

TESIS DOCTORAL

VARIABILIDAD GENÉTICA Y DISPERSIÓN POLÍNICA DEL ENDEMISMO CANARIO *Phoenix canariensis*

Presentada por la Lcda. Isabel Saro Hernández

Dirigida por:

Dr. Pedro A. Sosa Henríquez

Dr. Miguel A. González Pérez

Las Palmas de Gran Canaria 2015



D. JOSÉ MANUEL VERGARA MARTÍN, SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en sesión permanente tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "VARIABILIDAD GENÉTICA Y DISPERSIÓN POLÍNICA DEL ENDEMISMO CANARIO *Phoenix canariensis*" presentada por la doctoranda Da Isabel Saro Hernández y dirigida por los Doctores Dr. Pedro A. Sosa Henríquez y Dr. Miguel A. González-Pérez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Art^o 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a _____ de noviembre de 2015.

Fdo.: José Manuel Vergara Martín Departamento de Biología Universidad de la Palmas de Gran Canaria



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

PROGRAMA DE DOCTORADO: ECOLOGÍA Y GESTIÓN DE LOS RECURSOS VIVOS MARINOS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

VARIABILIDAD GENÉTICA Y DISPERSIÓN POLÍNICA DEL ENDEMISMO CANARIO *Phoenix canariensis*

Presentada por la Lcda. Isabel Saro Hernández

Dirigida por:

Dr. Pedro A. Sosa Henríquez Dr. Miguel A. González Pérez

El Director, Pedro A. Sosa El Director, Miguel A. González La Doctoranda, Isabel Saro



El Dr. Pedro A. Sosa Henríquez, Catedrático de Botánica de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y el Dr. Miguel A. González Pérez, Doctor en Biología,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación "VARIABILIDAD GENÉTICA Y DISPERSIÓN POLÍNICA DEL ENDEMISMO CANARIO *Phoenix canariensis*" realizado bajo nuestra dirección por la Lcda. Isabel Saro Hernández, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a noviembre de 2015.

Fdo.: Pedro A. Sosa Henríquez Fdo.: Miguel A. González Pérez

Es una antorcha al aire esta palmera, verde llama que busca al sol desnudo para beberle sangre; en cada nudo de su tronco cuajó una primavera.

Sin bretes y eslabones, altanera y erguida, pisa el yermo seco y rudo; para la miel del cielo es un embudo la copa de sus venas, sin madera.

No se retuerce ni se quiebra al suelo; no hay sombra en su follaje; es luz cuajada que en ofrenda de amor se alarga al cielo;

La sangre de un volcán que enamorada del padre sol se revistió de anhelo y se ofrece, columna, a su morada.

> Miguel de Unamuno (1864 -1937)

AGRADECIMIENTOS

En esta Tesis Doctoral han contribuido muchísimas personas, que de una manera más directa o a veces incluso sin saberlo, me han dado su apoyo, prestado su ayuda o sugerido ideas interesantes que han sido fundamentales para que este proyecto salga adelante. A todas ellas quiero darles las gracias, de todo corazón.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores, los doctores Pedro A. Sosa y Miguel A. González, la amistad que me han brindado estos años y la confianza depositada en mí para elaborar este trabajo de investigación. Concretamente, a Pedro Sosa quiero darle las gracias por haberme proporcionado en todo momento los medios necesarios para realizar esta tesis, además de respetar y apoyar las decisiones que he ido tomando para su desarrollo. A Miguel A. González, por su asistencia en el laboratorio durante los comienzos, y su paciencia y colaboración siempre que lo he necesitado con los análisis (¡no hay software que se le resista!).

También quisiera agradecer a los distintos Cabildos Insulares, por facilitar los medios y/o asistencia en la recogida de las muestras de palmera canaria en cada una de las islas. Especialmente, me gustaría dar las gracias a Jose A. Delgado (Cabildo de Tenerife), Julio Leal (Cabildo de La Palma) y Marco Márquez (Cabildo de Gran Canaria), quien además ha aportado la base de datos georreferenciados de ejemplares de palmera canaria en las islas, así como asesorándome cada vez que lo he necesitado. Al personal del Vivero Forestal del Cabildo de Gran Canaria, quienes me asistieron amablemente durante la siembra de la cosecha de semillas analizadas en esta tesis. A Carlos Samarín (Gobierno de Canarias), quien atentamente me ha asesorado o aportado información cada vez que le he consultado. Al personal de GESPLAN que realizaba las encomiendas fitosanitarias en los palmerales naturales y me asistieron en la colecta de las muestras, en especial a Carlos Izquierdo, Yolanda Betancort y Lina Bonet. También al Dr. Pedro Luis Pérez de Paz (ULL), que amablemente colaboró en el muestreo de Acusa Verde.

La elaboración de los trabajos que han sido publicados en el marco de esta tesis me permitió colaborar con los doctores Juan J. Robledo-Arnuncio y Carlos García-Verdugo, a los que quiero agradecer lo mucho que he aprendido de ellos estos años, por toda la atención recibida y los útiles y estimulantes comentarios durante el análisis y discusión de los datos. A JJ. Robledo también agradecerle la amable acogida durante las semanas que pasé en el CIFOR-INIA (Madrid) para analizar los datos.

La palmera canaria es una especie que realmente cautiva, y a lo largo de estos años he tenido la suerte de estar rodeada por sus 'mejores' conocedores. Muchas gracias a Marcos Díaz-Bertrana, Eduardo Franquiz, (de nuevo) Pedro Sosa y Puri Benito por mostrarme los 'mil rostros' de

esta enigmática especie, y por los buenos momentos que hemos pasado en estos años. En este grupo también quiero incluir a mi amigo y gran naturalista, Paco Alarcón, con quien comparto mi fascinación por la naturaleza y quien constantemente me ha ofrecido su ayuda para adentrarme en los 'misterios' de la palmera canaria, ¡mil gracias por todo Paco!

También me gustaría agradecer a Constantino Criado (ULL) y Alfredo Reyes-Betancort (INIA) por la información aportada sobre el palmeral de Haría, a Ángelo Santana (ULPGC) por 'traducir' la estadística al lenguaje del resto de los mortales, a Javier Gil por las maravillosas fotos que hace de la palmera canaria y cederme algunas para la edición de esta tesis, y a Agustín Naranjo (ULPGC) por tantísima ayuda recibida estos años, tanto con los SIG como proporcionándome medios y recursos para hacer esta tesis, pero sobre todo, por la amistad que se ha creado en estos años.

A los becarios y técnicos que han pasado por el laboratorio del Grupo Biogeografía, Conservación y Territorio: Elisabeth Rivero, Jesús Rubio, Cynthia Díaz, Josué Ramírez, Jorge Carnicer, Edna González, así como a las "Pretty Girls" (mis compañeras de fatiga) Carolina Medina, Leticia Curbelo y Priscila Rodríguez. Especialmente, me gustaría agradecer a Leti su amable predisposición cada vez que la necesitamos, ¡siempre tiene soluciones!, y a Pris, por rescatarme constante y cariñosamente de mis 'lagunas' informáticas. Todas y todos componen una parte de la historia de este viaje y me han dejado su huella. También me gustaría agradecer en general a todo el personal del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria que han proporcionado recursos necesarios para el desarrollo de esta tesis, especialmente a Pilar García, que me ha prestado su ayuda siempre que la he necesitado. También a Magui Olangua (JBCVC-CSIC), por su colaboración en la descripción y observación de la biología floral de la palmera canaria.

Personalmente, el camino que emprendí en la investigación no comenzó con el desarrollo de esta tesis. Mi paso por los grupos de investigación de Ecología y Biogeografía Insular (ULL), del Área de Producción Animal (ULL), y de Ecología y Evolución en Islas (INIA-CSIC) marcaron mi manera de entender y abordar la ciencia, y la huella que dejó en mí ha seguido de alguna manera presente en esta tesis. Me gustaría agradecer especialmente a los doctores José Mª Fernández-Palacios, José R. Arévalo, Javier Mata, Luis Bermejo, Silvia Fernández, Gustavo Morales, Celia García, Javier Méndez, Manuel Nogales, Juan C. Illera, Alfredo Valido y David Padilla, quienes han mantenido el interés por la evolución de esta tesis, mandándome siempre muchísimos ánimos. También me gustaría agradecer especialmente a dos grandes amigas y colegas investigadoras, a las que admiro y con quienes siempre he disfrutado trabajando: Bea Rumeu y Lea de Nascimento. Particularmente a Lea le debo un millón de gracias, por la cálida y constante ayuda recibida desde que la conocí, por todo lo que me ha enseñado y por hacer que 'pare el tiempo' cada vez que conversamos.

A parte de todas estás personas que han ido apareciendo por la vía académica, también están amigas, amigos y mi familia, que han supuesto un enorme apoyo a lo largo de estos años, mi mayor tesoro, los que aprenden a aceptar 'tu tesis' como una más. Especialmente, me gustaría mencionar a:

Gazmi, Vane y Yeni, mis luceros en el camino. A Yeni (Yanira Quintero) además agradecerle que me haya 'leído el pensamiento' creando la portada de esta tesis. Raque, mi 'hermana' canariona. Aranza, por toda la escucha y risas elásticas. Naira, por las 'recargas' de vitalidad. Carmen, por todo el cariño que siempre me manda. María, por estar siempre dispuesta a un 'bombardeo' (¡incluso para coger las muestras de Haría!). Melchor, por su amistad infinita. A todas 'Las Primas', por la alegría y espontaneidad que han aportado a mi vida en estos 'años de tesis'. Beita, por la amistad tan bonita que nos une. Desde una mayor distancia física pero siempre presentes Vicky, Rosana, Alex, Silvia Oliva, y otros que han aparecido en la recta final del camino y también han representado un gran apoyo como Patri, Juan Luis y Pablo Manent. También a Nacho, por socorrerme con prisas en la edición de la tesis.

A mis padres, Carlos y Marisa, por su amor y apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado en mi vida. A mi padre, por priorizar siempre mi formación y motivar en mí retos intelectuales como esta experiencia, que aunque en ocasiones ha sido dura, también sin duda alguna, enormemente enriquecedora. A mi madre, por despertar en mí la curiosidad por los detalles y enseñarme a apreciar la belleza, porque mi afán por la investigación parte de ese 'lugar' que creció en mi interior gracias a ella. A mi tía Kbb, por el cariño y la complicidad en todo momento. A TODA mi familia por su apoyo e interés en esta tesis, porque son y serán siempre con quienes mejor se comparten los logros y alegrías. A Leni en concreto quiero agradecerle el haberme cuidado tan bien la semana que me quedé con ella en La Gomera para coger las muestras de esta isla.

A Dani, por todo su amor a lo largo de estos años, siendo el mejor compañero de este 'viaje', el que primero ha celebrado conmigo los avances o amortiguado las caídas, y el que pacientemente ha aguantado mis ausencias. Por su maravilloso humor, que es todo un bálsamo para la rutina, pero sobre todo, por 'reglarme' el presente. También, a todos y cada uno de los componentes de la familia Ojeda-Rodríguez, por su interés y apoyo a lo largo del desarrollo de esta tesis, y por su inmensa hospitalidad desde que llegue a esta cálida y hermosa 'tierra' para comenzar este proyecto, haciéndome sentir en seguida parte de su familia.

