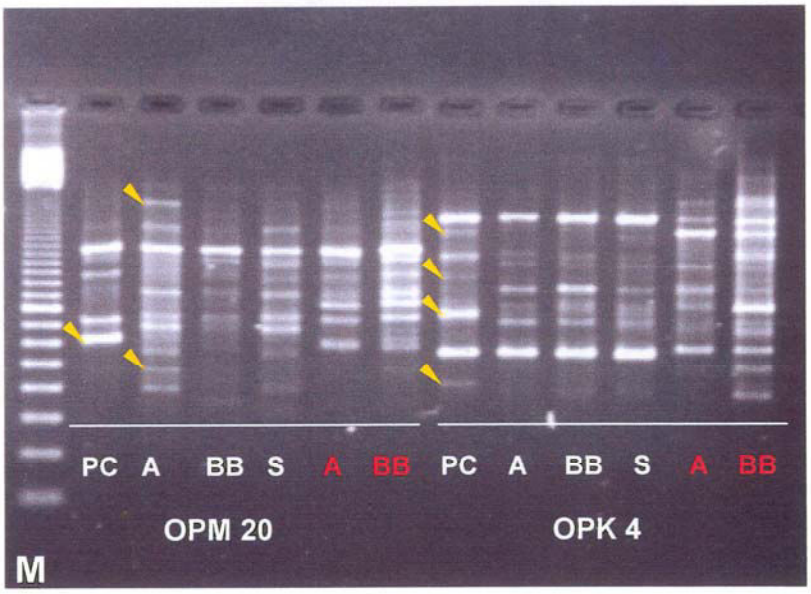



**Figura 19.- Amplificación RAPD de *bulks* de ADN de poblaciones de *G. canariense* (negro) y *G. arbuscula* (rojo) con el cebador OPM 20 y OPK 4. BB: Bocabarranco, A: Agaete, S: Sardina. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (100 pb Ladder, Pharmacia). ◤ : Marcadores específicos de población.**

### 4.1.5.2. Estructuración genética de las poblaciones.

La tabla 12 muestra los valores de similitud obtenidos con el coeficiente de Dice y el coeficiente SM. En todos los casos los valores más altos se obtuvieron con el coeficiente de Dice que sólo considera la presencia de bandas, al contrario que el coeficiente SM que considera tanto la presencia como la ausencia bandas como evidencia de semejanza entre poblaciones.

Considerando el coeficiente de Dice, los valores de similitud más bajos se obtuvieron al comparar las poblaciones de ambas especies alcanzando un valor medio de 0,512. Las similitudes alcanzadas entre las poblaciones de *G. canariense* variaron entre 0,660 y 0,868, siendo siempre la población del Puerto de la Cruz (PC) la que menor similitud presentó.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En *G. canariense*, dentro de Gran Canaria el valor más alto de similaridad genética (0,868) corresponde a las poblaciones de Bocabarranco (BB) y Sardina (S), mientras que el valor de similaridad genética más bajo (0,825) corresponde a las poblaciones de Agaete (A) y Bocabarranco (BB), las cuáles están más alejadas geográficamente. Sin embargo, el valor de similaridad genética (0,834) entre Agaete (A) y Sardina (S) no es tan alto como cabría esperar (Tabla 12).

Para *G. canariense* se obtuvo un porcentaje medio de similitud (Coeficiente Dice) de 84,2 % entre las poblaciones de la isla de Gran Canaria (Tabla 12) mientras que el porcentaje medio de similaridad entre las islas fue de 69,4 %.

| | PC | A | BB | S | A | BB |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PC | | **0.636** | **0.679** | **0.695** | 0.508 | 0.487 |
| A | **0.660** | | **0.807** | **0.823** | 0.487 | 0.444 |
| BB | **0.709** | **0.825** | | **0.856** | 0.508 | 0.508 |
| S | **0.714** | **0.834** | **0.868** | | 0.471 | 0.460 |
| A | 0.516 | 0.495 | 0.531 | 0.476 | | **0.807** |
| BB | 0.529 | 0.490 | 0.562 | 0.502 | 0.814 | |

**Tabla 12.- Matriz de valores de similitud entre las poblaciones analizadas de *G. canariense* y *G. arbuscula* basados en el coeficiente de Dice (debajo de la diagonal) y con el coeficiente SM (arriba de la diagonal). Negro: *G. canariense*. PC: Puerto de la Cruz, A: Agaete, BB: Bocabarranco, S: Sardina. Rojo: *G. arbuscula*. A: Agaete, BB: Bocabarranco.**

La correlación entre distancia geográfica y la distancia genética (Mantel 1967) (Figura 20) en las poblaciones de *G. canariense* se realizó a partir de las distancias genéticas como 1-S, siendo S el coeficiente de similitud de Dice. Este análisis generó un coeficiente de correlación de 0,99 con p=0,04.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

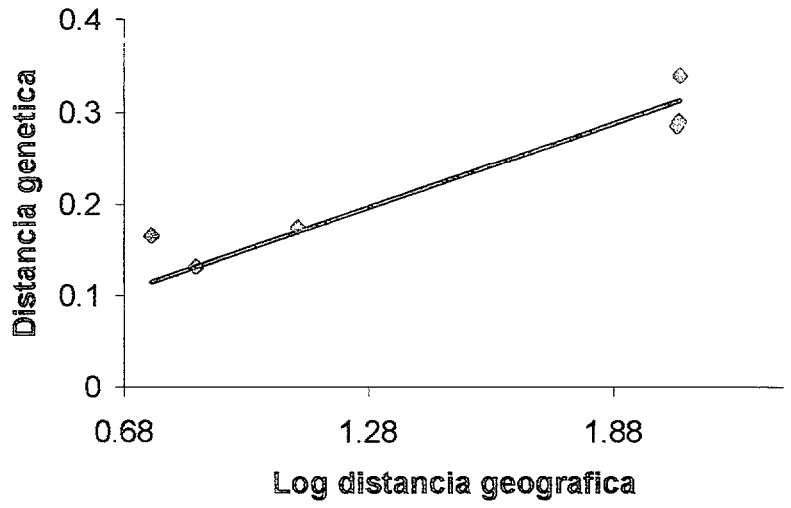


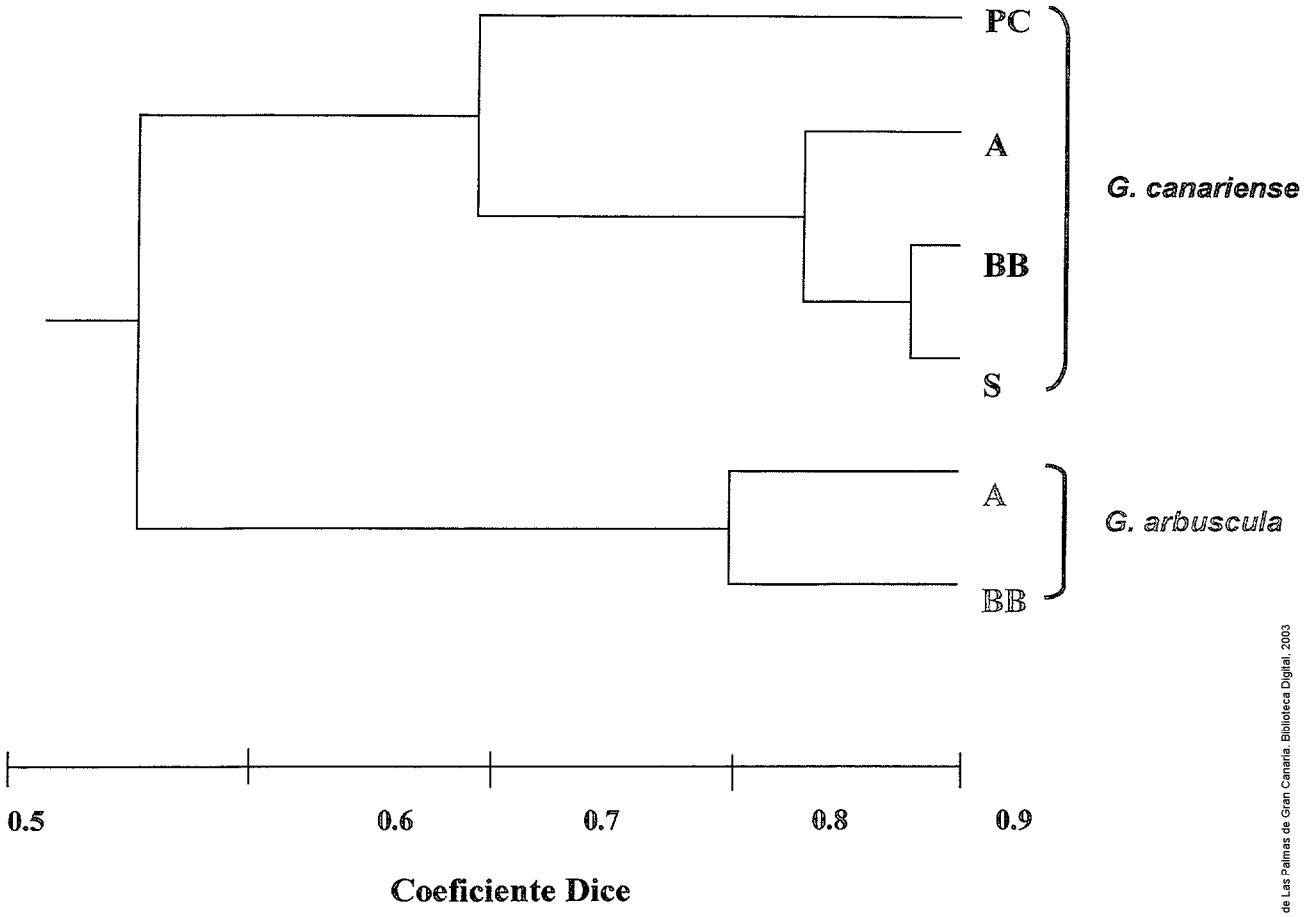

**Figura 20.- Variación de la distancia genética (D=1-S) en relación a la distancia geográfica en las poblaciones de *G. canariense*.**

A partir del coeficiente de similitudes entre poblaciones (coeficiente Dice) se realizó el árbol de similaridades por el método UPGMA (Figura 21).

Aunque se ensayaron otros coeficientes de similaridad (coeficiente SM y coeficiente Jaccard), los resultados que se obtuvieron fueron similares y se eligió el coeficiente de Dice para realizar el árbol de similitudes entre poblaciones porque este considera únicamente la presencia de bandas como evidencia de similitud.

En el árbol de similaridades (Figura 21) se observaron dos grupos correspondiendo cada uno de ellos con las poblaciones de *G. canariense* y *G. arbuscula* respectivamente. Dentro del grupo de la especie *G. canariense* destaca la población Puerto de la Cruz (PC) de la isla de Tenerife que se separa del subgrupo que engloba a las poblaciones de Gran Canaria (Agaete, Bocabarranco y Sardina).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003




© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**Figura 21.- Dendrograma UPGMA basado en el coeficiente de Dice obtenido con *bulks* poblacionales. Negro: *G. canariense*. PC: Puerto de la Cruz, A: Agaete, BB: Bocabarranco, S: Sardina. Rojo: *G. arbuscula*. A: Agaete, BB: Bocabarranco.**

### 4.1.6. Caracterización molecular de fase haploide y fase diploide.

#### 4.1.6.1. Niveles de diversidad genética.

De los diferentes cebadores ensayados en el análisis previo de *bulks* poblacionales, se seleccionaron veinte que originaban productos de amplificación con óptima resolución, nitidez y reproducibilidad y además de presentar un alto polimorfismo. De esta preselección, se excluirían del análisis final cinco cebadores (OPM 7, OPM 12, OPM 14, OPM 15, OPL 7, OPN 2) debido a la baja calidad de amplificación en la población de Talavera (TLVP1) de La Palma.

La tabla 13 muestra la lista de cebadores utilizados, las secuencias, el número de fragmentos generados por cada cebador y el número de fragmentos polimórficos obtenidos al comparar las fases haploide y diploide.

Los 15 cebadores analizados dieron lugar a 46 fragmentos en total con pesos moleculares comprendidos entre 350-2000 pb. El número medio de fragmentos por cebador fue de tres, estando comprendidos los valores entre un fragmento por cebador para OPM 18, OPK 4 y OPN 8 y siete para el cebador OPN 9.

De los 46 fragmentos, 18 (39,1 %) fueron polimórficos mientras que, siete de los 15 cebadores analizados, fueron monomórficos (OPM 7, OPM 18, OPK 4, OPK 10, OPK 16, OPL 16, OPN 8) para las dos poblaciones, encontrándose el máximo de polimorfismo (86 %) en el cebador OPN 9 (Tabla 14). Además se obtuvo un fragmento de 550 pb exclusivo para la población de Punta Brava (PB) de la isla de Tenerife con el cebador OPM 7 (Figura 22).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| CEBADOR | Secuencia cebador | Tamaño (pb) | NF | PF |
|---|---|---|---|---|
| **OPM 5** | GGGAACGTGT | 400-1100 | 3 | 2 |
| **OPM 7** | CCGTGACTCA | 500-550 | 2 | 0 |
| **OPM 18** | CACCATCCGT | 550 | 1 | 0 |
| **OPM 20** | AGGTCTTGGG | 780-850 | 2 | 1 |
| **OPK 4** | CCGCCCAAAC | 580 | 1 | 0 |
| **OPK 6** | CACCTTTCCC | 1200-2000 | 4 | 2 |
| **OPK 7** | AGCGAGCAAG | 600-2000 | 3 | 1 |
| **OPK 8** | GAACACTGGG | 750-1050 | 3 | 1 |
| **OPK 10** | GTGCAACGTG | 550-1200 | 2 | 0 |
| **OPK 16** | GAGCGTCGAA | 650-1100 | 3 | 0 |
| **OPL 14** | GTGACAGGCT | 780-1100 | 4 | 3 |
| **OPL 16** | AGGTTGCAGG | 550-950 | 5 | 0 |
| **OPN 4** | GACCGACCCA | 750-1700 | 5 | 2 |
| **OPN 8** | ACCTCAGCTC | 1000 | 1 | 0 |
| **OPN 9** | TGCCGGCTTG | 350-900 | 7 | 6 |
| **Total** | | | **46** | **18** |
| **Media** | | | **3** | **1.2** |

**Tabla 13.- Descriptores básicos de la variabilidad genética asociada a los 15 cebadores utilizados en el análisis fase haploide y diploide de *Gelidium canariense*. NF: Número total de bandas detectadas; NP: número de bandas polimórficas.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| Cebador | Población | NF | PF | %P | H'j |
|---|---|---|---|---|---|
| OPM 5 | Punta Brava | 3 | 2 | 67 | 0,572 |
| | Talavera | 3 | 1 | 33 | 0,314 |
| OPM 7 | Punta Brava | 2 | 0 | 0 | 0,000 |
| | Talavera | 1 | 0 | 0 | 0,000 |
| OPM 18 | Punta Brava | 1 | 0 | 0 | 0,000 |
| | Talavera | 1 | 0 | 0 | 0,000 |
| OPM 20 | Punta Brava | 2 | 1 | 50 | 0,531 |
| | Talavera | 1 | 0 | 0 | 0,000 |
| OPK 4 | Punta Brava | 1 | 0 | 0 | 0,000 |
| | Talavera | 1 | 0 | 0 | 0,000 |
| OPK 6 | Punta Brava | 4 | 2 | 50 | 0,832 |
| | Talavera | 4 | 2 | 50 | 0,572 |
| OPK 7 | Punta Brava | 3 | 1 | 33 | 0,517 |
| | Talavera | 3 | 1 | 33 | 0,237 |
| OPK 8 | Punta Brava | 2 | 0 | 0 | 0,000 |
| | Talavera | 3 | 1 | 33 | 0,314 |
| OPK 10 | Punta Brava | 2 | 0 | 0 | 0,000 |
| | Talavera | 2 | 0 | 0 | 0,000 |
| OPK 16 | Punta Brava | 3 | 0 | 0 | 0,000 |
| | Talavera | 3 | 0 | 0 | 0,000 |
| OPL 14 | Punta Brava | 2 | 1 | 50 | 0,237 |
| | Talavera | 4 | 3 | 75 | 1,106 |
| OPL 16 | Punta Brava | 5 | 0 | 0 | 0,000 |
| | Talavera | 5 | 0 | 0 | 0,000 |
| OPN 4 | Punta Brava | 5 | 2 | 40 | 0,649 |
| | Talavera | 5 | 2 | 40 | 0,754 |
| OPN 8 | Punta Brava | 1 | 0 | 0 | 0,334 |
| | Talavera | 1 | 0 | 0 | 0,000 |
| OPN 9 | Punta Brava | 6 | 5 | 83 | 1,776 |
| | Talavera | 5 | 3 | 60 | 1,126 |
| Total | Punta Brava | 42 | 14 | 33 | 0,363 |
| | Talavera | 42 | 13 | 31 | 0,295 |

**Tabla 14.- Descriptores básicos de la variabilidad genética por población asociada a los 15 cebadores en el análisis fase haploide y diploide de *G. canariense*. NF: Número total de bandas detectadas; NP: número de bandas polimórficas; H'j: Indice de Shannon.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

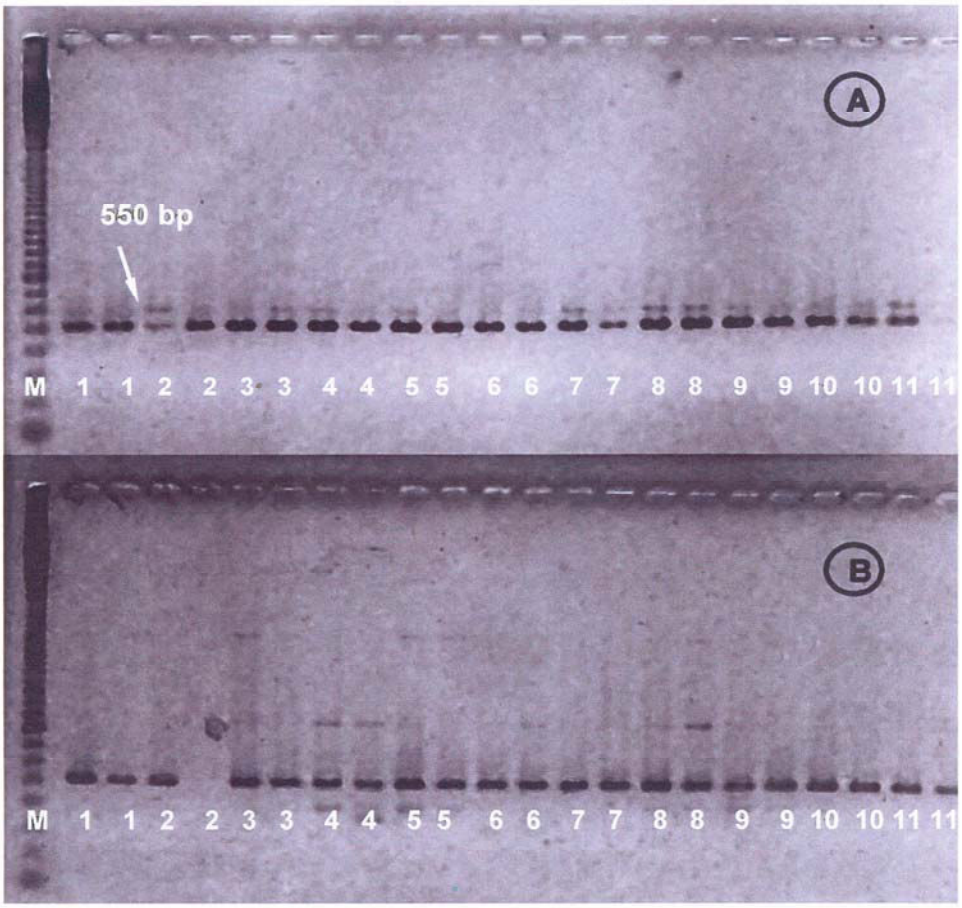



**Figura 22. Patrones de amplificación RAPD con el cebador OPM 7. A. Líneas 1-5: PBP1; Líneas 6-11: PBP2; B. Líneas 1-11: TLVP1. Se señala el marcador exclusivo de 550 bp.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El mayor porcentaje de polimorfismo (83%), al igual que la mayor diversidad genética de Shannon (1,77), se obtuvieron con el OPN 9 en Punta Brava. Ambas poblaciones presentaron un porcentaje de polimorfismo similar, 33% en la población de Punta Brava (PB) de Tenerife y 31% en la población de Talavera (TLV) de La Palma. El índice de Shannon por población también fue mayor para la población de Punta Brava (0,363) respecto a la población de Talavera (0,295) (Tabla 14).

Los fragmentos producidos por los 15 cebadores en el análisis de gametofitos femeninos y esporofitos se muestran en la Tabla 15. El porcentaje de polimorfismo fue similar en ambos grupos, 32 % para gametofitos femeninos y 36 % para los esporofitos a pesar de que el número de gametofitos fue tres veces menor que el número de esporofitos.

El número medio de bandas producido por cebador, fue de 2,9 tanto para gametofitos como para esporofitos. Inicialmente, cabría esperar un menor número de fragmentos en los individuos gametofíticos dado su carácter haploide, sin embargo en general se obtuvo el mismo número medio y tamaño de bandas en ambos estudios. Sólo dos cebadores, OPL 14 y OPN 9, mostraron diferencias entre la fase haploide y diploide, para el número total de fragmentos. Tan sólo se observaron dos fragmentos exclusivos en un individuo gametofítico de la población de Talavera (TLVP1: 16). Sin embargo, este al no estar presente en el resto de los individuos gametofitos femeninos analizados, no se puedo considerar como un marcador exclusivo de esta fase.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | | Gametofito femenino | | Esporofito | |
|---|---|---|---|---|---|
| CEBADOR | Tamaño (pb) | NF | PF | NF | PF |
| OPM 5 | 400-1100 | 3 | 2 | 3 | 1 |
| OPM 7 | 500-550 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| OPM 18 | 550 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| OPM 20 | 780-850 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| OPK 4 | 580 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| OPK 6 | 1200-2000 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| OPK 7 | 600-2000 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| OPK 8 | 750-1050 | 3 | 1 | 3 | 0 |
| OPK 10 | 550-1200 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| OPK 16 | 650-1100 | 3 | 0 | 3 | 0 |
| OPL 14 | 780-1100 | 4 | 2 | 2 | 1 |
| OPL 16 | 550-950 | 5 | 0 | 5 | 0 |
| OPN 4 | 750-1700 | 5 | 2 | 5 | 2 |
| OPN 8 | 1000 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| OPN 9 | 350-900 | 5 | 3 | 7 | 6 |
| Total | | 44 | 14 | 44 | 16 |
| % P | | | 32 | | 36 |

**Tabla 15.- Parámetros básicos de la variabilidad genética asociada a la fase haploide y a la fase diploide obtenidos con 15 cebadores. NF: Número total de bandas detectadas; NP: número de bandas polimórficas; % P: porcentaje de bandas polimórficas.**

### 4.1.6.2. Estructuración genética de las poblaciones.

La Figura 23 muestra los valores del coeficiente de similaridad de Dice y el coeficiente SM obtenidos para las diferentes individuos analizados.

Los valores de similitud de Dice entre los individuos pertenecientes a cada una de las poblaciones analizadas fueron considerablemente altos variando entre 0,882 y 1,000 para la población de Punta Brava y entre 0,886 y 1,000 para la población de Talavera (Figura 23).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Los valores más altos de similaridad se observaron dentro de cada una de las poblaciones, siendo el porcentaje medio de similitud para la población de Talavera (TLVP1) mayor (94%) que el porcentaje medio de similitud dentro de la población de Punta Brava (PB) (93%). El porcentaje medio entre las dos poblaciones fue de 90%. Dentro de la población de Punta Brava (PB) se obtuvo un porcentaje medio de similitud mayor dentro de las parcelas (94%) que entre las dos parcelas (91,8%).

A partir del coeficiente de similitudes entre poblaciones basadas en el coeficiente Dice se realizo el árbol de similaridades por el método UPGMA (Figura 24).

Aunque se ensayaron otros coeficientes de similaridad (coeficiente SM y coeficiente Jaccard), los resultados que se obtuvieron fueron similares y se eligió el coeficiente de Dice para realizar el árbol de similitud entre poblaciones porque este considera únicamente la presencia de bandas como evidencia de similitud.

El árbol UPGMA (Figura 24) muestra dos grupos claros, uno agrupa a la mayoría de individuos de la población de Punta Brava (PB) de Tenerife y otro a todos los individuos de la población de Talavera (TLV) de La Palma. A pequeña escala no se aprecia una diferenciación evidente, dado que los individuos de las dos parcelas de Punta Brava (PB) no se diferencian en grupos definidos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | PPB1 9* | PPB1 16 | PPB1 20 | PPB1 39 | PPB1 43 | PPB2 8 | PPB2 11 | PPB2 30 | PPB2 31* | PPB2 45* | PPB2 48* | TLV 1 | TLV 7 | TLV 9 | TLV 10 | TLV 14 | TLV16* | TLV18* | TLV 19 | TLV 23 | TLV 35 | TLV 49 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **PPB1 9*** | | 0,891 | 0,957 | 0,935 | 0,978 | 0,957 | 0,870 | 0,891 | 0,891 | 0,891 | 0,848 | 0,891 | 0,848 | 0,804 | 0,870 | 0,848 | 0,804 | 0,891 | 0,848 | 0,826 | 0,848 | 0,848 |
| **PPB1 16** | 0,925 | | 0,891 | 0,870 | 0,870 | 0,891 | 0,848 | 0,870 | 0,870 | 0,913 | 0,870 | 0,826 | 0,870 | 0,870 | 0,848 | 0,826 | 0,826 | 0,913 | 0,826 | 0,804 | 0,826 | 0,826 |
| **PPB1 20** | 0,971 | 0,925 | | 0,935 | 0,935 | 0,913 | 0,870 | 0,891 | 0,891 | 0,891 | 0,848 | 0,848 | 0,848 | 0,761 | 0,826 | 0,848 | 0,761 | 0,848 | 0,804 | 0,826 | 0,848 | 0,848 |
| **PPB1 39** | 0,955 | 0,909 | 0,955 | | 0,913 | 0,891 | 0,848 | 0,870 | 0,870 | 0,870 | 0,826 | 0,826 | 0,826 | 0,739 | 0,804 | 0,783 | 0,739 | 0,826 | 0,783 | 0,761 | 0,826 | 0,826 |
| **PPB1 43** | 0,986 | 0,912 | 0,957 | 0,941 | | 0,978 | 0,848 | 0,870 | 0,870 | 0,870 | 0,870 | 0,870 | 0,826 | 0,783 | 0,848 | 0,826 | 0,783 | 0,870 | 0,826 | 0,804 | 0,826 | 0,826 |
| **PPB2 8** | 0,971 | 0,925 | 0,941 | 0,925 | 0,986 | | 0,870 | 0,891 | 0,891 | 0,891 | 0,891 | 0,891 | 0,848 | 0,804 | 0,870 | 0,848 | 0,804 | 0,891 | 0,848 | 0,826 | 0,848 | 0,848 |
| **PPB2 11** | 0,912 | 0,896 | 0,912 | 0,896 | 0,899 | 0,912 | | 0,978 | 0,978 | 0,935 | 0,891 | 0,935 | 0,935 | 0,848 | 0,913 | 0,891 | 0,804 | 0,848 | 0,935 | 0,913 | 0,978 | 0,978 |
| **PPB2 30** | 0,925 | 0,909 | 0,925 | 0,909 | 0,912 | 0,925 | 0,985 | | 1,000 | 0,957 | 0,913 | 0,913 | 0,913 | 0,826 | 0,891 | 0,870 | 0,826 | 0,870 | 0,913 | 0,891 | 0,957 | 0,957 |
| **PPB2 31*** | 0,925 | 0,909 | 0,925 | 0,909 | 0,912 | 0,925 | 0,985 | 1,000 | | 0,957 | 0,913 | 0,913 | 0,913 | 0,826 | 0,891 | 0,870 | 0,826 | 0,870 | 0,913 | 0,891 | 0,957 | 0,957 |
| **PPB2 45*** | 0,925 | 0,939 | 0,925 | 0,909 | 0,912 | 0,925 | 0,955 | 0,970 | 0,970 | | 0,913 | 0,913 | 0,957 | 0,826 | 0,848 | 0,870 | 0,870 | 0,913 | 0,913 | 0,848 | 0,913 | 0,913 |
| **PPB2 48*** | 0,899 | 0,912 | 0,899 | 0,882 | 0,914 | 0,928 | 0,928 | 0,941 | 0,941 | 0,941 | | 0,870 | 0,870 | 0,783 | 0,804 | 0,826 | 0,783 | 0,826 | 0,826 | 0,804 | 0,870 | 0,870 |
| **TLVP1 1** | 0,928 | 0,882 | 0,899 | 0,882 | 0,914 | 0,928 | 0,957 | 0,941 | 0,941 | 0,941 | 0,914 | | 0,957 | 0,870 | 0,935 | 0,957 | 0,870 | 0,913 | 0,957 | 0,935 | 0,957 | 0,957 |
| **TLVP1 7** | 0,896 | 0,909 | 0,896 | 0,879 | 0,882 | 0,896 | 0,955 | 0,939 | 0,939 | 0,970 | 0,912 | 0,971 | | 0,870 | 0,891 | 0,913 | 0,870 | 0,913 | 0,957 | 0,891 | 0,957 | 0,957 |
| **TLVP1 9** | 0,870 | 0,912 | 0,841 | 0,824 | 0,857 | 0,870 | 0,899 | 0,882 | 0,882 | 0,882 | 0,857 | 0,914 | 0,912 | | 0,935 | 0,870 | 0,826 | 0,870 | 0,913 | 0,891 | 0,870 | 0,870 |
| **TLVP1 10** | 0,912 | 0,896 | 0,882 | 0,866 | 0,899 | 0,912 | 0,941 | 0,925 | 0,925 | 0,896 | 0,870 | 0,957 | 0,925 | 0,957 | | 0,935 | 0,848 | 0,891 | 0,935 | 0,957 | 0,935 | 0,935 |
| **TLVP1 14** | 0,901 | 0,886 | 0,901 | 0,857 | 0,889 | 0,901 | 0,930 | 0,914 | 0,914 | 0,914 | 0,889 | 0,972 | 0,943 | 0,917 | 0,958 | | 0,870 | 0,913 | 0,913 | 0,978 | 0,913 | 0,913 |
| **TLVP1 16*** | 0,873 | 0,886 | 0,845 | 0,829 | 0,861 | 0,873 | 0,873 | 0,886 | 0,886 | 0,914 | 0,861 | 0,917 | 0,914 | 0,889 | 0,901 | 0,919 | | 0,913 | 0,870 | 0,848 | 0,826 | 0,826 |
| **TLVP1 18*** | 0,925 | 0,939 | 0,896 | 0,879 | 0,912 | 0,925 | 0,896 | 0,909 | 0,909 | 0,939 | 0,882 | 0,941 | 0,939 | 0,912 | 0,925 | 0,943 | 0,943 | | 0,913 | 0,891 | 0,870 | 0,870 |
| **TLVP1 19** | 0,896 | 0,879 | 0,866 | 0,848 | 0,882 | 0,896 | 0,955 | 0,939 | 0,939 | 0,939 | 0,882 | 0,971 | 0,970 | 0,941 | 0,955 | 0,943 | 0,914 | 0,939 | | 0,935 | 0,957 | 0,957 |
| **TLVP1 23** | 0,886 | 0,870 | 0,886 | 0,841 | 0,873 | 0,886 | 0,943 | 0,928 | 0,928 | 0,899 | 0,873 | 0,958 | 0,928 | 0,930 | 0,971 | 0,986 | 0,904 | 0,928 | 0,957 | | 0,935 | 0,935 |
| **TLVP1 35** | 0,896 | 0,879 | 0,896 | 0,879 | 0,882 | 0,896 | 0,985 | 0,970 | 0,970 | 0,939 | 0,912 | 0,971 | 0,970 | 0,912 | 0,955 | 0,943 | 0,886 | 0,909 | 0,970 | 0,957 | | 1,000 |
| **TLVP1 49** | 0,896 | 0,879 | 0,896 | 0,879 | 0,882 | 0,896 | 0,985 | 0,970 | 0,970 | 0,939 | 0,912 | 0,971 | 0,970 | 0,912 | 0,955 | 0,943 | 0,886 | 0,909 | 0,970 | 0,957 | 1,000 | |

**Figura 23.- Matriz de los valores del coeficiente de Dice debajo de la diagonal y del coeficiente SM arriba de la diagonal entre los diferentes individuos analizados. PPB1: Punta Brava, Parcela 1, PPB2: Punta Brava, Parcela 2, TLVP1: Talavera, Parcela 1. * : Gametofitos femeninos.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

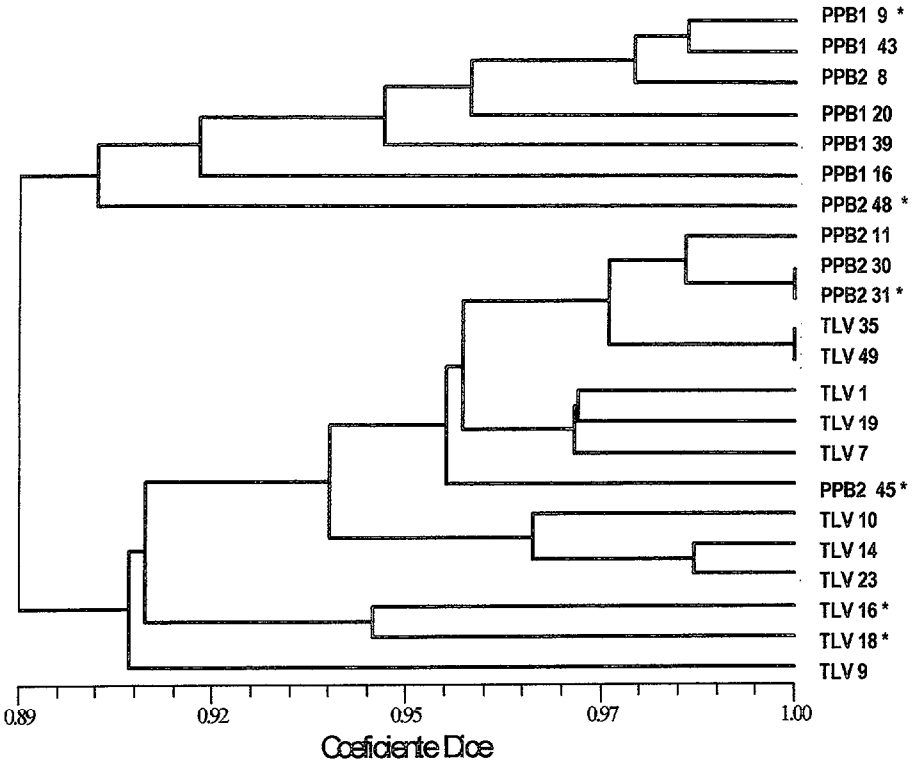



**Figura 24.- Dendrograma UPGMA basado en el coeficiente Dice.**

*** : Gametofitos femeninos.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.1.7. Caracterización de gametofitos masculinos.

Las secciones observadas con microscopia óptica presentaron idénticos caracteres vegetativos (por ej. organización celular) descritos previamente por Rodríguez & Santelices (1988) para distinguir las especies *Pterocladia* y *Gelidium*. En ninguno de los cinco tipos de fragmentos se identificó ninguna estructura reproductora relacionada con el espermatangio o con la formación de las espermátidas (Figura 25).

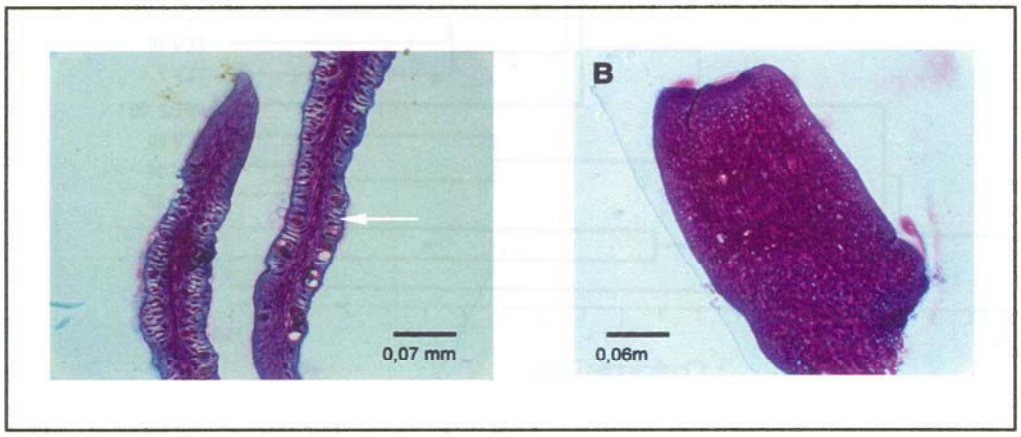



**Figura 25. A: Sección longitudinal de un fragmento de talo de *G. canariense*, soportando tetraesporofitos (Flecha). Tinción con azul de toluidina. Grosor 5 μm.**
**B: Sección transversal de un fragmento de *G. canariense* del tipo 4.2 (ver texto). Obsérvese que no hay ningún indicio de ningún tipo de célula o estructura relacionada con el espermatangio.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.1.8. Análisis de la fase haploide.

#### 4.1.8.1. Niveles de diversidad genética.

##### 4.1.8.1.1. Niveles de diversidad genética por población.

De los diferentes cebadores ensayados previamente, se seleccionaron para el análisis de la fase haploide 15 cebadores que dieron lugar a productos de amplificación con resolución, nitidez y reproducibilidad óptimas (OPM 5, OPM 7, OPM 18, OPK 4, OPK 7, OPK 8, OPK 10, OPK 16,OPL 14, OPL 16, OPN 4, OPN 8, OPN 9).

De esta preselección, se excluirían del análisis final OPM 20 y OPK6 debido a la baja calidad de amplificación en las dos últimas poblaciones de Punta Brava (PPB1) de Tenerife y Talavera (TLVP1) de La Palma. Para corroborar la homología de las bandas entre las distintas electroforesis se corrieron siempre individuos de distintas electroforesis y poblaciones en el mismo gel.

Se obtuvo un total de 131 bandas y se eliminó el 36,6 % de las bandas, al hacer un filtro que consistió en eliminar las bandas con frecuencia inferior al 5%. Se obtuvo una matriz de 83 marcadores con tamaños comprendidos entre 350 (OPN 9-8) y 2000 pb (OPM 7-1, OPK 8-1, OPL 16-1, OPN 8-1). De los 13 cebadores analizados en esta especie, los cebadores OPK 16 y OPL 16 fueron los mas variables, obteniéndose un máximo de 12 y 10 fragmentos respectivamente. Por el contrario, los cebadores OPK 10 (3) y OPM 5 y OPK 8 ( 4) dieron lugar al menor número de bandas (Tabla 1 Anexo).

El número medio de fragmentos por población y cebador varió entre 1,9 (OPM 5) y 8,9 (OPK 16), sin embargo el mínimo polimorfismo medio por cebador y población correspondió al cebador OPM 18 (55,2 %) y el máximo a los cebadores OPK 4 y OPN 9 (100 %).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El índice de Shannon (Lewontin 1972) se utilizó para cuantificar el nivel de diversidad genética presente dentro de cada población muestreada por cebador. Para cada población, las estimaciones de diversidad genética variaron entre los diferentes perfiles de RAPD amplificados por los diferentes cebadores. Por ejemplo, OPM 5 y OPK 16 dieron estimaciones de diversidad genética de 0,00 y 3,16 respectivamente para la población de Bocabarranco 1 (BBS1) de Gran Canaria. Los valores medios del índice de Shannon por población y cebador variaron entre 0,44 del OPM 5 y OPK 8 y 2,99 del OPK 16 (Tabla 16).