RESUMEN

El correcto manejo de la biodiversidad y conservación de sus recursos genéticos, pasan por la necesidad de comprender aspectos de la biología reproductiva y distribución de la variación genética de las especies, así como de las causas que la determinan. La palmera canaria (*Phoenix* canariensis H. Wildpret) es posiblemente uno de los endemismos vegetales más representativos del archipiélago canario, ya que la especie y sus poblaciones (palmerales) han constituido desde siempre un elemento característico y distintivo del paisaje y ecosistemas canarios. Su amplia pero desigual representación a lo largo del archipiélago, mostrando tanto palmerales continuos y de gran tamaño como otros fragmentados, la hacen una especie atractiva para estudios evolutivos y de flujo genético. Concretamente, la presente tesis busca aportar información experimental sobre la estructura genética y la dispersión polínica de P. canariensis mediante el uso de microsatélites nucleares como marcador molecular. Para ello se han combinado varias metodologías empíricas que abordan diferentes cuestiones evolutivas asociadas a distintas escalas geográficas: regional (archipiélago), insular y entre grupos de individuos próximos (local). La valoración de la dispersión polínica de la palmera canaria se llevó a cabo en una pequeña población relativamente aislada del noroeste de Gran Canaria (palmeral de Acusa Verde). La estimación de los parámetros del sistema reproductor reveló la participación de una media de 5,8 ($N_{\rm ep}$) donadores efectivos de polen en la descendencia de una hembra. No obstante, este patrón varía fuertemente según la progenie materna estudiada $(r_i$: 0 - 0,9), sin guardar relación alguna con la densidad y ubicación local de los machos con respecto a las hembras. Los análisis de paternidad revelaron que el 70% del polen efectivo es dispersado a menos de 75m, y un 90% a menos de 200m, con una distancia media de dispersión aproximada a 71m. El análisis espacial de la dispersión polínica apoyó claramente el patrón leptocúrtico mencionado, a la vez que detecta una cantidad significativa de polen inmigrante (12%) que es dispersado de forma efectiva desde áreas externas a la estudiada, así como un patrón direccional en la dispersión del polen. A escala regional, los niveles de variación genética de las poblaciones dependen de la isla considerada, exhibiendo un fuerte patrón decreciente desde las poblaciones localizadas en las islas más antiguas y orientales (Fuerteventura y Gran Canaria) hacia aquellas ubicadas en las más recientes y occidentales (Tenerife, La Gomera y La Palma). El patrón de diferenciación genética de las poblaciones se ajusta a un modelo de 'salto de piedra' (stepping-stone) a lo largo del archipiélago, el cual concuerda con la secuencia de emergencia de las islas. En su conjunto, los resultados a esta escala espacial sugieren que la configuración geográfica las Islas Canarias, y el relativamente reciente parón de diferenciación de P. canariensis a lo largo del archipiélago, parecen haber tenido una primera influencia en la estructura genética de este endemismo insular. Por otra parte, la variación genética estimada a nivel insular reveló una considerable estructura genética en cada una de las tres islas centrales (Gran Canaria, Tenerife y La Gomera), a pesar de la potencial habilidad de esta especie para la dispersión y colonización. No obstante, mientras la diferenciación genética en las islas más densamente pobladas por esta especie (Gran Canaria y

La Gomera) se ajusta a un patrón de 'aislamiento por distancia' (isolation by distance), en el caso de Tenerife el grado de diferenciación genética no se corresponde con la distancia geográfica, pudiendo ser el resultado de un fuerte aislamiento histórico de las poblaciones. Por otro lado, las islas mayores (Gran Canaria y Tenerife) mostraron un patrón más complejo de diferenciación genética de las poblaciones en comparación con La Gomera, posiblemente debido a cambios demográficos recientes. Adicionalmente, el análisis de la estructura genética espacial a escala fina reveló cierta asociación con respecto a la abundancia de la especie en el paisaje próximo a las poblaciones analizadas. Éste patrón sugiere que la discontinuidad espacial en la distribución de la especie, combinado con posibles restricciones en la dispersión de la especie, podrían influir en la agregación espacial de individuos genéticamente emparentados. La información molecular generada sobre el contexto geográfico, es de gran utilidad tanto para ser, directa o indirectamente, aplicada a las estrategias de manejo y conservación de *P. canariensis*, así como para aportar evidencias científicas de los patrones genéticos asociados a endemismos de amplia distribución en ambientes insulares oceánicos.

ABSTRACT

Knowing the reproductive biology of a species, along with the distribution of genetic diversity across populations and the factors that cause them, becomes necessary for an adequate biodiversity management and the conservation of its genetic resources. The Canarian palm (Phoenix canariensis H. Wildpret) is one of the most important and representative endemic plant species from the Canary Islands, since the species and their populations (palm groves) have always constituted a distinctive element of the Canarian landscape and ecosystems. Its widespread but uneven distribution across the Canarian archipelago, displaying both fragmented or continuous and large palm groves, makes it an attractive species for genetic flow and evolutionary studies. Specifically, this thesis aims to provide experimental information on the genetic structure and pollen dispersal of *P. canariensis* using nuclear microsatellites as molecular marker. For this purpose, several empirical methods have been combined to approach evolutionary questions related to different geographical scales: regional (i.e. archipelago), island and a fine-scale (local). The pollen dispersal analyses were investigated in a small isolated population of P. canariensis in the northwestern part of Gran Canaria (named Acusa Verde). Mating system analysis revealed an average of 5.8 effective pollen donors (N_{en}) per female. However, there was strong variation in correlated paternity rates across maternal progenies (ranging from null to 0.9), which could not be explained by the location and density of local males around focal females. Paternity analysis revealed a mean effective pollen dispersal distance of about 71 m, with approximately 70% of effective pollen originating from a distance of less than 75 m, and 90% from less than 200 m. A spatially explicit mating model also showed a clear leptokurtic pollen dispersal kernel, as well as indicating significant pollen immigration (12%) from external palm groves, and a directional pollen dispersal pattern. At regional scale, results showed that levels of within-population genetic diversity in *P. canariensis* depend on the island considered, with a strong decreasing pattern from the easternmost and oldest island (Fuerteventura and Gran Canaria) to the westernmost and youngest islands (Tenerife, La Gomera and La Palma). The population genetic differentiation pattern fitted with a stepping-stone model across the archipelago, according with the sequence of island emergence. Overall, the results suggest that the geographical configuration of the Canary Islands, and a relatively recent pattern of differentiation across the Canarian archipelago, appear to have had a primary influence on the genetic structure of this island taxon. Moreover, our analyses at island level revealed substantial genetic structure on each of the three central islands (Gran Canaria, Tenerife and La Gomera), despite of the potential high colonization and dispersal abilities of P. canariensis. However, while genetic differentiation on the islands where population densities are the highest (Gran Canaria and La Gomera) fit an isolation-by-distance pattern, such a pattern was not recovered on Tenerife, possibly due to long-term isolation of populations. On the other hand, largest islands (Gran Canaria and Tenerife) showed more complex patterns of population differentiation than La Gomera, possibly due to recent demographic changes. In addition, fine-scale spatial genetic structure seems to increase in those areas where P. canariensis is less abundant

in the landscape around focal populations. Such pattern suggests that spatial discontinuity in the distribution of this species, combined with possible restrictions in its dispersal, may influence the spatial aggregation of genetically related individuals. The molecular information generated in a spatial context is very useful to be, directly or indirectly, applied in strategies for management and conservation of *P. canariensis*, and to provide scientific evidence of genetic patterns in widespread endemic species from oceanic islands.

PRÓLOGO

La presente Tesis Doctoral se enmarca en las actividades del proyecto de investigación titulado 'Determinación de la estructuración y flujo genético de las poblaciones naturales de la palmera canaria y grado de introgresión con taxones afines en canarias, mediante marcadores moleculares', financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional de I+D+i (referencia CGL2009-10215), y cuyo investigador principal fue el Dr. Pedro A. Sosa, Catedrático de Botánica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Además, una parte de esta tesis también se ha abordado con recursos procedentes del Programa de Mecenazgo Universitario INNOVA Canarias 2020®, de la Fundación Universitaria de Las Palmas (FULP).

Parte de los resultados de este trabajo han dado lugar a dos publicaciones científicas, a las que se ha hecho referencia a lo largo del texto como Anexos con numeración romana, y a un tercer manuscrito que se encuentra en estos momentos en elaboración y será sometido a una revista incluida en el *SCI*, aunque no se expone como tal en la presente memoria.

[I] Saro I, Robledo-Arnuncio JJ, González-Pérez MA, Sosa PA (2014) Patterns of pollen dispersal in a small population of the Canarian endemic palm (*Phoenix canariensis*). *Heredity*, **113**: 215-223 (doi:10.1038/hdy.2014.16)

[II] Saro I, González-Pérez MA, García-Verdugo C, Sosa PA (2015) Patterns of genetic diversity in *Phoenix canariensis*, a widespread oceanic palm (species) endemic from the Canarian archipelago. *Tree Genetics & Genomes* 11: 815 (doi: 10.1007/s11295-014-0815-0)

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCION	1
1.1 SISTEMA REPRODUCTOR Y DISPERSIÓN POLÍNICA	2
1.2 VARIABILIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA	5
1.3 IMPACTO DE LOS SISTEMAS INSULARES EN LOS PATRONES DE	
VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAESPECÍFICA	13
1.4 ESTADO DE CONOCIMIENTO DE LA PALMERA CANARIA (<i>Phoenix</i>	
canariensis H. Wildpret)	15
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	27
3.1 ÁREAS DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	27
3.1.1 Sistema de reproducción y función de dispersión polínica	28
3.1.2 Diversidad y estructura genética a escala regional (archipiélago)	30
3.1.3 Diversidad y estructura genética a escala insular y local	31
3.2 ANÁLISIS CON MARCADORES MOLECULARES	32
3.3 ANÁLISIS DE DATOS	33
3.3.1 Sistema de reproducción y función de dispersión polínica	33
3.3.2 Diversidad y estructura genética a escala regional (archipiélago)	36
3.3.3 Diversidad y estructura genética a escala insular	39
3.3.4 Estructura genética espacial a escala fina	40
4. RESULTADOS	45
4.1 TESTADO DE LOS MARCADORES MOLECULARES	45
4.2. SISTEMA DE REPRODUCCIÓN Y FUNCIÓN DE DISPERSIÓN POLÍNICA	45
4.3 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA A ESCALA REGIONAL	49
4.4 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA A ESCALA INSULAR	54
4.5 ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL A ESCALA FINA	59

5. DISCUSIÓN	65
5.1 SISTEMA DE REPRODUCCIÓN Y FUNCIÓN DE DISPERSIÓN POLÍNICA	65
5.2 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA A ESCALA REGIONAL	68
5.3 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA A ESCALA INSULAR	72
5.4 ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL A ESCALA FINA	74
5.5 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN	77
6. CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXO I	105
ANEXO II	117

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.1	Función de densidad de probabilidad o kernel de dispersión	4
Figura 1.2	Modelos de migración y estructura genética.	8
Figura 1.3	Representación del contexto espacial de la estructura genética	12
Figura 1.4	Distribución del género <i>Phoenix</i> L.	15
Figura 1.5	Ejemplares macho y hembra de palmera canaria (<i>Phoenix canariensis</i>)	16
Figura 1.6	Inflorescencias y frutos de la palmera canaria (<i>Phoenix canariensis</i>)	18
Cuadro 1	Glosario.	20
MATERIA	L Y MÉTODOS	
Figura 3.1	Localización de las 29 poblaciones de palmera canaria (<i>Phoenix canariensis</i>)	
	consideradas en los diferentes diseños experimentales.	27
Figura 3.2	Distribución espacial de las palmeras presentes en la población	
	de Acusa Verde.	29
Figura 3.3	Procedimiento de colecta, almacenaje y siembra de la cosecha de semillas	
	procedentes de cada una de las 28 palmeras 'madres' muestreadas	30
Figura 3.4	Localización de las 15 poblaciones de palmera canaria (<i>Phoenix canariensis</i>) consi-	
	deradas para el análisis de la diversidad y estructura genética a escala regional	30
Figura 3.5	Localización de las 24 poblaciones de palmera canaria (<i>Phoenix canariensis</i>)	
	consideradas para el análisis de la diversidad y estructura genética espacial	
	a escala insular y a escala fina.	31
Tabla 3.1	Características geográficas de las 29 poblaciones de palmera canaria (<i>Phoenix</i>	
	canariensis) consideradas en los diferentes diseños experimentales	28
RESULTAI	DOS	
Figura 4.1	Histograma de frecuencias de las distancias potenciales de dispersión entre	
	machos y hembras y las distancias de polinización efectivas estimadas mediante	
	asignaciones fraccionales de la paternidad, en la población de $\it Phoenix canariensis$	
	de Acusa Verde.	46
Figura 4.2	Análisis multivariante de coordenadas principales (PCoA) basado en las frecuen-	
	cias alélicas obtenidas de las 15 poblaciones naturales de <i>Phoenix canariensis</i>	
	analizadas a nivel regional.	51
Figura 4.3	Límites de diferenciación genética detectados por BARRIER y resultados de	
	STRUCTURE en las 15 poblaciones naturales de <i>Phoenix canariensis</i> analizadas	
	a nivel regional	52

Figura 4.4	Test de correlación de Mantel aplicado a nivel regional	. 52
Figura 4.5	Análisis demográfico de <i>Phoenix canariensis</i> a lo largo del archipiélago canario	
	usando el método ABC implementado en DIYABC.	. 53
Figura 4.6	Límites de diferenciación genética detectados por BARRIER y resultados de	
	STRUCTURE para <i>Phoenix canariensis</i> a nivel insular.	. 56
Figura 4.7	Autocorrelogramas de las 20 poblaciones de <i>Phoenix canariensis</i> analizadas	
	a escala fina	. 61
Table // 1	Variación a nivel familiar de los parámetros del sistema reproductor y dispersión	
14014.1	polínica de <i>Phoenix canariensis</i> en la población de Acusa Verde	17
Table 4.2	Parámetros de dispersión polínica estimados con NM+ en la población de	. 47
14014.2	Acusa Verde.	10
Table 12	Estimadores de variación genética calculados con 8 loci microsatélites	. 40
Tabla 4.5		
	nucleares en los ejemplares de <i>Phoenix canariensis</i> presentes en la población de Acusa Verde y la cosecha de semillas.	40
Toble 4.4		. 43
18018 4.4	Comparación de los valores medios por isla de riqueza alélica (A),	ΕO
Table 4.5	heterocigosidad genética balanceada (H_s) y diferenciación genética.	. 50
18018 4.5	Estimadores de variación genética calculados con 8 loci microsatélites	
	nucleares en las 15 poblaciones naturales de <i>Phoenix canariensis</i> analizadas	Ε0
Table 4.0	a nivel regional.	. ວບ
Tabla 4.6	Estimaciones de los parámetros demográficos del escenario 3 mediante	F 4
T-1-1- 4.7	el método ABC implementado en DIYABC.	. 54
1abia 4. <i>1</i>	Estimadores de variación genética calculados con 8 loci microsatélites	
	nucleares en las 24 poblaciones naturales de <i>Phoenix canariensis</i> utilizadas	
T 11 40	en los análisis a escala insular y a escala fina.	. 55
Tabla 4.8	Matrices de valores pareados de diferenciación genética (F_{sr}), calculados	
	con 8 microsatélites, entre las poblaciones de <i>Phoenix canariensis</i> analizadas a	
	nivel insular en cada una de las islas centrales del archipiélago canario.	. 57
Tabla 4.9	Resultados del análisis jerárquico espacial de la varianza molecular (SAMOVA),	
	realizado de forma independiente en cada una de las islas centrales	
	(Gran Canaria, Tenerife y La Gomera) mediante SAMOVAv2.0.	. 58
Tabla 4.10	Estructura genética espacial (SGS) a escala fina, analizada con 8 loci micro-	
	satélites nucleares en 20 poblaciones de <i>Phoenix canariensis</i>	. 60
Tabla 4.11	Correlaciones de Spearman entre los estadísticos de variación genética y los	
	parámetros que caracterizan la ocupación del hábitat de <i>Phoenix canariensis</i>	
	en el paisaje.	. 60



1. Introducción

Durante los últimos 80 años, el estudio de la variación genética ha sido la piedra angular de la Biología Evolutiva, ya que esencialmente, la suma de variación nueva y la existente, ofrece el substrato sobre el cual opera la evolución a lo largo del espacio y tiempo (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2005; Templeton, 2006). El importante papel que juega el flujo genético¹ en la evolución y la diversificación de la vida ha quedado firmemente constatado en las últimas décadas (Frankham, 2002; Templeton, 2006;). Es por ello que llevar a cabo una conservación y gestión integral de la biodiversidad pasa por la necesidad de comprender los patrones evolutivos de las especies en particular.

El espectacular crecimiento del uso de los marcadores moleculares², contando con técnicas de genotipado a gran escala cada más versátiles y eficaces, ha ido emparejado con un considerable desarrollo de potentes métodos analíticos, implementados en diferentes programas y paquetes estadísticos para la estimación de la variación y flujo genético de las poblaciones (Beaumont, 2002; Beaumont y Rannala, 2004; Excoffier y Heckel, 2006). En concreto, los microsatélites, también denominados repeticiones de secuencias simples (SSR, simple sequence repeats, en inglés), han emergido como una de las elecciones más populares debido, en gran parte, a su mayor potencialidad para detectar la variabilidad genética a nivel individual y por su carácter codominante³, permitiendo una medición más rigurosa de las frecuencias alélicas en las poblaciones (Queller et al., 1993; Loikart y England, 1999; Squirrell et al., 2003). Generalmente, no se espera que la variación genética observada con marcadores moleculares refleje la acción de la selección natural sobre otras partes del genoma que gobiernan caracteres adaptativos (Reed y Frankham, 2001; McKay y Latta, 2002; Coates y Byrne, 2005). Dada la importancia de los procesos de selección natural en la adaptación local de las poblaciones, recientemente se han logrado nuevos avances en el campo de la genómica ambiental y funcional, enfocada en el polimorfismo de loci adaptativos (ver revisión en Storz, 2005), o en los polimorfismos de nucleótido único (SNPs, single nucleotide polymorphisms, en inglés; Nielsen et al., 2005), estando éstos últimos distribuidos de manera heterogénea por todo el genoma (tanto en regiones codificantes como no codificantes).

La estimación de la variabilidad genética con marcadores moleculares tiene un interés en sí mismo, siendo ideales para abordar un amplio espectro de cuestiones ecológicas y evolutivas (Selkoe y Toonen, 2006; Ellstrand, 2014). Los patrones de estructura genética de las poblaciones y/o individuos son, en su mayor parte, el resultado de los niveles de flujo genético o dispersión histórica de la especie, cuyo análisis requiere una submuestra representativa de la distribución de la especie a escala regional y/o local. Por otro lado, si lo que se pretende es estimar parámetros del sistema reproductor, o los patrones y factores que determinan el flujo genético o dispersión contemporánea de la especie (i.e. flujo de genes de una generación a la siguiente), conviene incrementar el esfuerzo de muestreo a escala local. Mientras los procesos microevolutivos⁴ que

definen la estructura genética intraespecífica pueden ser abordados con el uso de varios marcadores moleculares (Petit *et al.*, 2005), los involucrados en el ciclo reproductivo de las especies han empezado a ser investigados en profundidad desde la aparición de marcadores altamente polimórficos que permitan la discriminación individual, como es el caso de los microsatélites que suelen poseer una alta probabilidad de exclusión⁵ (Ashley, 2010).

1.1 SISTEMA REPRODUCTOR Y DISPERSIÓN POLÍNICA

La naturaleza y extensión del flujo genético entre generaciones es dependiente de dos características biológicamente intrínsecas a la especie: el modo de reproducción (sexual frente asexual y autogamia⁶ frente a cruzamiento biparental) y la movilidad de los individuos y/o sus propágulos (Lowe et al., 2004). Teniendo en cuenta el carácter sésil de las plantas superiores, el alcance potencial del flujo de genes vendrá dado únicamente por la dispersión de los propágulos reproductivos en la forma de gametos sexuales (polen), cigotos (semillas) y/o clones. No obstante, para que la dispersión acarree consecuencias evolutivas, el flujo genético generado debe producir cambios en las frecuencias alélicas o en la distribución de los genotipos dentro y entre las poblaciones (ver revisión de las implicaciones evolutivas del flujo genético en plantas en Ellstrand, 2014). Para que esto ocurra, es necesario que exista una mezcla eficiente de genes a nivel intrapoblacional, que la población reciba genotipos inmigrantes diferentes a los locales a través de un una dispersión a larga distancia (LDD, long-distance dispersal, en inglés), y que sobrevivan hasta la edad adulta reproductora. En este sentido, las poblaciones naturales están sujetas a numerosos factores ecológicos y demográficos, que influirán drásticamente en los patrones de flujo genético producido durante el ciclo reproductivo de las plantas, desde la dispersión del polen y la reproducción, hasta la dispersión de las semillas y el establecimiento de las plántulas (Barrett y Harder, 1996; Nathan y Muller-Landau, 2000; Ashley, 2010).

La asunción más simple sobre el sistema reproductor sexual de una especie es que exista homogeneidad en los apareamientos entre parentales, y que por tanto, la herencia de todos los alelos sea igualmente probable (*i.e.* panmixia). Sin embargo, el patrón reproductivo en la fase precigótica tiene un carácter dinámico, influenciado por variables que operan a diferentes escalas espacio-temporales. Por ejemplo, la asincronía de la fenología floral reduce las oportunidades de reproducción entre individuos y poblaciones (Pakkad *et al.*, 2008; Ottewell *et al.*, 2012; Weis, 2015); la densidad local puede favorecer los cruces entre individuos localizados en las cercanías (Franceschinelli y Bawa, 2000; Robledo-Arnuncio y Austerlitz, 2006); transformaciones del paisaje y/o de la masa poblacional podrían inducir variaciones en el comportamiento de los polinizadores o modificar las trayectorias de vectores de dispersión abióticos como el viento, incrementando los cruzamientos entre individuos cercanos y emparentados (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004; O´Connell *et al.*, 2006; Honnay y Jacquemyn, 2007; Bittencourt y Sebbenn, 2007; Lander *et al.*, 2013). A esto se le suma la influencia de variables a nivel individual, como el esfuerzo reproductor

empleado, determinados rasgos fenotípicos o posición dentro de la masa poblacional, que pueden conferir diferente éxito reproductivo (Burczyk*et al.*, 2002; García *et al.*, 2005; De Lucas *et al.*, 2008).