A pesar de los altos niveles de variación, no se encontró ninguna banda monomórfica exclusiva por población. Sin embargo, se detectaron 7 bandas polimórficas exclusivas de alguna isla. Así, las bandas OPM 7- 4, OPM 18- 2, OPM 18-3, OPK 7-2, OPK 16- 9, OPN 8-4 se observan sólo en los individuos de la isla de Gran Canaria. De igual manera, la banda OPN 4-6 fue exclusiva de las poblaciones de Tenerife con frecuencia 0,203 como se muestra en la Tabla 1 del Anexo. Sin embargo, ninguna de estas bandas constituyó un marcador identificativo e inequívoco de las poblaciones de cada isla porque en ningún caso, estuvieron presentes en todos los individuos de las poblaciones de cada isla.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**Tabla 16.- Descriptores básicos de la variabilidad genética asociada a los 13 cebadores utilizados para el análisis de las poblaciones de *Gelidium canariense*. NF: Número total de bandas detectadas; PF: número de bandas polimórficas; % P: porcentaje de bandas polimórficas; $H'_j$: Diversidad genética (Indice de Shannon). BBS1: Bocabarranco, Población 1 Parcela1; BBS2P2: Bocabarranco, Población 2, Parcela1; AP3: Agaete, Parcela3; PCP3: Puerto de la Cruz , Parcela 3; GAS2P1: Garachico, Población 2, Parcela 1; PPB1: Punta Brava, Parcela 1; FP1: Faro, Parcela 1; TLVP1: Talavera, Parcela 1; HP1: Hermigua, Parcela 1.**

| Cebador | Población | NF | PF | % P | $H'_j$ |
|---|---|---|---|---|---|
| OPM 5 | | | | | |
| | BBS1 | 1 | 0 | 0,0 | 0,00 |
| | BBS2P2 | 2 | 1 | 50,0 | 0,16 |
| | AP3 | 2 | 1 | 50,0 | 0,17 |
| | PCP3 | 1 | 1 | 100,0 | 0,05 |
| | GAS2P1 | 1 | 1 | 100,0 | 0,05 |
| | PPB1 | 4 | 4 | 100,0 | 2,01 |
| | FP1 | 1 | 1 | 100,0 | 0,05 |
| | TLVP1 | 4 | 4 | 100,0 | 1,21 |
| | HP1 | 1 | 1 | 100,0 | 0,22 |
| | **Media** | **1,9** | **1,6** | **77,8** | **0,44** |
| OPM7 | | | | | |
| | BBS1 | 4 | 4 | 100,0 | 1,34 |
| | BBS2P2 | 5 | 5 | 100,0 | 1,53 |
| | AP3 | 5 | 5 | 100,0 | 1,50 |
| | PCP3 | 3 | 2 | 66,7 | 0,67 |
| | GAS2P1 | 3 | 2 | 66,7 | 0,68 |
| | PPB1 | 2 | 2 | 100,0 | 0,55 |
| | FP1 | 4 | 3 | 75,0 | 1,36 |
| | TLVP1 | 1 | 1 | 100,0 | 0,35 |
| | HP | 3 | 2 | 66,7 | 1,03 |
| | **Media** | **3,3** | **2,9** | **86,1** | **1,00** |
| OPM 18 | | | | | |
| | BBS1 | 5 | 5 | 100,0 | 2,47 |
| | BBS2P2 | 5 | 5 | 100,0 | 1,43 |
| | AP3 | 5 | 4 | 80,0 | 0,91 |
| | PCP3 | 3 | 1 | 33,3 | 0,28 |
| | GAS2P1 | 3 | 3 | 100,0 | 0,17 |
| | PPB1 | 2 | 0 | 0,0 | 0,00 |
| | FP1 | 3 | 1 | 33,3 | 0,16 |
| | TLVP1 | 2 | 1 | 50,0 | 0,05 |
| | HP1 | 2 | 0 | 0,0 | 0,00 |
| | **Media** | **3,3** | **2,2** | **55,2** | **0,61** |
| OPK4 | | | | | |
| | BBS1 | 7 | 7 | 100,0 | 2,77 |
| | BBS2P2 | 8 | 8 | 100,0 | 3,68 |
| | AP3 | 7 | 7 | 100,0 | 2,57 |

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**Tabla 16 continuación.**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | PCP3 | 6 | 6 | 100,0 | 2,10 |
| | GAS2P1 | 6 | 6 | 100,0 | 2,42 |
| | PPB1 | | 3 | 100,0 | 0,61 |
| | FP1 | 6 | 6 | 100,0 | 2,16 |
| | TLVP1 | 4 | 4 | 100,0 | 0,73 |
| | HP1 | 3 | 3 | 100,0 | 1,46 |
| | **Media** | **5,6** | **5,6** | **100,0** | **2,06** |
| **OPK 7** | | | | | |
| | BBS1 | 5 | 5 | 100,0 | 2,00 |
| | BBS2P2 | 5 | 5 | 100,0 | 1,68 |
| | AP3 | 5 | 5 | 100,0 | 1,37 |
| | PCP3 | 2 | 1 | 50,0 | 0,45 |
| | GAS2P1 | 3 | 3 | 100,0 | 0,77 |
| | PPB1 | 2 | 2 | 100,0 | 0,47 |
| | FP1 | 3 | 2 | 66,7 | 1,06 |
| | TLVP1 | 1 | 1 | 100,0 | 0,14 |
| | HP1 | 2 | 2 | 100,0 | 0,65 |
| | **Media** | **3,1** | **2,9** | **90,7** | **0,95** |
| **OPK8** | | | | | |
| | BBS1 | 2 | 2 | 100,0 | 0,62 |
| | BBS2P2 | 2 | 2 | 100,0 | 0,28 |
| | AP3 | 1 | 1 | 100,0 | 0,14 |
| | PCP3 | 3 | 2 | 66,7 | 0,83 |
| | GAS2P1 | 4 | 4 | 100,0 | 1,14 |
| | PPB1 | 1 | 1 | 100,0 | 0,13 |
| | FP1 | 3 | 2 | 66,7 | 0,21 |
| | TLVP1 | 1 | 1 | 100,0 | 0,09 |
| | HP1 | 2 | 2 | 100,0 | 0,50 |
| | **Media** | **2,1** | **1,9** | **92,6** | **0,44** |
| **OPK 10** | | | | | |
| | BBS1 | 3 | 3 | 100,0 | 0,66 |
| | BBS2P2 | 2 | 2 | 100,0 | 0,32 |
| | AP3 | 2 | 1 | 50,0 | 0,43 |
| | PCP3 | 1 | 1 | 100,0 | 0,34 |
| | GAS2P1 | 1 | 1 | 100,0 | 0,00 |
| | PPB1 | 3 | 3 | 100,0 | 1,02 |
| | FP1 | 2 | 2 | 100,0 | 0,56 |
| | TLVP1 | 2 | 2 | 100,0 | 0,49 |
| | HP1 | 3 | 3 | 100,0 | 1,33 |
| | **Media** | **2,1** | **2,0** | **94,4** | **0,57** |
| **OPK16** | | | | | |
| | BBS1 | 10 | 10 | 100,0 | 3,16 |
| | BBS2P2 | 10 | 10 | 100,0 | 3,82 |
| | AP3 | 11 | 11 | 100,0 | 4,99 |
| | PCP3 | 6 | 4 | 66,7 | 1,51 |
| | GAS2P1 | 10 | 10 | 100,0 | 3,44 |
| | PPB1 | 8 | 8 | 100,0 | 2,51 |
| | FP1 | 11 | 9 | 81,9 | 3,42 |
| | TLVP1 | 5 | 5 | 100,0 | 0,70 |
| | HP1 | 9 | 9 | 100,0 | 3,40 |
| | **Media** | **8,9** | **8,4** | **94,3** | **2,99** |
| **OPL 14** | | | | | |
| | BBS1 | 6 | 6 | 100,0 | 2,53 |
| | BBS2P2 | 6 | 5 | 83,3 | 1,52 |
| | AP3 | 7 | 7 | 100,0 | 2,57 |

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**Tabla 16 continuación.**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | PCP3 | 4 | 3 | 75,0 | 1,01 |
| | GAS2P1 | 5 | 5 | 100,0 | 1,26 |
| | PPB1 | 6 | 6 | 100,0 | 2,23 |
| | FP1 | 6 | 5 | 83,3 | 1,95 |
| | TLVP1 | 6 | 6 | 100,0 | 2,06 |
| | HP1 | 5 | 4 | 80,0 | 1,47 |
| | **Media** | **5,7** | **5,2** | **82,0** | **1,84** |
| **OPL16** | | | | | |
| | BBS1 | 9 | 9 | 100,0 | 3,44 |
| | BBS2P2 | 9 | 9 | 100,0 | 3,08 |
| | AP3 | 9 | 9 | 100,0 | 2,54 |
| | PCP3 | 9 | 9 | 100,0 | 2,91 |
| | GAS2P1 | 8 | 7 | 87,5 | 2,96 |
| | PPB1 | 8 | 8 | 100,0 | 2,11 |
| | FP1 | 9 | 8 | 88,9 | 2,00 |
| | TLVP1 | 6 | 6 | 100,0 | 1,79 |
| | HP1 | 7 | 7 | 100,0 | 2,43 |
| | **Media** | **8,2** | **8,0** | **97,4** | **2,58** |
| **OPN4** | | | | | |
| | BBS1 | 5 | 5 | 100,0 | 1,67 |
| | BBS2P2 | 6 | 6 | 100,0 | 2,43 |
| | AP3 | 6 | 5 | 83,3 | 1,28 |
| | PCP3 | 6 | 6 | 100,0 | 1,57 |
| | GAS2P1 | 6 | 6 | 100,0 | 1,89 |
| | PPB1 | 6 | 6 | 100,0 | 1,81 |
| | FP1 | 5 | 3 | 60,0 | 1,41 |
| | TLVP1 | 4 | 4 | 100,0 | 0,76 |
| | HP1 | 5 | 4 | 80,0 | 1,74 |
| | **Media** | **5,4** | **5,0** | **82,2** | **1,62** |
| **OPN8** | | | | | |
| | BBS1 | 4 | 4 | 100,0 | 1,66 |
| | BBS2P2 | 4 | 4 | 100,0 | 1,10 |
| | AP3 | 3 | 2 | 66,6 | 0,91 |
| | PCP3 | 2 | 1 | 50,0 | 0,35 |
| | GAS2P1 | 2 | 2 | 100,0 | 0,32 |
| | PPB1 | 2 | 2 | 100,0 | 0,87 |
| | FP1 | 3 | 3 | 100,0 | 0,80 |
| | TLVP1 | 3 | 3 | 100,0 | 1,23 |
| | HP1 | 3 | 3 | 100,0 | 0,83 |
| | **Media** | **2,9** | **2,7** | **83,3** | **0,90** |
| **OPN 9** | | | | | |
| | BBS1 | 8 | 8 | 100,0 | 2,76 |
| | BBS2P2 | 7 | 7 | 100,0 | 3,23 |
| | AP3 | 7 | 7 | 100,0 | 2,34 |
| | PCP3 | 5 | 5 | 100,0 | 1,73 |
| | GAS2P1 | 7 | 7 | 100,0 | 2,96 |
| | PPB1 | 5 | 5 | 100,0 | 1,63 |
| | FP1 | 7 | 7 | 100,0 | 2,53 |
| | TLVP1 | 4 | 4 | 100,0 | 0,96 |
| | HP1 | 7 | 7 | 100,0 | 2,76 |
| | **Media** | **6,3** | **6,3** | **100,0** | **2,32** |

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

También se calculó el Indice de Shannon modificado por Bussell (1999) para cada locus y se obtuvieron los valores de diversidad genética poblacionales medios por locus. Se estimó un valor medio de 0,221 para las poblaciones y un valor de 0,367 para la especie. Los valores variaron entre 0,127 para la población de Talavera (TLV) de La Palma y 0,302 para la población de Bocabarranco (BBS1) de Gran Canaria. El valor de Shannon análogo al $G'_{ST}$ o medida de diferenciación entre poblaciones fue de 0,387, lo que indica una fuerte diferenciación entre poblaciones (Tabla 17)

| $H''_j$ | | | | | | | | | $H''_{POP}$ | $H''_{SP}$ | $G''_{ST}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BBS1 | BBS2 | AP3 | PCP3 | GAS2P1 | PPB1 | FP1 | TLVP1 | HP1 | | | |
| 0,302 | 0,292 | 0,261 | 0,166 | 0,218 | 0,192 | 0,213 | 0,127 | 0,215 | 0,221 | 0,367 | 0,387 |

**Tabla 17.- Diversidad genética media (Indice de Shannon) por locus de cada población ($H'_j$) incluyendo los monomórficos, $H''_{pop}$: diversidad genética media por locus y por población. $H''_{SP}$ : diversidad genética media por locus para la especie.**

El número de fragmentos por población varió de 43 para la población de Talavera (TLVP1) en La Palma, a 70 para Agaete (AP3) en Gran Canaria, siendo el número medio de fragmentos por población de 58,9. La población de Bocabarranco 1 (BBS1) de Gran Canaria fue la más polimórfica (98,6 %) y la población de Puerto de la Cruz (PCP3) de Tenerife con 82,4 %, la menos polimórfica, siendo el polimorfismo medio de todas las poblaciones de 92,7 % (Tabla 18).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| Isla | Población | NF | PF | % P | $H'_j$ |
|---|---|---|---|---|---|
| GRAN CANARIA | BBS1 | 69 | 68 | 98,6 | 0,302 |
| | BBS2 | 71 | 69 | 97,2 | 0,292 |
| | AP3 | 70 | 65 | 92,9 | 0,261 |
| TENERIFE | PCP3 | 51 | 42 | 82,4 | 0,166 |
| | GAS2P1 | 59 | 57 | 96,6 | 0,218 |
| | PPB1 | 52 | 50 | 96,2 | 0,192 |
| LA PALMA | FP1 | 63 | 52 | 82,5 | 0,213 |
| | TLVP1 | 43 | 42 | 97,7 | 0,127 |
| LA GOMERA | HP1 | 52 | 47 | 90,4 | 0,215 |
| Media | | 58,9 | 54,7 | 92,7 | 0,221 |

**Tabla 18. Número de bandas totales obtenidas (NF), número de fragmentos polimórficos (PF), porcentaje de marcadores polimórficos (% P), diversidad genética media ($H'_j$) por marcador dentro de cada una de las poblaciones analizadas de *G. canariense*.**

Una media de 6,4 marcadores fueron eliminados en cada población al aplicar el criterio 3/N (Tabla 19). Este número varió considerablemente entre las poblaciones, a pesar de tener tamaños poblaciones similares y fue especialmente alto para la poblaciones de Puerto de la Cruz (PCP3) y Talavera (TLVP1) con 41 bandas en cada una.

La diversidad génica (Lynch & Milligan 1994) por cebador y población varió entre 0,06 (OPK 8, OMP 5) y 0,492 (OPN 4) en las poblaciones de Bocabarranco 2 (BBS2) y Faro (FP1) respectivamente (Tabla 19).

La diversidad génica por población varió entre 0,223 para la población de Garachico (GAS2P1) y 0,313 para la población de Hermigua (HP1) según se muestra en la Tabla 19.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| Cebador | PF | Rango (pb) | Diversidad Génica | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Isla | Gran Canaria | | | Tenerife | | | La Palma | La Gomera |
| | | | Población | BBS1 | BBS2 | AP3 | PCP3 | GAS2P1 | PPB1 | FP1 | TLVP1 | HP1 |
| | | | 3/N | 21 | 24 | 27 | 41 | 26 | 34 | 31 | 41 | 34 |
| OPM 5 | 4 | 1100-400 | | - | 0,06 | 0,066 | 0,071 | 0,067 | 0,475 | 0,064 | 0,256 | 0,165 |
| OPM 7 | 5 | 2000-525 | | 0,283 | 0,243 | 0,238 | 0,285 | 0,233 | 0,241 | 0,362 | 0,412 | 0,410 |
| OPM 18 | 5 | 950-450 | | 0,435 | 0,274 | 0,187 | 0,137 | 0,067 | - | 0,064 | 0,062 | - |
| OPK 4 | 8 | 1800-400 | | 0,294 | 0,391 | 0,287 | 0,274 | 0,307 | 0,237 | 0,269 | 0,077 | 0,407 |
| OPK 7 | 5 | 1400-400 | | 0,395 | 0,268 | 0,226 | 0,308 | 0,227 | 0,235 | 1,836 | 0,271 | 0,278 |
| OPK 8 | 4 | 2000-700 | | 0,350 | 0,060 | - | 0,272 | 0,206 | 0,271 | 0,064 | 0,175 | 0,361 |
| OPK 10 | 3 | 1200-550 | | 0,187 | 0,404 | 0,275 | 0,197 | 0,128 | 0,293 | 0,308 | 0,206 | 0,375 |
| OPK 16 | 12 | 1700-400 | | 0,245 | 0,330 | 0,380 | 0,320 | 0,271 | 0,360 | 0,246 | 0,166 | 0,347 |
| OPL 14 | 7 | 1500-500 | | 0,355 | 0,159 | 0,288 | 0,260 | 0,224 | 0,345 | 0,296 | 0,243 | 0,354 |
| OPL 16 | 10 | 2000-550 | | 0,321 | 0,322 | 0,244 | 0,273 | 0,417 | 0,322 | 0,218 | 0,403 | 0,391 |
| OPN 4 | 7 | 1300-500 | | 0,408 | 0,419 | 0,287 | 0,282 | 0,265 | 0,298 | 0,492 | 0,199 | 0,403 |
| OPN 8 | 5 | 2000-550 | | 0,373 | 0,355 | 0,307 | 0,198 | 0,128 | 0,373 | 0,296 | 0,361 | 0,269 |
| OPN 9 | 8 | 1400-350 | | 0,223 | 0,338 | 0,207 | 0,283 | 0,355 | 0,304 | 0,306 | 0,305 | 0,313 |
| **Media** | **6,4** | **1600- 500** | | **0,298** | **0,279** | **0,230** | **0,243** | **0,223** | **0,289** | **0,371** | **0,241** | **0,313** |

**Tabla 19. Secuencia de cebadores, número de bandas polimórficas (PF), tamaño de los marcadores (pb) y valores de diversidad genética (Lynch & Milligan 1994) por cebador y población. El número debajo de los códigos de las poblaciones son los bandas eliminadas con el criterio 3/N.**

**-: Marcador monomórfico.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Los 13 cebadores ensayados en las 9 poblaciones estudiadas de *Gelidium canariense* dieron lugar a un total de 805 haplotipos. El número medio de haplotipos varió entre 2,0 para el cebador OPM 5 y 14,7 para el cebador OPK 16 (Tabla 20; Figura 26). El número medio de haplotipos varió también considerablemente entre las poblaciones estudiadas, con un rango que va desde 4,8 en la población de Hermigua (HP1) en La Gomera hasta 9,6 en la población de Bocabarranco (BB1P1) en Gran Canaria (Tabla 20), siendo 7 el número medio de haplotipos por cebador y población.

**Tabla 20. Número haplotipos por cebador y población. NMAL: Número medio de haplotipos por cebador.**

| | Gran Canaria | | | | Tenerife | | La Palma | | La Gomera | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Cebador** | **BBS1** | **BBS2** | **AP3** | **PCP3** | **GAS2P1** | **PPB1** | **FP1** | **TLVP1** | **HP1** | **Total** | **NMAL** |
| **OPM5** | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 5 | 1 | 4 | 1 | *18* | *2,0* |
| **OPM 7** | 7 | 7 | 6 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 3 | *37* | *4,1* |
| **OPM 18** | 10 | 8 | 5 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | *34* | *3,8* |
| **OPK 4** | 14 | 18 | 11 | 8 | 12 | 3 | 9 | 4 | 4 | *83* | *9,2* |
| **OPK 7** | 11 | 6 | 9 | 2 | 3 | 2 | 4 | 2 | 2 | *41* | *4,6* |
| **OPK 8** | 2 | 2 | 1 | 4 | 5 | 1 | 3 | 2 | 3 | *23* | *2,6* |
| **OPK 10** | 3 | 3 | 2 | 1 | 2 | 4 | 2 | 3 | 4 | *24* | *2,7* |
| **OPK 16** | 17 | 23 | 23 | 6 | 18 | 15 | 15 | 6 | 9 | *132* | *14,7* |
| **OPL 14** | 15 | 6 | 14 | 4 | 6 | 12 | 10 | 8 | 6 | *81* | *9,0* |
| **OPL 16** | 17 | 16 | 14 | 18 | 18 | 8 | 10 | 10 | 8 | *119* | *13,2* |
| **OPN 4** | 10 | 14 | 7 | 10 | 11 | 11 | 8 | 6 | 8 | *85* | *9,4* |
| **OPN 8** | 9 | 6 | 3 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | *37* | *4,1* |
| **OPN 9** | 9 | 12 | 8 | 9 | 17 | 7 | 13 | 6 | 10 | *91* | *10,1* |
| **Total** | *125* | *123* | *105* | *70* | *102* | *73* | *86* | *58* | *63* | *805* | |
| **Media** | *9,6* | *9,5* | *8,1* | *5,4* | *7,8* | *5,6* | *6,6* | *4,5* | *4,8* | *6,9* | *7* |

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.1.8.1.2. Niveles de diversidad genética por islas.

Los índices de variabilidad genética mas utilizados (%P, $H'_j$, Nº haplotipos) se calcularon para las islas haciendo las medias de los valores obtenidos en las respectivas poblaciones de cada una de las islas (Tabla 21).

El índice de Shannon y la diversidad génica (Nei 1987) fueron considerablemente mas altos en las islas de Gran Canaria y Gomera que en las otras islas (Tabla 21) siendo los valores para el primer índice de 0,285 y 0,215 respectivamente y de igual forma 0,300 y 0,288 para la diversidad genética.

Resultados similares se obtuvieron al comparar el porcentaje de loci polimórficos. Las poblaciones de Gran Canaria y Tenerife presentaron un mayor número de bandas polimórficas (96,2 % y 91,7 %), un mayor número de haplotipos (117,7 y 81,7) que las otra islas (Tabla 21).

| | %P | DG | $H'_j$ | Nº Haplotipos |
|---|---|---|---|---|
| Gran Canaria | 96,2 | 0,300 | 0,285 | 117,6 |
| Tenerife | 91,7 | 0,288 | 0,192 | 81,67 |
| La Palma | 90,1 | 0,264 | 0,170 | 72,0 |
| La Gomera | 90,4 | 0,352 | 0,215 | 63 |

**Tabla 21.- Porcentaje de polimorfismo, diversidad genética (DG), diversidad genética ($H'_j$) y número de haplotipos por islas en *Gelidium canariense*.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

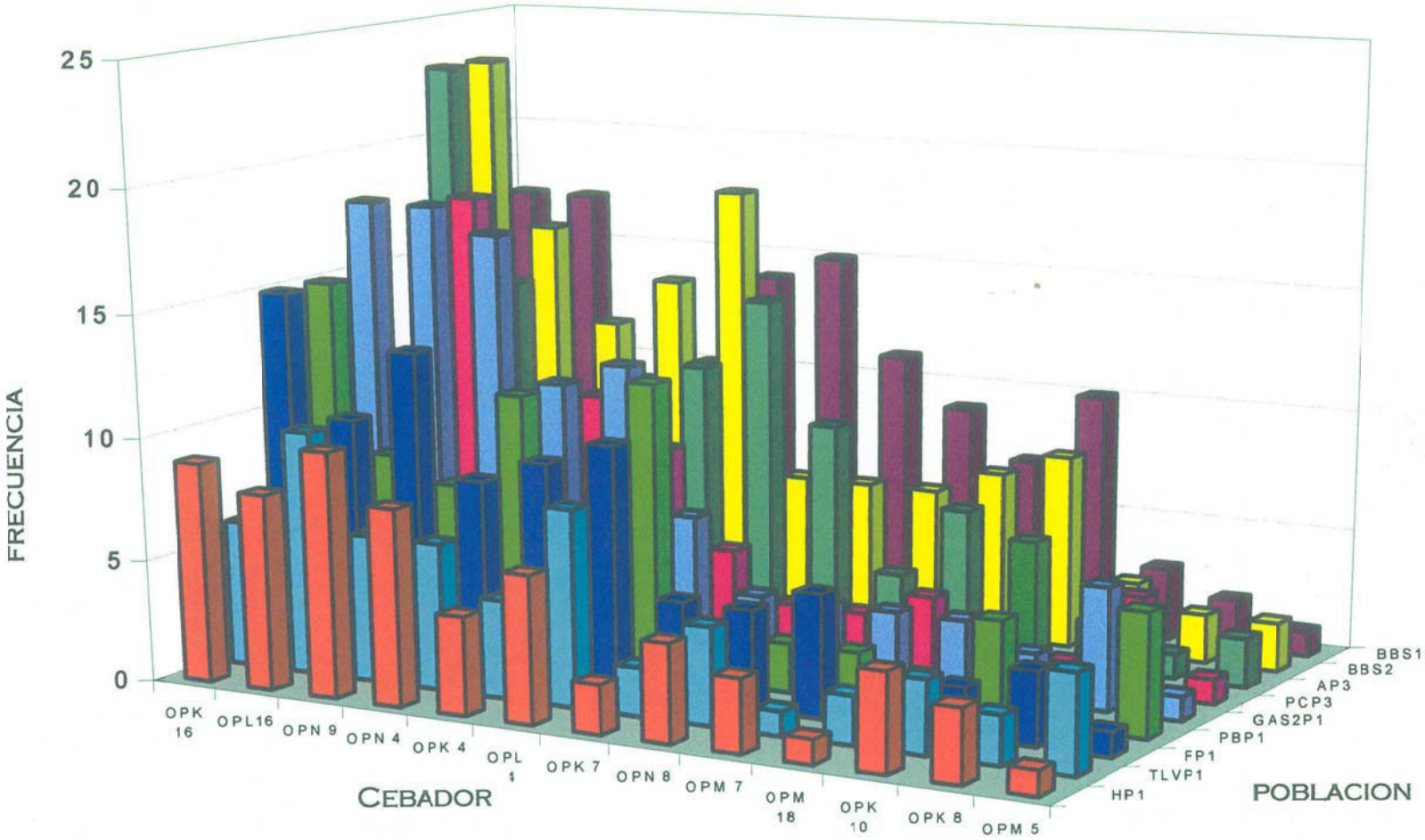



**Figura 26. Frecuencias de haplotipos totales para cada cebador estudiado en *Gelidium canariense*..**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.1.8.1.3. Robustez de los datos.

Con el fin de determinar si el tamaño muestral de las poblaciones analizadas era suficientemente representativo para detectar la mayor parte de la variabilidad genética, se representó el número medio de alelos por cebador frente al número de individuos analizados (Figura 27). Así se aprecia que la mayoría de las poblaciones analizadas se encuentran en la zona de estabilidad de la línea de tendencia, indicando que un tamaño muestral superior no supondría un aumento significativo del número medio de haplotipos por loci. Tan sólo en la población de Hermigua (HP1) de La Gomera esperaríamos un aumento de la variabilidad genética si se incrementa el tamaño muestral, ya que se encuentra en al zona exponencial de la curva (Figura 27).

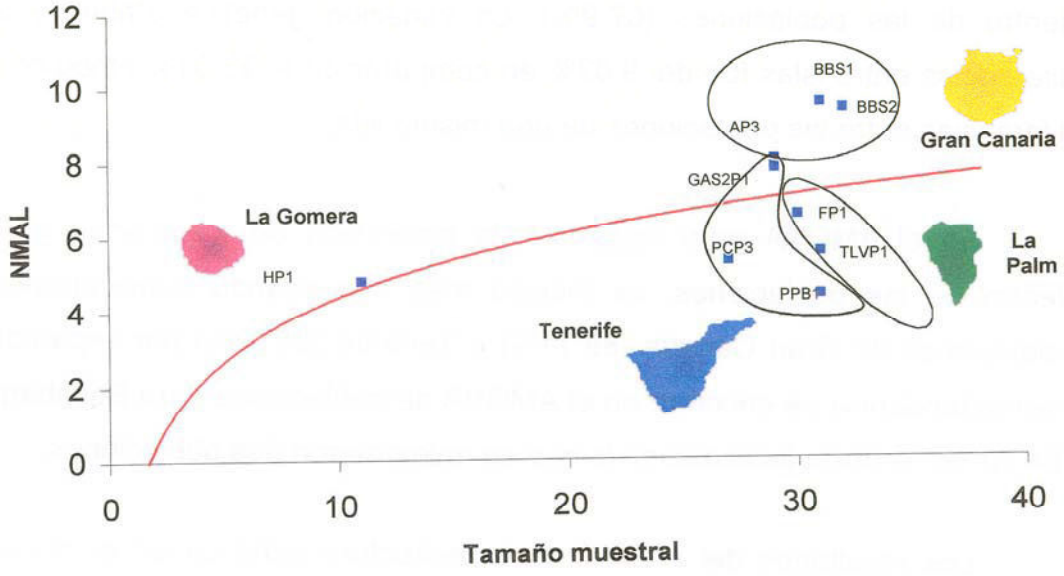



**Figura 27. Variación del número medio de haplotipos frente al tamaño poblacional.**

**MNAL: Número medio de haplotipos por cebador.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El número medio de haplotipos por cebador calculado para cada población varió entre 4,46 y 9,62 dependiendo del tamaño de la población. La población de Puerto de la Cruz (PCP3) presenta casi la misma diversidad genética que la población de Hermigua (HP1) aunque el tamaño muestral fue dos veces mayor.

### 4.1.8.2. Diferenciación genética entre poblaciones.

#### 4.1.8.2.1. Análisis de la varianza molecular e Indice de Shannon.

La Tabla 22 muestra el análisis de la varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones de *Gelidium canariense* analizadas en el estudio de la fase haploide.

El AMOVA jerarquizado mostraba que la mayoría de la variación estaba dentro de las poblaciones (67,9%). La variación genética atribuible a las diferencias entre islas fue del 9,02% en comparación al 23,01% atribuido a las diferencias entre las poblaciones de una misma isla.

En el AMOVA para cada isla, la proporción de variabilidad genética dentro de las poblaciones, es incluso más alta cuando consideramos las poblaciones de Gran Canaria (89,11%) o Tenerife (68,92%) por separado. La misma tendencia se encontró en el AMOVA de poblaciones para Bocabarranco (84.70 %), la única localidad en la que se muestrearon dos poblaciones.

Los resultados del análisis de la estructura genética en el marco del índice de Shannon fueron similares a los obtenidos en el AMOVA (Tabla 23). El 57 % de variación de los fenotipos RAPDs correspondía a la variación dentro de las poblaciones ($H'_{POP}/H'_{SP}$) y el 42 % a la variación entre poblaciones ($H'_{SP}$-$H'_{POP}$) /$H'_{SP}$. La mayoría de los cebadores generaron mayor diversidad genética dentro de las poblaciones que entre poblaciones a excepción de los cebadores OPM 5 y OPK 8, para lo cuál no tenemos explicación.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El valor de Shannon análogo al $G'_{ST}$ o medida de diferenciación entre poblaciones fue de 0,387, lo que indica una diferenciación moderada entre poblaciones.

| Factor | Grados de libertad | Componentes de la varianza | Porcentaje de variación | Indices de fijación |
|---|---|---|---|---|
| ***Islas*** | | | | |
| Entre todas las poblaciones | | | | 0.320*** |
| Entre islas | 3 | 0.835 | 9.02 | 0.090*** |
| Entre poblaciones (isla) | 5 | 2.131 | 23.01 | 0.253*** |
| Dentro de poblaciones | 243 | 6.298 | 67.98 | |
| ***Gran Canaria*** | | | | |
| Entre localidades | 1 | 1.179 | 10.89 | $F_{ST}$= 0.108*** |
| Dentro localidades | 90 | 9.648 | 89.11 | |
| ***Tenerife*** | | | | |
| Entre localidades | 2 | 2.458 | 31.08 | $F_{ST}$= 0.311*** |
| Dentro localidades | 84 | 5.449 | 68.92 | |
| ***La Palma*** | | | | |
| Entre localidades | 1 | 3.162 | 41.88 | $F_{ST}$= 0.419*** |
| Dentro localidades | 59 | 4.387 | 58.12 | |
| ***Bocabarranco (Gran Canaria)*** | | | | |
| Entre poblaciones | 1 | 1.735 | 15.58 | $F_{ST}$= 0.156*** |
| Dentro poblaciones | 61 | 9.403 | 84.42 | |

*** $P$< 0.001

**Tabla 22. AMOVA de la variabilidad de RAPD en los distintos niveles jerárquicos considerados en las poblaciones de *Gelidium canariense.***

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | H'j | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cebador | BBS1 | BBS2 | AP3 | PCP3 | GAS2P1 | PPB1 | FP1 | TLVP1 | HP1 | $H'_{POP}$ | $H'_{SP}$ | $H'_{POP}/H'_{SP}$ | $(H'_{SP}-H'_{POP})/H'_{SP}$ |
| OPM 5 | 0,000 | 0,156 | 0,168 | 0,052 | 0,049 | 2,006 | 0,047 | 1,213 | 0,219 | 0,435 | 1,103 | 0,394 | 0,606 |
| OPM 7 | 1,336 | 1,533 | 1,497 | 0,667 | 0,680 | 0,545 | 1,361 | 0,351 | 1,028 | 1,000 | 1,597 | 0,626 | 0,374 |
| OPM 18 | 2,466 | 1,430 | 0,908 | 0,278 | 0,170 | 0,000 | 0,164 | 0,046 | 0,000 | 0,607 | 1,167 | 0,520 | 0,480 |
| OPK 4 | 2,769 | 3,677 | 2,565 | 2,102 | 2,418 | 0,605 | 2,161 | 0,735 | 1,459 | 2,055 | 3,283 | 0,626 | 0,374 |
| OPK 7 | 2,001 | 1,677 | 1,368 | 0,451 | 0,767 | 0,468 | 1,059 | 0,141 | 0,650 | 0,954 | 1,632 | 0,584 | 0,416 |
| OPK 8 | 0,617 | 0,285 | 0,141 | 0,834 | 1,140 | 0,133 | 0,211 | 0,093 | 0,500 | 0,439 | 0,998 | 0,440 | 0,560 |
| OPK 10 | 0,664 | 0,320 | 0,427 | 0,340 | 0,000 | 1,019 | 0,557 | 0,490 | 1,326 | 0,571 | 0,943 | 0,606 | 0,394 |
| OPK 16 | 3,165 | 3,816 | 4,993 | 1,512 | 3,442 | 2,505 | 3,424 | 0,701 | 3,398 | 2,995 | 4,383 | 0,683 | 0,317 |
| OPL 14 | 2,528 | 1,515 | 2,569 | 1,008 | 1,258 | 2,229 | 1,949 | 2,056 | 1,472 | 1,843 | 2,693 | 0,684 | 0,316 |
| OPL 16 | 3,443 | 3,083 | 2,537 | 2,907 | 2,955 | 2,109 | 2,002 | 1,787 | 2,430 | 2,584 | 4,685 | 0,551 | 0,449 |
| OPN 4 | 1,674 | 2,427 | 1,277 | 1,573 | 1,892 | 1,807 | 1,410 | 0,763 | 1,739 | 1,618 | 2,537 | 0,638 | 0,362 |
| OPN 8 | 1,664 | 1,100 | 0,908 | 0,352 | 0,320 | 0,865 | 0,800 | 1,231 | 0,834 | 0,897 | 1,794 | 0,500 | 0,500 |
| OPN 9 | 2,755 | 3,226 | 2,345 | 1,728 | 2,959 | 1,625 | 2,533 | 0,961 | 2,761 | 2,321 | 3,695 | 0,628 | 0,372 |
| **Media** | **1,929** | **1,865** | **1,669** | **1,062** | **1,388** | **1,224** | **1,360** | **0,813** | **1,370** | **1,409** | **2,347** | **0,575** | **0,425** |
| **Total** | **25,083** | **24,244** | **21,702** | **13,804** | **18,050** | **15,917** | **17,678** | **10,569** | **17,816** | **18,318** | **30,511** | **7,481** | **5,519** |

**Tabla 23.- Repartición de la variabilidad genética estimada con el Indice de Shannon entre los componentes intra ($H'_{POP}/H'_{SP}$) e interpoblacional ($(H'_{SP}-H'_{POP})/H'_{SP}$) en las poblaciones de *G. canariense* analizadas.**

### 4.1.8.2.2. Dendrograma UPGMA.

A partir de la matriz de similitudes entre parejas de individuos se realizó un árbol por el método UPGMA. Se obtuvieron un total de cuatro dendrogramas muy similares entre ellos, por lo que se eligió una única topología como representante (Figura 28,29).

Aunque se ensayaron otras similitudes genéticas (coeficiente SM y coeficiente Jaccard) se obtuvieron resultados similares y se eligió el coeficiente de Dice porque este considera únicamente la presencia de bandas y coincidía en mayor medida con los resultados obtenidos en la diferenciación genética existente en la población.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

La primera división del árbol UPGMA es producida por un individuo de la población de TLVP1 de La Palma, el cuál está fuertemente diferenciado del resto de las poblaciones. A continuación aparece un segundo grupo (Grupo A), también bien diferenciado del resto, que engloba a individuos de PBP1 (Tenerife), HP1 (La Gomera) y de BBS1 y AP3 (Gran Canaria).

La quinta división del árbol (Figura 29) da lugar a agrupaciones mas grandes. Un grupo pequeño que separa a los individuos de la población de Bocabarranco (BBS1) y un grupo grande que agrupa, a su vez, varios grupos. Dentro de este asociación, el primer grupo corresponde a individuos de las poblaciones de BBS2 y AP3, el segundo grupo a individuos que pertenecen a las poblaciones de PCP3 y GAS2P1 (Tenerife), FP1 (La Palma) y Hermigua (La Gomera). Y por último, el tercer conjunto agrupa a los individuos de las poblaciones de PBP1 (Tenerife) y TLVP1 (La Palma). Destacando que existe un elevado grado de mezcla para los individuos de las poblaciones de Tenerife, La Palma y La Gomera dado que no forman agrupaciones evidentes que agrupan a todos los individuos de cada una de las poblaciones de las mencionadas islas.