Las plantas suelen presentar una gran flexibilidad en la expresión del sistema de reproducción sexual para compensar su inmovilidad, su frecuente condición hermafrodita y dependencia a los vectores de polinización (Barrett y Harder, 1996). El sistema reroductor suele ser caracterizado mediante las 'tasas de cruzamiento o alogamia' (t=1-s; donde s es la tasa de autogamia), entre las cuales adquiere una importante relevancia el grado de 'endogamia biparental', la cual representa el nivel de cruzamiento entre individuos emparentados (Ritland, 2002). Otro parámetro de interés es la 'tasa de paternidad correlacionada' (r_p), definida como la fracción de la progenie que comparten el mismo padre o que son hermanos completos (Ritland, 1989; 2002). La paternidad correlacionada determina la probabilidad de que dos granos de polen de un mismo progenitor fertilicen a un mismo individuo femenino, siendo inverso al 'tamaño de vecindario' descrito por Wright (ver Crawford, 1984; Smouse et al., 2001; Austerlitz y Smouse, 2001), o dicho de otro modo, siendo inverso al tamaño poblacional efectivo considerando únicamente la varianza de la dispersión de los gametos masculinos.

A diferencia del potencial colonizador que posee la dispersión de semillas, el flujo de genes a través de la dispersión del polen es el mayor determinante del sistema reproductor, diversidad genética intrapoblacional y conectividad entre poblaciones en especies de plantas espacialmente estructuradas (Ennos, 1994). Es por ello que estimar los patrones espaciales del movimiento del polen, así como su interacción con el sistema reproductor, síndromes de polinización y factores ecológicos y demográficos, ha llegado a convertirse en un importante tema experimental en estudios de ecología y evolución, especialmente con la disponibilidad de marcadores microsatélites hipervariables (Smouse et al., 2001; Burczyk et al., 2002; Robledo-Arnuncio et al., 2006). Los estudios de dispersión polínica están enfocados en la estimación de la dispersión efectiva, que atiende a la incidencia de los eventos de fertilización en función de la distancia que separan el emisor del receptor del polen, a diferencia de la dispersión potencial, que solo contempla el alcance de la deposición del polen en función de la distancia desde su origen (Levin y Kerster, 1974), y que posee el inconveniente de no reflejar el efecto de los factores que determinan el éxito de la reproducción. Las distribuciones de las distancias efectivas, o distancias de apareamiento, típicamente exhiben un exceso de eventos en las cercanías (i.e. distribución leptocúrtica; Levin y Kerster, 1974). Dicha dispersión efectiva de polen a corta distancia influirá substancialmente en las tasas de paternidad correlacionada (Robledo-Arnuncio y Austerlitz, 2006; Pluess et al., 2009), y en la disminución del tamaño de vecindario genético, lo que promueve la competición entre plántulas emparentadas, y en último término, una posible depresión endogámica8 en las generaciones sucesivas (Griffin y Eckert, 2003; Degen et al., 2004). Por tanto, las restricciones de la dispersión polínica y sistema reproductor, contribuirán en la magnitud y escala de la estructura genética espacial (Epperson, 2003), convirtiéndolo en una información crítica para el desarrollo de correctas estrategias de conservación (Medina-Macedo et al., 2015).

La dispersión polínica a corta distancia puede ser eficientemente evaluada mediante métodos directos como los análisis de parentesco (Jones et al., 2010), los cuales se desarrollan sobre un conjunto de muestras basadas en los genotipos de parentales y descendientes. Además, permiten investigar conjuntamente el efecto de rasgos fenotípicos y variables ambientales en el éxito reproductor de los individuos masculinos (Nielsen et al., 2001; Oddou-Muratorio et al., 2003). El mayor hándicap de esta aproximación metodológica es que requieren un muestreo y genotipado exhaustivo de los ejemplares reproductores, siendo prácticamente inabarcable en especies que ocupan grandes extensiones geográficas (Austerlitz y Smouse, 2001), aunque asumible en poblaciones pequeñas y aisladas. Posteriormente, la caracterización espacial de la dispersión efectiva de polen suele realizarse ajustando una función de distribución a las distancias de cruzamiento detectadas mediante análisis de paternidad. Para ello se estima la función de densidad de probabilidad de dispersión desde los árboles individuales, o también denominada 'kernel de dispersión', que define la probabilidad media de que un grano de polen se desplace una distancia dada desde su origen (Figura 1.1). Dependiendo del alcance y frecuencia de los eventos de dispersión efectiva desde el emisor de polen, la curva de probabilidad puede tener una forma muy leptocúrtica, si la mayor parte de dichos eventos ocurren a cortas distancias (distribución de Weibull), o la pendiente de la misma puede ir decayendo progresivamente y tener una forma cada vez menos leptocúrtica a mediada que aumentan las probabilidades de dispersión efectiva de polen a medias y/o largas distancias (distribuciones Exponencial y Geométrica), o incluso mostrar una forma platicúrtica, así como un ensanchamiento de la cola del kernel, si prácticamente existen las mismas probabilidades de dispersar el polen de forma efectiva a cortas como medias y/o largas distancias (distribución de t de Student bivariada o 2Dt, Figura 1.1).

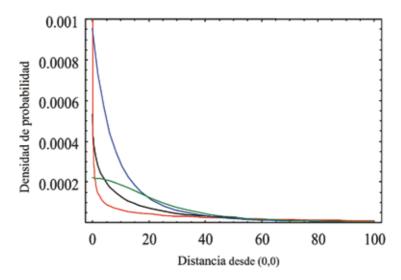


Figura 1.1 Función de densidad de probabilidad de dispersión, o kernel de dispersión, desde el árbol emisor (distancia cero). Las distintas curvas de probabilidad reflejadas en la gráfica corresponden a la distribución de Weibull (línea roja), distribución exponencial (línea negra), distribución geométrica (línea azul) y distribución 2Dt (línea verde: Modificado de Austerlitz et al., 2004).

Por otro lado, los eventos raros de dispersión polínica a larga distancia, aunque mucho más difíciles de detectar y cuantificar, son el vector de conectividad genética entre poblaciones, especialmente a lo largo de paisajes fragmentados (Trakhtenbrot et al., 2005; Klein et al., 2006), conllevando consecuencias potencialmente importantes para la adaptación local en ambientes cambiantes (Kremer et al., 2012). Aunque la estimación precisa de la frecuencia y origen de los eventos de dispersión polínica efectiva a larga distancia siguen constituyendo un enorme desafío experimental (Kremer et al., 2012), los análisis locales de paternidad pueden aportar algunas pistas sobre la frecuencia de éstos a través de la estimación de las tasas de inmigración de polen en poblaciones aisladas, y el análisis de la forma de la cola de las funciones de dispersión estimadas a nivel local (Burczyk et al., 2002; Austerlitz et al., 2004; Oddou-Muratorio et al., 2005; Klein et al., 2006). El uso de esta metodología ha demostrado en numerosas ocasiones cómo la dispersión polínica a larga distancia, aunque menos frecuente, es común tanto en sistemas de dispersión de polen mediados por el viento como por animales (ver revisión en Ashley, 2010). Para la estimación de los patrones locales de apareamiento, uno de los métodos más frecuentemente usados es la asignación categórica de paternidad mediante el cálculo de la máxima verosimilitud (ver, por ejemplo, Marshall et al., 1998), que permite la caracterización individual explícita de la dispersión efectiva de polen a costa de un aumento substancial de descendientes no asignados y del error de tipo II (Oddou-Muratorio et al., 2003). Los análisis de parentesco basados en métodos de asignación fraccionada (ver, por ejemplo, Nielsen et al., 2001) alivian las reducciones de los tamaños muestrales inherentes a los análisis categóricos y, aunque no identifica categóricamente a los padres, proveen de un medio alternativo para estimar la distribución de las distancias de apareamiento. Finalmente, el kernel de dispersión es unidimensional y no contempla la heterogeneidad espacial, pero esta limitación puede corregirse mediante 'modelos espacialmente explícitos de vecindario' (Burczyk et al., 2002; Oddou-Muratorio et al., 2005). Éstos modelos proporcionan una herramienta integradora para la estimación conjunta de los kernel de dispersión polínica, la dirección prevalente de la dispersión, las tasas de inmigración polínica en el área de estudio y las correlaciones ecológicas con el éxito reproductor entre los machos que han participado como padres en la progenie analizada.

1.2 VARIABILIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA GEOGRÁFICA

1.2.1. Estimaciones de la variación genética: diversidad, distancia y estructura genética

Los patrones genéticos en las poblaciones suelen abordarse desde tres componentes en los que se contextualiza la variación genética (Lowe *et al.*, 2004): la cantidad de variabilidad genética existente (diversidad genética), el modo en que se distribuye a lo largo de las poblaciones de una especie (estructuración genética) y el grado de similitud entre individuos y/o poblaciones (distancia o diferenciación genética).

Los niveles de variación genética neutral o casi neutral atribuida a los marcadores moleculares, así como su estructura geográfica, están determinadas principalmente por la actuación conjunta de la mutación, migración y deriva genética (Avise, 1994; Templeton, 2006). Por un lado, la velocidad a la que se genera nueva variación genética dependerá de la tasa de mutación y el nivel de recombinación atribuido al tipo marcador molecular utilizado, pues variará según la región del genoma analizada (Avise, 1994; Petit et al., 2005). Por otra parte, como consecuencia del tamaño finito de las poblaciones, la diversidad genética puede disminuir a causa de las fluctuaciones estocásticas de las frecuencias alélicas debido al muestreo al azar entre los gametos (i.e. deriva genética), mientras que aumenta a causa de la migración, ya que provee a la población de nuevos alelos o incrementa las frecuencias de los alelos ya presentes. No obstante, éstos procesos también pueden poseer importantes efectos sobre la diversidad no neutral o adaptativa, pudiendo interaccionar con la selección natural especialmente en ambientes heterogéneos (Lenormand, 2002). Asimismo, también algunos loci supuestamente neutrales pueden mostrar señales significativas de adaptación o estar hereditariamente unidos a genes cercanos que sí se encuentran bajo selección. Esta asociación produciría un comportamiento atípico de las frecuencias alélicas bajo lo esperado en la neutralidad (Charlesworth et al., 1997), pudiendo aumentar la diversidad si se trata de la fijación de múltiples alelos de un gen, como ocurre en la 'selección estabilizadora', o disminuirla si son retenidos valores extremos de un gen, como ocurre en la 'selección direccional' (Gillespie, 1994). Mientras por un lado, esta interacción puede ocasionar malinterpretaciones en las estimaciones de diversidad y diferenciación genética neutral, por otro lado pueden advertir sobre determinadas áreas del genoma que se encuentran bajo la selección natural (Ford, 2002). Las cada vez más asequibles técnicas de secuenciación y búsqueda de polimorfismo en el genoma completo, abren nuevas puertas para abordar hipótesis sobre los factores ecológicos y genéticos que afectan a los patrones de variabilidad genética en su conjunto (Leffler et al., 2012).