#### 4.1.8.2.3. Análisis de Componentes Principales.

El análisis de componentes principales (Figura 30) separa claramente las poblaciones de Gran Canaria (BBS1, BBS2 y AP3) del resto de las poblaciones analizadas, las cuales se agruparon independientemente de la isla de procedencia, con excepción de PCP3 y GAS2P1 que también se agruparon. La representación gráfica de los tres primeros componentes, explica el 84,9 % de la varianza. Todas las poblaciones presentan valores positivos para la primera componente, mientras que para el segundo componente las poblaciones de Gran Canaria (BBS1, BBS2 y AP3) presentan valores positivos y el resto valores negativos, es decir, que la componente que explica el 11 % de la varianza separa las poblaciones de Gran Canaria del resto de las poblaciones.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

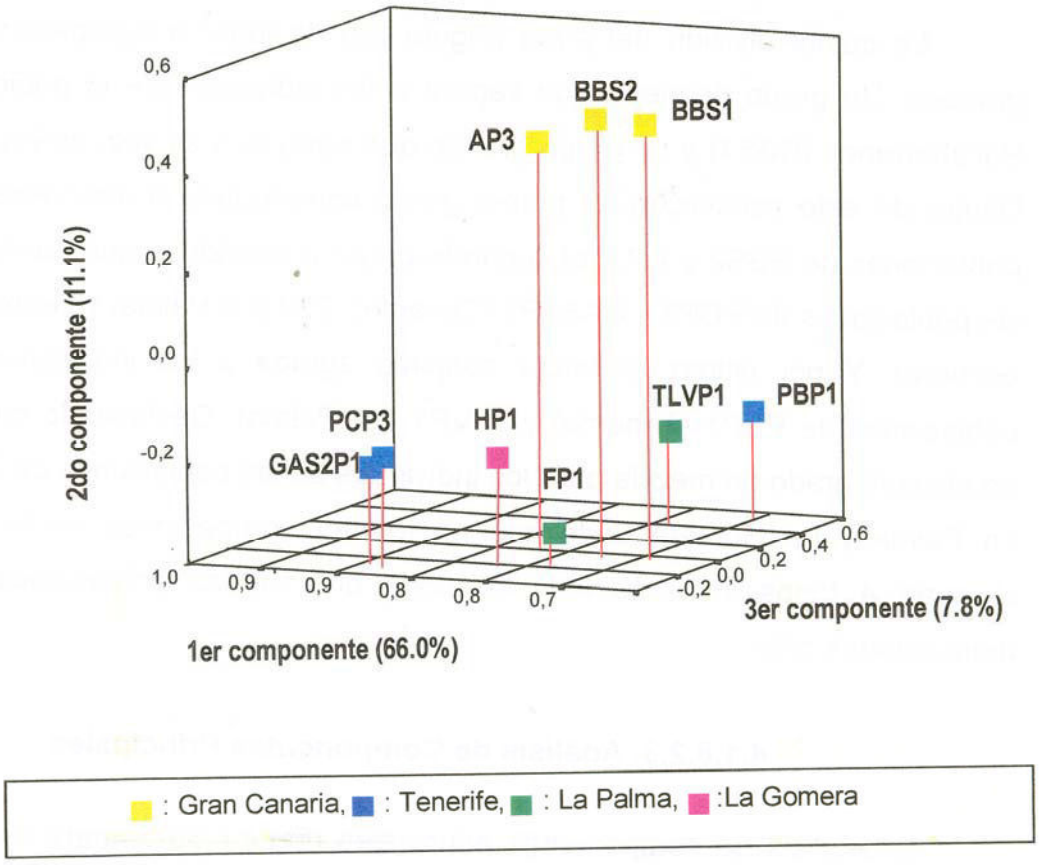



**Figura 30.- Análisis de componentes principales de las poblaciones analizadas en *Gelidium canariense*. BBS1: Bocabarranco, Población 1, Parcela 1; BBS2: Bocabarranco, Población 2, Parcela 1; AP3: Agaete, Parcela 3; PCP3: Puerto de la Cruz, Parcela 3; GAS2P1: Garachico, Población 2, Parcela 1; FP1: Faro, Parcela 1; HP1: Hermigua, Parcela 1.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

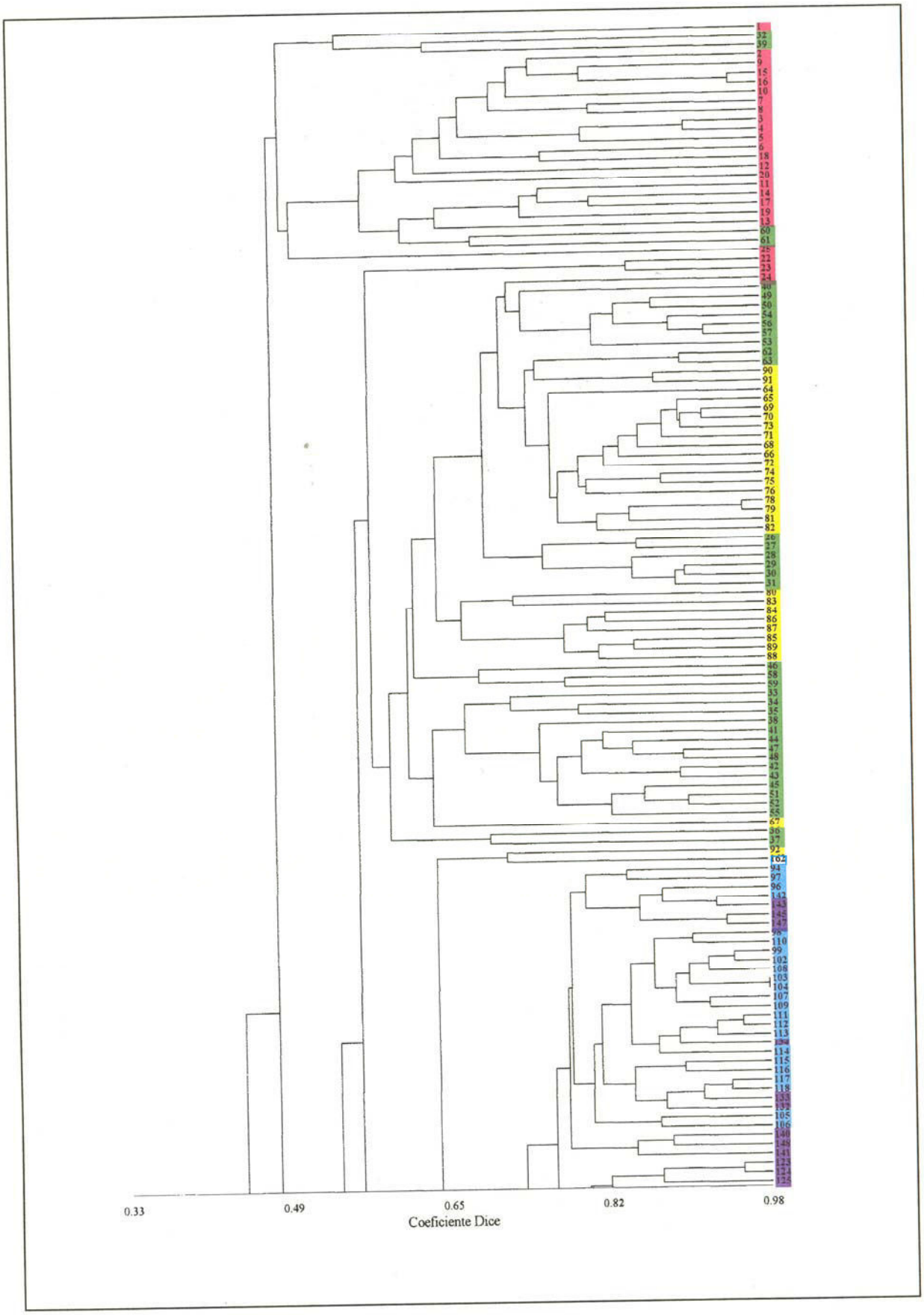



**Figura 28. Primera parte del dendrograma UPGMA basado en el coeficiente de Dice de 252 individuos analizados en *Gelidium canariensis*. BBS1: ; BBS2: , AP3: ; PCP3: ; GAS2P1: ; PBP1: ; FP1: ; TLVP1: ; HP1: .**

©Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**Figura 29. Segunda parte del dendrograma UPGMA basado en el coeficiente de Dice de 252 individuos analizados en *Gelidium canariensis*.BBS1: ■ ; BBS2: ■ , AP3: □ ; PCP3: □ ; GAS2P1: ■; PBP1: □ ; FP1: □ ; TLVP1: □; HP1: □.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.1.8.2.4. Aislamiento por distancia.

Para comprobar la existencia de aislamiento genético por distancia se relacionaron los valores de $F_{ST}$ con la distancia geográfica existente entre todas las poblaciones de *Gelidium canariense* (Figura 31) mediante el test de Mantel (Mantel 1967). Este análisis generó un coeficiente de correlación (R) de 0,35 con una probabilidad de P=0,02. Por lo tanto, existe un ligero aislamiento por distancia, que unido a otros factores biológicos, ecológicos e históricos determinan la diferenciación genética observada.

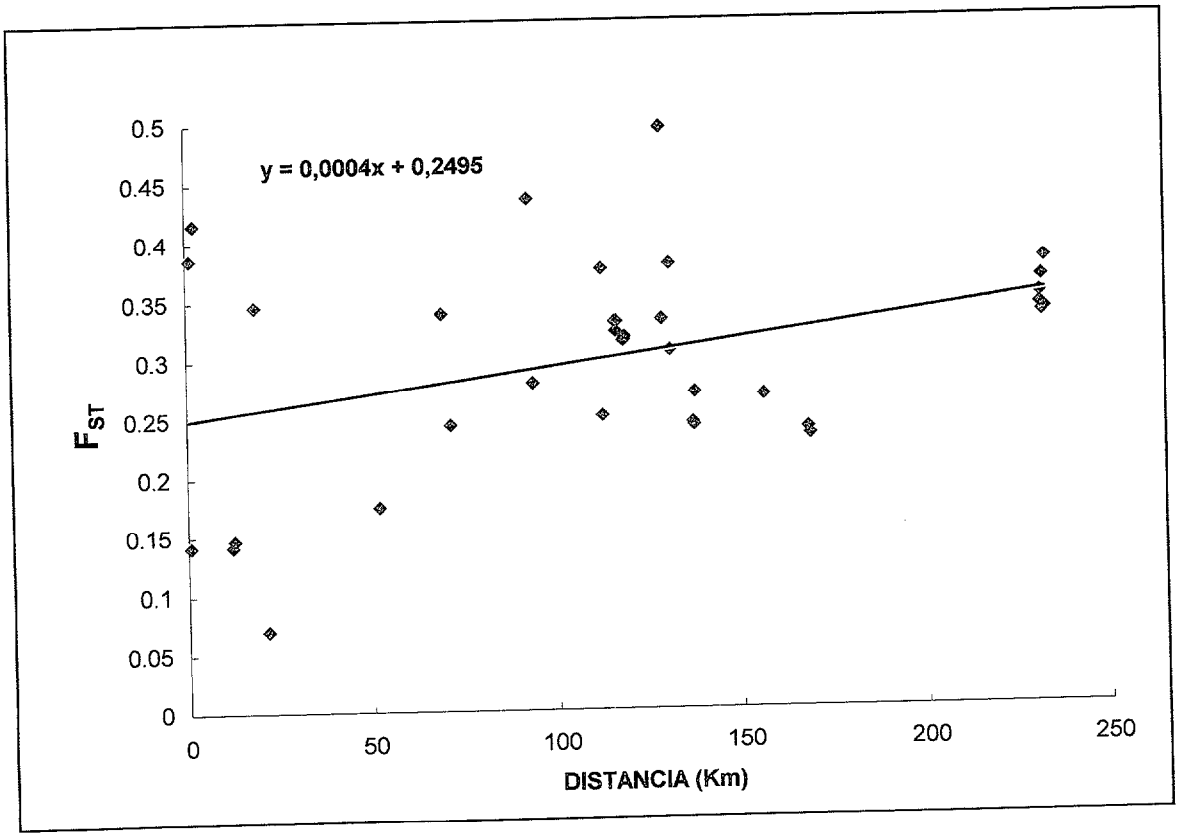



**Figura 31.- Variación de la distancia genética en relación a la distancia geográfica.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.1.8.2.5. Flujo genético entre poblaciones.

El cálculo del número de migrantes por generación (Tabla 24) como una medida del flujo genético entre las poblaciones, reveló que las poblaciones de Gran Canaria intercambian más migrantes entre ellas que con otras islas, presentaban valores de M que van desde 3 entre BBS2 y BBS1 y 1 entre PCP3 y AP3. Sin embargo, las poblaciones PCP3 y GAS2P1 de Tenerife intercambian el mayor número de migrantes (M= 6.53), aunque GAS2P1 tiene también un considerable valor de M con HP1 en la Gomera (M= 2.34). Estas estimaciones no parecen estar correlacionadas con el número absoluto de bandas compartidas entre poblaciones.

Respecto a los valores de flujo medio de cada generación las poblaciones de Gran Canaria tiene el valor mas alto (2.95) y las poblaciones de La Palma el valor mas bajo (0.79). Destaca el alto valor encontrado para las poblaciones de La Gomera y Tenerife (1.61) y La Gomera y Gran Canaria (1.52).

La Tabla 24 muestra los valores del coeficiente de diferenciación genética obtenidos para las diferentes poblaciones analizadas. Las distancias genéticas entre los pares de poblaciones se expresaron como valores $\Phi_{ST}$ los cuales son estimaciones directas de los coeficientes de diferenciación $F_{ST}$ (Excoffier *et al.* 1992)

El rango del coeficiente de diferenciación $F_{ST}$ varia ampliamente entre todas las poblaciones analizadas, se obtuvieron valores desde 0.071 entre la población de Garachico (GAS2P1) de Tenerife y Puerto de la Cruz (Tenerife) hasta 0.496 entre las poblaciones de Puerto de la Cruz (PCP3) y Talavera (TLVP1).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Por islas se obtienen valores medios que varían entre 0.145 para las poblaciones de Gran Canaria y 0.387 entre las poblaciones de La Palma. Destacando el valor medio de distancia entre Gran Canaria y La Gomera (0.248) y la alta diferenciación genética entre las poblaciones de la isla de La Palma (0.387).

| | BBS1 | BBS2 | AP3 | PCP3 | GAS2P1 | PPB1 | FP1 | TLVP1 | HP1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BBS1** | | 2.99 | 2.99 | 1.00 | 1.53 | 1.08 | 0.92 | 0.96 | 1.58 |
| **BBS2** | 0.143 | | 2.87 | 1.00 | 1.34 | 1.06 | 0.99 | 0.87 | 1.62 |
| **AP3** | 0.143 | 0.148 | | 1.04 | 1.55 | 1.07 | 0.98 | 0.81 | 1.36 |
| **PCP3** | 0.332 | 0.332 | 0.324 | | 6.53 | 0.70 | 1.00 | 0.51 | 1.53 |
| **GAS2P1** | 0.245 | 0.272 | 0.243 | 0.0711 | | 0.93 | 1.48 | 0.82 | 2.34 |
| **PPB1** | 0.316 | 0.319 | 0.317 | 0.417 | 0.347 | | 0.81 | 1.12 | 0.97 |
| **FP1** | 0.351 | 0.335 | 0.338 | 0.333 | 0.252 | 0.380 | | 0.79 | 1.28 |
| **TLVP1** | 0.342 | 0.365 | 0.381 | 0.496 | 0.377 | 0.307 | 0.387 | | 0.64 |
| **HP1** | 0.240 | 0.235 | 0.269 | 0.245 | 0.176 | 0.340 | 0.281 | 0.436 | |

**Tabla 24. Diferenciación genética ($F_{ST}$) entre las siete poblaciones de *G. Canariense* los valores por debajo de la diagonal. Los valores por encima de la diagonal corresponden al número de migrantes entre las distintas poblaciones.**

El $\Phi_{ST}$ análogo al $F_{ST}$ medio entre poblaciones fue de 0,320 (Tabla 24) y altamente significativo. Este valor también es comparable con el $G''_{ST}$ de Shannon de 0,387 (Tabla 17). Estos valores de $G''_{ST}$ o $F_{ST}$ (rango de 0 a 1) son indicativos en general, de una fuerte diferenciación entre poblaciones y un escaso flujo genético interpoblacional.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El dendrograma Neighbour-Joining (Figura 32) obtenido a partir del coeficiente de diferenciación genética es coincidente con los resultados del UPGMA y del Análisis de Componentes Principales. Este árbol muestra tres grupos. El primero, agrupa a las poblaciones de Gran Canaria (BBS1, BBS2 y AP3); el segundo grupo engloba a dos poblaciones de Tenerife (PCP3 y GAS2P1), a la población de La Palma (FP1), y a la única población de La Gomera (HP1). El tercer grupo independiente de los anteriores, agrupa a la población de La Palma, Talavera (TLVP1) y a la población de Tenerife, Punta Brava (PBP1).

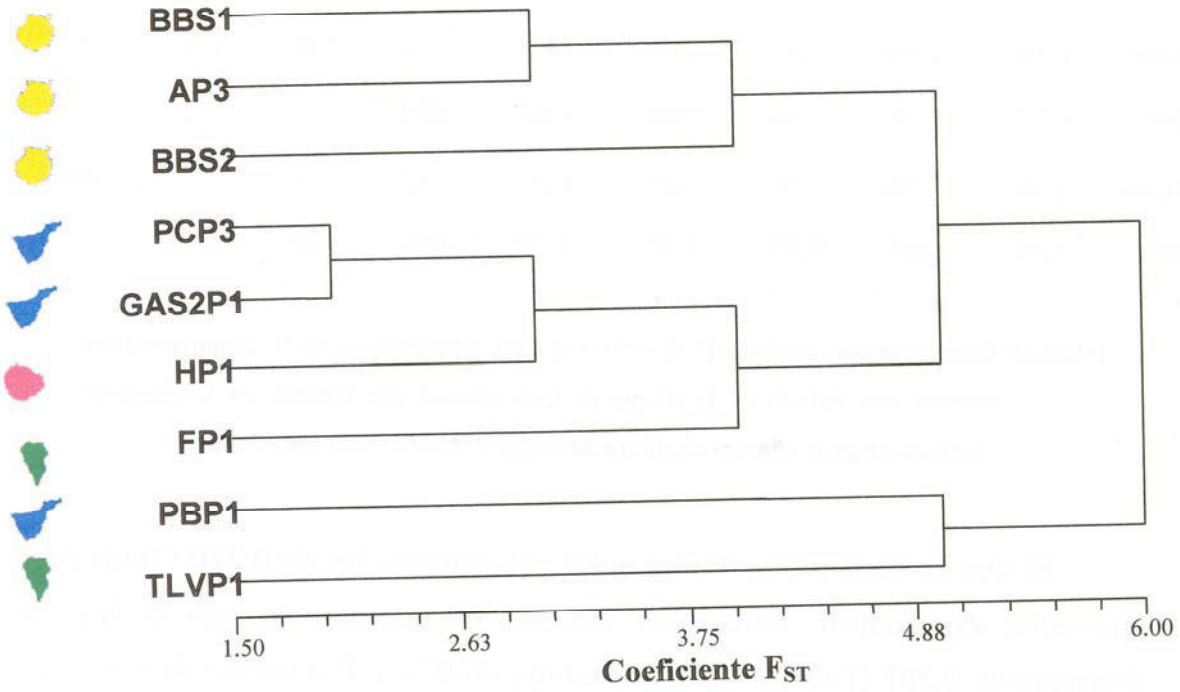



**Figura 32.- Dendrograma Neighbour-Joining basado en el coeficiente de diferenciación $F_{ST}$.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.1.8.3. Estructuración intrapoblacional.

La estructura espacial o relación de la variación de RAPDs en las poblaciones de *Gelidium canariense* fue determinada por el índice de Moran, I (Sokal & Oden 1978). El índice de Moran cuantifica la similitud genética de cada par de individuos espacialmente adyacentes con relación a la muestra de la población como un todo. Este análisis fue llevado a cabo en seis poblaciones de *G. canariense* procedentes de islas diferentes. Las poblaciones de Punta Brava (PPB1) y Talavera (TLVP1) no se incluyeron en el análisis porque no se disponía de las coordenadas de los individuos necesarias para llevar a cabo el análisis. La población de Hermigua (HP1) de La Gomera fue excluida del análisis, debido al escaso número de individuos estudiados.

En este análisis se utilizó la matriz de datos de quince cebadores ( OPM 5, OPM 7, OPM 18, OPM 20, OPK 4, OPK 6, OPK 7, OPK 8, OPK 10, OPK 16, OPL14, OPL 16, OPN 4, OPN 8, OPN 9) y se eliminaron aquellos que eran monomórficos para cada una de las poblaciones analizadas.

En el análisis del Indice de Moran para las seis poblaciones a través de cinco clases de distancia, el número de bandas que dieron correlogramas significativos variaron entre las distintas poblaciones, encontrándose desde siete bandas en Garachico (GAS2P1) hasta dieciséis bandas en Bocabarranco (BBS2).

En la población de Agaete (AP3 ) de Gran Canaria se observó una fuerte correlación positiva en las dos primeras clases de distancia (0-1,5 m) (Figura 33) la cual va disminuyendo a medida que aumentaba la distancia considerada entre los individuos. El punto de corte con el eje de abscisas, que delimita el radio del área homogénea donde los individuos están genéticamente emparentados entre sí, se sitúa en el límite superior de la segunda clase, lo que equivale a 1,5 m de distancia.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En las dos primeras clases de distancia hay diecinueve fenotipos que presentan valores significativos positivos, mientras que en las tres últimas clases de distancia el número de alelos que presentan valores significativos negativos llega a diecinueve. Además, hasta doce fenotipos (M20-3, K4-1, K4-4, K7-1, K7-3, K10-1, K16-2, K16-6, K16-7, K16-9, L16-7, N8-2) presentaron correlogramas estadísticamente significativos ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.005$) (Figura 33).

En la población de Puerto de la Cruz (PCP3) (Figura 34) también se detectó una importante correlación positiva en las dos primeras clases de distancia (0- 1 m), denotando una disminución de la correlación hasta alcanzar valores negativos por encima de la segunda clase de distancia y cortando el eje de abscisas en este punto, lo que supone un radio del área homogénea cercano a 1 m.

En la tabla de valores de la I de Moran para las cinco clases de distancia consideradas en esta población la mayoría de los alelos significativos (M20-3, K6-3, K6-4, K6-7, K7-10, K16-9, L16-3, L16-4, N9-2, N9-7, N9-9 ) para las dos primeras clases presentaban valores positivos, mientras que la mayoría de los alelos significativos (K4-15, K16-9, N9-9, M20-3, K6-3, K7-3, L16-1, L16-3, N9-2, K4-6, K16-9, N9-7) para las últimas clases de distancia consideradas presentaban valores negativos. Once alelos de un total de veintisiete alelos analizados presentaban correlogramas estadísticamente significativos ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0,001$) para esta población (M20-3, K6-3, K6-7, K4-6, K7-3, K16-9, L16-1, L16-3, N9-2, N9-7, N9-9) (Figura 34).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

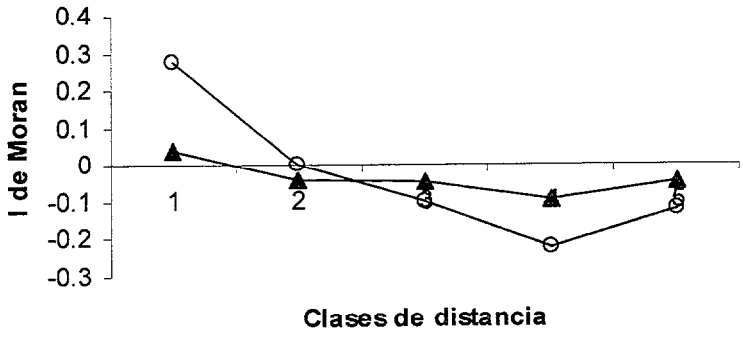
Por otro lado, el análisis de autocorrelación espacial de la población de Faro (FP1) también mostraba la existencia de estructuración intrapoblacional (Figura 35). Existe igualmente correlación positiva para las dos primeras clases de distancia (0-4,5 m), y el punto de corte con el eje de abscisas coincide de nuevo con el límite superior de la segunda clase de distancia, siendo en este caso de 4,5 m. Los alelos significativos para la primera y segunda clases de distancia (M20-8, K4-8, K4-9, K8-2, L14-9, N4-6. N9-9, N9-11), en general, mostraron valores positivos, en tanto que a partir de la segunda clase los alelos significativos presentaban valores negativos (Figura 35). De esta forma, ocho alelos analizados (M20-8, K6-4, K8-2, K16-1, L14-9, N4-6, N8-7, N9-11) exhibieron correlogramas estadísticamente significativos en esta población.

En el caso de la poblaciones de Bocabarranco (BBS1 y BBS2) de Gran Canaria mostraron valores de la I de Moran más bajos en la primera clase de distancia (0-2.72 m y 0-5 m respectivamente) y no presentan una declinación monotónica regular al incrementar la distancia (Figura 36 y 37).

En la población de Garachico (GAS2P1) de Tenerife tampoco se detectó la existencia de estructuración intrapoblacional (Figura 33) dado que no se observó correlación positiva en la primera clase de distancia. Por otro lado, tampoco se detectaron alelos positivos o significativos para esta clase lo que es también, un reflejo de la inexistencia de estructuración en esta población (Figura 38).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**A**



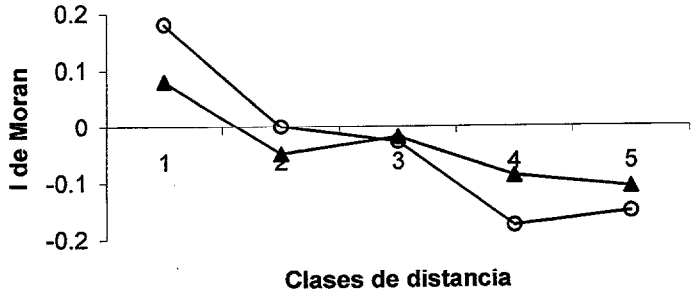

**B**

| | Clases de distancia | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Nº parejas | 81 | 81 | 81 | 81 | 82 |
| Limites clases (m) | 0-1 | 1-1.5 | 1.5-2.5 | 2.5-4 | 4-6.5 |
| Marcador | | | | | |
| M20-3** | 0.24** | 0.06 | 0.08 | -0.30** | -0.25** |
| K4-1** | 0.23** | -0.15 | -0.05 | -0.24* | 0.04 |
| K4-4*** | 0.38** | 0.22** | 0.25** | -0.30** | -0.72** |
| K7-1** | 0.07 | 0.01 | -0.13 | 0.12* | -0.24** |
| K7-3*** | 0.59** | -0.15 | -0.19 | -0.40** | -0.02 |
| K10-1*** | 0.37** | 0.11 | -0.31** | -0.43** | 0.08* |
| K16-2** | 0.12* | 0.03 | -0.04 | -0.05 | -0.24** |
| K16-6*** | 0.46** | 0.12* | -0.26** | -0.42** | -0.08 |
| K16-7** | 0.23** | 0.05 | -0.06 | -0.27** | -0.12 |
| K16-9*** | 0.33** | 0.05 | -0.17 | -0.42** | 0.03 |
| L16-7* | 0.13* | -0.27** | -0.07 | 0.04 | 0.00 |
| N8-2* | 0.16* | -0.07 | -0.26** | -0.06 | 0.06 |
| $\overline{X}_T$ | 0.04 | -0.04 | -0.045 | -0.095 | -0.045 |
| $\overline{X}_A$ | 0.275 | 0.0008 | -0.1 | -0.227 | -0.121 |

**Figura 33. A: Análisis de autocorrelación espacial de la población de AP3, para cinco primeras clases de distancia, mostrando los valores medios de los marcadores analizados (▲) y los valores medios de los marcadores estadísticamente significativos (○). B: Valores de I de Moran para los marcadores significativos, mostrando el número de parejas de individuos encontrados en cada clase de distancia, los límites en metros de las diferentes clases de distancia. $\overline{X}_T$ : Media general: $\overline{X}_A$: Media de marcadores significativos. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p<0.001$.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**A**



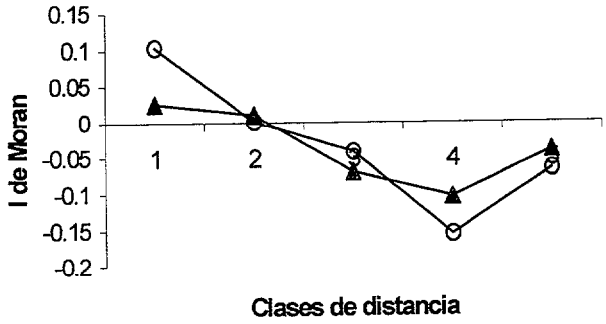

**B**

| | Clases de distancia | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| **Nº parejas** | 70 | 70 | 70 | 70 | 71 |
| **Limites Clases (m)** | 0-0.5 | 0.5-1 | 1-1.6 | 1.6-2.7 | 2.7-4.3 |
| **Marcador** | | | | | |
| M20-3** | 0.23** | 0.00 | -0.12 | 0.34** | 0.04 |
| K6-3* | 0.23** | -0.08 | 0.14 | -0.24* | -0.22* |
| K6-7* | 0.29** | -0.27* | -0.02 | -0.19 | -0.01 |
| K4-6*** | 0.07 | 0.07 | 0.15* | -0.03 | 0.44** |
| K7-3*** | 0.06 | 0.10 | 0.15* | -0.41** | -0.08 |
| K16-9* | 0.18* | 0.10 | -0.31** | 0.02 | -0.19* |
| L16-1** | 0.04 | -0.06 | 0.10 | -0.32** | 0.05 |
| L16-3** | 0.17* | 0.06 | -0.17 | 0.34** | 0.10* |
| N9-2*** | 0.32** | 0.22** | 0.02 | -0.22* | -0.52** |
| N9-7** | 0.18* | -0.04 | -0.04 | 0.01 | -0.28** |
| N9-9* | 0.23** | -0.15 | -0.21* | 0.10 | -0.15 |
| $\overline{X}_T$ | 0.08 | -0.05 | -0.02 | -0.09 | -0.11 |
| $\overline{X}_A$ | 0.18 | -0.0004 | -0.028 | -0.178 | -0.154 |

**Figura 34. A: Análisis de autocorrelación espacial de la población de PCP3, para las primeras cinco clases de distancia, mostrando los valores medios de los marcadores analizados (▲) y los valores medios de los marcadores estadísticamente significativos (○). B: Valores de I de Moran para los marcadores significativos, mostrando el número de parejas de individuos encontrados en cada clase de distancia, los límites en metros de las diferentes clases de distancia. $\overline{X}_T$ : Media general: $\overline{X}_A$: Media de marcadores significativos**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**A**



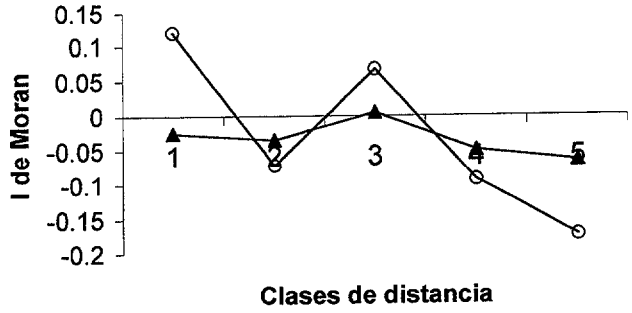

**B**

| | Clases de distancia | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Nº parejas | 87 | 87 | 87 | 87 | 87 |
| Limites clases (m) | 0-2.3 | 2.3-4.5 | 4.5-7.9 | 7.9-10.1 | 10.1-21.5 |
| **Marcador** | | | | | |
| M20-8* | 0.14* | 0.00 | -0.11 | -0.26** | 0.06 |
| K6-4* | -0.09 | 0.03 | 0.14* | -0.26** | 0.00 |
| K8-2*** | 0.30** | -0.12 | -0.09 | -0.14 | -0.12 |
| K16-1* | 0.02 | 0.08 | -0.28** | -0.03 | 0.05 |
| L14-9* | 0.07 | -0.25** | 0.18** | -0.24* | 0.07 |
| N4-6* | 0.19** | -0.03 | -0.08 | -0.16 | -0.09 |
| N8-7 * | 0.07 | 0.11 | 0.02 | -0.13 | -0.23** |
| N9-11** | 0.13* | 0.12* | -0.12 | -0.03 | -0.27 |
| $\overline{X}_T$ | 0.025 | 0.01 | -0.07 | -0.105 | -0.04 |
| $\overline{X}_A$ | 0.103 | 0.0007 | -0.042 | -0.156 | -0.066 |

**Figura 35. A: Análisis de autocorrelación espacial de la población de FP1, para las primeras cinco clases de distancia, mostrando los valores medios de los marcadores analizados (▲) y los valores medios de los marcadores estadísticamente significativos (○). B: Valores de I de Moran para los marcadores significativos, mostrando el número de parejas de individuos encontrados en cada clase de distancia, los límites en metros de las diferentes clases de distancia. $\overline{X}_T$ : Media general: $\overline{X}_A$: Media de marcadores significativos.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**A**



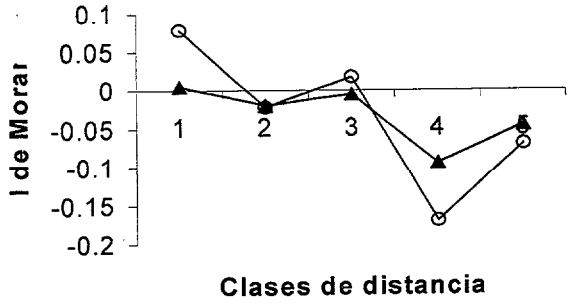

**B**

| | Clases de distancia | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| **Nº parejas** | 99 | 99 | 99 | 99 | 100 |
| **Limites clases (m)** | 0-2.72 | 2.7-5.4 | 5.4-6.8 | 6.8-10.2 | 10.2-21.1 |
| **Marcador** | | | | | |
| M20-5* | 0.17** | -0.06 | -0.06 | -0.06 | -0.16* |
| M18-3** | 0.14* | -0.12 | 0.26** | -0.23* | -0.19* |
| M18-4* | 0.06 | 0.01 | 0.17* | -0.19* | -0.20** |
| K6-3** | 0.21** | -0.33** | 0.09 | 0.06 | -0.15 |
| K4-3** | 0.08 | 0.02 | 0.06 | -0.28** | -0.05 |
| K7-3** | 0.22** | 0.18** | -0.18* | -0.25** | -0.12 |
| K16-2** | 0.04 | -0.26** | 0.02 | 0.14* | -0.09 |
| L16-1* | 0.15* | -0.16 | 0.03 | 0.05 | -0.22** |
| N4-4* | 0.11* | -0.18* | 0.20** | -0.10 | -0.19* |
| N9-5*** | 0.02 | 0.19** | 0.08 | -0.07 | -0.37** |
| $\overline{X}_T$ | -0.025 | -0.035 | 0.005 | -0.05 | -0.065 |
| $\overline{X}_A$ | 0.12 | -0.072 | 0.067 | -0.093 | -0.174 |

**Figura 36. A: Análisis de autocorrelación espacial de la población de BBS1, para las primeras cinco clases de distancia, mostrando los valores medios de los marcadores analizados (○) y los valores medios de los marcadores estadísticamente significativos (▲). B: Valores de I de Moran para los marcadores significativos, mostrando el número de parejas de individuos encontrados en cada clase de distancia, los límites en metros de las diferentes clases de distancia. $\overline{X}_T$ : Media general: $\overline{X}_A$: Media de marcadores significativos. *: p < 0.05, **: p <0.01, ***: p<0.001.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**A**



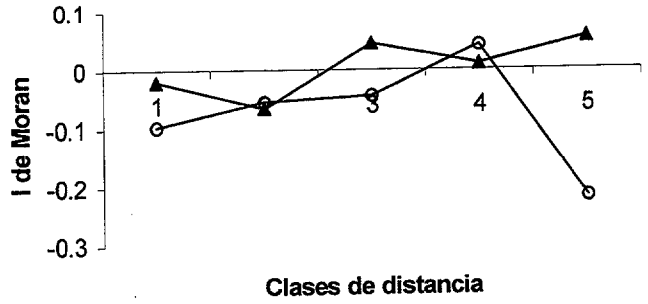

**B**

| | Clases de distancia | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| **Nº parejas** | 99 | 99 | 99 | 99 | 100 |
| **Limites clases (m)** | 0-5 | 5-8 | 8-11 | 11-16 | 16-28 |
| **Marcador** | | | | | |
| M20-2* | -0.16 | -0.17 | 0.22** | -0.15 | 0.04 |
| M20-5* | 0.05 | -0.04 | -0.23** | 0.13* | -0.05 |
| M18-1* | -0.11 | 0.20** | -0.17 | -0.06 | -0.03 |
| K6-3** | 0.08 | 0.18** | -0.17 | 0.05 | -0.29 |
| K6-4* | 0.17** | 0.02 | -0.07 | -0.24* | -0.05 |
| K6-6* | 0.01 | 0.03 | 0.13* | -0.27 | 0.06 |
| K4-5* | -0.05 | -0.15 | 0.21** | -0.21* | 0.03 |
| K4-7*** | 0.24** | -0.22 | 0.30** | 0.45** | -0.04 |
| K7-2*** | 0.05 | 0.12* | -0.08 | 0.10 | 0.35** |
| K10-2** | 0. I8 ** | -0.11 | 0.07 | -0.33** | 0.03 |
| K16-2* | 0.14* | -0.27** | 0.11* | -0.24** | 0.10* |
| K16-5*** | 0.30** | 0.16* | -0.16 | 0.01 | 0.01 |
| K16-6* | 0.00 | 0.01 | 0.03 | 0.04 | -0.24** |
| L16-5* | 0.19** | 0.05 | -0.06 | -0.16 | -0.17* |
| N8-1** | 0.00 | -0.23* | 0.21** | -0.07 | -0.10 |
| N8-2*** | 0.17* | 0.06 | -0.04 | -0.41** | 0.04 |
| $\overline{X}_T$ | 0.005 | -0.02 | -0.005 | -0.095 | -0.045 |
| $\overline{X}_A$ | 0.078 | -0.022 | 0.018 | -0.171 | -0.07 |

**Figura 37. A: Análisis de autocorrelación espacial de la población de BBS2, para las primeras cinco clases de distancia, mostrando los valores medios de los marcadores analizados (▲) y los valores medios de los marcadores estadísticamente significativos (○). B: Valores de I de Moran para los marcadores significativos, mostrando el número de parejas de individuos encontrados en cada clase de distancia, los límites en metros de las diferentes clases de distancia. $\overline{X}_T$: Media general: $\overline{X}_A$: Media de marcadores significativos.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**A**




**B**

| | Clases de distancia | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 45 | 5 |
| **Nº parejas** | 87 | 87 | 87 | 87 | 87 |
| **Limites clases (m)** | 0.81 | 1.08 | 2.97 | 4.32 | 8.37 |
| **Marcador** | | | | | |
| M20-3** | 0.16* | -0.13 | -0.31** | 0.24** | -0.17 |
| M20-5* | 0.01 | -0.05 | -0.13 | 0.17** | -0.20* |
| K6-3*** | 0.16* | 0.02 | 0.09 | -0.12 | -0.30** |
| K4-6*** | 0.11 | -0.19* | 0.11* | 0.11* | -0.31** |
| K4-15* | 0.05 | -0.04 | -0.04 | 0.05 | -0.19** |
| K16-13** | 0.17* | 0.02 | 0.05 | -0.29** | -0.12 |
| L14-13* | 0.02 | -0.01 | -0.08 | 0.14* | -0.26** |
| $\overline{X}_T$ | -0.02 | -0.065 | 0.045 | 0.01 | 0.055 |
| $\overline{X}_A$ | -0.097 | -0.054 | -0.044 | 0.042 | -0.22 |

**Figura 38. A: Análisis de autocorrelación espacial de la población de GAS2P1, para las primeras cinco clases de distancia, mostrando los valores medios de los marcadores analizados (▲) y los valores medios de los marcadores estadísticamente significativos (○). B: Valores de I de Moran para los marcadores significativos, mostrando el número de parejas de individuos encontrados en cada clase de distancia, los límites en metros de las diferentes clases de distancia. $\overline{X}_T$ : Media general: $\overline{X}_A$: Media de marcadores significativos.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.1.9. Análisis comparativo de *bulks* poblacionales e individuos haploides.

#### 4.1.9.1. Nivel de polimorfismo.

En el análisis de *bulks* poblacionales se obtuvo un total de 69 marcadores con tamaños comprendidos entre 300 (OPN 4, OPN 9) y 2100 pb (OPK 10, OPL 16) (Tabla 25), de los cuáles 38 (55 %) fueron polimórficos. El número medio de marcadores por cebador fue de 6 y estuvo comprendido entre 3 (OPK 8) y 12 (OPK 4). De los 12 cebadores analizados, los que presentaron menor polimorfismo fueron OPK 8 y OPL 14 con un 33% de marcadores polimórficos de un total de 3, mientras que el cebador OPK4, fue el más variable con un 75% de marcadores polimórficos de un total de 12. El número de marcadores exclusivos fue mayor en la población de PCP3 (13), seguido de la población de BBS1 (5) y Agaete (3).

Sin embargo, en el análisis de individuos haploides se obtuvo un total de 99 marcadores con pesos moleculares comprendidos entre 250 (OPL 14) y 2000 pb (OPM 7, OPK 7, OPL 16), de los cuáles, 98 fueron polimórficos (99 % de polimorfismo) (Tabla 25). El número medio de marcadores por cebador fue de 8 y estuvo comprendido entre 2 (OPK 10) y 11 (OPK 4 y OPK 7). En la mayoría de los cebadores el polimorfismo fue del 100%, excepto para el cebador OPN 9 que generó el 90%. A diferencia del análisis anterior, sólo se obtuvieron dos marcadores exclusivos, OPN 4-500 exclusivo de las poblaciones de Gran Canaria y OPN 9- 350 exclusivo de la población de Tenerife (Tabla 26).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| Cebador | *Bulks* poblacionales | | | | Individuos haploides | | | | % S |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tamaño (pb) | NF | PF | % P | Tamaño (pb) | NF | PF | % P | |
| OPM 7 | 500-550 | 2 | 1 | 50 | 550-2000 | 6 | 6 | 100 | 33 |
| OPM 18 | 450-2000 | 4 | 2 | 50 | 450-1400 | 6 | 6 | 100 | 50 |
| OPK 4 | 400-2000 | 12 | 9 | 75 | 400-1800 | 11 | 11 | 100 | 73 |
| OPK 7 | 400-2000 | 10 | 5 | 50 | 400-2000 | 11 | 11 | 100 | 82 |
| OPK 8 | 700-1100 | 3 | 1 | 33 | 700-1300 | 5 | 5 | 100 | 60 |
| OPK 10 | 550-2100 | 5 | 2 | 40 | 550-1200 | 2 | 2 | 100 | 50 |
| OPK 16 | 600-1500 | 7 | 4 | 57 | 400-1700 | 13 | 13 | 100 | 46 |
| OPL 14 | 700-1100 | 3 | 1 | 33 | 250-1500 | 10 | 10 | 100 | 30 |
| OPL 16 | 450-2100 | 8 | 4 | 50 | 550-2000 | 10 | 10 | 100 | 50 |
| OPN 4 | 300-1300 | 5 | 2 | 40 | 500-1300 | 9 | 9 | 100 | 44 |
| OPN 8 | 500-1000 | 3 | 2 | 67 | 500-1200 | 6 | 6 | 100 | 50 |
| OPN 9 | 300-900 | 7 | 5 | 71 | 300-1500 | 10 | 9 | 90 | 50 |
| TOTAL | | 69 | 38 | 55 | | 99 | 98 | 99 | 53 |

**Tabla 25. Cebadores empleados, peso molecular, número de fragmentos obtenidos (NF), número de fragmentos polimórficos (PF), porcentaje de polimorfismo (%P) y porcentaje de similitud de marcadores (%S) en el análisis comparativo de *bulks* poblacionales e individuos haploides en *G. canariense*.**

| | | |
|---|---|---|
| ***Bulks* Poblacionales** | PCP3 | OPM 18 - 600, OPK 4 – 1900, OPK 4 – 1100, OPK 4 – 800, OPK 4 – 450, OPK 7 – 1100, OPK 7 – 1000, OPK 7 – 900, OPK 16 – 1300, OPK 16 – 900, OPL 16 – 450, OPN 4 – 300, OPN 9 - 500 |
| | AP3 | OPN 9 - 850, OPN 9 - 550, OPN 9 - 400 |
| | BBS1 | OPK 4 - 400, OPK 7 - 200, OPK 10 - 2100, OPL 16 - 2100, OPN 4 - 700 |
| **Individuos haploides** | PCP3 | OPN 9 – 350 |
| | AP3 | OPN 4 - 500 |
| | BBS1 | OPN 4 - 500 |

**Tabla 26.- Lista de marcadores RAPD exclusivos obtenidos en el análisis comparativo de *bulks* poblacionales e individuos haploides en *G. canariense*. Para cada marcador se indica el cebador que lo genera y el peso molecular (pb) del fragmento.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En general, en el estudio de individuos haploides se obtuvo un mayor grado de polimorfismo. La mayoría de los cebadores generaron un polimorfismo próximo al 100%, mientras que en el análisis de *bulks* poblacionales el polimorfismo observado fue menor y más heterogéneo. La diferencia de número de fragmentos entre ambos estudios fue de 30 marcadores, lo que indica una disminución aproximadamente del 30 % en el número de marcadores obtenidos en el análisis de *bulks* poblacionales. En cuanto al número de marcadores exclusivos también encontramos diferencias conspicuas entre los dos análisis, siendo el análisis de *bulks* poblacionales el que genera diez veces más marcadores exclusivos de población.

En cuanto al índice de similitud de marcadores obtenido comparando los pesos moleculares entre ambos estudios, se obtuvo un valor medio de 53% por cebador, es decir que el 53 por ciento de los marcadores fueron comunes a ambos estudios. Los valores de similitud por marcador estuvieron comprendidos entre 30% para OPL 14 y 82% OPK 7. Pero es muy posible que este valor esté subestimado, dado que los cebadores con un elevado número de marcadores (OPK 4, OPK 16) son difíciles de comparar al no haber realizado las electroforesis juntas. Además, hay que tener en cuenta que los estudios se realizaron en diferentes laboratorios, lo que puede haber originado mayores diferencias debido a las diferentes marcas de productos y aparataje.

#### 4.1.9.2. Patrones de similitud genética.

El patrón de similitud (Figura 39 y 40) obtenido en el análisis de *bulks* poblacionales difiere del obtenido en el análisis de individuos haploides. El UPGMA de *bulks* poblacionales agrupa las poblaciones de Gran Canaria: Bocabarranco (BBS1), Agaete (AP3) y las separa de la población de Puerto de la Cruz (PCP3) de Tenerife. Sin embargo, en el UPGMA del análisis individual de la fase haploide, en general los individuos de la población de Agaete (AP3) de Gran Canaria se agrupan con los individuos de Puerto de la Cruz (PCP3) de Tenerife. En cualquier caso todos los individuos de una misma población se agrupaban juntos con excepción del individuo AP3-29 (Figura 39).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

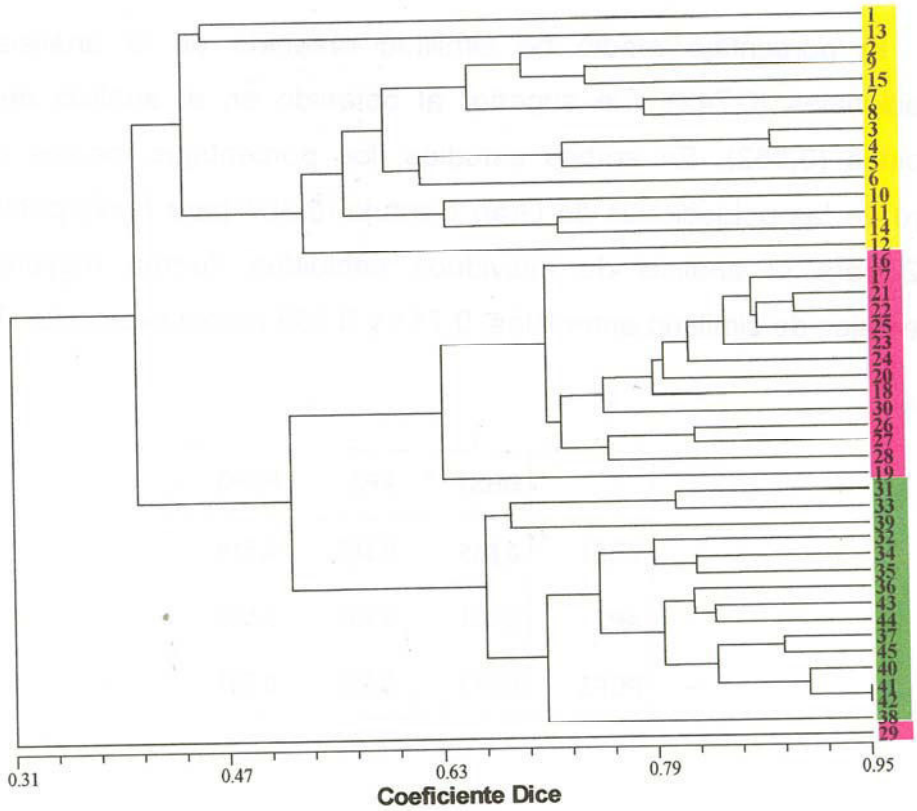



**Figura 39.- Dendrograma UPGMA basado en el coeficiente de Dice obtenido en el análisis de individuos haploides de *Gelidium canariense*. ■: BBS1; ■: AP3; ■: PCP3.**

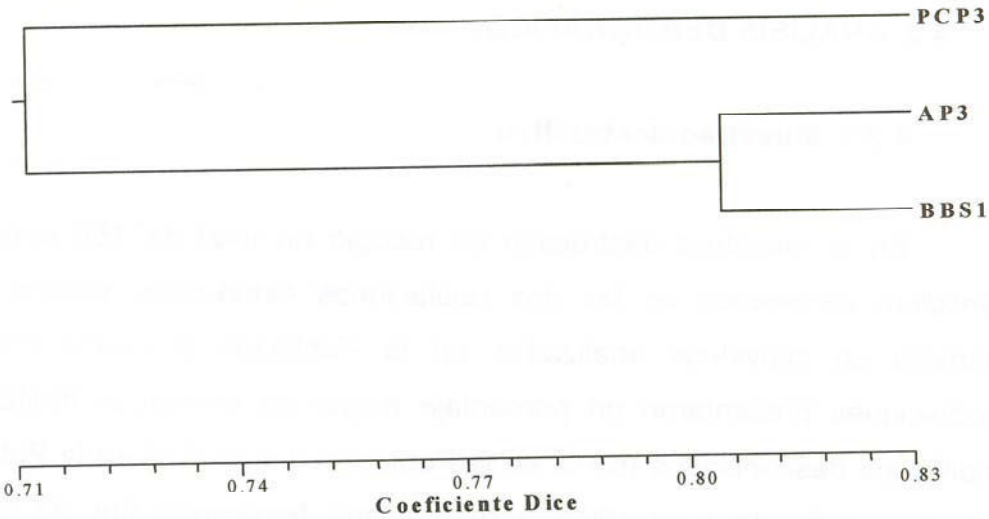



**Figura 40.- Dendrograma UPGMA basado en el coeficiente de Dice obtenido en el análisis de bulks poblacionales de *Gelidium canariense*.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El porcentaje medio de similitud obtenido en el análisis de *bulks* poblacionales (0,742), fue superior al obtenido en el análisis de individuos haploides (0,562). En ambos estudios, los porcentajes medios de similitud dentro de las poblaciones de Gran Canaria, 0,804 para *bulks* poblacionales y 0,652 para el análisis de individuos haploides, fueron mayores que los porcentajes de similitud entre islas, 0,711 y 0,559 respectivamente (Tabla 27).

| | BBS1 | AP3 | PCP3 |
|---|---|---|---|
| BBS1 | 0,665 | 0,562 | 0,519 |
| AP3 | 0,804 | 0,737 | 0,599 |
| PCP3 | 0,743 | 0,680 | 0,787 |

**Tabla 27.- Coeficiente Dice entre poblaciones. Azul: Valores medios del coeficiente de Dice obtenidos en el análisis de individuos haploides. Negro: Valores del coeficiente de Dice obtenidos en el análisis de *bulks* poblacionales.**

## 4.2. ANALISIS DEMOGRAFICO.

### 4.2.1. Muestreo destructivo.

En el muestreo destructivo se recogió un total de 168 individuos de *Gelidium canariense* en las dos poblaciones estudiadas, siendo mayor el número de individuos analizados en la Población 2 (Tabla 28). Ambas poblaciones presentaron un porcentaje mayor de individuos fértiles que de individuos desconocidos (69 % en la Población 1 y 66.8 % en la Población 2). La proporción de esporofitos y gametofitos femeninos fue de 5:1, en la Población 1 y de 6:1 en la Población 2 (Tabla 28).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | BBS1 | BBS2 |
|---|---|---|
| **Nº total de individuos** | 45 | 123 |
| **Peso húmedo medio (g/m²)** | 165.7 | 108.9 |
| **% Gametofitos femeninos** | 11 | 0.8 |
| **% Esporofitos** | 58 | 66 |
| **% Desconocidos** | 31 | 26 |

**Tabla 28 Número total de individuos, peso húmedo medio (g/m²) y porcentaje de gametofitos femeninos, esporofitos y desconocidos recogidos en las dos poblaciones durante el muestreo destructivo.**

En el estudio preliminar de marcaje de individuos de *Gelidium canariense* el porcentaje de relocalización de individuos etiquetados al cabo de un año fue nulo, por lo que se optó por el sistema de medición a tres puntos fijos, la elaboración de mapas de los Cuadrados e individuos y fotografía de los Cuadrados.

Los ANOVAs realizados para el peso seco individual y la densidad (Tabla 29, 30) mostraron diferencias significativas ($P< 0.05$) entre las poblaciones y/o entre los Cuadrados de cada una de las Parcelas, pero no revelaron diferencias significativas entre las Parcelas dentro de cada una de las Poblaciones. En el ANOVA de biomasa cosechable (Tabla 31) no se encontraron diferencias significativas a ningún nivel.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| *Factor* | *Grados de libertad* | *Medias cuadráticas* | *F-ratio* | *P* |
|---|---|---|---|---|
| Población | 1 | 1037,591 | 10,589 | 0,0313* |
| Parcela (Población) | 4 | 97,983 | 0,645 | 0,6505 |
| Cuadrado(Parcela,Población) | 6 | 151,945 | 4,067 | 0,0059* |
| Residuo | 24 | 37,356 | | |

*: $P<0.05$

**Tabla 29 .- ANOVA para el peso seco individual a partir de los datos del muestreo destructivo en *Gelidium canariense*.**

| *Factor* | *Grados de libertad* | *Medias cuadráticas* | *F-ratio* | *P* |
|---|---|---|---|---|
| Población | 1 | 507.0 | 10.56 | 0.0314* |
| Parcela (Población) | 4 | 48.0 | 3.94 | 0.0663 |
| Residuo | 6 | 12.2 | | |

*: $P<0.05$

**Tabla 30.- Análisis de ANOVA para la densidad a partir de los datos del muestreo destructivo en *Gelidium canariense*.**

| *Factor* | *Grados de libertad* | *Medias cuadráticas* | *F-ratio* | *P* |
|---|---|---|---|---|
| Población | 1 | 335,386 | 0,667 | 0,4599 |
| Parcela (Población) | 4 | 502,599 | 0,871 | 0,5323 |
| Residuo | 6 | 577,158 | | |

**Tabla 31.- ANOVA para la biomasa cosechable a partir de los datos del muestreo destructivo en *Gelidium canariense*.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El peso seco individual varió entre 0.4 y 50 g, siendo las medias poblacionales de 13.92 g en la Población 1 y de 3.18 g en la Población 2.

La ecuación de regresión entre peso seco y volumen ($LC^2$) (Figura 41) fue la siguiente:

$$DW = 0.0096\ LC^2 + 0.45$$

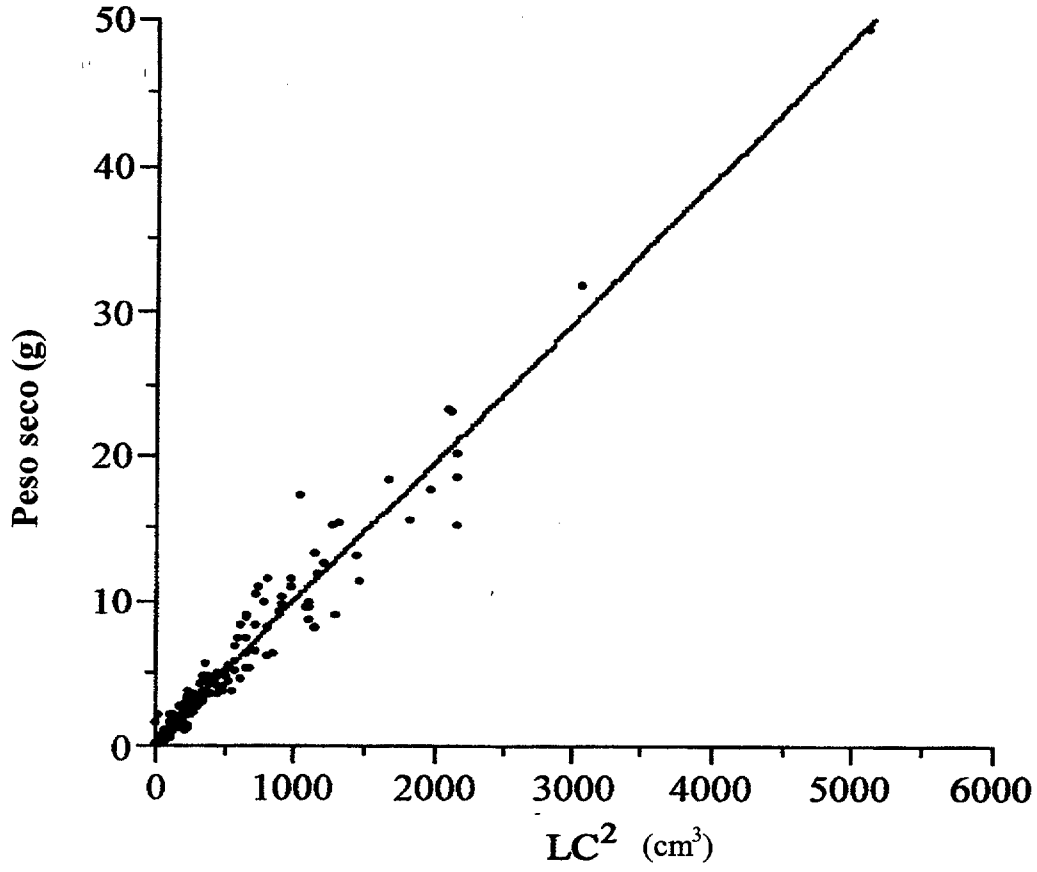



**Figura 41.- Relación entre el peso seco y el volumen ($LC^2$) individual en las poblaciones analizadas de *Gelidium canariense*.**

El coeficiente de correlación ($R^2$) fue de 0.95 y altamente significativo ($P < 0.0001$), lo que indica que el 95 % de la variación del peso seco individual se puede explicar por variaciones del volumen en *Gelidium canariense*.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.2.2. Muestreo no destructivo.

#### 4.2.2.1. Biomasa individual.

El ANOVA del peso seco individual mostró una diferencia significativa entre las dos poblaciones estudiadas después de hacer un agrupamiento de componentes *post hoc* para los factores Parcela (Población), Año* Parcela (Población) y Año* Cuadrado (Parcela, Población) (Tabla 32,33). En la población 1 el peso seco medio fue de 5.5 g y en la Población 2 de 2.4 g. La variación a escalas espaciales más pequeñas y la variación entre los dos años no fue significativa.

| *Factor* | *Grados de libertad* | *Medias cuadráticas* | *F-ratio* | *P* |
|---|---|---|---|---|
| Año | 1 | 4.196 | 2.290 | 0.3717 |
| Población | 1 | 20.088 | 15.99 | 0.0572 |
| Año* Población | 1 | 1.832 | 3.177 | 0.2166 |
| Parcela (Población) | 2 | 1.256 | 1.231 | 0.3085 |
| Año* Parcela (Población) | 2 | 0.577 | 0.871 | 0.4655 |
| Cuadrado (Parcela, Población) | 26 | 1.021 | 1.433 | 0.1136 |
| Año*Cuadrado (Parcela, Población) | 6 | 0.662 | 0.930 | 0.4784 |
| Residuo | 80 | 0.712 | | |

**Tabla 32.- ANOVA del peso seco individual en *Gelidium canariense*. Datos transformados con $\log_e$ para obtener la homogeneidad de varianzas.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| Factor | Grados de libertad | Medias cuadráticas | F-ratio | P |
|---|---|---|---|---|
| Año | 1 | 4.196 | 2.29 | 0.3717 |
| Población | 1 | 20.088 | 18.926 | 0.0002* |
| Año* Población | 1 | 1.832 | 2.624 | 0.1088 |
| Cuadrado(Parcela,Población) | 28 | 1.061 | 1.52 | 0.0724 |
| Residuo | 88 | 0.698 | | |

*: $P<0.05$

**Tabla 33.- ANOVA del peso seco individual después del agrupamiento de componentes *post hoc*.**

La estructura de clases de talla reveló que el 80% y del 90% de los individuos en la Población 1 y de la Población 2 respectivamente, pertenecían a las clases de talla mas pequeñas (Clase 1 y 2: 0 – 2.32 g en peso seco) en 1996 y esta estructura demográfica se mantuvo constante durante los dos años de estudio (Figura 42,43,44).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

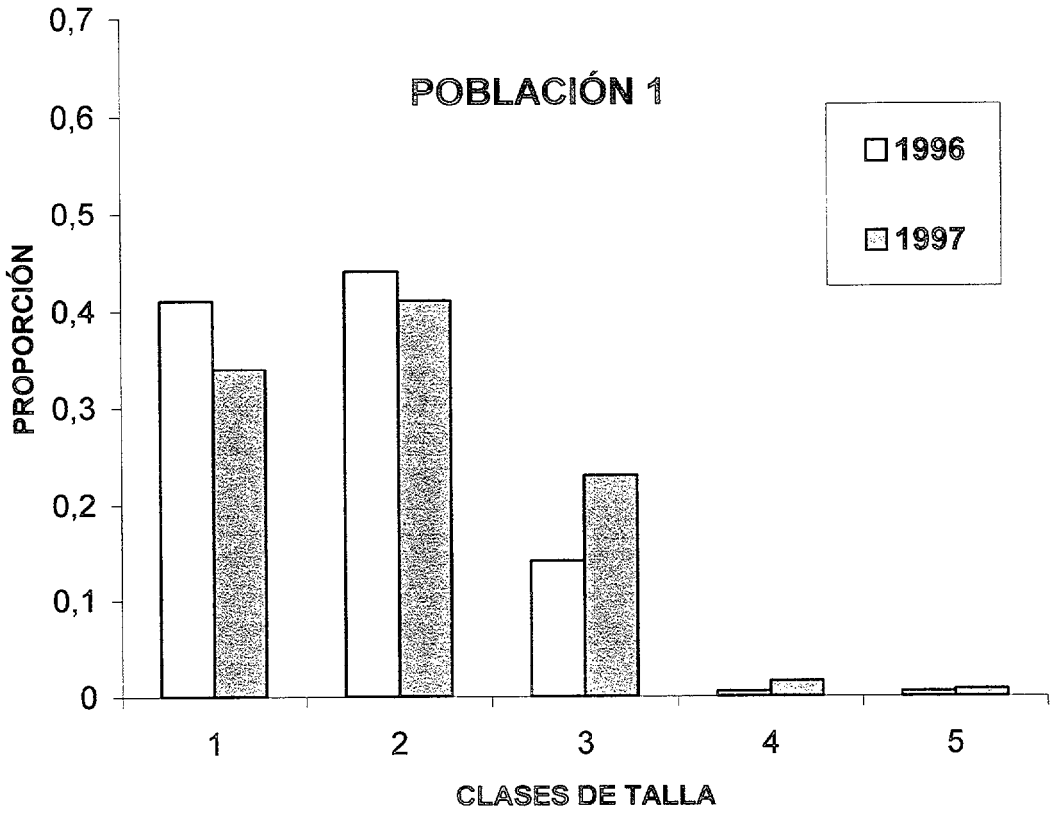



**Figura 43.- Estructura de clases de tallas en *Gelidium canariense* para la Población 1. Clase 1: 0 - 1.16 g; Clase 2: 1.16 – 2.32 g; Clase 3: 2.32 – 3.49 g; Clase 4: 3.49 – 4.66 g; Clase 5: > 4.66 g.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

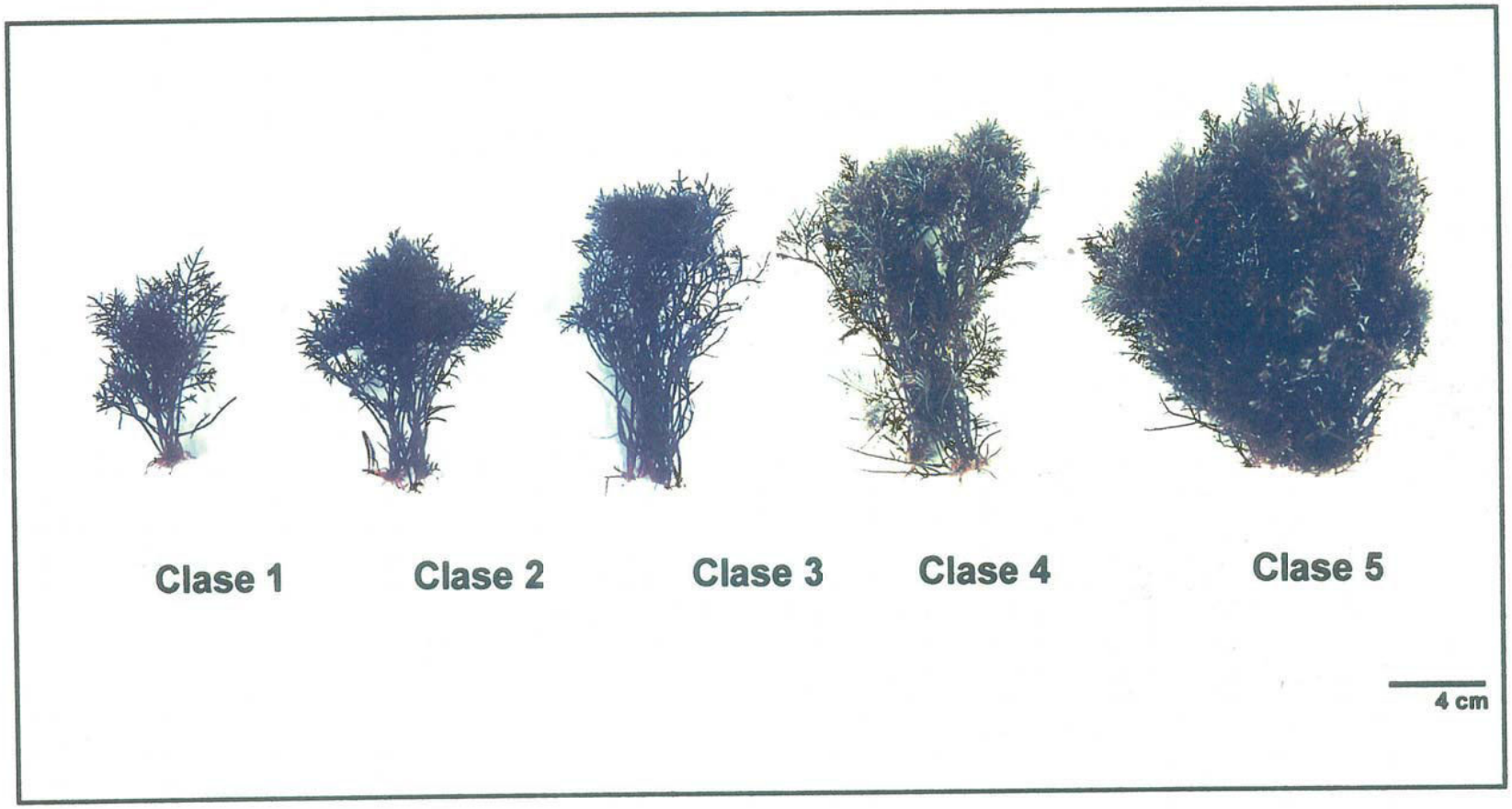



**Figura 42. Individuos de *Gelidium canariense* pertenecientes a las diferentes clases de talla. Clase 1: 0-1.16 g; Clase 2: 1.16-2.32 g; Clase 3:3.49-4.66 g; Clase 5: >4.66 g.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

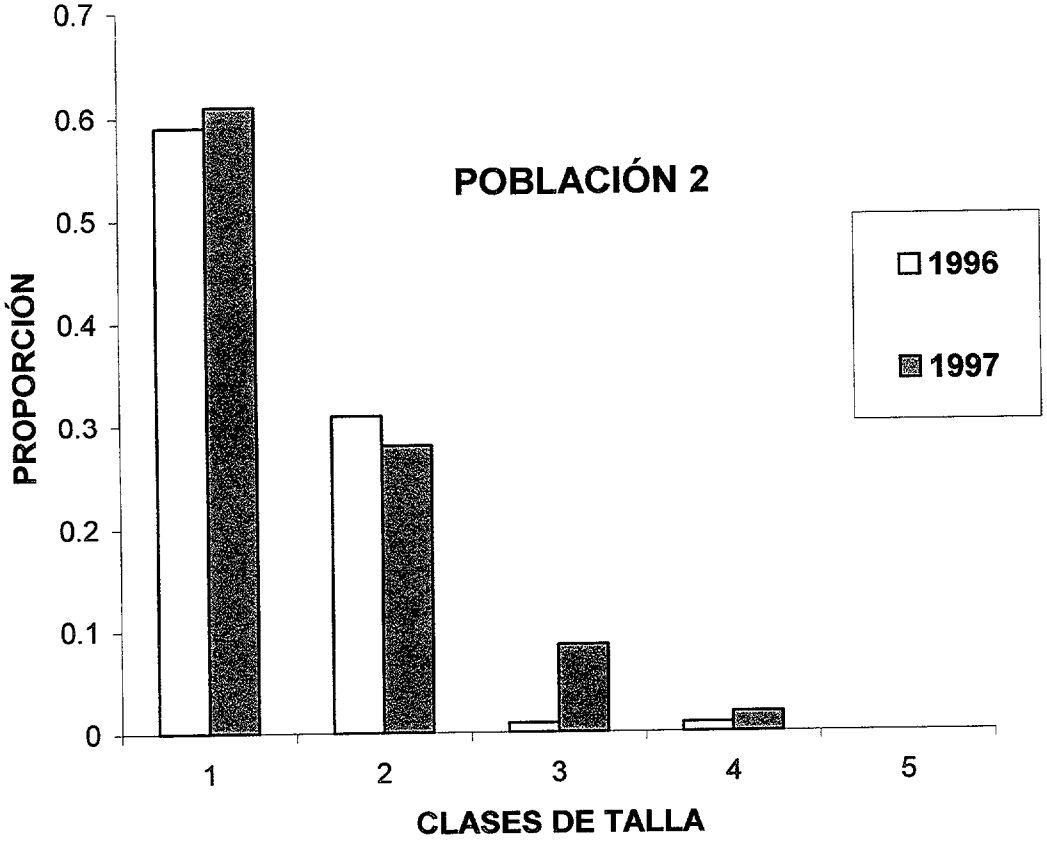



**Figura 44.- Estructura de clases de tallas en *Gelidium canariense* para la Población 2. Clase 1: 0 - 1.16 g; Clase 2: 1.16 – 2.32 g; Clase 3: 2.32 – 3.49 g; Clase 4: 3.49 – 4.66 g; Clase 5: > 4.66 g.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

### 4.2.2.2. Biomasa cosechable y densidad.

En el análisis de ANOVA de biomasa cosechable no se encontraron diferencias significativas en ningún nivel (Tabla 34). El valor medio de biomasa cosechable en la Población 1 fue de 960 $gm^{-2}$ y en la Población 2 de 912 $gm^{-2}$.

| *Factor* | *Grados de libertad* | *Medias cuadráticas* | *F-ratio* | *P* |
|---|---|---|---|---|
| Año | 1 | 1.177 | 5.755 | 0.2514 |
| Población | 1 | 0.148 | 1.410 | 0.3569 |
| Año* Población | 1 | 0.204 | 0.358 | 0.6103 |
| Parcela (Población) | 2 | 0.105 | 0.482 | 0.6217 |
| Año*Parcela (Población) | 2 | 0.571 | 2.63 | 0.0876 |
| Residuo | 32 | 0.217 | | |

**Tabla 34 .- ANOVA de la biomasa cosechable en los *poblaciones* de *Gelidium canariense*.**

En cuanto a la densidad de las poblaciones (nº plantas/$m^2$) tampoco se encontraron diferencias significativas espaciales o temporales (Tabla 35). El número medio de plantas en la Población 1 fue de 136 plantas/$m^2$ y en la Población 2 de 211 plantas/$m^2$.

| *Factor* | *Grados de libertad* | *Medias cuadráticas* | *F-ratio* | *P* |
|---|---|---|---|---|
| Año | 1 | 2.5 | 0.207 | 0.7284 |
| Población | 1 | 220.9 | 4.418 | 0.1703 |
| Año* Población | 1 | 12.1 | 2.327 | 0.2667 |
| Parcela (Población) | 2 | 50 | 1.601 | 0.2174 |
| Año* Parcela(Población) | 2 | 5.2 | 0.167 | 0.8473 |
| Residuo | 32 | 31.225 | | |

**Tabla 35.- ANOVA de la densidad (nº de plantas/$m^2$) en los *poblaciones de Gelidium***

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

***canariense.***

### 4.2.2.3. Estadios del ciclo de vida.

Los porcentajes de plantas esporofíticas, gametofíticas femeninas y desconocidos variaron mucho entre los dos años de muestreo, siendo en el año 1997 el número de plantas desconocidas de 88% y 92% para la Población 1 y 2 respectivamente (Figura 45). Esto puede ser debido a las dificultades de muestreo en este año, que impidieron una identificación cuidadosa del estado reproductivo de las plantas. Por esta razón, sólo se comprobó la variación espacial de los estadios del ciclo de vida en el año 1996.

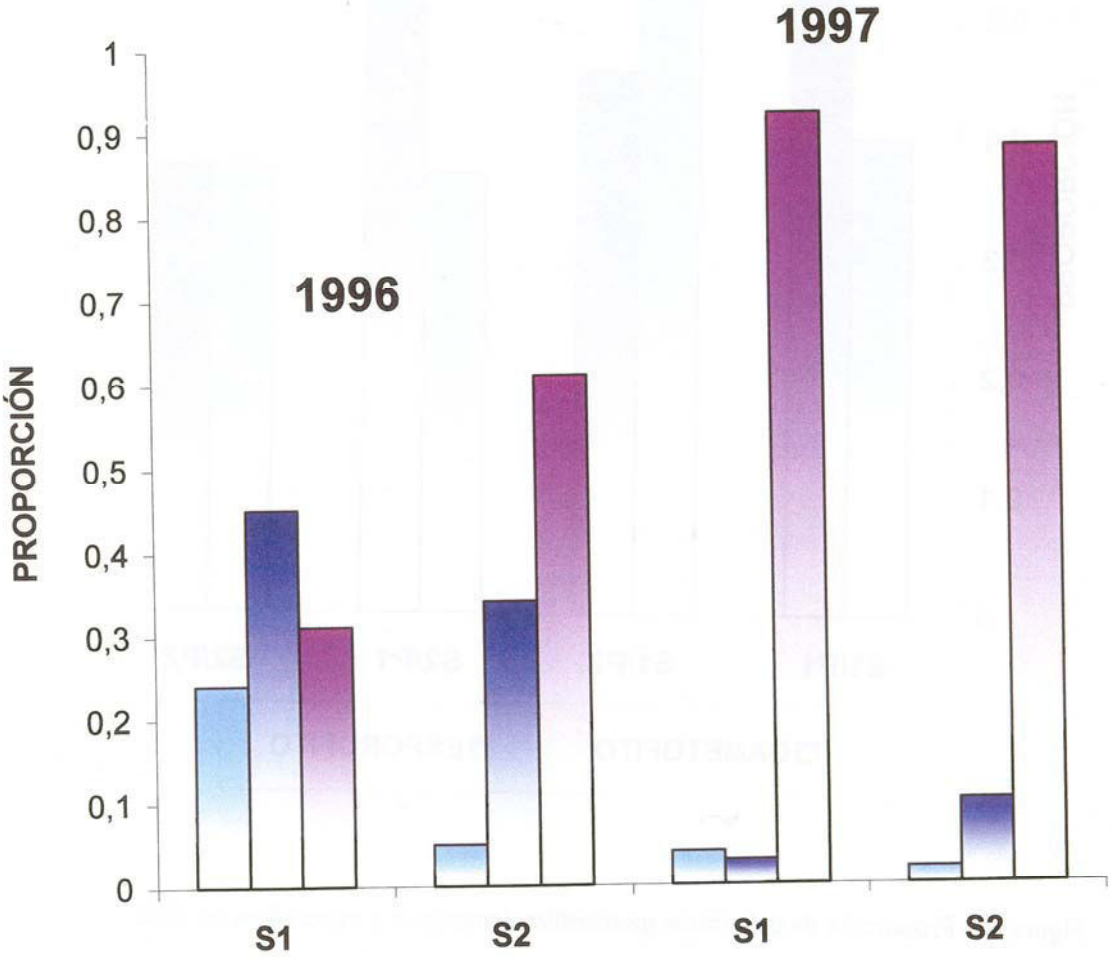



**Figura 45.- Proporción de individuos gametofitos femeninos ( ), esporofitos ( ) y desconocidos ( ) en el año 1996 y 1997. S1: Población 1, S2 : Población 2.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En el año 1996, la proporción total de plantas fértiles fue de 0.69 en la Población 1 y de 0.39 en la Población 2 (Figura 46). La proporción de gametofitos y esporofitos fue de 1:7 en la Población 2, mientras que en la Población 1 fue de 1:2.