Los niveles de diversidad genética también pueden abordarse desde el grado de similitud o distancia genética entre dos individuos o grupo de individuos (subpoblaciones). Los datos genéticos son notablemente multivalentes, ya que contienen diferentes frecuencias de cada alelo en un locus determinado para cada población (Jombart *et al.*, 2009). De hecho, conceptualmente, la distancia genética mide cuánto de alejadas están dos muestras genéticamente en un hiperespacio de *n* dimensiones en el que cada eje corresponde a la variación molecular de un solo marcador (Lowe *et al.*, 2004). De forma ideal, alcanzará valores que varían entre cero (cuando la variación molecular observada en todos los marcadores se comparte en ambas muestras) y uno (cuando la variación molecular observada en todos los marcadores es distinta entre muestras). Por tanto, el valor evolutivo de la distancia genética está necesariamente relacionado con la divergencia entre los individuos y/o subpoblaciones, razón por la cual es un concepto clave en la sistemática molecular o asociación genética (Avise, 1994). A lo largo de las últimas décadas se han propuesto y contrastado numerosos métodos para estimar la distancia genética entre pares de individuos y/o poblaciones con diferentes tipos de marcadores moleculares (Nei, 1978;

Weir y Cockerham, 1984; Goldstein et al., 1995; Pons y Petit, 1996; Rousset, 2000). Particularmente, el proceso de mutación de los loci microsatélites, caracterizado por cambios escalonados del número de repeticiones de las secuencias cortas o 'modelo de mutación escalonada' (SMM, stepwise mutation model, en inglés), permite estimar la distancia genética mediante dos métodos cualitativamente diferentes. El primero, se basa en la presencia/ausencia de los alelos y sus frecuencias, considerando 'alelos desordenados', es decir, que están codificados por el número total de pares de bases que contiene, siendo el cálculo de los pares de F_{cr} el tratamiento más común (Weir y Cockerman, 1984). El segundo, se basa en las semejanzas entre 'alelos ordenados', los cuales están codificados según su tamaño o número de repeticiones de secuencias simples siguiendo un modelo SMM sencillo (pares de R_{sr} ; Slatkin, 1995). Así pues, en el segundo caso, la diferencia de tamaño entre alelos podría indicar la cantidad de eventos de mutación pasados, e informaría de los tiempos de coalescencia⁹ entre alelos (Slatkin, 1995). Cuando las poblaciones pasan por varias generaciones de aislamiento reproductivo, la diferenciación genética observada con marcadores neutrales será el resultado de la deriva o de las mutaciones acumuladas de forma independiente en cada una de ellas. Por tanto, el patrón filogeográfico resultante puede ser detectado en función de cómo varíen entre sí las estimaciones entre F_{s_T} y R_{s_T} , siendo iguales si prevalece la deriva, o incrementando R_{sr} con respecto a F_{sr} si una importante contribución de mutaciones escalonadas (SMM) han ocasionado la divergencia de las poblaciones (Estoup et al., 1998; Hardy et al., 2003).

En términos genéticos, la población es considerada como el conjunto de subpoblaciones de individuos de una misma especie que forman una comunidad de intercambio genético a lo largo del espacio y tiempo, siendo definida por Dobzhansky (1950) como *población mendeliana*. Por consiguiente, el concepto de población está íntimamente relacionado al grado de flujo genético generado por la migración entre las subpoblaciones (demos). La variación genética tenderá a diferenciarse entre las subpoblaciones a causa de restricciones en el sistema reproductor y la dispersión de genes, influyendo en el tamaño de población efectiva y en el grado con que las poblaciones se subdividen por selección o deriva genética (Schoen y Brown, 1991; Glémin *et al.*, 2006).

La consecuencia más directa y común de una dispersión limitada durante varias generaciones es el cambio gradual de las frecuencias alélicas a lo largo del espacio, fenómeno denominado como 'aislamiento por distancia' (IBD, *isolation by distance*, en inglés; Wright, 1943, 1946). La alternativa de divergir mediante aislamiento por distancia, es hacerlo mediante contextos más complejos de aislamiento geográfico y/o ecológico entre las subpoblaciones de una especie, lo que en un caso extremo de inexistencia de flujo genético conduce a procesos de especiación. Para casos intermedios en que la divergencia de las poblaciones es relativa, se han ideado diferentes modelos teóricos que reflejan la estructura genética según el patrón de migración entre subpoblaciones (Figura 1.2). Wright (1951) desarrolló un 'modelo de isla' (*island model*, en inglés),

donde considera condiciones de equilibrio evolutivo entre un número infinito de poblaciones (islas) que contribuye de igual manera al conjunto de migrantes de la metapoblación, y que a su vez, tales migrantes se extienden de manera aleatoria a lo largo de todas las islas (Figura 1.2a). Ya que la distancia no influye en la posibilidad de recibir migrantes, ésta cualidad lo convierte en un modelo poco realista. Kimura (1953) redefinió este marco teórico con un modelo denominado 'piedras de paso o piedras rodantes' (*stepping-stone*, en inglés), donde considera que las poblaciones están dispuestas de forma consecutiva en una o dos dimensiones, y por tanto, cada subpoblación tendrá una tasa de migración determinada con cada una de las poblaciones vecinas (Figura 1.2b). Dado que las poblaciones más cercanas tendrán más posibilidades de intercambiar migrantes que las alejadas, también mostrarán menor grado de diferenciación genética, lo que se traducirá en un patrón clásico de 'aislamiento por distancia' (Kimura y Weiss, 1964).

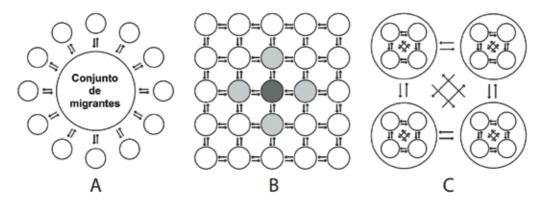


Figura 1.2 Representación de los tres modelos de migración descritos, donde cada círculo simboliza una subpoblación: A) Modelo de isla, en el cual cada población emite y recibe migrantes de un conjunto común; B) Modelo stepping-stone en dos dimensiones, donde la migración ocurre sólo entre poblaciones vecinas; C) Modelo de estructura jerárquica, definido como cuatro grupos que contienen cuatro subpoblaciones cada uno, y donde la migración es más probable dentro que entre grupos (Modificado de Fogelqvist, 2008).

La construcción de 'modelos jerárquicos' basados en el trabajo pionero de Wright (Slatkin y Voelm, 1991), consiste en asignar las subpoblaciones en grupos entre los que existe mayor posibilidad de compartir migrantes (Figura 1.2c). Actualmente, los estadísticos Fintroducidos por Wright (1951) para un 'modelo de isla' aunque desarrollados más ampliamente por Weir y Cockerman (1984), siguen siendo uno de los procedimientos más populares para el tratamiento jerárquico de la variabilidad genética (dentro de cada subpoblación, entre subpoblaciones y en la metapoblación total). En parte se debe a la facilidad de su cálculo y su utilidad en la exploración de un amplio rango de hipotéticas estructuras genéticas en las poblaciones (Escudero *et al.*, 2003; Hedrick, 2005). El procedimiento de análisis molecular de la varianza (AMOVA) desarrollado por Excoffier *et al.* (1992) proporciona un eficiente método para tal análisis, que puede ser fácilmente aplicado en matrices de distancias genética interindividuales. Actualmente, a través de simulaciones mediante métodos estadísticos más potentes, se empiezan a abordar modelos más complejos

incluyendo diferentes tipos de estructura genética de las poblaciones y variables como factores ambientales o tasas de migración desiguales, los cuales permiten inferir en patrones más realistas de diferenciación genética entre las poblaciones (Foll y Gaggiotti, 2008; Excoffier *et al.*, 2009a).

1.2.2 Factores que influyen en el patrón de distribución de la diversidad genética

Intuitivamente se espera que las especies ampliamente distribuidas alberguen mayores niveles de diversidad y menor diferenciación genética que las especies de distribución restringida (Hamrick y Loveless, 1989; Frankham, 1996; Gitzendanner y Soltis, 2000). En parte se debe a que poseen tamaños poblacionales relativamente estables que tienden a experimentar una menor fluctuación de las frecuencias alélicas, y que conservan grandes tamaños poblacionales efectivos (N_{θ}) , lo que posibilita mantener los niveles de variación genética a lo largo de las generaciones (Charlesworth, 2009). Inversamente, existe una serie de riesgos genéticos asociados a la reducción de las poblaciones: la pérdida de diversidad genética asociada a una mayor influencia de la deriva (Wright, 1931), así como el riesgo de sufrir procesos endogámicos por la reducción de los tamaños efectivos mínimos (Ellestrand y Ellam, 1993; Frankham, 1996; Jump y Peñuelas, 2006). La erosión genética que acarrea una reducción del tamaño efectivo de las poblaciones, así como el aislamiento de las subpoblaciones de una especie es un tema crucial en conservación genética (Ellstrand, 1992; Ellestran y Ellam, 1993; Frankham et al., 2002; Palstra y Fraser, 2012). Los niveles de diversidad genética que pueden afectar a la eficacia biológica de las poblaciones, y limitar su adaptación frente a nuevas presiones selectivas, han sido tema de debate durante años. Si bien la relación entre tamaño poblacional, heterocigosidad y eficacia biológica de las poblaciones resulta significativa en numerosos estudios empíricos (ver meta-análisis: Reed y Frankham, 2003; Leimu et al., 2006), no es tan fácil de generalizar y su uso con fines predictivos puede ser controvertido. Así, especies de amplia distribución pueden reflejar niveles bajos de variación genética (Walter y Epperson, 2001), y contrariamente, especies de distribución restringida o raras no son equivalente a bajos niveles de variabilidad genética (Gitzendanner y Soltis, 2000). De hecho, un empobrecimiento de la eficacia biológica en poblaciones pequeñas no solo puede ser consecuencia de la reducción de la diversidad genética, sino también de una compleja interacción entre los factores bióticos del ambiente y la estocasticidad demográfica (Leimu et al., 2006).

En definitiva, las especies son entidades dinámicas y los patrones de distribución de la variación genética observada en el presente pueden estar reflejando el equilibrio de fuerzas evolutivas determinadas bajo el contexto actual o bien la huella temporal de procesos históricos (Epperson, 2003). Tanto las fluctuaciones demográficas a lo largo del tiempo como las variaciones asociadas al éxito reproductivo, pueden desviar considerablemente el tamaño de población efectiva del censo real de individuos en la población (Nunney, 1993; Frankham, 2007; Charlesworth, 2009). Por ejemplo, los episodios de colonización de un nuevo hábitat dan lugar a una drástica reducción de

la variación genética como consecuencia del efecto fundador¹⁰, así como a complejas modificaciones del tamaño efectivo poblacional que pueden traducirse en cuellos de botella¹¹ (Luikart et al., 1998). Asimismo, la historia demográfica de las poblaciones puede estar sujeta a oscilaciones climáticas o eventos catastróficos que ocasionan procesos de extinción-recolonización de las poblaciones a lo largo del rango de distribución de las especies, originando complejos patrones de variación genética (Eckert et al., 2008; Excoffier et al., 2009b; Mayol et al., 2012). Por otro lado, la fragmentación del hábitat confina la distribución de la especie a parches más o menos aislados entre sí, pudiendo sufrir las implicaciones asociadas a una reducción del tamaño poblacional efectivo y del flujo genético (Young et al., 1996). Mientras los efectos de la fragmentación a corto plazo son más evidentes en los patrones de variación genética de las semillas y plántulas producidas en las generaciones siguientes a la misma (Hamrick, 2004), los efectos a largo plazo están más relacionados con el incremento de los niveles de endogamia y deriva genética de los parches o subpoblaciones (Young et al., 1996). Con el desarrollo de la teoría de la coalescencia (Kingman, 1982), la distribución de las frecuencias y estados alélicos obtenidos con marcadores moleculares pueden interpretarse desde una perspectiva genealógica. Para este fin, el creciente uso de métodos de computación bayesiana aproximada (ABC, Approximate Bayesian computation, en inglés) se ha convertido en una de las herramientas más extensamente usadas para simular genealogías de genes bajo, prácticamente, cualquier modelo genético y demográfico (Beaumont y Rannala, 2004; Bertorelle et al., 2010), permitiendo la estimación de parámetros de importancia como tiempos de coalescencia o divergencia, tasas de migración o tamaños de población efectiva.