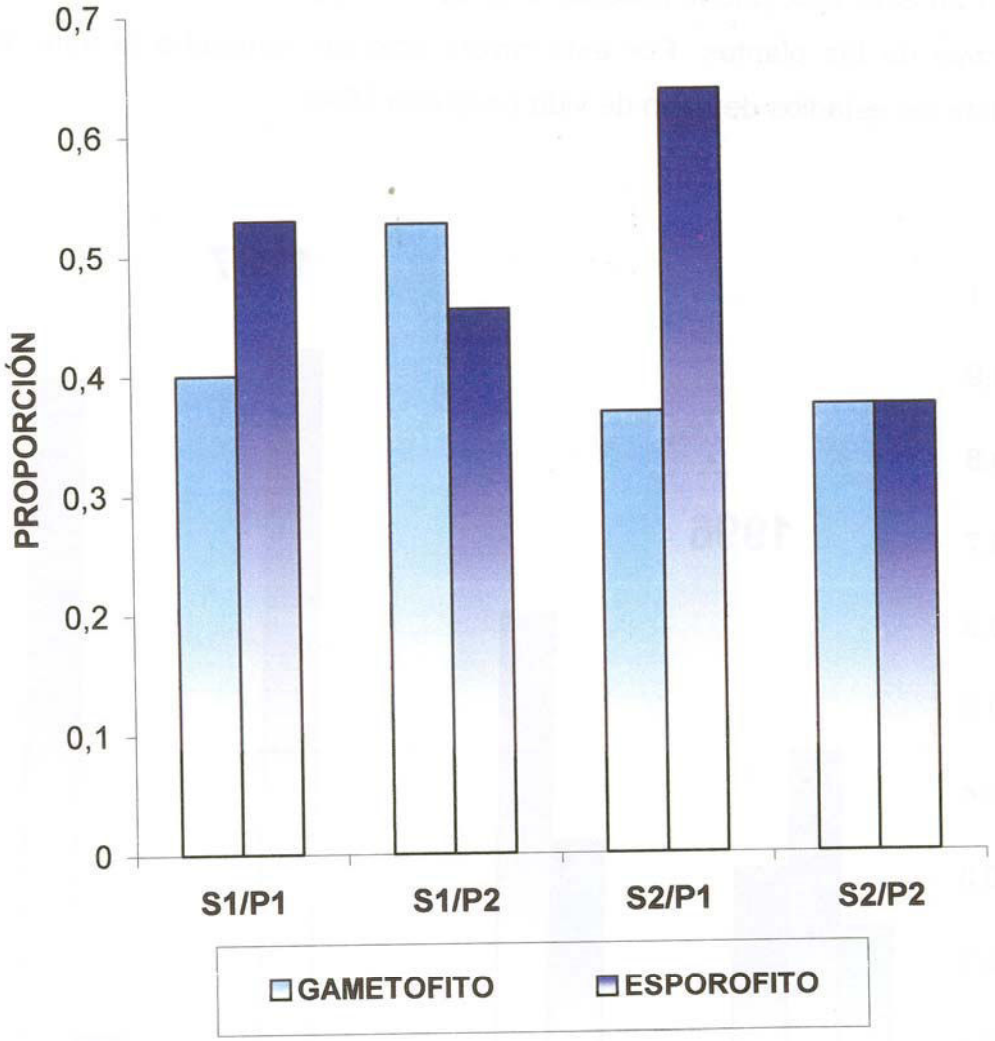



**Figura 46.- Proporción de individuos gametofitos femeninos y esporofitos en 1996.**
**S1/P1 : Población 1/Parcela 1; S1/P2: Población 1/Parcela 2;**
**S2/P1: Población 2/Parcela 1; S2/P2: Población 2/Parcela 2.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El análisis de ANOVA reveló diferencias significativas a pequeña escala entre las Parcelas de cada Población, es decir, que puede existir un dominancia de los gametofitos femeninos o de los esporofitos a distancias de 20-50 m (Tabla 36). La media para las poblaciones fue de 37% esporofitos y 15% gametofitos femeninos, sin embargo ésta no fue estadísticamente significativa.

| *Factor* | *Grados de libertad* | *Medias cuadráticas* | *F-ratio* | *P* |
|---|---|---|---|---|
| Estadío | 1 | 0.231 | 2.719 | 0.347 |
| Población | 1 | 0.100 | 0.692 | 0.4931 |
| Estadío* Población | 1 | 0.085 | 0.352 | 0.613 |
| Parcela (Población) | 2 | 0.143 | 4.352 | 0.0244* |
| Estadío*Parcela(Población) | 2 | 0.242 | 7.344 | 0.0032* |
| Residuo | 24 | 0.033 | | |

*: $P<0.05$

**Tabla 36.- ANOVA de la proporción de gametofitos femeninos y esporofitos en 1996.**

### 4.2.2.4. Supervivencia y reclutamiento.

El 85 % de los individuos sobrevivieron de 1996 a 1997 y no se encontraron diferencias espaciales significativas en las dos poblaciones estudiadas (Tabla 37).

| *Factor* | *Grados de libertad* | *Medias cuadráticas* | *F-ratio* | *P* |
|---|---|---|---|---|
| Población | 1 | 0.101 | 2.756 | 0.2388 |
| Parcela (Población) | 2 | 0.037 | 1.06 | 0.3653 |
| Residuo | 20 | 0.035 | | |

**Tabla 37.- ANOVA de la tasa de supervivencia de individuos en *Gelidium canariense*.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En el análisis de ANOVA para el reclutamiento (Tabla 38) no se encontraron diferencias espaciales a ningún nivel, pero si se encontraron al hacer el agrupamiento de componentes *post hoc* para el factor Parcela (Población). En este análisis se detectaron diferencias significativas entre las dos poblaciones, siendo 1, el número medio de individuos nuevos en la Población 1 y 3, en la Población 2 (Tabla 39).

| *Factor* | *Grados de libertad* | *Medias cuadráticas* | *F-ratio* | *P* |
|---|---|---|---|---|
| Población | 1 | 16.667 | 15.385 | 0.0593 |
| Parcela (Población) | 2 | 1.083 | 0.272 | 0.7647 |
| Residuo | 20 | 3.983 | | |

**Tabla 38.- ANOVA del reclutamiento de individuos en *Gelidium canariense*.**

| *Factor* | *Grados de libertad* | *Medias cuadráticas* | *F-ratio* | *P* |
|---|---|---|---|---|
| Población | 1 | 16.667 | 4.481 | 0.0458* |
| Residuo | 22 | 3.720 | | |

*: *P<0.05*

**Tabla 39.-ANOVA del reclutamiento de individuos de *Gelidium canariense* después del *post hoc pooling* del factor Parcela (Población).**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# V. DISCUSION

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

## 5.1. ANÁLISIS GENÉTICO.

### 5.1.1. Optimización de la técnica RAPDs.

La simplicidad del método de extracción de ADN (Cenis 1992; Alberto *et al.* 1997) modificado, nos permite procesar muchas muestras, por lo que constituye una ventaja en los estudios de genética de poblaciones, donde normalmente, se requiere analizar un gran número de individuos. Además, el uso escaso de solventes orgánicos lo hacen más interesante.

Sin embargo, y a diferencia de *Gelidium sesquipedale* (Alberto *et al.* 1997), en *G. canariense* fue necesario incorporar una etapa de purificación, consecuencia probablemente del mayor contenido de polisacáridos en *G. canariense* tal y como se ha señalado para otras especies (Mayes *et al.* 1992; Patwary *et al.* 1993; Saunders 1993).

La baja reproducibilidad de los patrones RAPDs debida a la baja especificidad de la hibridación, constituye uno de los aspectos más relevantes para poder alcanzar unos resultados coherentes en el análisis molecular. Este problema se acentúa si se comparten datos entre laboratorios (Penner *et al.* 1993; Hoffman & Bregitzer 1996; Jones *et al.* 1997), se comparan resultados obtenidos durante largos periodos de tiempo (Pérez *et al.* 1998), se utilizan diferentes marcas de reactivos ó de termocicladores (MacPherson *et al.* 1993; Meunier & Grimont, 1993; He *et al.* 1994) o si las reacciones de amplificación son elaboradas por distintos investigadores (McEwan *et al.* 1998).

La falta de reproducibilidad de los marcadores RAPDs se traduce en la dificultad de repetir algunos patrones encontrados (Hadrys *et al.* 1992). Este hecho es apuntado por van Oppen *et al.* (1996) como la principal razón de abandono de la técnica en muchos laboratorios. No obstante, el problema ha sido tratado de diferentes maneras según los autores y laboratorios. Dos Santos *et al.* (1994), Beebe *et al.* (1995), Nienhuis *et al.* (1995), Park *et al.* (1998) y De Greef & Triest (1999) presentan resultados basados en datos sin replicar. Crochemore *et al.* (1996); Alberto *et al.* (1997); Le Corre *et al.* (1997),

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Jenczewski *et al.* (1999) se refieren a ellos simplemente como patrones reproducibles pero no señalan el grado de reproducibilidad de las bandas. Otros autores (Cardoso *et al.* 1998, Tollefsrud *et al.* 1998, Bolch *et al.* 1999, Prathepha & Baimai 1999, Tansley & Brown 2000; Sun & Wong, 2001) seleccionan sólo los cebadores que generan bandas fuertes, reproducibles y con buena resolución. En otras ocasiones se comprueba la reproducibilidad de bandas y se interpretan como *valores perdidos* aquellos que no se pueden reproducir (Hilu 1994; Liu *et al.* 1994; Swensen *et al.* 1995). Pero la mayoría de los autores hacen replicaciones parciales o completas y eliminan las bandas que no presentan reproducibilidad (van Oppen *et al.* 1995,1996; Procaccini & Mazzella 1996; Alberto *et al.* 1999; Ashburner *et al.* 1997; Lindstrom *et al.* 1997; Waycott 1998; Bartish *et al.* 1999a, Martín *et al.* 1999; Gillies *et al.* 1997,1999; Gauer & Cavalli-Molina 2000; Esselman *et al.* 1999; Wright *et al.* 2000; Engelen *et al.* 2001; Lee *et al.* 2002). Además, en general no se indica el grado de reproducibilidad y tan solo los estudios de Skroch & Nienhuis (1995) y Pérez *et al.* (1998) muestran una relación entre los datos replicados y la precisión de las estimaciones de los parámetros de variabilidad genética. Precisamente estos últimos autores (Skroch & Nienhuis 1995) obtuvieron un 76 % de bandas reproducibles y concluyeron que la reproducibilidad es muy dependiente de la uniformidad de las condiciones de amplificación entre experimentos, así como de la intensidad relativa de las bandas amplificadas.

La reproducibilidad del patrón de bandas de RAPD realizada siempre por el mismo operario y en un corto espacio de tiempo, una vez obtenido ADN de alta calidad y habiendo optimizado los parámetros de la PCR, depende, de manera extrema, del mantenimiento de las condiciones absolutas e idénticas entre las reacciones de amplificación. En los estudios de reproducibilidad, se encontró que a medida que uniformamos las condiciones de amplificación y electroforesis, en general, se incrementaban los porcentajes de reproducibilidad de los patrones RAPDs para las bandas fuertes, medias y débiles (Tabla 7). La uniformidad en la amplificación se consiguió elaborando un *cóctel de amplificación* con todos los reactivos para cada cebador. El no obtener una reproducibilidad total, puede ser el reflejo de la sensibilidad de la reacción de amplificación a variaciones muy sutiles a la vez que incontrolables

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

en el ambiente de la reacción, como por ejemplo la temperatura ambiente, que podría influir en los pasos de desnaturalización e hibridación durante la amplificación (Skroch & Nienhuis 1995; Pérez *et al.* 1998).

La reproducibilidad entre distintas extracciones de ADN ha sido comprobada también por Russell *et al.* 1993 y van Oppen *et al.* 1996, obteniendo resultados muy similares a los de este estudio.

Los estudios experimentales de Skroch & Nienhuis (1995) también demostraron que en las estimaciones de distancias genéticas es más beneficioso un aumento del número de bandas analizadas, que una disminución del número de bandas debido al error de interpretación que conlleva sucesivas amplificaciones para garantizar la reproducibilidad del patrón de bandas. Consecuenteme, y dado el volumen del muestreo del análisis de la fase haploide (252 individuos) y teniendo en cuenta, que los análisis de RAPDs tienen un elevado coste económico y consumen tiempo, se optó, una vez estandarizadas las condiciones de extracción y amplificación por realizar amplificaciones únicas con cada cebador y muestra y posteriormente realizar un filtro (5%) para eliminar el posible ruido.

### 5.1.2. Análisis de *bulks* poblacionales.

El carácter dominante de los marcadores RAPDs presenta desventajas a la hora de estudiar especies con ciclos haplo-diplontes, dado que el estado de ploidía de los individuos puede influenciar los patrones de RAPDs (Williams *et al.* 1990, van Oppen *et al.* 1996). De esta forma, la comparación de individuos diploides genera una sobreestimación de la similaridad entre estos, porque no se pueden distinguir los individuos homocigóticos de los heterocigóticos. Por otro lado, la comparación de individuos de diferente ploidía puede dar lugar a una falsa variación genética relacionada con el equilibrio entre el cebador y los sitios de reconocimiento del ADN (Stam *et al.*1995). Los individuos diploides (esporofitos) presenta un mayor número de sitios potenciales de reconocimiento para el cebador que los individuos haploides (gametofitos).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Este hecho puede originar que una misma secuencia presente en individuos haploides y diploides, apenas sea amplificada en los individuos haploides.

Por todo esto, es necesario determinar la ploidía de los individuos que se va a analizar mediante RAPD en especies con ciclos haplo-diplontes, como es el caso de *Gelidium canariense*. Sin embargo, y debido a que no fue posible la caracterización de gametofitos masculinos, se hizo una primera aproximación del conocimiento de la variabilidad genética con la metodología de *bulks* poblacionales y posteriormente se realizó un análisis intrapoblacional exclusivamente con los individuos haploides.

El análisis de *bulks* poblacionales ha sido utilizado de manera exitosa para establecer las relaciones genéticas entre poblaciones vegetales de alfalfa (*Medicago sativa*) por Yu & Pauls (1993) y en el alga roja, *Gelidium sesquipedale* por Alberto *et al.* (1997;1999). Alberto *et al.* (1999) obtuvieron para diferentes *bulks* poblacionales formados con 15 individuos de una misma población de *G. sesquipedale*, distancias genéticas mucho más bajas, que las distancias genéticas obtenidas entre los *bulks* poblacionales de diferentes poblaciones. Estos autores sugieren que los *bulks* formados por 15 individuos de *G. sesquipedale* se puede considerar como una muestra representativa de cada población. El patrón de similaridades genéticas entre las cuatro poblaciones de *G. canariense* analizadas mediante *bulks,* fue independiente del coeficiente de similaridad utilizado.

Contrariamente a lo encontrado con estudios isoenzimáticos en *G. canariense* (Sosa & García-Reina 1993), en este trabajo se encontró una relación entre la distancia geográfica y la distancia genética. Así, la población de Puerto de la Cruz (PC) en la isla de Tenerife presenta los valores de similaridad más bajos con las poblaciones de Gran Canaria (Tabla 12). Dentro de Gran Canaria, las poblaciones de Agaete (A) y Bocabarranco (BB) están más alejadas geográficamente y presentan el valor de similaridad genética menor (0.825) y por tanto, el menor flujo genético. Sin embargo cabría esperar una mayor similitud genética entre las poblaciones de Sardina (S) y Agaete (A) dado que son las poblaciones más proximas.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Además, el número de marcadores específicos en la población de Puerto de la Cruz fue casi el doble respecto a las poblaciones de Agaete y Bocabarranco, lo cuál puede ser indicativo de un menor flujo genético entre la población de Tenerife y las poblaciones de Gran Canaria. Esta hipótesis está de acuerdo con la circulación oceánica general en el área de Canarias, siendo la corriente predominante dirección SSO (Pérez-Martell 1988; Sangrá 1995).

### 5.1.3. Análisis comparativo de *bulks* poblacionales e individuos haploides.

El porcentaje medio de similitud por cebador entre ambos estudios, obtenido a partir del recuento de bandas comunes alcanza el 53% de los casos. No obstante, puede existir una subestimación de ésta similitud ya que es difícil establecer la comparación de pesos moleculares en aquellos cebadores que generan un mayor número de bandas. Este bajo porcentaje de similitud puede ser consecuencia de que los análisis se han realizado con diferentes individuos y en diferentes laboratorios. Diversos autores (Penner *et al.* 1993; Hoffman & Bregitzer 1996; Jones *et al.* 1997) han demostrado que los experimentos realizados en diferentes laboratorios, pueden contribuir a incrementar la disparidad de datos, dada la sensibilidad de los marcadores RAPD a pequeñas variaciones no controlables.

El número de marcadores obtenidos, el porcentaje de polimorfismo y el número de fragmentos exclusivos por población (Tabla 25, 26) obtenidos en el análisis de *bulks* poblacionales fue menor respecto al análisis de individuos haploides lo que está en concordancia con lo propuesto por Yu & Pauls (1993) y Alberto *et al.* (1999). Estos autores postularon que la metodología de *bulks* poblacionales revela sólo los marcadores poblacionales bien conservados reduciendo las bandas débiles y poco reproducibles, lo que es consecuencia posiblemente de que los marcadores que están presentes en unos pocos individuos no amplifican, dado que representan una pequeña proporción de ADN en la mezcla de *bulks* poblacionales. Michelmore *et al.* (1991) demostró que los marcadores RAPD raros no pueden ser detectados en los *bulks* poblacionales cuando la muestra de ADN de la que derivan representa menos

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

de un 10% en la muestra total de ADN. Por tanto, en *Gelidium canariense* la metodología de *bulks* solo revela los marcadores poblacionales bien conservados, es decir, aquellos que mejor caracterizan las poblaciones. De esta manera, se reducen las bandas débiles, las cuáles presentan una menor reproducibilidad. Sin embargo, también supone un inconveniente la pérdida de los marcadores débiles, ya que son éstos, los que realmente aportan información a escalas geográficas pequeñas.

Además de esta ventaja, la metodología de *bulks* permite evaluar las propiedades genéticas más comunes de las poblaciones de una forma muy eficiente, rápida y económica, dado que en lugar de realizar 15 amplificaciones individuales para cada población estudiada, se realiza sólo una amplificación por población. En especies con ciclo de alternancia de generaciones, evita los problemas derivados de la comparación de individuos con distinta ploidía.

Dos son los principales inconvenientes que surgen en la aplicación de esta metodología. Por una parte existe una pérdida de información respecto a la población analizada ya que tratamos una mezcla de individuos como una única entidad, es decir, estamos añadiendo una nueva variable (desconocida) a la ya *heterogénea* y *poco reproducible* técnica. Y por otro lado, sólo permite realizar análisis interpoblaciones.

### 5.1.4. Análisis de la fase haploide.

#### 5.1.4.1. Niveles de variabilidad genética.

Uno de los principales condicionantes de la detección del nivel de diversidad genética de las poblaciones naturales es el tamaño muestral analizado, ya que existe una relación directa entre el número de individuos analizados y la diversidad genética (Ellstrand & Elam 1993). El índice que más se ve afectado por el tamaño muestral es el número medio de alelos por locus, en nuestro caso, el número medio de haplotipos por cebador.

En la mayoría de las poblaciones el número de individuos analizados por población, se encuentra en la zona de estabilización de la curva de tendencia

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

del número medio de haplotipos por cebador (Figura 27). Por tanto, un aumento del tamaño muestral en estas poblaciones no supondría un incremento significativo de la diversidad genética observada. La población de Hermigua (HP1) presenta una variabilidad genética igual a la población de Puerto de la Cruz (PCP3), aunque ésta, tiene un tamaño muestral dos veces inferior. Esta circunstancia unida al hecho de que HP1 se encuentra en la zona exponencial, nos indica que posiblemente la escasa diversidad genética (NMAL) es más consecuencia del bajo número de individuos analizados y no una característica intrínseca de la población, como revelan otros parámetros de diversidad génica (Tabla 16). Por tanto, es posible que un incremento en el tamaño muestral haría aumentar proporcionalmente la diversidad génica en esta población.

En general, los niveles de polimorfismo RAPD detectados en *G. canariense* son notablemente altos. Todos los cebadores utilizados fueron variables y el polimorfismo dentro de las poblaciones siempre fue superior al 55,2 % (Tabla 16). Se descarta la posibilidad de que algunos marcadores interpretados sean artefactos causados por la amplificación del ADN procedente de otros organismos epífitos, dado que los frondes fueron escrupulosamente limpiados. La contaminación bacteriana puede ser también descartada, porque la baja complejidad del genoma procariota no interfiere en la amplificación del ADN eucariota (Williams *et al.* 1993). Por consiguiente, los altos niveles de variación genética detectado en las poblaciones naturales de *G. canariense* mediante RAPDs son específicos de la especie.

Esta elevada variabilidad genética contrasta con la depauperada variación isoenzimática encontrada en *G. canariense* por Sosa y García-Reina (1993). Una discrepancia marcada entre datos de isoenzimas y de RAPDs han sido encontrada en otras algas (van Oppen *et al.* 1995a) y también en otras fanerógamas marinas (Waycott 1998). En plantas, también se han señalado diferencias entres ambas técnicas, siendo normalmente las estimaciones con RAPDS mucho más variables (Liu & Furnier 1993; Lannér-Herrera *et al.* 1996; Díaz *et al.* 1999; Wong & Sun 1999; Virk *et al.* 2000), aunque también se han encontrado valores similares (Aagaard *et al.* 1998; Buso *et al.* 1998) y valores

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

menores (Jenczewski *et al.* 1999). Sin embargo, las comparaciones no son fáciles, debido a la utilización de diferentes estrategias en el tratamiento de datos. Waycott (1995) justifica el mayor polimorfismo de RAPDs asociándolo a las regiones y al nivel de muestreo de ambas técnicas. La técnica RAPD muestrea un amplio rango de secuencias dentro del genoma: ADN codificante, no codificante, estructural y repetitivo, mientras que las isoenzimas muestrean sólo los productos de secuencia codificados. De esta manera, los RAPD tienen ventajas sobre las isoenzimas para detectar variación genotípica debido a que muestrean una región más amplia del genoma. Por otro lado, las isoenzimas están bajo una presión selectiva para ajustarse a ciertos requerimientos y mantener la actividad enzimática. Además, los RAPD muestrean regiones que acumulan más cambios que en las isoenzimas y por eso se observan niveles mayores de polimorfismo. Por otro lado, los RAPDs generan un número de marcadores ilimitados lo que los convierte en más ventajosos particularmente cuando poca variación isoenzimática ha sido observada (Whitkus *et al.* 1994) como es el caso de *G. canariense* (Sosa *et al.* 1998). Además, datos empíricos han demostrado que los polimorfismos isoenzimáticos a veces no son neutrales como previamente se suponía (Lönn *et al.* 1998), mientras que los marcadores RAPD se consideran neutrales (Heaton *et al.* 1999).

La primera ventaja del elevado número de marcadores polimórficos obtenidos con RAPDs es que nos permiten abordar las hipótesis planteadas en el estudio de isoenzimas (Sosa & García-Reina 1993). Si el reclutamiento en las poblaciones de *G. canariense* es conseguido a expensas de la reproducción asexual (Sosa & García-Reina 1993) cabría esperar un mayor número de individuos con fenotipos similares en términos de RAPDs. Si por el contrario, el papel de la reproducción asexual es minoritario en el crecimiento de la población, el polimorfismo intrapoblacional considerable debería ser la norma. El que no se hayan encontrado individuos con fenotipos RAPDs idénticos, sugiere que la propagación asexual no es la estrategia reproductiva predominante en estas poblaciones, porque durante la reproducción asexual se generan individuos con idéntico genotipo al progenitor.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El número de fenotipos o haplotipos RAPD diferentes observados (99,2 % para la muestra total) es muy alto en comparación con otros estudios que utilizan marcadores de ADN multilocus en especies alógamas. Por ejemplo: Faugeron *et al.* (2001) encontraron en el alga roja *Mazzaella laminarioides,* el 70% de genotipos RAPD diferentes. Wright *et al.* (2000) señala que 81 fenotipos RAPD entre 149 individuos muestreados (54%) eran distintos en el alga roja apomítica *Delisea pulcra.* En el coral gorgonia *Plexaura kuna*, el porcentaje medio de patrones de M13 diferentes fue de 50% en los diferentes estudios realizados en arrecifes (Coffroth & Lasker 1998), mientras que en una especie de planta autogama, *Medicago trunculata*, solo se observaron 62 genotipos diferentes entre 187 plantas estudiadas (33%, Bonnin *et al.* 1996). Además, el porcentaje de fenotipos distintos es similar entre las distintas poblaciones (94-100%). Faugeron *et al.* (2001) encontró diferencias similares entre las poblaciones (66-86%) en la especie alógama *Mazzaella laminariodes.* Sin embargo, en especies autógamas y clonales, este porcentaje es generalmente variable entre las poblaciones, variando entre 40% y 75% en *Delisea pulcra* (Wright *et al* 2000), de 3% al 100% en *Plexaura kuna* (Coffroth & Lasker 1998) o del 15% al 52% en *Medicago trunculata* (Bonnin *et al.* 1996). La composición genética en especies clonales y autógamas está determinada principalmente por el número de migrantes, mientras que en especies alógamas, además de los procesos migratorios estocásticos, los genotipos diferentes están regulados por la recombinación.

El valor del Indice de Shannon por población (0,221) (Tabla 20) fue bastante menor que el obtenido para especies con reproducción sexual. Engelen *et al.* (2001) obtuvieron un valor medio poblacional de 0,868 en el alga parda *Sargassum polyceratum.* Sin embargo, este índice, presenta el inconveniente de que en la mayoría de los estudios los valores no están estandarizados y limitan su comparación.

Las estimaciones de la diversidad génica empleando el índice de Lynch & Milligan (1994), el cuál es equivalente a la heterocigosidad esperada (0,276) es similar a la obtenida en *Mazzaella laminarioides*, 0,23 y es ligeramente superior al rango de valores de diversidad génica dados para especies de algas

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

rojas con reproducción sexual en estudios isoenzimáticos (Sosa & Lindstrom 1999). Sin embargo, la comparación directa con la información disponible se debe hacer con cautela, porque las aproximaciones utilizadas en ambos estudios no son idénticas y en el segundo caso los datos proceden de isoenzimas, los cuáles son generalmente menos polimórficos que los marcadores RAPD. Comparado con otros estudios de marcadores RAPD, el valor de diversidad génica obtenido dentro de las poblaciones de *Gelidium canariense* (0,22-0,37) es ligeramente más alto al obtenido en la especie *Mazzaella laminarioides* (0,21-0,25) y comparable con el obtenido con marcadores RAPDs en especies vegetales terrestres alógamas (Huang *et al.* 2000;Thomas *et al.* 1999) pero siempre más alto que el valor estimado para especies autógamas terrestres (Owuor *et al.* 1997; Wong & Sun 1999).

Aunque no se ha publicado ningún trabajo sobre el mecanismo de reproducción de las especies estudiadas, en especies del género *Gelidium* los estudios realizados a nivel de frondes o módulos señalan una reproducción mayoritariamente asexual mediante ejes rastreros a partir de individuos establecidos (*G. chilensi, G. lingulatum:* Santelices 1989; *G. sesquipedale:* Oliveira 1989; Gorostiaga 1990; *G. latifolium*: Rueness & Frediksen 1989). En general la mayoría de las especies de Clorofitas, Feofitas y Rodofitas presentan reproducción asexual (Santelices 1990). La propagación vegetativa mediante rizoides se ha interpretado como un mecanismo conservativo de adaptación al medio, ya que los nuevos individuos son genéticamente idénticos a unos progenitores bien adaptados a unas condiciones ambientales determinadas (Stebbins & Hill 1980; Santelices 1990; Gorostiaga 1990). Por otro lado la multiplicación vegetativa hace menos vulnerable la permanencia de la especie a la competencia por el sustrato que el complejo proceso de emisión, fijación y germinación de esporas. La estructura basal y la reproducción por propágulos sería consecuencia de una adaptación vegetativa adecuada, a expensas de la reproducción sexual (Santelices 1990).

Sin embargo, los primeros estudios realizados a un nivel superior (clones diferentes o *genets*) en *G. canariense* con isoenzimas, sugerían que esta especie se caracterizaba por presentar una reproducción asexual mayoritaria y

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

además estaba sujeta a deriva genética (Sosa 1991; Sosa & García-Reina 1993). Sin embargo, estas conclusiones se basaron en frecuencias génicas haploides calculadas en tamaños muestreales pequeños, lo que probablemente originó resultados sesgados. Una re-evaluación de los datos *a posteriori* por los autores, Sosa *et al.* (1998) pone de manifiesto que la reproducción sexual tiene mayor peso específico y que existe una marcada diferenciación a pequeña escala en las poblaciones naturales de *Gelidium canariense*. Los resultados obtenidos utilizando marcadores RAPDs corroboran la reproducción sexual como mayoritaria y la fecundación cruzada como los mecanismos más importantes en las poblaciones naturales de *G. canariense*.

La elevada diversidad genética en las poblaciones naturales de especies vegetales puede explicarse por tres causas: a) alta tasa de recombinación, b) altos niveles de deriva entre pequeños grupos de individuos que viven en hábitats alterados, c) cambios en el genoma, tales como transposición, re-arreglo y amplificación de genes, d) mosaicos de diferentes genotipos, producido por la adaptación espacial y temporal a ambientes heterogéneos (selección disruptiva o diferenciación ecotípica) o por una corta dispersión de gametos y esporas que terminan ocasionando subestructuración espacial, e) causas históricas (van Oppen *et al.* 1995; Valatka *et al.* 2000).

A estos factores, se unen los atributos especie-específicos, tales como la biología reproductiva, el tipo de cruzamiento mayoritario (autofecundación o reproducción cruzada), o la capacidad de dispersión de los gametos, esporas y fragmentos vegetativos. También influye el carácter perenne o anual de la planta, el porte de la misma y el grado de distribución geográfica de la especie Así, las poblaciones naturales de especies alógamas, generalmente presentan una mayor diversidad genética que las poblaciones naturales de especies autógamas. Este patrón se explica porque en los cruzamientos aumenta el número de genotipos diferentes presentes en la población, entre otros mecanismos condicionados por la recombinación genética meiótica. Al mismo tiempo, las especies perennes promueven el intercambio de alelos entre los individuos de generaciones diferentes aumentando por tanto la diversidad genética. Las especies con una amplia distribución exhiben, en general, una

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

elevada diversidad genética con respecto a especies de distribución reducida, debido posiblemente al escaso número de individuos que colonizaron y formaron las poblaciones (Loveless & Hamrick 1984; Frankel *et al.* 1995; Hamrick & Godt 1996; Sosa 2001).

Valatka *et al.* (2000) indican que la alta diversidad genética encontrada en el alga roja *Furcellaria lumbricalis* es muy difícil explicarla por reproducción sexual y la atribuyen a un alto nivel de deriva entre pequeños grupos de individuos entre hábitats, a cambios en el genoma, tales como transposición, re-arreglo y amplificación de genes o bien por mosaicos de diferentes genotipos.

Teniendo en cuenta estos factores, en *Gelidium canariense* las hipótesis más plausibles para justificar la alta variabilidad genética a nivel de *genet* obtenida mediante marcadores RAPD, son el efecto de combinado de una variabilidad genética histórica alta, el origen reproductivo sexual de los gametofitos femeninos y una microdiferenciación genética de clones diferentes producida por la heterogeneidad espacial.

Lo más probable es que los gametofitos tengan un origen sexual mayoritario. Debido a que probablemente la adhesión al sustrato de talos vegetativos procedentes de gametofitos es mucho menor que la de talos esporofíticos como se ha descrito para otras especies de *Gelidium* (Salinas 1991; Juanes & Puente 1993) y por otro lado, los individuos gametofitos femeninos siempre aparecen muy próximos en la población.

*Gelidium canariense* es una especie perenne, con un reclutamiento muy bajo y supervivencia muy alta de los individuos, por lo que las poblaciones son muy estables, luego también es posible que la alta variabilidad sea debida a que históricamente siempre ha presentado alta variabilidad genética.

Los mosaicos de diferentes genotipos se pueden originan por medio de una microdiferenciación espacial o por una corta dispersión de gametos,

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

esporas o fragmentos vegetativos, lo que está avalado por una estructuración espacial moderada, revelado en el análisis intrapoblacional.

Aunque la mayoría de los estudios se hayan realizado en plantas superiores, existen también estudios que evidencian una alta tasa de cambio en el genoma de algas (van Oppen *et al.* 1993; Oliveira & Ragan 1994). La dificultad a esta explicación, es que la alta variabilidad genética tiene que ocurrir en todas las poblaciones. En *Gelidium canariense* todas las poblaciones presentan altos niveles de variabilidad genética, por lo que también podría contribuir a la alta variabilidad genética.

La caracterización molecular mediante RAPDs en la determinación del sexo, ha sido llevada a cabo de manera exitosa en *Gracilaria gracilis* (Martínez *et al.* 1999). Sin embargo en el estudio de caracterización molecular de la fase haploide y diploide de *Gelidium canariense,* no fue posible identificar ningún marcador diagnostico de las diferentes fases. La identificación de los gametofitos masculinos por microscopía tampoco reveló resultados positivos.

### 5.1.4.2. Estructuración genética poblacional.

Las poblaciones de *Gelidium canariense* se encuentran considerablemente diferenciadas, dado que el valor medio del coeficiente de diferenciación genética ($F_{ST}$) en todas las poblaciones fue de 0,320 y significativo ($p<0,001$) (Tabla 24). El valor de $G''_{ST}$ obtenido con el Indice de Shannon (0,387) es similar al $F_{ST}$ y está en concordancia con el obtenido por Engelen *et al.* (2001) en las poblaciones naturales de islas del alga parda *Sargasum polyceratum*. Los coeficientes de diferenciación medios más bajos se obtienen entre las poblaciones de Gran Canaria ($F_{ST}$= 0,145) y los más elevados entre las poblaciones de La Palma ($F_{ST}$= 0,387). En La Palma y en Tenerife se detectan mayores diferencias genéticas entre poblaciones de la misma isla (1- 20 Km) que interinsulares (50-220 Km), por el contrario entre la isla de Gran Canaria se observó un menor grado de diferenciación dentro de la isla que con otras islas. Esto se refleja, tanto en el dendrograma Neighbour-

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Joining, en el dendrograma UPGMA, como en el análisis de componentes principales (Figura 28-32).

El fuerte grado de diferenciación genética observado puede deberse a dos efectos principales: es posible que las poblaciones hayan sufrido procesos de deriva, y consecuentemente se haya generado la diferenciación genética observada. Sin embargo, en el caso de *G. canariense*, todas las poblaciones presentan elevados niveles de diversidad genética (Tabla 18), los cuáles no se esperan después de un proceso de deriva genética, de no existir múltiples colonizaciones. Por otro lado, podría ser consecuencia de un escaso o nulo flujo genético interpoblacional, consecuencia de un aislamiento geográfico (Weir & Cockerham 1984; Slatkin 1990; Hartl & Clark 1997). El escaso flujo genético puede aumentar el aislamiento genético y por ende la fijación de diferencias genéticas entre poblaciones, según la capacidad de dispersión de una especie y las diferentes características de la población (Amos & Harwood 1998; Dieckmann *et al.* 1999; Sork *et al.* 1999; Sosa 2001).

Cuando comparamos, el nivel de variabilidad genética por islas, observamos en general, una tendencia de la diversidad genética a disminuir desde las islas orientales hacia las occidentales, lo que se podría interpretar como un reflejo de la dirección de colonización de esta especie en las diferentes islas. Además, la distancia geográfica explica el 35% de la distancia genética de manera significativa, lo que indica un ligero aislamiento por distancia y puede tener relación con el sistema de corrientes en el área de Canarias.

La utilización de la diversidad genética entre poblaciones algales como trazadores biológicos de las corrientes predominantes presenta la ventaja de que engloba los patrones de movimiento de agua en una gran escala temporal, mientras que los datos oceanográficos están limitados a simples instrumentos de medición que realizan la toma de datos en periodos de semanas (Barton 1990). La diversidad genética ha sido utilizada como trazador biológico por Alberto *et al.* (1999) en *Gelidium sesquipedale*. La corriente general que afecta al área de Canarias, tiene dirección SSO (Pérez-Martell 1988; Sangrá 1995) y

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

los últimos estudios de corrientes superficiales indican que en los meses de mayor influencia de los vientos alisios existe un transporte dirección Este-Oeste (Villagarcía *et al.* 1999) en la capa de mezcla (150 m). Sin embargo, no existen datos de corrientes costeras, las más influyentes en el proceso de migración, dada la distribución de la especie.

En general, las macroalgas se consideran poco dispersoras, limitadas a pocos metros y con una supervivencia media de las esporas de unos pocos días (Hoffmann 1987; Santelices 1990; Valero *et al.* 2001). Las esporas de *Gelidium* carecen de flagelos, por tanto, presentan una capacidad de dispersión muy restringida en distancias largas, pero tienen una fuerte capacidad de adhesión al sustrato una vez liberadas (Santelices 1990). En el alga roja *Gracilaria gracilis*, se ha demostrado en experimentos de laboratorio, que el período de vida de las espermátidas (gametos masculinos) es de cinco horas (Valero *et al.* 2001) y mediante experimentos de campo se ha visto que la fertilización ocurre a 80 m como máximo de una población (Destombe *et al.* 1990). Engel *et al.* (1999) mediante análisis de paternidad realizados con microsatélites en esta misma especie, señala que los gametos masculinos fertilizan primeramente a las hembras próximas y que la mayoría de los procesos de emparejamiento ocurren en una distancia menor de 1 m. Sólo el 11% de gametos masculinos proceden de una población distinta. Otros estudios empíricos también indican distancias de dispersión de propágulos algales del orden de pocos metros desde la planta madre (Reed *et al.* 1988; Kendrick & Walker 1991; Pearson & Brawley 1996). La existencia de estructuración genética observada mediante marcadores isoenzimáticos ya ha sido puesta de manifiesto por Williams & Di Fiori (1996). Estos autores realizaron estudios en *Pelvetia fastigata*, una alga con dispersión de gametos restringida y encontraron subdivisión genética en pocos metros. Las algas con una dispersión potencial mayor debido a la existencia de frondes reproductivos flotantes o a la liberación de esporas al plancton no presentan una estructura genética a pequeña escala, sino a escalas superiores (entre 5 y 90 Km; Lu & Williams 1994; Pearson & Murray 1997).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Por tanto la explicación más probable para *G. canariense* es que las diferencias genéticas encontradas entre las poblaciones (separadas 0,5 Km) y las localidades (separadas 1 y 20 Km) son debidas a un flujo genético restringido, como resultado de una limitada capacidad de dispersión de esporas y gametos a estas escalas. Alberto *et al.* (1999) señalan la regeneración a partir de fragmentos vegetativos, como el principal mecanismo de dispersión a gran escala de *Gelidium sesquipedale.* Por tanto, es probable que los fragmentos vegetativos de *Gelidium canariense* se dispersen hacía el SSO, lo que explicaría la mayor relación de las poblaciones de Gran Canaria y Tenerife con la población de La Gomera. Durante las épocas de alisios podría existir un transporte dirección Este a Oeste, esto es, desde la islas orientales hacia las islas más occidentales. Esto podría explicar la mayor relación entre algunas poblaciones de las islas de Tenerife, La Gomera y La Palma. También puede ocurrir que Tenerife sea una barrera física que interrumpe la migración desde Gran Canaria hacia las islas más occidentales. Por eso, parece razonable plantear la hipótesis, de que Gran Canaria intercambia migrantes principalmente con la isla de La Gomera y Tenerife (además de consigo misma), favorecido probablemente por la contracorriente dirección NNO, mientras que los migrantes de estas islas pueden alcanzar más fácilmente las poblaciones de La Palma. Esta hipótesis parece plausible con la estimación del número de individuos migrantes por generación (Tabla 24). Sin embargo, los valores del coeficiente genético son considerablemente altos o lo que es lo mismo, las poblaciones se encuentran muy diferenciadas genéticamente, lo cuál nos indica que el flujo genético entre las poblaciones no es continuo, sino un proceso ocasional.

Engelen *et al.* (2001) analizó la estructura genética espacial de *Sargassum polyceratum* en un amplio espectro de hábitats intermareales y submareales encontrando que la profundidad y el tipo de bahía promueven la diferenciación poblacional a lo largo de las costas de la isla, aunque la dispersión alrededor de los extremos de la isla de Curacao conecta las poblaciones en diferentes grados. Procaccini *et al.* 1999 encontró diferencias significativas en *Halophila stipulacea* recogida entre profundidades 5, 15, 25 m y la posición dentro y entre los sitios de dos islas de la costa de Sicilia.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

A pesar de la diferenciación genética existente entre las poblaciones de *G. canariense*, el mayor nivel de variación genética de la especie, revelada en el AMOVA y en el análisis del Indice de Shannon se encuentra a nivel intrapoblacional (57-68%). Estudios de estructuración genética basados en el AMOVA y en el Indice de Shannon realizados por Bussell (1999), Martín *et al.* (1999) y Engelen *et al.* (2001) también mostraron concordancia entre los resultados de los dos análisis. Un gran porcentaje de la variación es debida a las diferencias entre individuos dentro de las poblaciones lo que es común para especies alógamas (Bussell 1999) y ha sido observado en el alga roja *Mazzaella laminarioides* (Faugeron *et al.* 2001), en *Sargassum polyceratum* (Engelen *et al.* 2001), en el kelp *Alaria marginata* (Kusumo & Druehl 2000) y en *Halidrys dioca* (Lu & Williams 1994). El origen reproductivo sexual de los gametofitos femeninos combinado con una alta tasa de dispersión local de las esporas originada por la fuerte hidrodinamia y la diferenciación microgeográfica moderada dentro de las poblaciones podrían ser el origen de estos resultados.

van Oppen *et al.* (1995) explican los altos niveles de variación intrapoblacional generados por RAPDs en *Phycodris rubens* por la actuación combinada de la deriva y la selección disruptiva. La selección natural ha sido apuntada como una causa de diferenciación genética en los organismos marinos (Hilbish 1996). Se ha sugerido que los organismos clonales tienen mayor probabilidad para ser organismos genéticamente distintos y adaptados localmente (Williams 1975; Ayre *et al.* 1991) y los mosaicos de individuos con genotipos localmente adaptados también se pueden originar por una escasa dispersión local.