El tamaño de población efectiva requerido para mantener los niveles de variación genética a lo largo del tiempo es fuertemente dependiente de la historia de vida de las plantas (Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick y Godt, 1996; Nybom, 2004). Factores como el tipo de sistema reproductor, potencial para la dispersión de propágulos reproductores y la forma de vida, así como el potencial para el establecimiento de las poblaciones y su persistencia, también van a determinar los patrones de distribución de la variabilidad genética. En este sentido, los árboles suelen exhibir predominantemente una reproducción cruzada, además de poseer habilidades para la dispersión a larga distancia, lo que conduce a mantener grandes tamaños poblacionales. Ésta combinación de características promueve que, habitualmente, las especies arbóreas muestren altos niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones y baja diferenciación genética entre ellas (Petit y Hampe, 2006), contribuyendo en aumentar su resiliencia frente a los efectos negativos de la fragmentación y/o poblaciones pequeñas (Hamrick, 2004; Jump y Peñuelas, 2006).

1.2.3 Estructura genética espacial

A parte de los procedimientos tradicionales para analizar la estructura genética de las poblaciones, otro tipo de métodos incorporan el componente espacial en los análisis a fin de detectar y caracterizar la estructura genética espacial (SGS, spatial genetic structure, en inglés). El carácter

sedentario de las plantas promueve que los procesos que determinan la SGS operen a diferentes escalas: población, subpoblación o entre individuos próximos (*i.e.* a escala fina) (Escudero *et al.*, 2003; Epperson, 2003). El nivel de flujo genético producido entre individuos y poblaciones va a ser el mayor determinante de los patrones de SGS (Loveless y Hamrick, 1984; Smouse y Sork, 2004).

La vía clásica para visualizar los patrones de la variabilidad genética es por medio de gráficos basados en las matrices de distancias genéticas (principalmente, dendrogramas o análisis de componentes principales), en los que se proyectan las similitudes y diferencias genéticas en un espacio virtual. Estos métodos se muestran particularmente informativos para identificar valores atípicos o agrupaciones de las muestras que expliquen el tipo de estructura subyacente en la variabilidad genética global. Sin embargo, son menos apropiados si lo que se pretende es detectar los patrones espaciales de la distribución de la variación genética (Figura 1.3). Caracterizar la distribución espacial de la variación genética se ha convertido en un paso esencial para poder inferir en las variables ambientales y/o elementos del paisaje que interfieren en los patrones de migración y flujo genético, lo que hoy en día conforma un nuevo campo de investigación denominado 'genética del paisaje' (Landscape Genetics; Manel et al., 2003; Holderegger y Wagner, 2008). En lo que respecta a los factores ambientales, solo afectarán indirectamente a la distribución de la diversidad genética neutral si éstos interfieren en procesos como el flujo genético o el sistema reproductor (Kawecki, 2008; Ouborg et al., 2010). Si lo que se pretende es estimar la divergencia de las poblaciones como respuesta a las adaptaciones locales a lo largo de un gradiente ambiental, se debería estimar previamente la variación genética adaptativa (Kawecki y Elbert, 2004; Reusch y Wood, 2007; Parisod y Joost, 2010). No obstante, es de tener en cuenta que un patrón reciente de IBD o una historia filogeográfica compleja como resultado de expansiones y contracciones demográficas, puede producir patrones confusos de SGS, así como valores de $F_{\rm sr}$ atípicos y más pronunciados, que pueden mimetizar procesos adaptativos a determinadas escalas de análisis (Excoffier y Ray, 2008; Excoffier et al., 2009a; Holderegger et al., 2010).

Una de las cuestiones espaciales más básicas en el análisis con marcadores neutrales es la evaluación del patrón IBD mediante el test de Mantel (1967). Éste consiste en correlacionar la matriz de distancias genéticas con respecto a la matriz de distancias geográficas (euclidianas) entre pares de individuos o poblaciones. También, resulta de gran interés la detección de las barreras geográficas potenciales que han podido interferir en los patrones filogeográficos observados (Figura 1.3). Para ello se suelen utilizar técnicas de superposición a través de las cuales se identifican grupos de poblaciones, barreras, discontinuidades genéticas o isolíneas (Manni *et al.*, 2004; Holderegger *et al.*, 2010). Una vez obtenida la SGS, se sobrepone en mapas topográficos, para detectar coincidencias geográficas en los bordes de los grupos genéticos observados. No obstante, el principal inconveniente es que la coincidencia en ambos componentes se basa simplemente en la inspección visual subjetiva (Holderegger *et al.*, 2010). También, existen adaptaciones de los métodos clásicos de agrupación genética en los que se incorporan las coordenadas geográficas

de las muestras, como el 'análisis espacial de la varianza molecular' (SAMOVA, *spatial analysis of molecular variance*, en inglés; Dupanloup *et al.*, 2002) o análisis multivariantes y bayesianos (Jombart *et al.*, 2008; François y Durand, 2010).

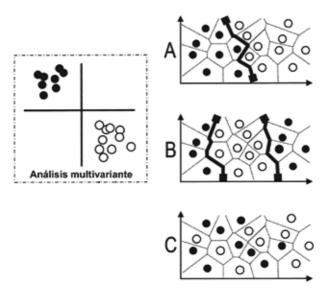


Figura 1.3 Representación del contexto espacial de la estructura genética. La asociación genética de las muestras (representadas por puntos) en diferentes grupos (color negro o blanco) puede ser visible en un análisis multivariante, pero las barreras o discontinuidades genéticas que los separan en el contexto espacial son imperceptibles. De hecho, los tres escenarios diferentes de la derecha (A, B y C) reflejan el mismo resultado obtenido con los análisis multivariantes: A) todas las poblaciones pertenecientes a cada grupo son espacialmente continuas, y por tanto, en los análisis espaciales se espera observar sólo una barrera genética entre ellos; B) Sólo un grupo (puntos blanco) es espacialmente continuo, por lo que se espera observar dos barreras genéticas; C) No existe correspondencia entre las diferencias genéticas de los grupos y su localización geográfica, por lo que los análisis espaciales no revelarán barreras genética (Modificado de Manni *et al.*, 2004).

Por otro lado, mientras la mayoría de los métodos han sido aplicados a escalas amplias y/o medianas (*i.e.* regiones), y no proveen información por debajo de la menor subdivisión capturada en el muestreo, la SGS a escala fina (*i.e.* entre individuos próximos) ha permanecido durante más tiempo insuficientemente explorada (Escudero *et al.*, 2003). El carácter hipervariable de los microsatélites nucleares, ha motivado el estudio de los procesos microevolutivos cada vez a menores escalas con el fin de comprender los procesos de flujo genético y adaptación a la escala de los paisajes naturales (Epperson, 2003). La distribución de los genotipos a lo largo del espacio será predominantemente consecuencia de las limitaciones en la dispersión de polen y semillas a cortas escalas (Vekemans y Hardy, 2004; Cavers *et al.*, 2005), pudiendo influir en los patrones genéticos de las plantas a mayores escalas (Heer *et al.*, 2015). En este proceso es aún más determinante el alcance de la dispersión de semillas que la dispersión polínica, así como los procesos post dispersivos, ya que son los responsables de la ubicación final de las plántulas. Restricciones

en alguno de estos procesos ocasionan la agregación de genotipos emparentados y la formación de estructuras familiares (Degen *et al.*, 2001; Hampe *et al.*, 2010). Por otro lado, la inestabilidad demográfica a lo largo del tiempo (entre clases de edades o estadios de crecimiento) y el espacio (continuidad espacial de los individuos) como consecuencia de los factores históricos, fragmentaciones y/o manejo de las poblaciones, pueden causar variaciones en los patrones de SGS a escala fina (Oddou-Morutorio *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011; Nakanishi *et al.*, 2015).

1.3 IMPACTO DE LOS SISTEMAS INSULARES EN LOS PATRONES DE VARIABILI-DAD GENÉTICA INTRAESPECÍFICA

La relativa simplicidad de las islas con respecto a las zonas continentales convierten a los sistemas insulares en 'laboratorios biológicos', proporcionando ejemplos que ayudan a comprender procesos universales en ecología y evolución (Carlquist, 1974; Barret, 1996; Whittaker y Fernández-Palacios, 2007; Bramwell y Caujapé-Castells, 2011). Las islas oceánicas surgen del lecho marino por la actividad volcánica y están desprovistas de vida en el momento de su emergencia, siendo pobladas paulatinamente por la biota mediante la dispersión a larga distancia (Vargas et al., 2012). El aislamiento que de forma natural ofrecen las islas, especialmente las oceánicas, condiciona en gran término la evolución de las especies que logran colonizarlas, produciendo en la mayoría de los casos una asombrosa diversificación de especies. En general, la mayoría de las investigaciones desarrolladas en islas han estado centradas en cuestiones biogeográficas o de la historia filogenética de los taxones insulares (Juan et al., 2000; Emerson, 2002; Whittaker y Fernández-Palacios, 2007). No obstante, la colonización y expansión geográfica de las especies a lo largo de los sistemas insulares no siempre se traduce en procesos de radiación adaptativa¹², pudiendo causar fuertes patrones de variabilidad genética intraespecífica sin que se originen nuevas especies (Stuessy, 2007). En este sentido, las especies insulares de amplia distribución permiten investigar los factores involucrados en la colonización de varias islas sin que impliquen procesos de especiación, pudiendo inferir en los patrones genéticos a lo largo de mayores escalas geográficas (Bottin et al., 2005; García-Verdugo et al., 2010; Martins et al., 2013). En el caso de los archipiélagos, la presencia de barreras oceánicas restringe el flujo genético entre las islas, por lo que se espera que las especies ampliamente distribuidas a lo largo de los mismos presenten fuertes estructuras genéticas (Bottin et al., 2005; Kaneko et al., 2008). Asimismo, se espera que la colonización secuencial del archipiélago (i.e. modelo stepping-stone), particularmente en aquellos sistemas insulares que muestran una configuración lineal (Juan et al., 2000; Emerson, 2002; Kwon y Morden, 2002; Kaneko et al., 2008; Yamada y Maki, 2012), lleve a un decrecimiento de la diversidad genética de las poblaciones en el frente de expansión geográfica de la especie, y a un patrón de IBD por las restricciones en la dispersión a lo largo del archipiélago (Inoue y Kawahara, 1990; Kaneko et al., 2008; Yamada y Maki, 2012).