Nybom & Bartish (2000) sostiene que los parámetros genéticos basados en RAPD muestran aproximadamente la misma asociación con los atributos de especie identificados previamente por Hamrick & Godt (1989) para isoenzimas, excepto para el rango geográfico de la especie. Estos autores encontraron que la diversidad dentro de la población no está muy afectada por el rango de distribución de la especie en cuestión y los valores de diversidad entre poblaciones basados en RAPD, incrementan cuando incrementa el rango de

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

distribución a diferencia de lo que se espera en de isoenzimas (Hamrick & Godt 1990). Nybom & Bartish (2000) concluyen que la diversidad dentro de la población derivada de marcadores RAPD no es probablemente un buen predictor de la diversidad genética total de la especie.

La probabilidad de una dispersión de esporas reducida sugiere una estructura genética a escala fina, como ocurre en otras algas rojas de similar comportamiento como en el caso de *Delisea pulcra* (Wright *et al.* 2000). Sin embargo, los estudios demográficos realizados en las poblaciones naturales de *G. canariense* (Lindgren *et al.* 1998) revelaron una alta tasa de supervivencia de las plantas y una estructura poblacional estable. Además, los estudios isoenzimáticos previos realizados por Sosa *et al.* (1998) no encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de las subpoblaciones esporofíticas y gametofíticas dentro de las poblaciones en equilibrio Hardy-Weinberg. Por lo tanto, no cabría esperar un alto grado subestructuración genética espacial en las poblaciones analizadas mediante RAPDs.

El análisis de autocorrelación confirmó la existencia de microdiferenciación genética moderada en tres poblaciones: Agaete (AP3), Puerto de la Cruz (PCP3) y Faro (FP1) (Figura 33, 34, 35), pero no se detectó en otras tres poblaciones (BBS1, BBS2 y GAS2P1). En aquellas poblaciones con autocorrelación espacial los límites de las primeras clases de distancia estaban entre 1 y 4,5 m dependiendo de la población. Estos resultados sugieren que en las poblaciones de Agaete (AP3), Puerto de la Cruz (PCP3) y Faro (FP1), los individuos genéticamente relacionados se encuentran también próximos geográficamente formando estructuras familiares. Así, los individuos situados dentro de este radio de distancia son genéticamente más similares entre sí, que aquellos que se sitúan fuera de esa distancia. Los valores de autocorrelación negativos encontrados en las clases de distancia mayores indican la incorporación de individuos genéticamente más distantes y por lo tanto, la entrada en otra subunidad genética de la población.

La estructura genética a pequeña escala puede ser el resultado de una dispersión restringida de gametos o zigotos, o consecuencia de un proceso de

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

autofecundación (Grosberg 1991; Doherty *et al.* 1994; Hellberg 1994; Ruckelshaus 1998). Sin embargo, también puede ocurrir estructuración debido a una dispersión restringida de propágulos asexuales (Burnett *et al.* 1995; McFadden 1997) o a la existencia de una selección natural localizada (Hilbish 1996).

Como ya se ha descrito anteriormente, las algas por lo general, presentan una corta dispersión en el espacio y en el tiempo, por lo que cabe esperar una subestructuración espacial elevada. Sin embargo las especies de *Gelidium* viven en hábitats asociados a fuerte hidrodinamia, siendo ésta una ventaja adaptativa en relación a otras especies, por lo que creemos que se produce buena dispersión local de esporas, gametos y fragmentos vegetativos en las poblaciones de *Gelidium canariense*. Como ya se ha discutido anteriormente, los elevados niveles de diversidad genética detectados en *G. canariense* son consecuencia probablemente del origen reproductivo sexual mayoritario, por lo que es poco probable que la estructuración detectada sea debida a una dispersión restringida de propágulos asexuales o a un proceso de autofecundación. La inexistencia de estructuración genética en la mitad de las poblaciones analizadas indica precisamente que a pequeñas escalas el encuentro de gametos y el establecimiento de las esporas puede estar afectado por una combinación compleja de fenómenos locales tales como la fuerte hidrodinamia local, las corrientes derivadas de las mareas y la heterogeneidad del hábitat. Por ej. Ruckelshaus (1988) sugiere que las corrientes de marea pueden ser las principales responsables de las discrepancias entre las distancias genética y las distancias geográficas analizadas en muchos organismos marinos sésiles.

Por tanto, la estructuración genética intrapoblacional moderada de los gametofitos en *G. canariense,* puede estar relacionado con la existencia de diferencias ambientales a pequeña escala (microhábitat) y la actuación de la selección natural.

En plantas terrestres, la selección natural puede causar diferencias genéticas a pequeña escala (Linhart & Grant 1996). En organismos marinos se

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

piensa que el flujo genético podría reducir o neutralizar los efectos de la selección a pequeña escala (Grosberg 1991) y la diferenciación genética relativa a la selección se ha identificado a escalas espaciales más grandes (Hilbish 1996), pero si la selección natural es suficientemente fuerte, puede no ser reducida por el flujo genético (Linhart & Grant 1996). En el caso de *Gelidium canariense,* puede existir una selección natural más notable, de lo que refleja el análisis de autocorrelación espacial, pero estar atemperada por el alto flujo genético local.

Por tanto, no podemos descartar la posibilidad de que la selección natural esté actuando a pequeña escala en *Gelidium canariense* y origine la estructuración genética observada. La actuación de la selección natural se ha argumentado en diversas ocasiones para explicar la observación de estructuración genética observada tanto en plantas terrestres (Linhart & Grant 1996) como en organismos marinos (Grosberg 1991; Hilbish 1996) e incluso en poblaciones de algas (Innes 1987;1988). Así, en *Enteromorpha linza*, se ha visto, que la dispersión potencial no siempre explica los patrones de estructura genética de pocos cientos de metros, esta especie presenta una subdivisión genética producida por la adaptación local a diferentes salinidades. En poblaciones algales de aguas templadas un agente selectivo fuerte y que varía a escalas pequeñas es la presión de pastoreo de erizos (Wright *et al.* 2000).

Es posible la existencia de clones adaptados a zonas muy concretas de salinidad, irradación, emersión, etc. Esta interpretación viene avalada por los datos de Innes (1987;1988), en los que describe la existencia de un mayor grado de diferenciación genética entre individuos muy próximos entre sí, pero en ambientes muy heterogéneos, que entre poblaciones separadas varios kilómetros en *Enteromorpha linza.* Innes (1987, 1988) se basa en el efecto de una presión selectiva diferencial en los microhábitats de una misma población, lo que conlleva la promoción de variabilidad genética dentro de la globalidad de la población.

Estudios realizados en *Fucus distichus* (Sideman & Mathieson 1983) también evidenciaron diferenciación ecotípica relacionada con la altura de

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

marea. Zuccarello *et al.* (1999) correlacionó la distribución espacial de los haplotipos del plastidio con la posición de la marea en el alga roja *Caloglossa leprieurii.* El número de haplotipos decrecía de la posición alta de la marea hacia la baja. Estos autores sugieren igualmente la adaptación diferencial de los haplotipos a las heterogéneas condiciones intermareales. Wright *et al.* (2000) encontraron en *Delisea pulcra* que los patrones de variabilidad genética a pequeña escala son debidos al movimiento del agua y a la actuación de la selección natural a microescala.

Esta interpretación viene asimismo, avalada por la consideración de la zona intermareal como una zona que soporta unos niveles de diferenciación genética mayores que las zonas submareales debido a su ambiente heterogéneo (Levinton 1973; Black & Jonson 1979; Jonson & Black 1984; Innes 1988).

Finalmente, la existencia de estructuras genética intrapoblacionales es un fenómeno muy común en las poblaciones vegetales terrestres (Linhart *et al.* 1981; Sokal & Watenberg 1983; Soltis & Soltis 1988; Berg & Hamrick 1995; Takahashi *et al.* 2000) y también se ha descrito en especies de algas (Williams & Di Fiori 1996; Wright *et al.* 2000; Zuccarello *et al.* 2001).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

## 5.2. ANÁLISIS DE DEMOGRÁFICO.

El porcentaje de relocalización de individuos marcados al cabo de un año mediante etiquetas fue nulo, lo cual nos indica las fuertes y extremas condiciones ambientales a las cuáles se encuentra sometida esta especie en las costas del Archipiélago Canario. El porcentaje de pérdidas de las etiquetas fue del cien por cien, no obstante los individuos que habíamos marcado mediante este sistema permanecía en la población desapareciendo sólo la etiqueta colocada. En otras especies de Gelidiales, se ha visto que los frondes pequeños son imposibles de etiquetar sin dañarlos o cortarlos, por lo que su tamaño no puede ser seguido a través del tiempo y esto se hace más patente en lugares de intermareales sujetas a fuerte hidrodinamia (Scrosati & Serviére-Zaragoza 2000).

Esta fuerte hidrodinamia se encuentra asociada en general a las especies de *Gelidium*, siendo uno de los rasgos más representativos del hábitat de este género y que ha dificultado incluso el cultivo de la especie en tanques de cultivo (Melo et al. 1991). De hecho, este aspecto es mucho más importante en la dinámica de la población que el ramoneo por herbívoros o el crecimiento de algas calcáreas y otros organismos sobre los frondes como ocurre en *Gelidium sesquipedale* (Gorostiaga 1990, Santos 1995). Por ello y a la hora de relocalizar las unidades muestrales se optó por el método de seguimiento desarrollado con los puntos fijos, apoyado con fotografías y mapas de los cuadrados e individuos resultando óptimo en la relocalización de las unidades muestrales.

La fuerte correlación positiva entre el peso seco y el volumen ($LC^2$) de las plantas de *Gelidium canariense* (Figura 41), nos permitió hacer una estimación indirecta del peso seco esperado a partir de parámetros morfológicos obtenidos en el muestreo no destructivo.

No se encontraron diferencias significativas para cualquiera de los parámetros demográficos entre los dos años de estudio, lo que indica que *G. canariense* tiene una estructura poblacional estable.

De las dos poblaciones analizados y comparadas en el muestreo no destructivo, solamente detectamos diferencias significativas entre poblaciones para los parámetros de biomasa individual y reclutamiento. Respecto al primer parámetro, se obtuvieron valores mayores para la población 1 y esta tendencia se mantiene constante al año siguiente y, está apoyada por la alta tasa de supervivencia de los individuos. Por lo tanto, *G. canariense*, es una especie que presenta un crecimiento extremadamente lento, y los individuos permanecen estables año tras año.

Respecto al reclutamiento de nuevos individuos, se obtuvieron diferencias significativas en el número de reclutas, pero éste fue extremadamente bajo (1 y 3 nuevos individuos en término medio para cada

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

población), lo cuál nos indica, que *G. canariense* presenta una dinámica poblacional interanual estable.

La existencia de variabilidad espacial a cualquiera de las escalas consideradas en tan solo dos parámetros demográficos puede indicar una cierta homogeneidad de las grandes variables ecológicas a gran escala, frente a una suave microdiferenciación ecológica a pequeña escala, como cabe esperar en ambientes intermareales. A gran escala, la temperatura y la luz determinan los límites de distribución de las especies, a través de la mortalidad y la inhibición del crecimiento o reproducción (Breeman 1988, Lüning 1990). A escala local, la luz, la hidrodinamia, la topografía del sustrato, la sedimentación y la competencia, son los factores determinantes en la zonación o distribución de especies observada a lo largo de un gradiente espacial y a su vez, están relacionados con el crecimiento de individuos adultos y la supervivencia de las plántulas procedentes de la germinación de esporas (Lobban *et al.* 1985; Schiel & Foster 1985, 1986; Kain & Norton 1990; Santos 1993b). En especies intermarelaes la tolerancia a la desecación ha sido señalada como la principal causa de zonación de las especies por diversos autores (Schonbek & Norton 1980; Oates & Murray 1983). Rico & Frediksen (1996) demostraron que el patrón de distribución de tres especies intermareales del género *Gelidium* es función de los rangos de tolerancia a la temperatura, exposición al aire, salinidad y cantidad de luz.

*Gelidium canariense* se asienta sobre sustrato basáltico volcánico, el cuál presenta una topografía abrupta formada por pequeños entrantes y salientes, montículos y oquedades por lo que puede existir una ligera microdiferenciación espacial la cuál añade una mayor heterogeneidad espacial a la ya de por si heterogénea zona intermareal. Este estudio se llevó a cabo en una zona aproximadamente de 4 metros cuadrados donde pueden existir diferentes microambientes, por lo que es lógico asumir la existencia de microdiferenciación de clones adaptados a zonas muy concretas de salinidad, temperatura, irradiación, energía de olas, herbívoros, etc. Esta hipótesis esta avalada por los resultados obtenidos para el patrón fenológico de las distintas generaciones de la especie. Sin embargo, el análisis genético fue realizado con

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

individuos procedentes de la misma zona y los resultados no revelaron una subestructuración poblacional. Respeto al patrón fenológico de la especie en general, existe dominancia de esporofitos pero a pequeña escala, cualquier de los dos estadios puede dominar. Santelices (1988) señala que los principales factores que varían a pequeña escala pueden ser los responsables del patrón a microescala de la fertilidad de los individuos, como por ej: la variación de la luz y de la temperatura.

Por otro lado, es posible que las diferencias de biomasa individual y reclutamiento sean debidas a la fuerte hidrodinamia o a las diferencias de presión de herbívoros entre ambas poblaciones separadas 500 m. La población 1 presenta individuos más grandes y un menor numero de reclutas respecto a la población 2.

La fuerte hidrodinamia es un rasgo característico de las poblaciones de *Gelidium*, por lo que puede estar íntimamente ligado al crecimiento positivo de los individuos. El oleaje estimula el desarrollo de la fijación de las algas al sustrato, de tal forma que únicamente en temporales severos se puede producir el desprendimiento de las plantas fijadas más débiles (Lobban *et al.* 1985). La presencia de un sistema basal de fijación al sustrato bien desarrollado y de un sistema de frondes erectos de consistencia fibrosa son importantes adaptaciones morfológicas que permiten a las especies de *Gelidium* resistir la acción del oleaje intensa. La presencia de hifas internas en los frondes de *Gelidium*, parece favorecer la adaptación de estas plantas a condiciones de fuerte oleaje (Feldmann & Hamel 1936). Anderson (1982) en un estudio de hidrodinamia en *Gelidium nudiformis* muestra que la morfología de esta especie favorece las microturbulencias que facilitan la incorporación de nutrientes y el intercambio de gases.

La acción de los herbívoros ha sido señalado como fuente importante de mortalidad para las esporas de macrófitos de crecimiento lento por diversos autores (Katada 1955; Schonbeck & Norton 1978, 1980; Ojeda & Santelices 1984; Dayton 1985; Gorostiaga 1990). Los principales potenciales herbívoros de las especies de *Gelidium* son los gasterópodos (abalón), equinodermos

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

(erizo) y peces herbívoros (Santelices 1988). Para un mejor entendimiento del reclutamiento de *G. canariense* se requieren estudios utilizando escalas temporales más largas y más cortas.

Santelices (1988) señala a los peces e invertebrados, principalmente moluscos y equinodermos como los principales herbívoros de especies de *Gelidium*. Santelices & Ugarte (1987) y Paya & Santelices (1989) indican además que la susceptibilidad al pastoreo de los diferentes estadios de las especies de *Gelidium* es poca, aunque éstas constituyen el recurso energético de varios herbívoros. Las poblaciones más extensas de *Gelidium* crecen en hábitats templados, donde existen peces herbívoros y estos pueden ser herbívoros importantes pero no existen datos en la bibliografía que avalen esta hipótesis. Los erizos, peces y cangrejos son los herbívoros potenciales en el hábitat de *G. canariense*. Numerosos crustáceos se encuentran en su hábitat, pero se desconoce si estos organismos lo utilizan como hábitat para protección y reproducción o como alimento. Burgados y lapas habitan la zona superior, por encima donde *G. canariense* crece, pero probablemente no pasten sobre ella. En el campo hemos encontrado parches de individuos con los frondes cortados a la mitad, pero no sabemos si esto es debido al herbivoría o a la alteración física producida por la fuerte hidrodinamia. La regeneración apical ha sido documentada para otras especies de *Gelidium* (e.j. *G. sesquipedale*, Gorostiaga 1990). Sin embargo, y dado que *Gelidium canariense* crece en la zona intermareal, es probable que los herbívoros de esta especie varíen según el estado de la marea.

Gorostiaga (1990) encontró en la base de individuos de mayor porte y densos de *Gelidium sesquipedale*, un estrato basal formado por algas esciáfilas, debido a la escasez de energía lumínica. Este autor también sugirió la competencia intraespecífica como un factor influyente sobre la baja viabilidad de las nuevas plántulas en *G. sesquipedale,* cuándo las poblaciones alcanzan la densidad máxima o capacidad de carga de la población (Levinton 1982). Otra posible explicación sugerida por el mismo autor es la alta ocupación de algas coralináceas incrustante, que compiten por sustrato y el espacio (Santelices 1988). Aunque experimentos llevados a cabo por Akatsuka (1986a)

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

en los que se destruía la capa basal de coralináceas incrustantes en campos de *Gelidium amansii*, no confirman esta hipótesis. En otros macrófitos ha sido comprobada la relación entre la baja tasa de reclutamiento y la existencia de un denso recubrimiento (Foster & Shiel 1985; Dayton *et al.* 1984; Benson 1986).

Los resultados obtenidos establecen claramente que las poblaciones de *G. canariense* del norte de Gran Canaria son considerablemente estables y homogéneas, en las que no se aprecian diferencias significativas en cuanto a los índices demográficos básicos: biomasa cosechable, densidad y supervivencia. El bajo reclutamiento junto con la alta supervivencia de los individuos registrado en las poblaciones son características de poblaciones de macrófitos perennes, estables y bien adaptados a las condiciones ambientales (Dayton *et al.* 1984; Dayton 1985). Comportamientos muy similares se han encontrado en *Gelidium sesquipedale* aunque los estudios se han realizado en dinámica de frondes (Gorostiaga 1990).

La modelización demográfica en *G. canariense* a partir de tres años de muestreo indican que los individuos de mayor biomasa sobreviven varias décadas, siendo el tiempo medio de generación alrededor de 40 años (Aberg *et al.* en revisión). La tasa de crecimiento media es ligeramente superior a 1 y la distribución de las clases de talla encontrada en el campo estuvo cerca de la distribución estable, lo que indica que las poblaciones están próximas a su capacidad. Este comportamiento es similar al encontrado para el alga roja *Gracilaria gracilis* (Engel *et al.* 2001) y también al de otras plantas perennes (e. g. Bierzychudek 1982; Aberg 1992a,b; Alvarez-Buylla *et al.* 1996; Valverde & Silvertown 1998). Otros estudios de demografía de especies de *Gelidium* están basados en la dinámica de módulos o frondes (Santos 1993; Santos & Nyman 1998) y es difícil hacer comparaciones.

Considerando el porcentaje de individuos fértiles en 1996 (69 % y 39 %), el reclutamiento de nuevos individuos fue considerablemente bajo, siendo 1 y 3 el número medio de individuos nuevos en la Población 1 y 2 respectivamente. Sin embargo no tenemos datos de variación intra e inter-anual y pueden haber aparecido o desaparecido nuevos individuos durante el año y también el

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

reclutamiento puede ser mayor en otros años. Los principales mecanismos de reclutamiento en las especies de *Gelidium* son a partir de: 1) regeneración vegetativa a partir del anclaje de fragmentos desprendidos; 2) germinación de esporas. En el caso de *Gelidium canariense*, puede ser debido al efecto combinado de ambos mecanismos ya que se carece de datos para determinar la importancia relativa. Gorostiaga (1990) observó en el estudio a nivel de frondes en *Gelidium sesquipedale*, un mayor importancia de la germinación de esporas frente a la fragmentación vegetativa, esta última se producía sólo de manera esporádica. Sin embargo, el bajo número de reclutas es un reflejo de la inexistencia de reclutamiento a partir de germinación de esporas y los principales factores que afectan al reclutamiento y a la supervivencia de los estados juveniles pueden ser los mismos que los que afectan al crecimiento de la especie como ya se discutió anteriormente. Especies de *Gelidium*, así como en otras algas rojas perennes, producen un gran número de esporas que parece ser excesivo respecto a la cantidad necesaria para mantener la población (Bhattacharya 1985). Sin embargo, las esporas pueden tener una mortalidad muy alta. Santos & Duarte (1996) realizaron estimaciones de la probabilidad de transición de tetraesporas a reclutas en *Gelidium sesquipedale* y obtuvieron resultados muy bajos, $4{,}7 \times 10^{-5}$. La baja viabilidad de plántulas procedentes de la germinación de esporas y fragmentos ha sido señalada para otras especies de *Gelidium*, además de una lenta maduración de las escasas plántulas supervivientes (*Gelidium sesquipedale*: Gorostiaga 1990; *G. pristoides*: Carter & Anderson 1985; *G. robustum y G. purpurascens*: Northcraft 1948).

En el caso de *Gelidium canariense,* puede estar ocurriendo multiplicación vegetativa de fragmentos procedentes de clones diferentes bien adaptados a microhábitats, lo que contribuye a mantener los altos niveles de variabilidad genética encontrados con marcadores RAPD.

Las investigaciones del ciclo de vida indican que una gran parte de la población está formada por plantas vegetativas, como se ha encontrado en muchas otras especies de algas rojas (May 1986; Santelices 1990; De Wreede & Green 1990). No obstante hay que presuponer que un número por

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

determinar, de las plantas vegetativas son gametofitos masculinos sin determinar.

En 1996 la proporción de individuos fértiles varió entre 0.69 y 0.39 para las Poblaciones 1 y 2 respectivamente. En 1997 la proporción de individuos fértiles fue de 0.10, esta baja proporción en 1997 fue debido probablemente a unas condiciones de muestreo muy difíciles: oleaje muy fuerte y las mareas más bajas coincidiendo con la última hora de la tarde, lo que significo menor cantidad de luz natural para identificar las estructuras reproductoras en el campo.

En el año 1996, a escalas espaciales de 500 m encontramos dominancia de los esporofitos no significativa pero a escalas más pequeñas (20-50 m) cualquiera de los dos estadios puede dominar. Hay que suponer que la proporción de gametofitos es mayor, dado que los gametofitos masculinos no están incluidos. Los principales factores que varían a pequeña escala pueden ser los responsables del patrón a microescala de la fertilidad de los individuos, como por ej: la variación de luz y de temperatura (Santelices 1988). Molenaar *et al.* (1997) encontró que el ciclo haplo-diploide isomórfico del alga roja *Cystoclonium purpureum* estaba regulado por la temperatura y la luz. El efecto de la luz y la temperatura también han sido indicados como los factores que producen crecimiento diferencial y consecuentemente el desequilibrio de las diferentes fases del alga roja *Chondracanthus chamissoi* (Bulboa 2001)

En *Gelidium canariense* se carecen de datos experimentales que avalen esta hipótesis y son necesarios estudios adicionales donde se analice a mayor y menor escala espacial y temporal, aún considerando las condiciones oceanográficas en el área de Canarias bastante uniformes a lo largo del año. Estos resultados ponen en evidencia la importancia de incluir las escalas pequeñas temporales y espaciales en los estudios de los ciclos de vida de *G. canariense*, donde normalmente existe mayor variación en medio ambientes marinos (Lindegardh *et al.* 1995; Aberg & Pavia 1997).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Al igual que otras especies del género *Gelidium* que presentan fases isomórficas, *Gelidium canariense* presenta dominancia de la fase esporofítica sobre la fase gametofítica femenina a gran escala (Santelices 1988, Sosa & García-Reina 1993) pero también existen especies con ratios de ploidía balanceados (Norall *et al.* 1981; De Wreede & Klinger 1988; Destombe *et al.* 1989; Kain (Jones) & Destombe 1995; Lindgren & Aberg 1996; Scrosati 1998b; Engel *et al.* 2001). Mucho se ha discutido respecto a la existencia de dominancia de una fase respecto a la otra y existen diversas hipótesis para explicar la preponderancia de fases en macroalgas marinas.

Factores abióticos como por ejemplo: temperatura, luz, altura de costa y factores bióticos tales como la diferencias de susceptibilidad a herbívoros, ventajas de diploides sobre haploides, mayor regeneración vegetativa de talos esprofíticos, procesos de apomeiosis, diferencias en el tiempo de maduración de las diferentes generaciones, mayor viabilidad de carpoesporas respecto a las tetraesporas, etc. se han sugerido como posibles factores que afectan al ratio de ploidía (Sosa 1991; Zucarrello *et al.* 2001, Aberg *et al.* en revisión).

Aunque muchos autores han atribuido el desequilibrio entre las dos fases a diferencias fisiológicas ocasionadas por diferencias de luz, temperatura, nutrientes, etc. (Allender 1977; Hannach & Santelices 1985; Luxoro & Santelices 1989; Destombe *et al.* 1993; Zucarrello *et al.* 2001) en el caso de *Gelidium canariense* no se han encontrado diferencias significativas medidas en nueve parámetros fisiológicos entre las generaciones haploides y diploides (Sosa *et al.* 1993). Resultados similares han sido obtenidos por Littler *et al.* (1987) en *Polycavernosa debilis* y Britting & Chapman (1993) en *Endocladia muricata.* El modelo de estadios (modelo GT) realizado en la modelización demográfica de *Gelidium canariense* (Aberg *et al.* en revisión), evidencia mayor sensibilidad a la alteración de la supervivencia de los individuos mayores fértiles que de los individuos pequeños. Además, se obtuvieron diferencias en las tasas vitales de las diferentes fases, lo que podría justificar el desequilibrio en el ratio de ploidía. La fase esporofítica tiene una supervivencia mayor que la gametofítica. El modelo GT simula una pequeña dominancia de esporofitos (56%) casi coincidente con la distribución obtenida en el campo y una mayor

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

tasa de supervivencia de estos. Por otro lado no se encontraron gametofitos en las clases de talla más grandes, lo que indica que los esporofitos pueden alcanzar una talla máxima mayor. Destombe *et al* (1989) y Lindgren & Aberg (1996) sugieren como factor determinante en el ratio de ploidía la supervivencia de los estadios juveniles debido principalmente a las dinámicas de supervivencia y no a las de fertilidad. En este estudio al igual que Engel *et al.* (2001) en *Gracilaria gracilis* se demostró que el balance de ploidía es debido principalmente a la dinámica de supervivencia y no la de fertilidad. Una razón para que suceda esto es que ambas especies son perennes y considerando el intervalo de un año, la supervivencia es más importante que la reproducción. El modelo GT se desarrolló asumiendo igual proporción de sexos y aunque este es un punto de partida razonable, el modelo de dos sexos es más apropiado. El modelo de los dos sexos en *G. gracilis* evidenció, que la alteración de la supervivencia de esporofitos es casi equilibrada si ambos sexos son alterados simultáneamente y ocurre lo mismo cuando el ratio de sexo es variado. Sin embargo, si sólo un sexo es alterado el cambio absoluto y la dirección depende del ratio de sexo.

Sosa (1991) encontró un gran número de heterocigóticos en las subpoblaciones de esporofitos de *Gelidium arbuscula* y señaló que los esporofitos pueden poseer las ventajas del heterocigótico, mostrando una mayor adaptación a cambios ambientales y aptitud colonizadora que los gametofitos. Esta hipótesis ha sido formulada anteriormente en las poblaciones de macroalgas marinas, en base a los superiores límites de distribución geográficos de los esporofitos de *Gelidium* en comparación a las plantas gametofitas (Dixon 1965; De Wreede & Klinger 1988; Clayton 1988; Rueness & Frediksen 1998). Se ha correlacionado la heterocigosis proteica con un mayor eficacia biológica, velocidad de desarrollo, y viabilidad en reptiles, coníferas e invertebrados marinos (Mitton & Grant 1984; Zouros & Foltz 1987). Los resultados indican que la preponderancia de la fase esporofítica en *G. canariense* puede ser debida también a una mayor preponderancia colonizadora de los esporofitos. Salinas (1991) y Juanes & Puente (1993) señalan para *Gelidium sesquipedale* una mayor capacidad de regeneración de los talos esporofíticos en relación a los talos gametofíticos. En *G. canariense*

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

no es posible relacionar la mayor capacidad colonizadora de la fase esporofítica en base al mayor nivel de polimorfismo de marcadores RAPDs en esta fase (Tabla 15).

Wooward (1989) sostiene en un estudio detallado sobre las poblaciones del alga roja *Endocladia muricata* que la predominancia de los individuos esporofíticos es debida a un mayor crecimiento y supervivencia de éstos y no al mayor reclutamiento de los esporofitos. Este autor no encontró diferencias en cuanto a los aspectos relativos a producción de esporas (tamaño de esporas, salida esporas, fenología reproductiva), susceptibilidad de herbívoros y tasas de dispersión. Sin embargo, encontró diferencias significativas en cuanto a la segunda tasa de adhesión al sustrato (adhesión de los ápices de las ramas a la superficie de la roca), siendo la tasa dos veces mayor para los esporofitos que para los gametofitos. En consecuencia, este autor considera que la mayor tasa de adhesión en los esporofitos es debido al menor coste reproductivo en el esporofito y la mayor tasa de adhesión al sustrato origina una mayor supervivencia de esta fase.

Los valores de densidad y biomasa obtenidos en *G. canariense* no se pueden comparar con los estudios de otras especies *Gelidium*, dado que los individuos se han definido como clones distintos o conjunto de módulos y la mayoría de los estudios considera cada fronde un individuo. Dyck & De Wreede (1995) obtuvieron valores de densidad de clones para el alga roja *Mazzaella splendens* valores inferiores, (76 clones/$m^2$) a los obtenidos con *Gelidium canariense*.

Los valores de biomasa (stock) para mantos de especies comerciales varían entre algunos cientos de gramos hasta 1.5 $kgm^{-2}$ (Santelices 1988), considerando estos valores *G. canariense* parece tener una biomasa cosechable alta (1000 $gm^{-2}$), aunque estos valores son sólo válidos para la zona intermareal donde se realizó el muestreo. Por tanto, son necesarios estudios de distribución y abundancia que abarquen todo el manto, es decir la población intermareal y la población submareal, para obtener una aproximación más precisa de este parámetro.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Para un mejor conocimiento de la dinámica poblacional, por ejemplo del reclutamiento, son necesarios estudios a escala temporal menor y mayor, dado que este estudio sólo nos permite conocer la dinámica interanual, pero puede que aparezcan y desaparezcan individuos en la población durante el año y además el reclutamiento puede ser mayor en otros años.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# VI. CONCLUSIONES

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1. El método de extracción de ADN fue eficiente, rápido y económico, por lo que se puede considerar un método óptimo para el análisis molecular en *Gelidium canariense.*

2. La metodología *bulks* parece ser apropiada para obtener una aproximación rápida de la variabilidad genética interpoblacional en *Gelidium canariense.* Esta metodología nos ofrece ventajas con relación a la simplificación y eficacia de la técnica, dado que reduce quince veces el trabajo experimental y evita los problemas derivados de la comparación de individuos de diferente ploidía. Sin embargo, presenta el inconveniente añadido al de pérdida de información, el que sólo permite realizar análisis interpoblacionales.

3. *Gelidium canariense* dispone de unos considerables niveles de diversidad genética, medidos mediante RAPD, mayoritariamente distribuidos dentro de las poblaciones, lo cuál puede ser un reflejo del origen reproductivo sexual de los gametofitos femeninos, combinado posiblemente con el carácter perenne de sus poblaciones, una variabilidad histórica elevada y la existencia de microdiferenciación genética espacial.

4. El grado de diferenciación genético existente entre las poblaciones de *Gelidium canariense* es considerable y existe aislamiento por distancia. El patrón del flujo genético interinsular entre las poblaciones naturales de *Gelidium canariense* parece ser en parte, consecuencia de la dinámica de corrientes en el área de Canarias.

5. La estructuración genética intrapoblacional no es un fenómeno generalizado en las poblaciones naturales de *Gelidium canariense*, lo cuál se puede explicar por la fuerte hidrodinamia local en las poblaciones.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

6. No se observaron diferencias significativas en los patrones de variación molecular mediante RAPD obtenidos en las fases gametofíticas (haploide) y esporofíticas (diploide) de *Gelidium canariense,* lo que es indicativo de la extensa similitud genética entre ambas fases.

7. Existe una fuerte y significativa correlación entre el volumen y el peso seco individual en *Gelidium canariense* lo cuál permite inferir el peso seco esperado de los individuos directamente de las poblaciones naturales, sin necesidad de muestreos destructivos.

8. No se encontraron diferencias significativas de las variables demográficas (biomasa cosechable, densidad, supervivencia) en las escalas analizadas a la vez que se detectó una escasa tasa de reclutamiento y una alto porcentaje de supervivientes en las poblaciones naturales de *Gelidium canariense*, todo lo cuál es consecuencia probablemente de una estructura demográfica estable de la especie.

9. Se detectaron diferencias espaciales significativas a escala de 500 m en la estructura de tallas, las cuáles pueden ser explicadas por diferencias de hidrodinamia o de presión de herbívoros entre las dos poblaciones. Estos dos factores pueden considerarse como los que más afectan al reclutamiento y a la supervivencia, por lo que se requieren muestreos a escalas temporales más cortas y más largas.

10. A escalas pequeñas (de 20-50 m) cualquiera de los dos estadios del ciclo de vida de la especie (gametofitos o esporofitos) puede dominar, estando este patrón posiblemente determinado por la variación a pequeña escala de factores ambientales (luz y temperatura), poniendo de manifiesto la importancia de incluir las escalas pequeñas en el diseño experimental. La modelización de las distintas fases del ciclo de vida evidencian que el equilibrio en el ratio de ploidía es debido a la dinámica de supervivencia más que a la dinámica de fertilidad.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

11. Los valores de biomasa detectados fueron alrededor de 1000 $gm^{-2}$ y están en consonancia con los descritos para mantos comerciales de otras agarofitas.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# VII. ANEXOS

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

**Tabla 1- Frecuencia de bandas por población de los 13 cebadores analizados. BBS1: Bocabarranco, Población 1 Parcela1; BBS2: Bocabarranco, Población 2, Parcela1; AP3: Agaete, Parcela3; PCP3: Puerto de la Cruz, Parcela 3; GAS2P1: Garachico, Población 2, Parcela 1; PPB1: Punta Brava, Parcela 1; FP1: Faro, Parcela 1; TLVP1: Talavera, Parcela 1; HP1: Hermigua, Parcela 1. se muestra el Número de individuos analizados entre paréntesis.**

| Cebador | Fragmento | Tamaño (pb) | GRAN CANARIA | | | TENERIFE | | | LA PALMA | | LA GOMERA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | BBS1 (31) | BBS2 (32) | AP3 (29) | PCP3 (27) | GAS2P1 (29) | PPB1 (31) | FP1 (30) | TLVP1 (31) | HP1 (12) |
| OPM 5 | 1 | 1100 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,484 | 0,000 | 0,645 | 0,000 |
| | 2 | 700 | 0,000 | 0,031 | 0,034 | 0,000 | 0,000 | 0,290 | 0,000 | 0,258 | 0,000 |
| | 3 | 500 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,581 | 0,000 | 0,065 | 0,000 |
| | 4 | 400 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,963 | 0,966 | 0,419 | 0,967 | 0,968 | 0,833 |
| OPM 7 | 1 | 2000 | 0,000 | 0,063 | 0,069 | 0,037 | 0,000 | 0,000 | 0,533 | 0,000 | 0,000 |
| | 2 | 1000 | 0,032 | 0,094 | 0,034 | 0,000 | 0,034 | 0,000 | 0,133 | 0,000 | 0,333 |
| | 3 | 600 | 0,226 | 0,094 | 0,379 | 0,519 | 0,276 | 0,581 | 0,233 | 0,000 | 0,250 |
| | 4 | 550 | 0,452 | 0,656 | 0,172 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | 5 | 525 | 0,871 | 0,813 | 0,931 | 1,000 | 1,000 | 0,935 | 1,000 | 0,710 | 1,000 |
| OPM 18 | 1 | 950 | 0,387 | 0,065 | 0,034 | 0,074 | 0,036 | 0,000 | 0,033 | 0,000 | 0,000 |
| | 2 | 850 | 0,161 | 0,258 | 0,034 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | 3 | 600 | 0,581 | 0,161 | 0,310 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | 4 | 550 | 0,355 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | 5 | 450 | 0,419 | 0,839 | 0,966 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,968 | 1,000 |
| OPK 4 | 1 | 1800 | 0,581 | 0,344 | 0,793 | 0,704 | 0,586 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,333 |
| | 2 | 1200 | 0,129 | 0,344 | 0,172 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,032 | 0,000 |
| | 3 | 1000 | 0,129 | 0,438 | 0,069 | 0,037 | 0,000 | 0,032 | 0,033 | 0,000 | 0,000 |
| | 4 | 900 | 0,129 | 0,094 | 0,069 | 0,481 | 0,414 | 0,032 | 0,200 | 0,032 | 0,500 |
| | 5 | 800 | 0,419 | 0,500 | 0,690 | 0,074 | 0,172 | 0,000 | 0,400 | 0,000 | 0,000 |
| | 6 | 700 | 0,000 | 0,063 | 0,000 | 0,074 | 0,069 | 0,000 | 0,533 | 0,000 | 0,000 |
| | 7 | 450 | 0,032 | 0,531 | 0,172 | 0,000 | 0,069 | 0,000 | 0,067 | 0,065 | 0,000 |
| | 8 | 400 | 0,226 | 0,375 | 0,310 | 0,259 | 0,207 | 0,774 | 0,067 | 0,032 | 0,167 |

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| OPK 7 | 1 | 1400 | 0,290 | 0,406 | 0,828 | 0,000 | 0,000 | 0,065 | 0,000 | 0,000 | 0,167 |
| | 2 | 1000 | 0,355 | 0,156 | 0,241 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | 3 | 800 | 0,968 | 0,938 | 0,897 | 1,000 | 0,966 | 0,839 | 1,000 | 0,897 | 0,833 |
| | 4 | 500 | 0,419 | 0,094 | 0,103 | 0,185 | 0,586 | 0,000 | 0,367 | 0,000 | 0,000 |
| | 5 | 400 | 0,129 | 0,094 | 0,034 | 0,000 | 0,069 | 0,000 | 0,333 | 0,000 | 0,000 |
| OPK 8 | 1 | 2000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,034 | 0,000 | 0,967 | 0,000 | 0,250 |
| | 2 | 1100 | 0,903 | 0,938 | 0,897 | 1,000 | 0,966 | 0,903 | 1,000 | 0,933 | 1,000 |
| | 3 | 900 | 0,226 | 0,031 | 0,000 | 0,111 | 0,138 | 0,000 | 0,033 | 0,000 | 0,000 |
| | 4 | 700 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,222 | 0,345 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| OPK 10 | 1 | 1200 | 0,194 | 0,742 | 0,621 | 0,000 | 0,000 | 0,276 | 0,000 | 0,233 | 0,143 |
| | 2 | 1000 | 0,032 | 0,032 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,172 | 0,567 | 0,000 | 0,143 |
| | 3 | 550 | 0,968 | 1,032 | 1,000 | 0,889 | 1,000 | 1,000 | 0,933 | 1,000 | 0,429 |
| OPK 16 | 1 | 1700 | 0,161 | 0,281 | 0,069 | 0,000 | 0,034 | 0,000 | 0,167 | 0,000 | 0,167 |
| | 2 | 1200 | 0,290 | 0,125 | 0,345 | 0,000 | 0,276 | 0,556 | 0,067 | 0,038 | 0,083 |
| | 3 | 1100 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,074 | 0,138 | 0,000 | 0,100 | 0,000 | 0,583 |
| | 4 | 1050 | 0,935 | 0,938 | 0,862 | 1,000 | 0,897 | 1,000 | 1,000 | 0,962 | 0,750 |
| | 5 | 900 | 0,065 | 0,063 | 0,379 | 0,000 | 0,034 | 0,185 | 0,067 | 0,000 | 0,333 |
| | 6 | 800 | 0,097 | 0,063 | 0,345 | 0,000 | 0,207 | 0,000 | 0,133 | 0,000 | 0,000 |
| | 7 | 700 | 0,871 | 0,719 | 0,345 | 0,519 | 0,379 | 0,407 | 0,200 | 0,077 | 0,750 |
| | 8 | 650 | 0,581 | 0,281 | 0,552 | 1,000 | 0,931 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,750 |
| | 9 | 600 | 0,032 | 0,594 | 0,276 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| | 10 | 550 | 0,129 | 0,406 | 0,138 | 0,000 | 0,000 | 0,074 | 0,133 | 0,038 | 0,083 |
| | 11 | 450 | 0,000 | 0,000 | 0,276 | 0,667 | 0,517 | 0,630 | 0,467 | 0,000 | 0,583 |
| | 12 | 400 | 0,129 | 0,281 | 0,345 | 0,111 | 0,207 | 0,704 | 0,133 | 0,000 | 0,000 |
| OPL 14 | 1 | 1500 | 0,097 | 0,125 | 0,448 | 0,889 | 0,759 | 0,032 | 0,900 | 0,290 | 0,500 |
| | 2 | 1100 | 0,871 | 1,000 | 0,966 | 1,000 | 0,966 | 0,903 | 1,000 | 0,839 | 1,000 |
| | 3 | 1000 | 0,452 | 0,094 | 0,172 | 0,000 | 0,000 | 0,548 | 0,000 | 0,194 | 0,000 |
| | 4 | 850 | 0,323 | 0,063 | 0,138 | 0,000 | 0,000 | 0,484 | 0,333 | 0,097 | 0,583 |
| | 5 | 750 | 0,194 | 0,094 | 0,172 | 0,000 | 0,034 | 0,387 | 0,133 | 0,129 | 0,000 |
| | 6 | 700 | 0,419 | 0,063 | 0,103 | 0,259 | 0,552 | 0,000 | 0,267 | 0,000 | 0,833 |
| | 7 | 500 | 0,000 | 0,000 | 0,138 | 0,111 | 0,069 | 0,161 | 0,133 | 0,032 | 0,083 |
| OPL16 | 1 | 2000 | 0,667 | 0,281 | 0,103 | 0,519 | 0,414 | 0,045 | 0,967 | 0,000 | 0,083 |
| | 2 | 1850 | 0,200 | 0,938 | 0,897 | 0,926 | 0,793 | 0,045 | 0,967 | 0,235 | 0,667 |
| | 3 | 1700 | 0,000 | 0,156 | 0,103 | 0,222 | 0,448 | 0,045 | 0,800 | 0,412 | 0,000 |

**Tabla 1 continuación.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| OPL16 | 4 | 1000 | 0.233 | 0.094 | 0.103 | 0.815 | 0.862 | 0.545 | 0.967 | 0.941 | 0.833 |
| | 5 | 950 | 0.933 | 0.938 | 0.862 | 0.074 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 6 | 900 | 0.133 | 0.000 | 0.000 | 0.333 | 0.655 | 0.500 | 0.433 | 0.000 | 0.000 |
| | 7 | 800 | 0.200 | 0.250 | 0.207 | 0.259 | 0.345 | 0.000 | 0.133 | 0.000 | 0.583 |
| | 8 | 700 | 0.033 | 0.281 | 0.724 | 0.037 | 0.000 | 0.818 | 0.033 | 0.412 | 0.583 |
| | 9 | 600 | 0.233 | 0.250 | 0.103 | 0.000 | 0.379 | 0.773 | 0.333 | 0.882 | 0.500 |
| | 10 | 550 | 0.500 | 0.969 | 0.966 | 0.926 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.917 |
| OPN 4 | 1 | 1300 | 0.700 | 0.688 | 0.966 | 0.963 | 0.931 | 0.452 | 1.000 | 0.677 | 1.000 |
| | 2 | 1200 | 0.000 | 0.125 | 0.069 | 0.667 | 0.207 | 0.000 | 0.533 | 0.000 | 0.167 |
| | 3 | 900 | 0.167 | 0.563 | 0.138 | 0.593 | 0.276 | 0.613 | 0.533 | 0.032 | 0.667 |
| | 4 | 800 | 0.433 | 0.375 | 0.448 | 0.963 | 0.690 | 0.710 | 0.600 | 0.903 | 0.667 |
| | 5 | 750 | 1.000 | 0.938 | 1.000 | 0.926 | 0.966 | 0.935 | 1.000 | 0.935 | 0.333 |
| | 6 | 650 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.407 | 0.138 | 0.065 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 7 | 500 | 0.700 | 0.406 | 0.966 | 0.000 | 0.000 | 0.032 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| OPN 8 | 1 | 2000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.793 | 0.000 | 0.111 |
| | 2 | 1000 | 0.793 | 1.034 | 1.000 | 1.000 | 0.964 | 0.677 | 1.000 | 0.400 | 1.000 |
| | 3 | 950 | 0.517 | 0.069 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.600 | 0.000 |
| | 4 | 750 | 0.276 | 0.517 | 0.172 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 5 | 550 | 0.138 | 0.724 | 0.207 | 0.111 | 0.071 | 0.226 | 0.379 | 0.067 | 0.222 |
| OPN 9 | 1 | 1400 | 0.194 | 0.469 | 0.172 | 0.296 | 0.310 | 0.000 | 0.367 | 0.000 | 0.583 |
| | 2 | 780 | 0.387 | 0.313 | 0.379 | 0.222 | 0.207 | 1.000 | 0.833 | 1.000 | 0.167 |
| | 3 | 700 | 0.065 | 0.000 | 0.103 | 0.111 | 0.345 | 0.172 | 0.900 | 0.567 | 0.083 |
| | 4 | 650 | 0.226 | 0.250 | 0.034 | 0.741 | 0.655 | 0.000 | 0.200 | 0.000 | 0.583 |
| | 5 | 550 | 0.097 | 0.156 | 0.069 | 0.000 | 0.276 | 0.586 | 0.400 | 0.900 | 0.000 |
| | 6 | 500 | 0.032 | 0.250 | 0.000 | 0.000 | 0.103 | 0.069 | 0.033 | 0.000 | 0.083 |
| | 7 | 400 | 0.032 | 0.219 | 0.069 | 0.000 | 0.000 | 0.207 | 0.000 | 0.700 | 0.417 |
| | 8 | 350 | 0.129 | 0.219 | 0.103 | 0.963 | 0.862 | 0.000 | 0.233 | 0.000 | 0.083 |

**Tabla 1 continuación.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

# VIII. BIBLIOGRAFIA

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Aagaard JE, Krutovskh K, Strauss SH (1998) RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. Heredity 81:69-78.

Aberg P, Lindgren A, Bouza N, Sosa P (En revisión) Demography of a haploid-diploid red alga, *Gelidium canariense*. J Ecol

Aberg P (1989) Distinguishing between genetic individuals in *Ascophyllum nodosum* populations on the Swedish west coast. Br Phycol J 24:183-190.

Aberg P (1990) Measuring size and choosing category size for a transition matrix study of the seaweed *Ascophyllum nodosun*. Mar Ecol Progr Ser 63: 281-287.

Aberg P (1992a) A demographic study of two populations of the seaweed *Ascophyllum nodosum*. Ecology 73:1473-1487.

Aberg P (1992b) Size based demography of the seaweed *Ascophyllum nodosum* in stochastic environments. Ecology 73:1488-1501.

Aberg P, Pavia H (1997) Temporal and multiple scale spatial variation in juvenile and adult abundance of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. Mar Ecol Progr Ser 158:111-119.

Aguilera-Klink F, Brito A, Castilla C, Díaz A, Fernández-Palacios JM, Rodríguez A, Sabaté F, Sánchez J (1994) Canarias: economía, ecología y medio ambiente. Lemus F (ed). La Laguna, Tenerife, España.

Aide TM, Rivera E (1998) Geographic patterns of genetic diversity in *Poulsenia armata* (Moraceae): implications for the theory of the pleistocene refugia and the importance of riparian forest. J Biogeogr 25:695-705.

Akatsuka I (1970) Male organs of *Gelidium amansii* LMx. *Gelidium pacificum*

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Okam. And *Gelidium pusillum* (Stakh.) Le Jol. Bulletin of the Japanese Society of Phycology 18:112-115.

Akatsuka I (1973) Male organs of *Pterocladia capillacea* (Gelidiaceae, Rhodophyta). Journal of Japanese Botany 48:52-54.

Akatsuka I (1979) A note on the male reproductive organs of *Gelidium japonicum* Okam., and *Beckerella subcostata* (Okam.) Kylin (Gelidiaceae, Rhodophyta). Revue Algolgique, ns 14:17-20.

Akatsuka I (1986a) Japanese Gelidiales (Rhodophyta), especially *Gelidium*. Oceanogr Mar Biol Annu Rev 24:171-263.

Akerman S, Tammisola J, Lapinjoki SP, Soderlund H; Kapuppinen V, Vihera-Aarnio-Aarnio A, Regina M & Hagqvist R (1995) RAPD markers in parentage confirmation of a valuable breeding progeny of European white birch. Can For Res 25:1070-1076.

Alberto F, Santos R, Leitao J M (1997) DNA extraction and RAPD markers to assess the genetic similarity among *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) populations. J Phycol 33:706-710.

Alberto F, Santos R, Leitao J M (1999) Assesing patterns of geographic dispersal of *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) through RAPD differentiation of populations. Mar Ecol Prog Ser 191:101-108.

Alvarez-Buylla ER, García-Barrios R, Lara-Moreno C, Martínez-Ramos M (1996) Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. Ann Rev Ecol Syst 27:387-421.

Alveal K, Oliveira E, Ferrario M (1995) Manual de métodos filológicos. Editorial Anibal Pinto Concepción (Chile): 643-666.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Allender BM (1977) Ecological experimentation with the generations of *Padina japonica* Yamada (Dictyotales: Phaeophyta). J Exp Mar Biol Ecol 26:225-234.

Allphin L, Windham MT, Harper KT (1998) Genetic diversity and gene flow in the endangered dwarf bear poppy, *Arctomecon humilis* (Papaveraceae). Am J Bot 85: 1251-1261.

Amos W, Harwood J (1998) Factors affecting level of genetic diversity in natural populations Philosophical Transactions, Roy Soc Lond Ser B 353:177-186.

Anderson, SM, Charters AC (1982) A fluid dynamics study of sea water flow through *Gelidium nudifrons*. Limn Ocean 27:399-412.

Ang PO, De Wreede RE (1990) Matrix models for algal life history stages. Mar Ecol Ser 59:171-181.

Ang PO , De Wreede RE (1993) Simulation and analysis of the dynamics of a *Fucus distichus* (Phaeophyceae, Fucales) population. Mar Ecol Prog Ser 93:253-265.

Ang P, De Wreede RE, Shaughnessy F, Dyck L (1990) A simulation model for an *Iridaea splendens* (Gigartinales, Rhodophyta) population in Vancouver, Canada. Hydrobiologia 204/205:191-196.

Apostol BL, Black IV, Miller BR, Reiter P, Beaty BJ (1993) Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers applications to the mosquito *Aedes aegypti*. Theor Appl Genet 86:991-1000.

Arístegui J (1990) La distribución de la clorofila a en aguas de Canarias. Bol Inst Esp Oceanogr 6:61-72.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Arístegui J, Hernández-León S, Gómez M, Medina L, Ojeda A, Torres S (1989) Influence of the north trade winds on the biomass and production of neritic plankton in Gran Canaria. En: Ros JD (ed) Topics in marine biology. Scientia Marina, 53: 223-229.

Arístegui J, Tett P, Hernández-Guerra A, Basterretxea G, Montero MF, Wild K, Sangrá P, Hernández-León S, Cantón M, García-Braun JA, Pacheco M, Barton ED (1997) The influence of island-generated eddies on chlorophyll distribution: a study of mesoscale variation around Gran Canaria. Deep-Sea Research I, 44:71-96.

Ashburner GR, Thompson WK, Halloran GM (1997) RAPD analysis of south pacific coconut palm population. Crop Sci 37:992-997.

Atienzar FA, Cordi B, Donkin ME, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH (2000) Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. Aqua Toxic 50:1-12.

Auge H, Neuffer B, Erlinghagen F, Grupe R, Brandl R (2001) Demographic and random amplified polymorphic DNA analyses reveal high levels of genetic diversity in a clonal violet. Mol Ecol 10:1811-1819.

Avise JC (2000) Phylogeography. The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Ayre DJ, Read J, Wishart J (1991) Genetic subdivision within the eastern Australian population of the sea anemone *Actinia tenebrosa*. Mar Biol 109:379-390.

Ayre DJ, Davis AR, Billingham M, Llorens T, Styan C (1997a) Genetic evidence for contrasting patterns of dispersal in solitary and colonial ascidians. Mar Biol 130:51-61.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Ayre DJ, Hughes TP, Standish RJ (1997b) Genetic differentiation, reproductive mode, and gene flow in the brooding coral *Pocillopora damicornis* along the Great Barrier Reef, Australia. Mar Ecol Prog Ser 159:175-187.

Bacallado JJ, Arístegui J, Barquín J, Brito A, Bouchet P, Cejas JR, Cruz T, Capdevilla F, García-Talavera F, Hernández F, Izquierdo M, Moreno E, Nuñez J, Ortea JA, Pérez-Dionis G, Pérez A, Pérez JM, López J, Díaz C, Brito M (1983) Estudio del bentos marino del Archipiélago Canario: I Catálogo preliminar de los invertebrados marinos bentónicos de Canarias. Confección de un manual de identificación. Gobierno Autónomo de Canarias. Facultad de Biología. Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

Bacallado JJ, Báez M, Brito A, Cruz T, Dominguez F, Moreno E, Pérez JM (1984) Fauna (marina y terrestre) del Archipiélago Canario. Colección Gran Biblioteca Canaria. Editorial Edirca. Las Palmas de Gran Canaria. 356 p.

Barilotti, DC (1980) Genetic considerations and experimental design of outplanting studies. En: Abbott IA, Foster MS, Eklund LF (eds), Pacific Seaweed Aquaculture. California Sea Grant Coll. Progm, La Jolla, p 10-18.

Bartish IV, Jeppsson N, Nybom H (1999a) Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphyc DNA (RAPD) markers. Mol Ecol 8:791-802.

Barton ED (1990) The poleward undercurrent on the eastern boundary of the subtropical north Atlantic. En: Neshyba SJ, Mooers ChNK, Smith RL, Barber RT (eds) Poleward flows along eastern ocean boundaries. Springer-Verlag, New York, p 82-92.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1992) DNA amplification fingerprinting of bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 38:70-76.

Bhattacharya D (1985) The demography of fronds of *Chondrus crispus*

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Stackhouse. J Exp Mar Biol Ecol 91:217-231.

Beebe, SE, Ochoa I, Skroch PW, Nienhuis J, Tivang J (1995) Genetic diversity among common-bean breeding lines developed for Central America. Crop Sci 35:1173-1178.

Bell G (1994) The comparative biology of the alternation of generations. En: Kirpatrick M (ed) Lectures on Mathemathics in Life Sciences: Theories for the evolution of Haplo-Diploid Life Cycles. American Mathematical Association, Providence.

Benson MR (1986) A demographic study of *Dictyopteris undulata* Holmes (Dictyotales, Phaeophyta) at Santa Catalina Island. California. Phycologia 25:448-454.

Benter T, Papadopoulos S, Pape M, Manns M, Poliwoda H (1995) Optimization and reproducibility of random amplified polymorphic DNA in human. Annal Biochem 230:92-100.

Benzie JAH, Stoddart JA (1992) Genetic structure of outbreaking and non-outbreaking crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) populations of the grat Barrier Reef. Mar Biol 112:119-130.

Berg EE, Hamrick JL (1995) Fine-scale genetic structure of a turkey oak forest. Evolution 49:110-120.

Betancort-Villalba MJ, González-Henríquez MN (1991) Estudio preliminar sobre la biología de las poblaciones de *Gelidium canariensis* (Grunow) Seoane en Gran Canaria. Act Bot Malac 16:51-58.

Bhattacharya D (1985) The demography of fronds of *Chondrus crispus* Stackbouse. J Exp Mar Biol Ecol 91:217-231.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Bielawski JP, Pumo DE (1997) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. Heredity 78:32-40.

Billot C, Rousvoal S, Estoup A, Epplen JT, Saumitou-Laprade P, Valero M, Kloareg B (En revisión) Kelp populations in the English Channel are highly structured by long-term currents.

Billot C, Rousvoal S, Estoup A, Epplen JT, Saumitou-Laprade P, Valero M, Kloareg B (1998) Isolation and characterisation of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown alga *Laminaria digitata*. Mol Ecol 7:1778-1780.

Billot C (1999) Structuration génétique des populations de *Laminaria digitata* (Phaeophycées) en Manche: Utilisation de marqueurs hypervaribles. PhD thesis.

Billot C, Boury S, Benet H, Kloareg (1999) Development of RAPD markers for parentage analysis in *Laminaria digitata*. Bot Mar 42:307-314.

Bierzychudek P (1982) The demography of jack-in-the-pulpit, a forest perennial that changes sex. Ecol Monogr 52:335-351.

Bolch CJ, Blackburn SI, Hallegraeff GM, Vaillancourt RE (1999) Genetic variation among globally disjunct populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham assessed by RAPD-PCR. J Phycol 35:356-367.

Bonnin I, Huguet T, Gherardi M, Prosperi JM, Oliveri I (1996) High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago trunculata* (Leguminosae), shown with RAP markers. Am J Bot 83:843-855.

Bouza N, Caujapé-Castells J, González-Pérez MA, Batista F, Sosa PA (2002) Population structure and genetic diversity of two endangered endemmic species of the canarian laurel forest: *Dorycnium spectabile* (Fabaceae) and

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

*Isoplexis chalcantha* (Scrophulariaceae). Int J Plant Sci 163: en prensa.

Bowditch BM, Albright DG, Willians JGK, Braun MJ (1993) Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA markers in comparative genome studies. Meth Enzymol 224:294-309.

Braun JG, de Armas JD, Real F, Escanez JE, Villamandos JE, Santamaría MTG (1986) Oceanographical conditions in Canary Islands waters. I. Oxigen and nutrients. I.C.E.S. 1986/C:26.14 p.

Breeman AM (1988) Relative importance of temperature and other factors in determining geographical boundaries of seaweeds: experimental and phenological evidence. Helgoländer Meeresunters 42:199-241.

Britting SA, Chapman DJ (1993) Physiological comparision of the isomorphic life history phases of the high intertidal alga *Endocladia muricata* (Rhodophyta). J Phycol 29:739-745.

Brown AHD (1979) Enzyme polymorphisms in plant populations. Theor Popul Biol 15:1-42.

Brown AHD, Weir B (1983) Measuring genetic variability in plant populations. En: Tanksley SD, Orton TJ (eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, p. 219-239.

Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (1990b) Plant genetic diversity. TRENDS ECOL EVOL 6:265-266.

Brunell MS, Whitkus R (1997) RAPD marker variation in *Eriastrum densifolium* (Polemoniaceae): implications for subespecific delimitation and conservation. Systematic Botany 22:543-553.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Bulboa CR, Macchiavello JE(2001) The effects of light and temperature on different phases of the life cycle in the carrageenan producing alga Chondracanthus chamissoi (Rhodophyta, Gigartinales). Bot Mar 44:371-374.

Burnett WJ, Benzie JAH, Beardmore JA, Ryland JS (1995) Patterns of genetic subdivision in populaitons of a clonal cnidarian, Zoanthus coppingeri, from the Great Barrier Reff. Mar Biol 122:665-673.

Buso GSC, Rangel PH, Ferreira ME (1998) Analysis of genetic variability in South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. Mol Ecol 7:107-117.

Büscher N, Zyprian E, Blaich R (1993) Identification of gravepine cultivars by DNA analyses: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10-mer primers. Vitis 32:187-188.

Buschmann AH, Vergara PA (1993) Effect of rocky intertidal amphipods on algal recruitment: a field study. J Phycol 29:154-159.

Bussell JD (1999)The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). Mol Ecol 8:775-789.

Cardoso MA, Provan J, Powell W, Ferreiras PCG, Oliveira DE (1998) High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). Mol Ecol 7:601-608.

Carter AR (1985) Reproductive morphology and phenology, and culture studies of *Gelidium pristoides* (Rhodophyta) from Port Alfred in South Africa. Bot Mar. XXVIII:303-311.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Carter AR, Anderson RJ (1985) Seasonal growth and agar contents in *Gelidium pristoides* (Gelidiales, Rhodophyta) from Port Alfred, South Africa. Bot Mar 29:117-123.

Caujapé-Castells J, Pedrola-Monfort J (1997) Space-time patterns of genetic structure within a stand of *Androcymbium gramineum* (Cav.) McBride (Colchicaceae). Heredity 79:341-349.

Cenis JL(1992) Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucl Acid Res 20:2380.

Chalmers KJ, Waugh R, Sprent JI, Simons AJ, Powell W (1992) Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata*. Heredity 69: 465-472.

Chapman ARO (1974) The ecology of macroscopic marine algae. Ann Rev Ecol Syst 5: 65-80.

Chapman ARO (1993) 'Hard' data for matrix modelling of *Laminaria digitata* (Laminariales, Phaeophyta) populations. Hydrobiologia 260/261:263-267.

Chopin T, Pringle JD, Semple RE (1992) Impact of harvesting on frond density and biomass of Irish moss (*Chondrus crispus* Stackhouse) beds in the southern Gulf of St. Lawrence. Can J Fish Aqual Sci 49:349-357.

Clark AG, Lanigan CMS (1993) Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. Mol Biol Evol 10:1096-1111.

Clayton MN (1988) Evolution and life histories of brown algae. Bot Mar 31:379-387.

Crawley MJ (1997) Plant Ecology. 2nd edn. Blackwell Science Ltd. Oxford.

Coffroth MA, Lasker HR (1998) Effect of rocky intertidal amphipods on algal

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

recruitment: a field study. J Phycol 29:154-159.

Coyer JA, Olsen JL, Stam WT (1997) Genetic variability and spatial separation in the sea palm kelp, *Postelsia palmaeformis* (Phaeophyceae) as assessed with M13 fingerprintints and RAPDs. J Phycol 33: 561-568.

Crochemore ML, Huyghe C, Kerelan MC, Duirand F, Julier B. (1996) Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of population of the *Medicago sativa complex*. Agronomie 16:421-432.

Culotta E (1994) Is marine biodiversity a risk?. Science 263: 918-920.

Dawson IK, Simons AJ, Waugh R, Powel W (1995) Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. Heredity 75:10-18.

Dayton PK (1985) Ecology of kelp communities. Annu Rev Ecol Syst 16:215-245.

Dayton PK, Currie V, Gerrodette T, Keller BD, Rosenthal R, Ven Tresca D (1984) Patch dynamics and stability of some California kelp communities. Ecol Monogr 54:253-289.

De Greef, Triest L (1999) The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for hybrid detection in *Scripus* form the river Schelde (Belgium). Mol Ecol 8:379-386.

De Kroon H (1993) Competition between shoots in stands of clonal plants. Plant Species Biol 8:85-94.

De Kroon H, van Groenendael J (1997) The Ecology and Evolution of Conal Plants. Backhuys Publishers, Leiden.

De León AR, Braun JG (1973) Ciclo anual de la producción primaria y su

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

relación con los nutrientes en aguas Canarias. Bol Inst Esp Oceanogr 167:1-24.

Devos KM, Gale MD (1992) The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. Theor Appl Genet 84:567-572.

Denny MW, Shibata MF (1989) Consequences of surf-zone turbulences for settlement and external fertilization. Am Nat 134, 503-506.

Destombe C, Valero M, Vernet P, Couvet D (1989) What controls haploid-diploid ratio in the red alga, *Gracilaria verrucosa*? J Evol Biol 2, 317-338.

Destombe C, Godin J, Nocher M, Richerd S, Valero M (1993) Differences in response between haploid and diploid isomorphic phases of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta: Gigartinales) exposed to artificial environmental conditions. Hydrobiologia 260/261:131-137.

De Wreede RE, Klinger T (1988) Reproductive strategies in algae. En: Lovett-Doust J, Lovett-Doust L (eds) Plant reproductive ecology: patterns and strategies. Oxford University Press, Oxford, UK, p 267-284.

De Wreede RE, Green LG (1990) Patterns of gametophyte dominance of *Iridaea splendens* (Rhodophyta) in Vancouver Harbour, Vancouver, British Columbia. Canada. J Appl Phycol 2: 27-34.

Dieckmann U, O'Hara B, Weisser W (1999) The evolutionary ecology of dispersal. Trends Ecol Evol 14:88-90.

Díaz O, Sun G-L, Salomon B, von Bothmer R (1999) Levels and distribution of allozyme and RAPD variation in populations of *Elymus fibrosus* (Schrenk) Tzvel. (Poaceae). Gen Resour Crop Evol 47:11-24.

Dixon PS (1958a) The structure and development of the thallus in the British species of *Gelidium* and *Pterocladia*. Ann Bot NS 22:353-368.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Dixon PS (1959) The structure and development of the reproductive organs and carporsporophyte in two British species of *Gelidium*. Ann Bot NS 23:397-407.

Dixon PS (1965) Perennation, vegetative propagation and algal life histories, with special reference to *Asparagopsis* and other rhodophyta. Bot Gothob 3:67-74.

Dixon PS (1973) Biology of the Rhodophyta. Oliver and Boyd, Edinburgh.

Dixon PS, Irvine LM (1973) Seaweeds of the British isles. Volume 1. Rhodophyta, part 1. introduction, Nemaliales, Gigartinales. British Museum (Natural History). Londres. 252 p.

Doherty PJ, Planes S, Mather P (1995) Gene flow and larval duration in seven species of fish from the Great Barrier Reef. Ecology 76: 2373-2391.

Dos Santos JB, Nienhuis J, Skroch P, Tivang J, Slocum MK (1994) Comparision of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. Theor Appl Genet 87:909-915.

Doty, MS (1947) Critical tide factors that are correlated with the vertical distribution of marine algae and other organisms along Pacific coast. Ecology 27:315-328.

Dutcher JA, Kapraun DF (1994) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). J Appl Phycol 6:267-273.

Dyck LJ, DeWreede RE (1995) Patterns of seasonal demographic change in the alternate isomorphic stages of *Mazzaella splendens* (Gigartinales, Rhodophyta). Phycologia 34:390-395.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
BIBLIOTECA DE CIENCIAS BASICAS

Eanes W, Kohen RK (1978) An analysis of genetic structure in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. Evolution 32:784-797.

Elisiário PJ, Justo EM, Leitao JM (1999) Identification of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis. Scientia Hortic 81:287-299.

Ellstrand NC , Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. Annu Rev Ecol Syst 24: 217-242.

Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL (1993) Artifacutal variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. Biotechniques 14:215-217.

Engel C, Wattier R, Destombe CD, Valero M (1999) Performance of non-motile male gamets in the sea: analysis of paternity and fertilization success in a natural population of a red seaweed, *Gracilaria gracilis*. Proceedings of the Royal Society of London. Biological Series 266:1879-1886.

Engel C, Åberg P, Gaggiotti O, Destombe C, Valero M (2001) Population dynamics and stage structure in a haploid-diploid red seaweed, *Gracilaria gracilis*. J Ecol 89:436-450.

Engelen AH, Olsen JL, Breeman AM, Stam WT (2001) Genetic differentation in *Sargassum polyceratium* (Fucales: Phaeophyceae) around the island of Curacao (Netherlands Antilles). Mar Biol 139:267-277.

Epperson BK (1990) Spatial patterns of genetic variation within plant populations. En: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds) Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates Inc.

Epperson BK (1993) Recent advances in correlation studies of spatial patterns of genetic variation. Evol Biol 27:95-155.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Eriksson O (1993) Dynamics of genets in clonal plants. Trends Ecol Evol 8:313-316.

Eriksson O, Jerling L (1990) Hierarchical selection and risk spreading in clonal plants. In: van Groenendael J, De Kroon H (eds) Clonal Growth in Plants: Regulation and Function. SPB Academic Publishers, The Hague, p 79-94.

Esselman EJ, Jianqiang L, Crawford DJ, , Windus JL, Wolfe AD (1999) Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphyc DNA (RAPD) and inters imple sequence repeat (ISSR) markers. Mol Ecol 8:443-451.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitocondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.

Fan KC (1961) Morphological studies of the Gelidiales. University of California Publications in Botany 32:315-368.

Faugeron S, Valero M, Destombe C, Martínez EA, Correa JA (2001) Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). J Phycol 37:705-716.

Fernández C, Niell FX (1982) Zonación del fitobentos intermareal de la región de Cabo Peñas (Asturias). Inv Pesq 46:121-141.

Fernández C, Menéndez P (1990) Producción de las frondes juveniles de *Chondrus crispus* Stackhouse (Rhodophyceae). Scien Mar 54:211-215.

Feldmann J, Hamel G (1936) Floridées de France. 7. Gélidiales. Rev algol 9:85-140.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Frankel OH, Brown AD, Burdon JJ (1995) The conservation of plant biodiversity. Cambridge Univ. Press.

Freile-Pelegrín Y (1996) Caracterización química y estacionalidad del agar en tres agarofitas de interés económico. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Freile-Pelegrín Y, Robledo DR, García-Reina G (1995) Seasonal agar yield and quality in *Gelidium canariensis* (Grunow) Seoane-Camba (Gelidiales, Rhodophyta) from Gran Canaria, Spain. J Appl Phycol 7:141-144.

Foster MS, Dean TA, Deysher LE (1985) Subtidal techniques. En: Littler MM, Littler DS (eds) Handbook of Phycological Methods, Ecological Field Methods: Macroalgae. Cambridge University Press. NY, p 199-232.

Garbary DJ, De Wreede RE (1988) Life history phases in natural populaitons of Gigartinaceae (Rhodophyta): quantification using resorcinol. En: Lobban CS, Chapman DJ, Kremer BP (ed) Experimental phycology. A laboratory manual. Cambridge University Press, Cambridge, p 174-178.

García-Jiménez P, Marian FD, Rodrigo M, Robaina RR (1999) Sporulation and sterilization method for axenic culture of *Gelidium canariensis*. J Biotech 70: 227-229.

Gauer L, Cavalli-Molina S (2000) Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguaariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. Heredity 84:647-656.

Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ (1994) Genetic anlysis of populations of threatened snake species using RAPD markers. Mol Ecol 3: 329-337.

Gillies ACM, Cornelius JP, Newton AC, Navarro C, Hernández M, Wilson J (1997) Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber tree

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

*Cedrela odorata* L. (Spanish cedar), assessed using RAPDs. Mol Ecol 6:1133-1145.

Gillies ACM, Navarro C, Lowe AJ, Hernández M, Wilson J, Cornelius JP (1999) Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Switetenia macrophylla*), assessed using RAPDs. Heredity 83:722-732.

Goodell K, Elam DR, Nason JD, Ellstrand NC (1997) Gene flow among small populations of a self-incompatible plant: an interaction between demography and genetics. Amer J Bot 84:1362-1371.

Goff LJ, AW Coleman (1988) The use of plastid DNA restriction endonuclease patterns in delineating red algal species and populations. J Phycol 24:357-368.

González-Henríquez MN, Betancort-Villalba MJ (1997) Seasonal dynamics in populations of *Gelidium canariensis* (Grunow) Seoane (Gelidiaceae, Rhodophyta). Book of Abstracts II International Workshop on *Gelidium*. Las Palmas de Gran Canaria. Canary Islands. December 9-12.

González M, Montoya R, Candia A, Gómez P, Cisternas M (1996) Organellar DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) and nuclear random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of morphotypes of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) from Chile. Hydrobiologia. 326/327:229-234.

Gorostiaga JM (1990) Aspectos demográficos del alga roja *Gelidium sesquipedale* (Clemente) Thuret. Discusión sobre su adecuada gestión como recurso explotable. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco.

Graham LE, Wilcox LW (2000) Algae. Prentice may, Upper Saddle River, NJ.

Griffith DA (1987) Spatial autocorrelation: a primer. Resource publications in geography. State College, Pennsylvannia.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1993) Genética. McGraw-Hill Interamericana.

Grosberg RK (1991) Sperm-mediated gene flow and the genetic structure of a population of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. Evolution 45:130-145.

Gustafsson L, Gustafsson P (1994) Low genetic variation in Swedish populations of the rare species *Vicia pisiformis* (Fabaceae) revealed with RFLP (rDNA) and RAPD. Plant Syst Evol 189:133-148.

Hadrys H, Balick M, Schierwater B (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in Mol Ecol. Mol Ecol 1:55-63.

Hamrick J, Linhart Y, Mitton JB (1979) Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Ann Rev Ecol Syst 10:173-200.

Hamrick JL, Godt MJW (1990) Allozyme diversity in plant species. En: Brown HD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds) Plant populations genetics, breeding and genetic resources. Sinauer, Sunderland, MASS.

Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of the life history traits on genetic diversity in plants species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B 351:1291-1298.

Hannan GL, Orick MW (2000) Isoenzyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (Iridaceae). Am J Bot 87: 293-01.

Hannach G, Santelices B (1985) Ecological differences between the isomorphic reproductive phases of two species of *Iridaea* (Rhodophyta:Gigartinales). Mar Ecol Prog Ser 22:291-303.

Hara T (1994) Growth and competition in clonal plants persistence of shoot

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

populations and species diversity. Folia Geobot Phytotax 29:181-201.

Haroun RJ, Gil-Rodríguez MC, Díaz de Castro J, Prud'homme van Reine WF (2002) A checklist of marine plants from the Canary Islands (Central Eastern Atlantic Ocean). Bot Mar 45:139-169.

Harper JL (1977) Population Biology of Plants. Academic Press. London, p 892.

Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of population genetics. Sinauer Publ., Sunderland, MA.

Hawkes MW (1990) Reproductive strategies. En: Cole KM, Sheath RG (eds) The Biology of the Red Algae Cambridge University Press. New York, p 455-476.

Hawkins SJ, Harnoll RT (1985) Factors determining the upper limits of intertidal canopy-forming algae. Mar Ecol Prog Ser 20: 265-271.

He Q, Viljanen MK, Mertsola J (1994) Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. Mol Cell Probes 8:155-160.

Heaton HJ, Whitkus R, Gómez-Pompa A (1999) Effects of life history traits on genetic ecological and phenotypic differences in the tropical tree chicozapote (*Manikara zapota* (L.) R. Royen) are not matched by genetic divergence: a random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Mol Ecol 8:627-632.

Hellberg ME (1994) Relationships between inferred levels of gene flow and geographic variation in a philopatric coral, *Balanophyilla elegans*. Evolution 48:1829-1854.

Hernández-León S (1988a) Gradients of mesozooplancton biomass and ETS activity in the wind-shear area as evidence of an island mass effect in the Canary Island waters. J Plankton Research 10:1141:1154.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Hernández-León S (1988b) Algunas observaciones sobre la abundancia y estructura del mesozooplancton en aguas del Archipiélago Canario. Bol Inst Esp Oceanogr 5:109-118.

Heywood JS (1991) Spatial analysis of genetic variation in plant populations. Ann Rev Ecol Syst 22: 335-355.

Hilbish TJ (1996) Populations genetics of marine species: The interaction of natural selection and historically differentiated populations. J Exp Mar Biol Ecol 200: 670-683.

Hilu KW (1994) Evidence from RAPD markers in the evolution of *Echinochloa millets* (Poaceae). Pl Syst Evol 189:247-257.

Hillis DM, Moritz C, Mable BK (1996) Molecular systematics. 2nd edn. Sinauer Publ, Sunderland, MA.

Ho CL, Phang SM, Pang T (1995a) Molecular characterisation of Sargassum *polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerasee chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. J Appl Phycol 7:33-41.

Ho CL, Phang SM, Pang T (1995b) Application of polymerase chain reaction (PCR) using random amplied polymorphic DNA (RAPD) primers in the molecular identification of selected *Sargassum* species (Phaeophyta, Fucales). Eur J Phycol 30: 273-280.

Hoelzel AR (1992) Molecular genetics analisys of populations: A practical approach. Oxford University Press.

Hoffmann AJ (1987) The arrival of seaweed propagules at the shore: a review. Bot Mar 30:151-165.

Hoffman DL, Bregitzer P (1996) Identification of reproducible PCR-RAPD

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

markers that enable the differentiation of closely related six-rowed malting barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars.

Hommersand MH, Fredericq S (1988) An investigation of cystocarp development in *Gelidium pteridifolium* with a revised description of the Gelidiales (Rhodophyta). Phycologia 27:254-272.

Hong Y, Coury DA, Polne-Fuller M, Gibor A (1992) Lithium chloride extraction of DNA from seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta). J Phycol 28:717-720.

Hong Y-K, Kim SD, Polne-Fuller M, Gibor A (1995) DNA extraction condictions from Porphyra perforata using LiCl. J Appl Phycol 7:101-107.

Huang H, Layne DR, Kubisiak TL (2000) RAPD inheritance and diversity in Pawpaw (*Asimina triloba*). J Am Soc Hort Sci 125:454-459.

Hsiao JY, Lee SM (1999) Genetic diversity and microgeographic differentiation of Yushan cane (*Yushania niitakayamensis*; Poaceae) in Taiwan. Mol Ecol 8: 263-270.

Huenneke LF (1991) Ecological implications of genetic variation in plant populations. In: Falk DA, Holsinger KE (eds) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York, p 31-44.

Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.). Theor Appl Genet 86:927-934.

Hunt A (1993) Effects of constrasting patterns of larval dispersal on the genetic connectedness of local populations of two intertidal starfish, *Patteriella calcar* and *P. exigua*. Mar Ecol Prog Ser 92:179-186.

Innes DJ (1987) Genetic structure of asexually reproducing *Enteromorpha linza* (Ulvales:Chlorophyta) in Long Island Sound. Mar Biol 94:459-467.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Innes DJ (1988) Genetic differentiation in the inrtertidal zone in populations of the alga *Enteromorpha linza* (Ulvales: Chlorophyta). Mar Biol 97:9-16.

Isabel N, Beaulieu J, Bousquet J (1995) Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. Proc Natl Acad Sci USA 92:6369-6373.

ITC (1981) Pilot survey of the world seaweed industry and trade. Int. Trade Centre UNCTAD/GATT, Geneva, 111 p.

Jaccard P (1908) Nouvelles rescherches sur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat 44:223-270.

James EA, Ashburner GR (1997) Intraspecific variation in *Astelia australiana* (Liliaceae). Biol Conservation 82:253-261.

Jenczewski E, Prosperi JM, Ronfort J (1999) Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. Mol Ecol 8:1317-1330.

Jones WE (1956) Effect of spore coalescence on the early development of *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss. Nature (Lond) 178:426-427.

Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevschi A, Marmiroli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez, Karp A (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of Euoropean laboratories. Mol Breed 3:381-390.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Juanes JA, Puente A (1993) Differential reattachment capacity of isomorphic life phases of *Gelidium sesquipedale*. Hidrobiología 260/261:139-144.

Kain JM, Norton TA (1990) Marine ecology. En: Cole KM, Sheath (eds) The biology of Red Algae. Cambridge University Press, p 375-421.

Kain (Jones) JM, Destombe C (1995) A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. J Appl Phycol 7:269-281.

Katada M (1955) Fundamental studies on the propagation of Gelidiaceous algae with special reference to shedding and adhesion of the spores, germination, growth and vegetative reproduction. J. Shimonoseki Coll Fish 5:1-87.

Kays S, Harper JL (1974) The regulation of plant and tiller density in grass sward. J Ecol 62:97-105.