Tradicionalmente, se ha sostenido la idea de que los taxones insulares están caracterizados por una reducción de los niveles de variación genética en comparación con las poblaciones

continentales (Barrett, 1996; Frankham, 1996, 1997). La baja diversidad genética observada en muchas especies insulares suele estar relacionada con cambios drásticos del número y tamaño de las poblaciones, los cuales están frecuentemente ligados a los eventos estocásticos inherentes a la colonización en las islas y/o a la fragmentación (Kaneko et al., 2008; Stuessy et al., 2014). No obstante, algunos estudios desarrollados en linajes emparentados y de amplia distribución en el continente e islas, han detectado patrones de diversidad genética inversos a los esperados, probablemente debido a un aumento de las tasas de extinción, o complejas variaciones demográficas (procesos de contracción y expansión de las poblaciones) en áreas continentales durante los periodos del Plioceno y Pleistoceno (Chiang et al., 2006; Chiang y Shaal, 2006). Esta última tendencia también ha sido sugerida para taxones macaronésicos de amplia distribución, combinado además, con el efecto que ocasionan los eventos de colonización múltiple facilitados por la proximidad de los archipiélagos macaronésicos al continente (Francisco-Ortega et al., 2000; Fernández-Mazuecos y Vargas, 2011; Désamoré et al., 2012; García-Verdugo et al., 2013). Asimismo, en particular para las Islas Canarias debido a su gran antigüedad geológica (20 Ma para Fuerteventura y Lanzarote), estas islas pueden albergar taxones muy antiquos que han podido experimentar numerosos procesos de mutación y flujo genético desde el establecimiento de las poblaciones, lo que se traduciría en un incremento de la diversidad genética (Kim et al., 1999; Francisco-Ortega et al., 2000).

Po otro lado, también se ha sugerido que los síndromes de dispersión asociados con largas distancias como la anemofilia (polinización a través del viento), la anemocoria (dispersión de semillas a través del viento) o la endozoocoria (dispersión de semillas a través de la ingesta por parte de vertebrados), frecuentemente exhibidos en árboles, pueden aliviar la subdivisión de las poblaciones como resultado del aislamiento geográfico y el patrón de IBD esperado para los taxones insulares a lo largo del archipiélago (Payn et al., 2008; García-Verdugo et al., 2010; Martins et al., 2013; García-Verdugo et al., 2014). No obstante, incluso en especies que exhiben un importante flujo genético entre islas y mantienen altos niveles de diversidad y población efectiva, éstas no están exentas de sufrir variaciones espacio-temporales del tamaño, forma y conexiones entre sus poblaciones a escala intra-insular (Lu et al., 2002; Gómez et al., 2003; Rosas-Escobar et al., 2011; Shepherd y Perrie, 2011). Las especies insulares en general también están sujetas a episodios de extinción y recolonización de las poblaciones debido a perturbaciones geológicas (Gómez et al., 2003; García-Verdugo et al., 2010; Mairal et al., 2015) u oscilación del nivel del mar (Shepherd y Perrie, 2011; Mayol et al., 2012), así como a los efectos del impacto humano (Muller et al., 2009), lo que promueve restricciones del flujo genético y la divergencia de las poblaciones también a medianas escalas. En general la información disponible sugiere que los patrones de diversidad y diferenciación genética de los endemismos insulares dependen de varios factores (ver revisión en Stuessy et al., 2014), siendo los siguientes los más influyentes: tiempo que ha pasado desde la colonización, la ontogenia insular, la tasa generacional, el sistema de reproducción y los patrones de dispersión (incluyendo también la migración producida por el ser humano). Por tanto, las condiciones y características particulares de cada especie podrían desviarse de las

clásicas expectativas mencionadas para especies insulares (Pfosser *et al.*, 2006; López-Sepulveda *et al.*, 2013; Stuessy *et al.*, 2014).

1.4 ESTADO DE CONOCIMIENTO DE LA PALMERA CANARIA (*Phoenix canarien-sis* H. Wildpret)

La palmera canaria, Phoenix canariensis H. Wildpret (ver reciente revisión de la nomenclatura de P. canariensis en Rivera et al., 2013), es una de las 14 especies descritas en el género Phoenix L. (World Checklist of Arecaceae; Govaerts et al., 2011), el cual, se caracteriza principalmente por incluir todas las palmeras con hojas pinnadas-induplicadas y estar ampliamente distribuido en climas cálidos del Viejo Mundo, desde la Macaronesia hasta China, así como por poseer una gran relevancia económica en sus lugares de origen (Figura 1.4; Dransfield et al., 2008). Se trata de un género, morfológica y filogenéticamente, aislado dentro de la Subfamilia Coryphoideae (Arecaceae), formando la Tribu Phoeniceae que se constituye únicamente por el género Phoenix (Asmussen et al., 2006; Dransfield et al., 2008). La poca variación morfológica y genética, así como el alto grado de hibridación interespecífica que muestra este género (Barrow, 1998; Henderson et al., 2006), han dificultado la completa comprensión filogenética de las especies de éste género (Barrow, 1998; Pintaud et al., 2010; Henderson et al., 2006; Ballardini et al., 2013; Rivera et al., 2014), siendo prácticamente imposible la discriminación de las 14 especies mediante el uso de una única herramienta metodológica. No obstante, independientemente del método molecular utilizado, P. canariensis suele agruparse con Phoenix dactylifera, Phoenix sylvestris, Phoenix atlantica y Phoenix theophrasti, en el también denominado 'Clado Phoenix dactylifera'. En concreto, los microsatélites nucleares han sido empleados en varias ocasiones para desarrollar estudios de diversidad y estructura genética en especies del género Phoenix (Zehdi et al., 2004, 2015; Elshibli y Koperlainen, 2008, Pintaud et al., 2013).

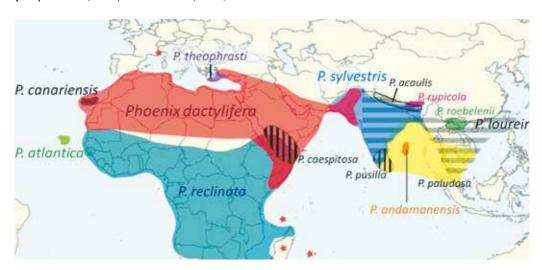


Figura 1.4 Distribución del género Phoenix L.

P. canariensis es un endemismo de las Islas Canarias, de biotipo arborescente y longevo (pudiendo vivir hasta 200 años). Posee un tronco grueso (puede alcanzar de 60 a 100 cm de diámetro) y solitario (sin capacidad para generar hijuelos en su base), que crece hasta casi 30 m aunque las alturas más comunes son entre los 5-10 m. Como todas las especies del género *Phoenix*, es diploide (n=18) y dioica, es decir, existe una separación de ambos sexos en distintos pies de planta, implicando una reproducción sexual estrictamente alógama. Las palmeras femeninas y masculinas se diferencian en la morfología de su inflorescencia (Kunkel y Kunkel, 1974; Barrow, 1998; Sosa *et al.*, 2007), llegando a manifestar cierto grado de dimorfismo sexual en la corona foliar, algo poco común en especies vegetales (Díaz-Bertrana, 2005; Morici, 2006; Sosa *et al.*, 2007; Figura 1.5).

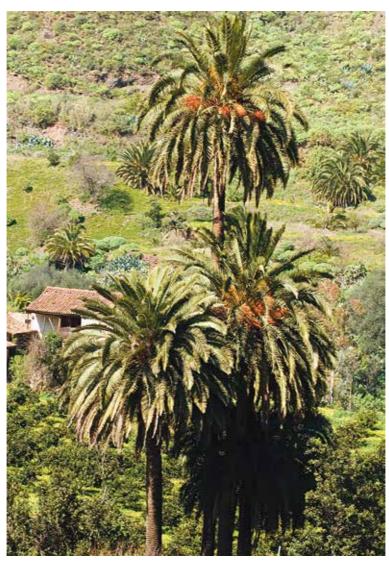


Figura 1.5 Ejemplares macho (izquierda) y hembra (centro y derecha) de palmera canaria (*Phoenix canariensis* H. Wildpret).

Las poblaciones de la palmera canaria (palmerales) pueden encontrarse en una gran amplitud de ecosistemas, principalmente formando comunidades donde es la única especie arbórea. P. canariensis es fuertemente freatófita, mostrándose muy agresiva en la captación de agua, aunque pudiendo soportar tanto condiciones de encharcamiento temporal de sus raíces como prolongadas sequías. Por tanto, sus requerimientos en humedad edáfica, determinan enormemente su marcada apetencia por ocupar fondos de barrancos y laderas próximas a éstos donde se crean suelos apropiados para su establecimiento (Sosa et al., 2007; Fernández-Palacios et al., 2008). Potencialmente, P. canariensis habita el bosque termófilo canario (de constitución fuertemente emparentada con el bosque mediterráneo), por lo que preferentemente abunda entre los 300 y 500 m s.n.m. en las vertientes húmedas a barlovento, y entre 500 y 1000 m s.n.m., en las vertientes secas a sotavento (Sosa et al., 2007; Fernádez-Palacios et al., 2008). Sin embargo, siempre que se reúnan condiciones de humedad edáfica, es posible encontrarla fuera de estos márgenes, adentrándose a través de los cauces de los barrancos en el dominio del matorral costero, junto con otras formaciones arbóreas termófilas (con muy marcada presencia en el dominio del acebuchal, Olea europea spp. cerasiformis), e incluso en las zonas más montañosas constituyendo ecotonos con el monteverde y con el pinar (Morici, 1998; Del Arco et al., 2006; Fernández-Palacios et al., 2008). En la actualidad, los palmerales naturales pueden ser encontrados en mayor o menor medida en todas las Islas Canarias, siendo especialmente abundantes en las islas de Gran Canaria y La Gomera (concentrando más del 85% de las palmeras naturales presentes en el archipiélago), y ausentes en la isla de El Hierro a excepción de algunos ejemplares distribuidos de forma dispersa (Morici, 1998, 2006; Del Arco et al., 2006; Sosa et al., 2007; Fernández-Palacios et al., 2008).

Las inflorescencias de la palmera canaria se caracterizan por ser espádices con ramificación paniculada y color blanquecino amarillento, recubiertas por una espata coriácea que permanece cerrada hasta el momento de la floración. Cuando la espata se abre deja al descubierto numerosas flores pequeñas, sésiles, trímeras e inconspicuas, que se agrupan densamente en las inflorescencias. Las flores femeninas son aún más inconspicuas que las masculinas, presentando éstas últimas una corola más desarrollada (pétalos entre 6-8 mm) y de color blanquecino (Barrow, 1998; Figura 1.6). Aunque el género *Phoenix* ha sido tradicionalmente descrito como anemófilo, éste síndrome de polinización ha sido cuestionado en numerosas ocasiones debido a los rasgos morfológicos de la inflorescencia masculina (Uhl y Moore, 1971, 1977; Henderson, 1986; Meekijjaroenroj y Anstett, 2003), similares a los de muchas especies de palmeras cantarófilas (i.e. polinizadas por escarabajos) (Barfod et al., 2011), y porque sus flores son frecuentemente visitadas por insectos. No obstante, en inspecciones recientes de la composición de los visitantes florales de P. canariensis, no se observaron insectos entrando en las flores femeninas, y por tanto, se considera que el viento es el principal vector de polinización de esta especie (Saro et al., 2015b). La antesis floral posiblemente ocurre de noche o al alba. Luego, el periodo floral receptivo de las hembras transcurre entre 2 y 3 días desde la apertura de la espata, y la liberación del polen se produce desde algunas horas hasta completarse en 3 o 4 días tras la apertura de las flores masculinas (Olangua-Corral et al., 2015). Es de resaltar que esta especie exhibe cierta asincronía floral entre individuos y poblaciones, siendo frecuente encontrar palmeras en flor a lo largo de todo el verano y entrado del otoño, pero nunca más del 50% de los individuos de la población en floración simultánea (Saro et al., 2015b). El corto periodo de receptividad floral, así como el patrón fenológico de esta especie, podrían determinar enormemente las combinaciones de apareamiento entre ambos sexos.