Kendrick GA, Walker DI (1991) Dispersal distances for propagules of *Sargassum spinuligerum* (Sargassceae, Phaeophyta) measured directly by vital staining and venturi suction sampling. Mar Ecol Prog Ser 79:133-138.

King LM, Schaal BA (1989) Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. Evolution 43:1117-1119.

Kuehn MM, Minor JE, White BN (1999) An examination of hybridization between the cattail species *Typha latifolia* and *Typha angustifolia* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and chloroplast DNA markers. Mol Ecol 8:1981-1990.

Kusumo HT, Druehl LD (2000) Variability over space and time in the genetic structure of the winged kelp *Alaria marginata*. Mar Biol 136:397-409.

La Violette PE (1974) A satellite-aircraft thermal study of the upwelled water off Spanish Sahara. J Phys Oceanogr 4:676-684.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. Science 241:1455-1460.

Lannér-Herrera C, Gustafsson M, Fält A-S, Bryngelsson T (1996) Diversity in natural populations of wild *Brassica olearacea* as estimated by isozyme and RAPD analysis. Genetic Resources and Crop Evolution 43:13-23.

Lazo ML, Greenwell M, McLachlan J (1989) Population structure of *Chondrus crispus* Stackhouse (Gigartinaceae, Rhodophyta) along the coast of Prince Edward Island. Canada: distribution of gametophytic and sporophytic fronds. J. Exp. Mar Bio Ecol 12:45-58.

Le Corre V, Dumoulin-Lapègue S, Kremer A (1997) Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. The role of history and geography. Mol Ecol 6:519-529.

Lee S-W, Ledig T, Johnson DR (2002) Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the white mountains, California. Am J Bot 89:566-577.

Levin DA (1977) The organisation of genetic variability in *Phlox drummondii*. Evolution 31:477- 494.

Levin DA (1978) Genetic variation in annual *Phlox*: Self-compatible versus self-incompatible species. Evolution 32:245-263.

Levin DA, Kerster HW (1974) Gene flow in seed plants. Evol Biol 7:139-220.

Levinton JS (1982) Marine Ecology. Prentice-Hall. Englewood Cliffs. NJ. 526 p.

Lewis JR (1964) Ecology of Rocky Shores. English University Press, London.

Lewis WM, Grant MC, Saunders JF (1984) Chemical patterns of atmospheric deposition in the state of Colorado. Wat Resour Res 20:1691-1704.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. Evolut Biol 6:381-394.

Lim P, Thong K, Phang S (2001) Molecular differentation of two morphological variants of *Gracilaria salicornia.* J Appl Phycol 13:335-342.

Lindegardh M, André C, Jonsson PR (1995) Analysis of the spatial variability in abundance and age structure of two infaunal bivalves, *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki.* using hierarchical sampling programs. Mar Ecol Prog Ser 116: 85-97.

Lindgren A, Aberg P (1996) Proportion of life cycle stages of *Chondrus crispus* and its population structure: a comparison between a marine and an estuarine environment. Bot Mar 39: 263-268.

Lindgren A, Bouza N, Aberg P, Sosa PA (1998) Spatial and temporal variation in distribution of *Gelidium canariensis* (Rhodophyta) from natural populations of the Canary Islands. J Appl Phycol 10:273-278.

Lindstrom SC, Olsen JL, Stam WT (1997) Postglacial recolonization and the biogeography of *Palmaria mollis* (Rhodophyta) along the Norteast Pacific coast. Can J Bot 75:1887-1896.

Linhart YB (1974) Intrapopulation differentiation in annual plants. *I. Veronica peregrina* L. raised under non-competitive conditions. Evolution 28:232-243.

Linhart YB, Grant MC (1996) Evolutionary dynamics of complex polymorphisms. Evolution 14:450-472.

Linhart YB, Mitton JB, Sturgeon KB, Davis ML (1981) Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. Heredity 46: 407-426.

Lin-Sheng S, Duan D-L, Li X-H, Li C-X (1998) Use of RAPD for detecting and

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

identifying *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). Chin J Oceanol Limnol 16:237-242.

Littler MM, Murray SM (1975) Impact of sewage on the distribution, abundance and community structure of rocky intertidal macroorganims. Mar Biol 30: 277- 291.

Littler MM, Littler DS, Taylor PR (1987) Functional similarity among isomorphic life-history phases of *Polycavernosa debilis* (Rhodophyta: Gracilariaceae). J Phycol 23:501-505.

Liu ZW, Jarret RL, Duncan RR, Kresovich S (1994) Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum viginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. Genome 37:1011-1017.

Liu Z, Furnier GR (1993) Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. Theo Appl Genet 98:873-883.

Llinás O, Rueda MJ, Pérez-Martell E (1993) Variabilidad de parámetros oceanográficos en aguas de Canarias. Bol Inst Esp Oceanogr 9:89-100.

Lobban CS, Harrinson PJ, Duncan MJ (1985) The Physiological Ecology of Seaweeds. Cambridge University Press, Cambridge.

Lönn M, Sandberg A, Redbo-Torstensson P (1998) Fitness-related traits of allozyme genotypes in *Bromus hordeaceaus* L. (Poaceae) associated with field habitat and experimental floofing. Biol J Linnean Soc 64:207-222.

Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Ann Rev Ecol Syst 15:65-95.

Lu TT, Williams SL (1994) Genetic diversity and genetic structure in the brown

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

alga *Halidrys dioica* (Fucales: Cystoseiracea) in Southern California. Mar Biol 121:363-371.

Lüning K (1990) Seaweeds. Their Enviroment, Biogeography, and Ecophysiology. Wiley-Interscience, New York.

Luo H, Mörchen M, Engel C, Destombe C, Epplen JT, Epplen C, Saumitou-Laprade P, Valero M (1999) Characterisation of microsatellite markers in the red alga *Gracilaria gracilis*. Mol Ecol 8:700-7002.

Luxoro C, Santelices B (1989) Additional evidence for ecological differences among isomorphic reproductive phases of *Iridaea laminarioides* (Rhodophyta: Gigartinales). J Phycol 25:206-212.

Lynch M, Milligan G (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol Ecol 3:91-99.

Macler BA (1988) Salinity effects on photosynthesis, carbon allocation and nitrogen assimilation in the red alga, *Gelidium coulteri*. Plant Physiol. 88: 690-694.

MacPherson JM, Eckstein PE, Scoles GJ, Gajadhar AA (1993) Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers and effects of primer and DNA concentration. Mol Cell Probes 7:239-299.

Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27:209-220.

Marián FD, García-Jimenez P, Robaina RR (2000) Polyamines in marine macroalgae: levels of putrecine, spermidine and spermine in the thalli and changes in their concentration during glycerol-induced cell growth in vitro. Physiologia plantarum 110:530-534.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Martín C, González-Benito ME, Iriondo JM (1997) Genetic diversity within and among populations of a threatened species: *Erodium paularense* Fern. Gonz., Izco. Mol Ecol 6:813-820.

Martín C, González-Benito E, Irondo JM (1999) The use of genetic markers in the identification and characterization of three recently discovered populations of a threatened plant species. Mol Ecol 8:831-840.

Martínez EA, Destombe C, Quillet MC, Valero M (1999) Identification of RAPD markers highly linked to sex determination in the red algae *Gracilaria gracilis*. Mol Ecol 8:1533-1538

May G (1986) Life history variations in a predominantly gametophytic population of Iridaea cordata (Gigartinaceae, Rhodophyta). J Phycol 22:448-455.

May G (1986) Life history variations in a predominantly gametophytic population of I*ridaea cordata* (Gigartinaceae, Rhodophyta). J Phycol 22: 448-455.

Mayes C, Saunders GW, Tan IH, Druehl LD. (1992) DNA extration methods for Kelp (Laminariales) tissue. J Phycol 28:712-716.

McEwan NR, Bakht J, Cecchini E, Coultart A, Geri C, Mcdonald FM, Mcdonald MS, Rahman NNA, Williamson (1998) Examination of the pipetting variation between individuals performing random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J Microbiol Meth 32:213-215.

McFadden CS (1997) Contributions of sexual and asexual reproduction to population structure in the clonal soft coral, *Alcyonium rudyi*. Evolution 51:112-126.

McHugh DJ (1991) Worlwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. Hydrobiologia 221:19-29.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

McLachlan JL, Lewis NI, Lazo ML (1988) Biological considerations of *Chondrus crispus* Stackhouse (Rhodophyta, Gigartinaceae) in the southern Gulf of St. Lawrence, Canada. Gayana Bot 45:29-54.

Medina L (1995) Análisis multidisciplinar del ecosistema costero insular, balance energético, capa de mezcla y modelo biológico. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Melo RA (1998) *Gelidium* comercial exploitation: natural resources and cultivation. J App .Phycol 10:303-314.

Melo RA, Harger BWW, Neushul M (1991) *Gelidium* cultivation in the sea. Hydrobiologia 221:91-106.

Meneses I (1996) Assesssment of populations of *Gracilaria chilensis* (Gracilaria, Rhodophyta) utilizing RAPDs. J Appl Phycol 8:185-192.

Meneses I, Santelices B (1999) Strain selection and genetic variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 11:241-246.

Meneses I, Santelices B, Sanchez P (1999) Growth-related intraclonal genetic changes in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales: Rhodophyta). Mar Biol 135:391-397.

Meneses I (2001) Insights on the biology of *Gracilaria chilensis* using molecular techniques. Cah Biol Mar 42:45-51.

Menkir A, Goldsbrough P, Ejeta G (1997) RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of sorghum. Crop Science 37:564-569.

Mercado JM, Niell FX, Gil-Rodríguez (2001) Photosynthesis might be limited by light, not inorganic carbon availability, in three intertidal Gelidiales species. New Phytologist 149:431-439.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Meunier JR, Grimont PAD (1993) Factors affecting reproducibility of amplified polymorphic DNA fingerprints. Res Microbiol 144:373-379.

Michaneck G (1983) World resources of marine plants. En: O Kinne (ed) Marine Ecology. Vol V. Part 2. John Wiley & Sons Ltd. New York, p 795-837.

Micheli MR, Bova R, Pascale E, D'Ambrosio E (1994) Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Nucl Acid Res 22:1921-1922.

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to diesease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acd Sci USA 88:9828-9832.

Miller KA, Olsen JL, Stam WT (2000) Genetic divergence correlates with morphoogical and ecological subdivisión in the deep-water elk kelp, *Pelagophycus porra* (Phaeophyceae). J Phycol 36:862-870.

Mizukami Y, Kito H, Kunimoto M, Kobayashi M (1998) Effect of DNA preparation from laver (*Porphyra yezoensis*) thalli on reproducibility of RAPD (random amplified polymorphic DNA) patterns. J Appl Phycol 10:23-29.

Molenaar FJ, Breeman AM (1997) Latitudinal trends in the growth and reproductive seasonality of *Delesseria sanguinea*, *Membranoptera alata*, and *Phycondrys rubens* (Rhodophyta). J Phycol 33:330-343.

Monaghan BG, Halloran GM (1996) RAPD variation within and between natural populations of morama [*Tylosema esculentum* (Burchell) Schreiber] in southern Africa. S Afr J Bot 62:287-291.

Moran P (1948) The interpretation of Statistical maps. J Roy Stat Soc 10B: 243-251.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed Chain Reaction. Methods Enzimology. 155:335-350.

Munda IM (1980a) Changes in the benthic algal associations of the vicinity of Rovinj (Istrian coast, North Adriatic) caused by organic wastes. Acta Adriat. 21: 299-332.

Munda IM (1980b) Survey of the algal biomass in the polluted area around Rovinj (Istrian coast, North Adriatic). Acta Adriat 21:333- 354.

Murray SN, Littler MM (1978) Patterns of algal succession in a pertubated marine intertidal community. J Phycol 14:506- 512.

Murray-Jones S, Ayre DJ (1997) High levels of gene flow in the surf bibalve *Donax deltoides* (Bivalvia: Donacidae) on the east coast of Australia. Mar Biol 128:83-89.

Nebauer SG, del Castillo-Agudo L, Segura J (1999) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.). Theor Appl Genet 98:985-994.

Nei M (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.

Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studuing genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Nat Acad Sci USA 76:5269-5274.

Neuffer B, Auge H, Mesch H, Amarell U, Brandl R (1999) Spread of violets in polluted pine forest: morphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization. Mol Ecol 8: 365-377.

Neuffer B (1996) RAPD analyses in colonial and ancestral populations of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Med. (Brassicaceae). Biochem Syst Ecol 24:393-403.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Nesbitt KA, Potts BM, Vaillancourt RE, West AK, Reid JB (1995) Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). Heredity 74: 628-637.

Nienhuis J, Tivang J, Skroch PW, dos Santos JB (1995) Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phsaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. J Am Soc Hort Sci 120:300-306.

Norall TL, Mathieson AC, Kilar JA (1981) Reproductive ecology of four subtidal red algae. J Exp Mar Biol Ecol 54:119-136.

Northcraft RD (1948) Marine algal colonization on the Monterrey Península. California. Am J Bot 35:396-404.

Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. Perspectives in Plant Ecology. Evol and Syst 3/2:93-114.

Oates BR, Murray SN (1983) Photosynthesis, dark respiration and dessication resistance of the intertidal seaweeds *Hesperophycus harveyanus* and *Pelvetia fastigata* f *gracilis*. J Phycol 19:371-380.

Oden NL (1984) Assessing the significance of a spatial correlogram. Geogr Annals 16, 1-16.

Ojeda FP, Santelices B (1984) Ecological dominance of *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta) in central Chile. Mar Ecol Prog Ser 19:83-91.

Oliger P, Santelices B (1981) Physiological ecology of chilean Gelidiales. J Exp Mar Biol Ecol 53:65-76.

Oliveira JC (1989) A note on the elongation rate of *Gelidium sesquipedale* in-situ cages in Portugal. En: Kain (Jones) JM, JW Andrews, BJ McGregor (eds).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Aquatic primary biomass. Marine macroalgaeProceedings of the workshop COST 48. Commission of European Communities. Bruselas, p 69-75.

Oliveira MC, Ragan MA (1994) Variant forms of a Group I intron in nuclear small-subunit rRNA genes of the marine red alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*. Mol Biol Evol 11:195-207.

Oostermeijer G, Hvatum H, Nijs H, Borgen L (1995) Genetic variation, plant growth strategy and population structure of the rare, disjunctly distributed *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae) in Norway. Sym Bot Ups 31:185-203.

Orth RJ, Luckenbach M, Moore KA (1994) Seed dispersal in a marine macrophyte: implications for colonization and restoration. Ecology 75:1927-1939.

Owuor ED, Fahima T, Beiles A, Korol A, Nevo E (1997) Population genetic response to microsite ecological stress in wild barley, *Hordeum spontaneum*. Mol Ecol 6:1177-1187.

Pakker H, Klerk H, van Campen JH, Olsen JL, Breeman AM (1996) Evolutionary and ecological differentiation in the pantropical to warm temperate seaweed *Digenea simplex* (Rhodophyta). J Phycol 32:250-257.

Palacios C, González-Candelas F (1997b) Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). Mol Ecol 6:1107-1121.

Palminha F, Melo RA, Santos R (1982) A existencia de *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Bornet et Thuret, na costa sul do Algarbe. I. Biomasa total. Bol Inst Nac Invest Pescas 8:93-105.

Palminha F, Santos R, Melo R (1985) A existencia de *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Bornet et Thuret, na costa sul do Algarve. II. Biomasa total. Bol Inst

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Nac Invest Pescas 13:77-91.

Palumbi SR (1992) Marine speciation on a small planet. Trends Ecol Evol 7: 114-118.

Palumbi SR (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine especiation. Ann Rev Ecol Syst 25:547-572.

Park JW, Cho YC, Nam BH, Jin HJ, Sohn CH, Hong YK (1998) RAPD Identification of genetic variation in seaweed *Hizikia fusiformis* (Fucales, Phaeophyta) J Mar Biotechnol 6:62-64.

Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA (1998) What molecules can tell us about populaitons: choosing and using a molecular marker. Ecology 79:361-382.

Parsons TJ, Maggs CA, Douglas SE (1990) Plastid DNA restriction analysis links the heteromorphic phases of an apomictic red algal life history. J Phycol 26:495-500.

Patwary MU, Mackay RM, Van der Meer JP (1993) Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. J Phycol 29:216-222.

Patwary MU, Van der Meer JP (1994) Application of RAPD markers in an examination of heterosis in *Gelidium vagum* (Rhodophyta). J Phycol 30:91-97.

Paya I, Santelices B (1989) Macroalgae survive digestion by fishes. J Phyc 25:186-188.

Pearson GA, Brawley SH (1996) Reproductive ecology of *Fucus distichus* (Phaeophyceae): an intertidal alga with successful external fertilisation. Mar Ecol Porg Ser 143:211-223.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Pearson GA, Murray SN (1997) Patterns of reproduction, genetic diversity, and genetic differentiation in California populations of the geniculate coralline alga (Rhodophyta). J Phycol 33:753-763.

Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G (1993) Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis among Laboratories. PCR Methods and Applications 2:341-345.

Pérez T, Albornoz J, Domínguez A (1998) An evaluation of RAPD fragment reproducibility and mature. Mol Ecol 7:1347-1357.

Pérez-Martell E (1988) Interacción vientos-corrientes en profundidades reducidas. Un modelo para la costa Este de Gran Canaria. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Pielou EC (1974) Biogeographic range comparisons and evidence of geographic variation in host-parasite relations. Ecology 55: 1359-1367

Pielou EC (1979) Biogeography. John Wiley and Sons, NY.

Pikaart MJ, Villeponteau B (1993) Suppression of PCR amplification by high levels of RNA. Bitechnology 14:24-25.

Prathepha P, Baimai V (1999) Genetic differentiation in Thai populations of the rare species *Afgekia sericea* Craib (Leguminosae) revealed by RAPD-PCR assays. Genética 105:193-202.

Procaccini G, Mazzella L (1996) Genetic variability and reproduction in Two Mediterranean Seagrasses. Seagrass Biology: Proceedings of an International Workshop. 85-92.

Puertas JM (1992) Genética. Fundamentos y perspectivas. Interamericana

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

McGraw-Hill.

Rallo A, Gorostiaga JM, Saiz JI, Isasi I, Limia JM (1988) Comunidades bentónicas del Abra de Bilbao y su entorno (N. España). Cah Biol Mar 29:3-19.

Reed DC, Laur DR, Ebeling AW (1988) Variation in algal dispersal and recruitment: the importance of episodic events. Ecol Monogr 58:321- 335.

Regli D, Abed Y, Charrel RN, Bollet C, de Micco P (1995) Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD figerprinting patterns. Res Microbiol 146:561-568.

Renfrew DE, Gabrielson PW, Scagel RF (1989) The marine algae of British Columbia, northern Washington, and southeast Alaska: division Rhodophyta (red algae), class Rhodophyceae, order Gelidiales. Can J Bot 67:3295-3314.

Rico JM, Fredriksen S (1996) Effects of environmental factors on net photosysthesis and growth of intertidal species of the genus *Gelidium* (Gelidiaceae, Rhodophyta) in northern Spain. Sci Mar 60:265-273.

Rico JM, Guiry MD (1997a) Life history and reproduction of *Gelidium maggsiae* sp. Nov. (Rhodophyta, Gelidiales) from Ireland. Eur J Phycol 32:267-277.

Rico JM, Guiry MD (1997b) A taxonomic assesment of north-eastern atlantic Gelidiales. Book of Abstracts of II International Workshop of *Gelidium*. Las Palmas de Gran Canaria. December 9-12. Canary Islands.

Rieseberg LH (1996) Homology among RAPD fragments in interspecific comparisions. Mol Ecol 5:99-105.

Robaina RR (1988) Biotecnología del cultivo *in vitro* de algas rojas (Rhodophyta) de interés industrial. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Robledo DR (1993) Cultivo, adaptación morfológica y fisiopatología de macroalgas marinas de interés industrial. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Rohlf FJ (1993) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 1.80. Setauket: Exeter Software.

Rosenvinge LK (1931) The marine algae of Denmark, contributions to their natural history. Part IV. Rhodophyceae, IV. Gigartinales, Rhodymeniales, Nemastomatales. K. Danske Vidensk. Selsk. 7:449-599.

Rossetto M, Weaver PK, Dixon KW (1995) Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). Mol Ecol 4:321-329.

Round FE (1981) The Ecology of Algae. Cambridge University Press.

Ruckelshaus MH (1998) Spatial scale of genetic structure and an indirect estimate of gene flow in eelgrass, *Zostera marina*. Evolution 52:330-343.

Rueness J, Frediksen S (1998) Intraspecific reproductive variation in *Gelidium pusillum* (Stackh.) Le Jol. (Gelidiales, Rhodophyta) from Europe. J Appl Phycol 10:253-260.

Rueness J, Frediksen S (1989) Culture studies of agarophytes, with reference to *Gelidium* species at their northern limit of distribution. En: Kain (Jones) JM, Andrews JW, McGregor BJ (eds) Aquatic primary biomass. Marine macroalgae. Proceedings of the workshop COST 48. Commission of the European Communities. Bruselas, p 55-58.

Russell G, Fielding AH (1981) Individuals, populations and communities. En: Lobban CS, Wynne MJ (eds) The Biology of Seaweeds. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 393-420.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Russell JR, Hosein F, Johnson E, Waugh R, Powell W (1993) Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. Mol Ecol 2:89-97.

Saiki RK (1989) Optimization of the Polymerase Chain Reaction. En: Current Communications in Molecular Biology. New Cork, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 25-30.

Salinas JM (1987) Localización de los campos industriales de *Gelidium sesquipedale*. Perspectivas de cultivo. En: Primeras Jornadas Acuicultura Comunidad Autónoma Cantabria. Gobierno de Cantabria, Santander, p 127-166.

Salinas JM (1991) Spray system for re-attachment of *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born. Et Thur. (Gelidiales: Rhodophyta). Hidrobiología 221:107-117.

Sambrook L, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sangrá P (1995) Perturbación de un flujo geofísico por un obstáculo: aplicación en la isla de Gran Canaria. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Santelices B (1978) Multiple interaction of factors in the distribution of some Hawaiian Gelidiales (Rhodophyta). FAO Fish Synop 145:1-55.

Santelices B, Ugarte R (1987) Algal life-history strategies and resistance to digestion. Mar Ecol Prog Ser 35:267-275.

Santelices B (1988) Synopsis of biological data on the seaweed genera *Gelidium* and *Pterocladia* (Rhodophyta). FAO Fish Synop 145.

Santelices B (1989) Algas marinas de Chile. Distribución, ecología, utilización y

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

diversidad. Universidad Católica de Chile.

Santelices B (1990) Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. Oceanogr Mar Biol Annu Rev 28:177-276.

Santelices B, Flores V (1995) Spermatangial sori on cystocarpic branchlets of species of *Gelidium* and *Pterocladia* (Gelidiales, Rhodophyta). Phycologia 34:337-341.

Santelices B, Correa JA, Aedo D, Flores V, Hormazábal M, Sánchez P (1999) Convergent biological proceses in coalescing Rhodophyta. J Phycol 35:1127-1149.

Santos R (1993b) A multivariate study of biotic and abiotic relationships in a subtidal algal stand. Mar Ecol Prog Ser 94:181-190.

Santos R (1994) Frond dynamics of the commercial seaweed *Gelidium sesquipedale:* effects of size and of frond history. Mar Ecol Prog Ser 107: 295-305.

Santos R (1995) Size structure and inequality in a commercial stand of the seaweed *Gelidium sesquipedale*. Mar Ecol Prog Ser 119: 253- 263.

Santos R, Duarte P (1996) Fecundity, spore recruitment and size in *Gelidium sesquipedale* (Gelidiales, Rhodophyta). Hidrobiología 326/327:223-228.

Santos R, Nyman M (1998) Population modelling of *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta, Gelidiales). J App Phycol 10:261-272.

Saunders GW (1993) Gel purification of red algal genomic DNA: an inexpensive rapid method for the isolation of polymerase chain reaction-friendly DNA. J Phycol 29:251-254.

Sauvageau C (1912) A propos des *Cystoseira* de Banyuls et de Guéthary.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Bulletin de la Station Biologique d'Arcachon.

Schaal BA (1974) Balancing selection and population structure in *Liatris cylindraceae*. PhD Dissertation. Yale Universit, New Haven.

Schiel DR, Foster MS (1986) The structure of subtidal algal stands in temperate waters. Oceanogr Mar Biol Ann Rev 24:265-307.

Schierwater B, Ender A (1993) Different thermostable DNA-polymerases may amplify different RAPD products. Nucl Acid Res 21:4647-4648.

Schnabel A, Laushman RH, Hamrick JR (1991) Comparative genetic structure of two co-occurring tree species, *Maclura pomifera* and *Gleditsia triacanthos* (Leguminosae). Heredity 67:357-364.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.0. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

Schoen DJ, Latta RG (1989) Spatial autocorrelation of genotypes in populations of Impatiens pallida and Impatiens capensis. Heredity 63:181-189.

Schonbeck, MW, Norton NA (1978) Factors controlling the upper limits of fucoid algae on the shore. J Exp Mar Biol Ecol 31:303-313.

Schonbeck MW, Norton NA (1980) Factors controlling the upper limits of fucoid algae on the shore. J Exp Mar Biol Ecol 43:131-150.

Scrosati R, DeWreede RE (1997) Dynamics of the biomass-density relationship and frond biomass inequality for *Mazzaella cornucopiae* (Gigartinaceae, Rhodophyta): implications for the understanding of frond interactions. Phycologia 36:506-516.

Scrosati R (1998a) Mechanisms of recolonization of the clonal intertidal alga

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

*Mazzaella cornucopiae* (Rhodophyta, Gigartinaceae) after disturbances. Can J Bot 76:1717-1724.

Scrosati R (1998b) Population structure and dynamics of the clonal alga *Mazzaella cornucopiae* (Rhodophyta, Gigartinaceae) from Barkley sound, Pacific Coast of Canada. Bot Mar 41:483-493.

Scrosati R, Serviere-Zaragoza E (2000) Ramet dynamics for the clonal seaweed *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta): a comparison with *Chondrus crispus* and with *Mazzaella cornucopiae* (Gigartinales). J Phycol 36:1061-1068.

Seoane-Camba J (1979) Sobre algunas gelidiaceas nuevas o poco conocidas de las costas españolas. Acta Bot Malac 5:9-112.

Shannon CE, Weaver W (1949) The Mathematical Theory of Communication. University of Illionois Press, Urbana.

Shapcott A (1995) The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). Heredity 74:28-38.

Sharp GJ, Tremblay DM (1985) A tagging technique for small macrophytes. Bot Mar 28:549- 551.

Shen WH, Hobn B (1992) DMSO improves PCR amplification of DNA with a complex secondary structure. Trends Genet 8:227-230.

Shulman MJ (1998) What can population genetics tell us about dispersal and biogeographic history of coral-reef fishes? Aust J Ecol 23:216-225.

Sivertown JW, Charlesworth D (2001) Introduction to plant population biology. Blackwell Science.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Shivji MS, Rogers SO, Stanhope MJ (1992) Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae. Mar Ecol Prog Ser 84:197-203.

Skroch P, Nienhuis J (1995) Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. Theor Appl Genet 91:1086-1091.

Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. Annu Rev Ecol Syst 16: 393-430.

Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236:787-792.

Slatkin M (1990) Gene flow and genetic structure of populations. En: Takahata N, Crow JF (eds) Population Biology of Genes and Molecules. Baifukan, Tokyo, p 105-122.

Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. En: Real LA (ed) Ecological genetics. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, p 3-17.

Smcmid B (1990) Some ecological and evolutionary consequences of modular organization and clonal growth in plants. Evol Trends in Plants 4:25-34.

Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco.

Sokal RR, Oden N (1978) Spatial autocorrelation in biology. 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. Biol J Linn Soc 10:229-249.

Sokal RR (1979) Testing statistical significance of geographical variation patterns. Syst Zool 28:227-232.

Sokal RR, Wartenberg DE (1983) A test of spatial autocorrelation analysis using

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

an isolation-by-distance model. Genetics 105: 219-237.

Sork VL, Nason J, Campbell DR, Fernandez JF (1999) Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. Trends Ecol Evol 14:219-224.

Solomon NE (1969) Population Dynamics. Edward Arnold, London.

Soltis PS, Soltis DE (1988) Genetic variation and population structure in the fern *Blechnum spicant* (Blechnaceae) from western north america. Am J Bot 75(1):37-44.

Sosa PA (1991) Estudio de la variabilidad y diferenciación genética de *Gelidium arbuscula, Gelidium canariensis y Gracilaria ferox* por electroforesis isoenzimática. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Sosa PA (2001) Genes, poblaciones y especies. En: Esquivel M, Fernández-Palacios JM (eds) Naturaleza de las Isla Canarias. Editorial Turquesa, Sta. Cruz de Tenerife.

Sosa PA, Oliveira MC (1992) DNA extraction from macroalgae. Appl Phycol Forum 9(2):7-9.

Sosa PA, García-Reina G (1992) Genetic variability and differentiation of sporophytes and gametophytes in populations of *Gelidium arbuscula* (Gelidiaceae: Rhodophyta) determined by isozyme electrophoresis. Mar Biol 112:679-688.

Sosa PA, García-Reina G (1993) Genetic variability of *Gelidium canariensis* (Rhodophyta) determined by isozyme electrophoresis. J Phycol 29: 118-124.

Sosa PA, Jimenez del Río M, García-Reina G (1993) Physological comparision between gametophytes and tetrasporophytes of *Gelidium canariensis* (Gelidiaceae, Rhodophyta). Hydrobiología 260/261:445-449.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Sosa PA, Valero M, Batista F, González-Pérez MA (1998) Genetic structure of natural populations of *Gelidium* species: A re-evaluation of results. J Appl Phycol 10:279-284.

Sosa PA, Lindstrom SC (1999) Isozymes in macroalgae (seaweeds): genetic differentiation, genetic variability and applications in systematics. Eur J Phycol 34:427-442.

Sosa PA, Batista F, González-Pérez MA, Bouza N (en revisión) La conservación genética de las especies vegetales amenazadas. Conservación de las plantas amenazadas.

Stam WT, Olsen JL, van Oppen MJH, Kerk H, De Graaf M (1995) RAPDs and reds: assessing the limits for population level studies. The Phycologist 40 (Abstracts of the 1995 BPS Meeting):32.

Stebbins GL, Hill GJC (1980) Did multicellular plants invade the land? Am Nat 115:342-353.

Stewart CN, Porter DM (1995) The usefulness of RAPD profiling in biological conservation: an application to estimating clonal variation in rare and endangered Iliamna in Virginia. Biol. Conservation 74:135-142.

Stewart CN, Excoffier L (1996) Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). J Evol Biol 9:153-171.

Sulaiman IM, Hasnain SE (1996) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal genetic homogeneity in the endangered Himalayan species *Meconopsis paniculata* and *M. simplicifolia*. Theor Appl Genet 93:91-96.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Sun M, Wong KC (2001) Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. Am J Bot 88(12):2180-2188.

Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. Trends Ecol Evol 15:199-203.

Swensen SM, Allan GJ, Howe M, Elisens WJ, Junak SA, Rieseberg LH (1995) Genetic analysis of the endangered island endemic *Malacothamnus fasciculatus* (Nutt.) Greene var. *nesioticus* (Rob.) Kearn. (Malvaceae). Conserv Biol 9:404-415.

Takahashi M, Mukouda M, Koono K (2000) Differences in genetic structure between two Japanese beech (Fagus crenata Blume) stands. Heredity 84: 103-115.

Tansley SA, Brown CR (2000) RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae):implications for their conservation. Biol Conserv 95:39-48.

Tewari A, Joshi HV (1988) Effect of domestic sewage and industrial effluents on biomass and species diversity of seaweeds. Bot Mar 31:389- 397.

Thom RM (1980) A gradient in benthic intertidal algal assemblages along the southern Californian coast. J Phycol 16:102- 108.

Thomas BR, Macdonald SE, Hicks M, Adams DL, Hodgetts BR (1999) Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor Appl Genet 98:793-801.

Tollefsrud MM, Bachmann K, Jakobsen KS, Brochmann C (1998) Glacial survival does not matter- II: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga cespitosa*. Mol Ecol 7:1217-1232.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Travis SE, Maschinski J, Keim P (1996) An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. Mol Ecol 5:735-745.

Tseng CK (1947) Seaweed resources of North America and their utilization. Econ Bot 1:69-97.

Tseng CK, Sweeney BM (1946) Physiological studies of *Gelidium cartilagineum*. I. Photosynthesis, with special reference to the carbon dioxide factor. Am J Bot 33: 706-715.

Turner M, Stephens JC, Anderson WW (1982) Homozygosity and patch structure in plant populations as a result of nearest neighbor pollination. Proc Nat Acad Scien USA 79:203-207.

Underwood AJ (1997) Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance. Cambridge University Press, Cambridge, 504 p.

Vadas RL, Norton TA (1982) Ecology of benthic marine algae: introduction and bibliography. En: Rosowski JR, Parker BC (eds) Selected Papers in Phycology II. Phyc Soc Am. Lawrence, Kansas, p 549-550.

Valatka S, Maekinen A, Yli-Mattila T (2000) Analysis of genetic diversity of *Furcellaria lumbricalis* (Gigartinales, Rhodophyta) in the Baltic sea by RAPD-PCR technique. Phycologia 39:109-117.

Valero M, Engel C, Billot C, Kloareg B, Destombe C (2001) Concepts and issues of populations genetics in seaweeds. Cah Biol Mar 42:53-62.

Valverde T, Silvertown J (1998) Variation in the demography of a woodland understorey herb (*Primula vulgaris*) along the forest regeneration cycle: projection matrix analysis. J Ecol 86:545-562.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Van der Meer JP, Todd ER (1977) Genetics of Gracilaria sp. IV. Mitotic recombination and its relationship to mixed phases in the life history. Can J Bot 55:2810-2817.

Van Oppen MJH, Diekmann OE, Wiencke C, Stam WT, Olsen JL (1994) Tracking dispersal routes: phylogeography of the Artic-Antartic disjunct seaweed species *Acrosiphonia arcta*. J Phycol 30:67-80.

Van Oppen MJH, Olsen JL, Stam WT (1995a) Genetic variation within and among North Atlantic and Baltic populations of the benthic alga *Phycodrys rubens* (Rhodophyta). Eur J Phycol 30:251-260.

Van Oppen MJH, Draisma SGA, Olsen JL, Stam WT (1995b) Multiple trans-Artic interchanges in the red alga *Phycodrys rubens*: evidence from nuclear rDNA ITS sequences. Mar Biol 123:170 -188.

Van Oppen JH, Klerk H, De Graaf M, Stam WT, Olsen JL (1996) Assessing the limits of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) in seaweed biogeography. J Phycol 32:433-444.

Vierling RA, Nguyen HT (1992) Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. Theor Appl Genet 84:835-838.

Villagarcía MG, Pérez-Marrero J, Cianca A, Barrera C, Llinás O (1999) Ekman layer circulation in Canary Islands. Canigo Conference. Las Palmas de Gran Canaria. 12-16 Septiembre 1999. Book of Abstracts. CICCA.

Villemur R (1990) Circular plasmid DNAs from the red alga *Gracilaria chilensis*. Curr Genet 18:251-257

Virk PS, Zhu J, Newbury HJ, Bryan GJ, Jackson MT, Ford-Lloyd BV (2000) Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. Euphytica 112:275-284.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Vuorisalo T, Tuomi J, Pedersen B, Käär P (1997) Hierarchical selection in clonal plants. En: de Kroon H, van Groenendael J (eds) The Ecology and Evolution of Clonal Plants. Backhuys Publishers, Leiden, p 243-261.

Wang Q, Lija A, Jun Y, Qiao S, Wang H, Xiaohui K (2000) RAPD analysis of Grateloupia ficilina and Sinotubimorpha porracea. Oceanol Limnol Sin. 31:506-510.

Wartenberg D (1989) SAAP version 4.3. Spatial autocorrelation Analysis Program. Distributed by the author.

Wattier R, Dallas JF, Destombe C, Saumitou-Laprade P, Valero M (1997) Single locus microsatellites in Gracilariales (Rhodophyta): high level of genetic variability within *Gracilaria gracilis* and conservation in related species. J Phycol 33:868-880.

Waycott M (1995) Assesment of genetic variation and clonality in the seagrass *Posidonia australis* using RAPD and allozyme analysis. Mar Ecol Prog Ser 116:289-295.

Waycott M (1998) Genetic variation, its assessment and implications to the conservation of seagrasses. Mol Ecol 7:793-800.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38:1358-1370.

Weir BS (1996) Genetic data analysis II. Sinauer Publ, Sunderland, MA.

Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W (1995) Fingerprinting in Plants and Fungi. Boca Raton, CRC Press.

Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 18:7213-7218.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Whitkus R, Doebley J, Wendel JF (1994) Nuclear DNA markers in systematics and evolution. En: Philips RL, Vasil IK (eds) DNA-Based Markers in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p 116-141.

Williams GC (1975) Sex and evolution. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Williams JK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. Nucl Acid Res 18:6531-6535.

Williams JK, Hanafey MK, Rafalski J, Tingey S (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymol 218:704-740.

Williams SL, Di Fiori RE (1996) Genetic diversity and structure in *Pelvetia fastigata* (Phaeophyta: Fucales): does a small effective neighbourhood size explain fine-scale genetic structure? Mar Biol 126:371-386.

Wilks SS (1962) Mathematical statistics. New York, Wiley.

Winer BJ, Brown DR, Michels KM (1991) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw-Hill, NY.

Wolff K, Rijn JP-V (1993) Rapid detection of genetic variability in crysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. Heredity 71:335-341.

Wong KC, Sun M (1999) Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). Am J Bot 86:1406-1413.

Woodward DL (1989) Unbalanced gametophytes:sporophytes ratios in populations of the intertidal red alga *Endocladia muricata* in central

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

California. Tesis doctoral.

Wright S (1943) Isolation by distance. Genetics 28:114-138.

Wright JT, Zuccarello GC, Steinberg PD (2000) Genetic structure of the red alga *Delisea pulcra*. Mar Biol 136:439-448.

Wu J, Krutovskii KV, Strauss SH (1999) Nuclear DNA diversity, populaiton differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. Genome 42:893-908.

Yang R, Jixun D, Biqian L (2001) Current biotechnology in *Porphyra* (Rhodophyta): a review. Trans Oceanol Limnol 2:68-77.

Yeh FC, Chong DKX, Yang R-C (1995) RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. J Heredity 86:454-460.

Yeh WJ (2000) Genetic similarity of geographic Caulerpa (Chlorophyta) populations in Taiwan Island revealed by Random Amplified Polymorphic DNA. J Fish Soc Taiwan 27:115-127.

Yu K, Pauls KP (1992) Optimization RAPD analysis. Nucl Acid Res 20. 2606.

Yu K, Pauls KP (1993) Rapid estimation of gentic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. Theor Appl Genet 86:788-794.

Yue Z, Dapeng L, Jixun D (2000) análisis of genetic variations of *Undaria pinnatifida* by using RAPD. Mar Sci Bull 19:24-28.

Zouros E, Foltz DW (1987) The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis. En: MC Rattazzi, JG Scandalios, GS Whitt (eds) Isozymes, Vol. 13. Alan R Liss Publisher, New York, p 1-59.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Zuccarello GC, Burger G, West JA, King RJ (1999) Population structure and physilogical differentitation of haploytes of *Caloglossa leprieurii* (Rhodophyta) in a mangrove intertidal zone. Mol Ecol 8:1443-447.

Zuccarello GC, Bartlett J, Yeates PH (2000) Differentiation of *Caloglossa leprieurii* (Rhodophyta) populations in northern and eastern Australia using plastid haplotypes. Eur J Phycol 35:357-363.

Zuccarello GC, Yeates PH, Wright JT (2001) Population structure and physiological differentiation of haplotypes of *Caloglossa leprieurii* (Rhodophyta) in mangrove intertidal zone. J Phycol 37:235-244.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003