Figura 1.6 Inflorescencias y flor masculina (imágenes superior e inferior izquierda), inflorescencias y flor femenina (imágenes centrales superior e inferior) e infrutescencias y frutos (imágenes superior e inferior derecha) de la palmera canaria (*Phoenix canariensis* H. Wildpret).

Por otro lado, los frutos son bayas carnosas y monospermas con forma ovoide de aproximadamente 2 cm de largo, que tardan en fructificar entre 10 y 11 meses, pudiendo solaparse con el ciclo de floración del siguiente año, y alcanzando su óptimo estado de maduración (cuando adquiere un color anaranjado) en los meses de mayo a julio (Saro *et al.* 2015b; Olangua-Corral *et al.*, 2015). El sistema de dispersión de semillas de esta especie, así como los factores que pueden incidir en los procesos post-dispersivos, aún permanece insuficientemente estudiados. Mientras sus semillas han sido detectadas en los excrementos de lagartos (*Gallotia* sp.; Valido, 1999) y cuervos (*Corvus corax*, Nogales *et al.*, 1999), aún se desconoce cuáles son sus verdaderos dispersores efectivos. Además, una elevada cantidad de semillas caen por gravedad cerca de la planta madre, aunque la acción de los escolítidos que parasitan las semillas de las palmeras (*Coccotrypes dactyliperda* y *Dactylotrypes uyttenboogaarti*) es visualmente notable, especialmente cuando los frutos sobrepasan el estadio óptimo de maduración y adquieren una coloración castaño-rojizo.

Los primeros trabajos que abordaron la caracterización genética de poblaciones naturales de P. canariensis fueron reportados por Sosa et al. (1998). Sin embargo, sus resultados, basados en 12 loci isoenzimáticos, fueron establecidos en sólo dos poblaciones localizadas en Gran Canaria, por lo que el carácter preliminar de los mismos condicionó las conclusiones obtenidas. Posteriormente, a través del uso de 18 loci isoenzimáticos y un aumento muestral de las poblaciones de P. canariensis (González-Pérez, 2001; González-Pérez et al., 2004a), se observaron unos niveles de variación genética considerablemente elevados, propios de una especie arbórea y alógama aunque superiores a los esperados para una especie endémica, coincidiendo con el patrón obtenido para muchos taxones canarios mediante el uso de isoenzimas (Francisco-Ortega et al., 2000; Pérez de Paz y Caujapé-Castell, 2013). Además, se observó que el 75% de dicha variabilidad genética se encontraba dentro de las poblaciones, las cuales y a su vez, no se hallaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, mostrando en general, un exceso de heterocigosidad que podía ser el resultado de eventos estocásticos o consecuencia de una promoción por selección estabilizante. También, la diferenciación genética interpoblacional dentro y entre islas fue bastante débil, siendo interpretada como el reflejo de un importante flujo genético, probablemente consecuencia de un trasiego artificial de palmeras y semillas mediada por el hombre en las últimas décadas a lo largo del archipiélago (González-Pérez, 2001; González-Pérez et al., 2004a). Como excepción a este patrón, las poblaciones analizadas en La Gomera se diferenciaron notablemente del resto. Posiblemente, el fuerte aislamiento geográfico y socioeconómico de la isla de La Gomera hayan influido en la preservación y diferenciación genética de la especie. No obstante, en esta isla sólo se estudiaron 3 poblaciones, condicionando la extensión y extrapolación de los resultados al resto de las poblaciones colombinas.

Como otras especies pertenecientes al bosque termófilo canario, la distribución de P. canariensis ha sufrido una severa fragmentación tras la colonización y conquista por parte de la Corona de Castilla en el s. XV (Naranjo, 2002), y posiblemente también por el impacto ocasionado por la población aborigen en tiempos prehistóricos (Morales et al., 2009), debido a que las áreas fértiles que habita la palmera canaria fueron deforestadas y destinadas a los asentamientos humanos y explotaciones agrícolas. Por tanto, la distribución natural actual es un rastro de la distribución potencial pasada (Del Arco et al. 2006), pudiendo encontrar áreas continuas y densamente pobladas, distribuciones dispersas y/o delimitando bordes de cultivos, o incluso palmerales pequeños y aislados (Sosa et al., 2007). A parte de la fragmentación, P. canariensis está afectada por otros factores de perturbación como diversas plagas (las más dramáticas ocasionadas por los escarabajos curculiónidos Rhynchophorus ferrugineus y Diocalandra frumenti) e infecciones (especialmente la causada por el hongo Fusarium oxysporum). En concreto, la conservación genética de esta especie se ve especialmente amenazada por la hibridación con otras especies congéneres alóctonas (Kunkel y Kunkel, 1974; Morici, 1998; González-Pérez et al., 2004a,b), especialmente con Phoenix dactylifera, introducida masivamente en el archipiélago canario y con la que se ha demostrado que forma descendencia híbrida fértil mediante marcadores moleculares (González-Pérez et al., 2004a,b). La gran plasticidad ecológica y morfológica que presentan ambas especies, conlleva a que su identificación morfológica sea considerablemente subjetiva.

En definitiva, la relevancia de la palmera canaria y los palmerales en el ámbito del archipiélago canario es incuestionable, constituyendo uno de los elementos más representativos del paisaje, economía y cultura canaria. Ello ha contribuido considerablemente en su designación como Símbolo Vegetal del archipiélago por el Parlamento de Canarias (BOC, 1991), y en que los palmerales endémicos canarios estén catalogados como Hábitat Prioritario en la Red Natura 2000 de la Unión Europea (92/43/EEC). Asimismo, la palmera canaria está incluida como especie forestal (BOE, 2006), habiendo declaradas algunas poblaciones como fuentes semilleras (destinadas a la colecta de material de reproducción controlada). No obstante, la elección de estas poblaciones se ha realizado sin el conocimiento y la compresión exhaustiva de los patrones de estructura genética de esta especie, ni de los factores que la determinan. Además, aspectos del sistema de reproducción y el alcance y extensión de la dispersión polínica de esta especie, son cuestiones absolutamente inexploradas. Por tanto, inferir en los procesos y mecanismos microevolutivos de *P. canariensis*, puede ofrecer información valiosa para diseñar eficientes estrategias para la gestión y conservación *in situ* y *ex situ* de este endemismo.

CUADRO 1. GLOSARIO

- ¹Flujo genético: incorporación y transferencia al acervo genético de una población, de genes procedentes de otra u otras poblaciones.
- ²**Marcadores moleculares:** moléculas detectables mediante técnicas de laboratorio, que permiten detectar e identificar un proceso o un patrón biológico. En el campo de la genética de poblaciones pueden revelar niveles de variación genética a diversas escalas (dentro y entre individuos, poblaciones y especies).
- ³*Marcador codominante:* un marcador molecular que detecta los alelos presentes en un locus particular. Por tanto, puede distinguir entre genotipos homocigóticos frente a heterocigotos para el locus analizado, lo cual es un prerrequisito para una correcta estimación de las frecuencias alélicas en los estudios de genética de poblaciones.
- ⁴**Procesos microevolutivos:** son aquellos procesos y mecanismos que producen pequeños cambios en las frecuencias alélicas en una población. También pueden ser considerados aquellos cambios evolutivos producidos en las poblaciones naturales de una especie.
- ⁵**Probabilidad de exclusión:** probabilidad de excluir, mediante la comparación de los perfiles genéticos, a un individuo candidato como progenitor.
- ⁶Autogamia/Alogamia: sistema de reproducción que se refiere a la fecundación exitosa con gametos masculinos y femeninos provenientes del mismo individuo (autogamia) o de individuos diferentes (alogamia).
- ⁷**Tamaño poblacional efectivo:** número promedio de individuos que participan en la reproducción sexual, y por tanto, cuyos genes pasan a la siguiente generación.
- ⁸Depresión endogámica: pérdida de la eficacia biológica de los organismos por la expresión de alelos deletéreos en estado de homocigosis, como consecuencia del sucesivo cruzamiento entre individuos genéticamente emparentados.
- ⁹Tiempo de coalescencia: tiempo necesario para la diferenciación entre la secuencia original de ADN y las secuencias que se observan en un momento dado en la población. A través de los tiempos de coalescencia se puede deducir el tipo de efecto que los procesos como mutación, migración o recombinación, han tenido sobre la secuencia original.
- 1º Efecto fundador: pérdida de variación genética que se produce cuando una nueva población se forma a partir de un número pequeño de individuos que portan sólo una fracción de la variación genética presente en la población de origen.
- ¹¹ **Cuello de botella:** reducción severa y temporal en el tamaño poblacional efectivo de una población, que provoca la variación aleatoria de las frecuencias alélicas.
- ¹² Radiación adaptativa: Patrón de divergencia de miembros de una misma línea filogenética en una variedad de formas como consecuencia a cambios adaptativos al ambiente.



2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue investigar, mediante el uso de marcadores moleculares nucleares e hipervariables (microsatélites), la variabilidad, estructura y diferenciación genética de las poblaciones naturales de la palmera canaria (*Phoenix canariensis* H. Wildpret) en el archipiélago canario, incluyendo el análisis de su dispersión polínica y sistema reproductor, así como el flujo genético desde diferentes perspectivas espaciales y geográficas (regional, insular y local), con el propósito de contribuir, directa o indirectamente, en el desarrollo de estrategias para la gestión y conservación de esta especie endémica de las Islas Canarias.

Este objetivo general, se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- · Estimar los principales parámetros del sistema reproductor y dispersión efectiva de polen en *Phoenix canariensis*, y evaluar las relaciones fenotípicas y ecológicas con los parámetros reproductivos individuales.
- Caracterizar y detectar los niveles de variación genética de las poblaciones naturales de *Phoenix canariensis* a lo largo del archipiélago canario, evaluando el impacto de las barreras oceánicas en la estructura genética de la especie, e inferir los modelos de diferenciación más plausibles para explicar los patrones observados.
- Analizar la estructura genética insular, centrando el estudio en las islas con mayor abundancia de palmerales de *Phoenix canariensis* (Tenerife, La Gomera y Gran Canaria), y evaluar el efecto de la localización del hábitat en los patrones genéticos observados en las poblaciones.
- Estudiar la estructura genética espacial a escala fina en las poblaciones naturales de Phoenix canariensis, evaluando el efecto que ocasiona la ocupación del hábitat en la distribución espacial de los genotipos.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ÁREAS DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de los diferentes experimentos incluidos en esta tesis, se seleccionaron 29 poblaciones naturales (palmerales) localizadas a lo largo del rango de distribución natural de *Phoenix canariensis* H. Wildpret en el archipiélago canario según Del Arco *et al.* (2006). La cantidad y distribución de los palmerales muestreados en cada isla fue acorde a la abundancia de esta especie y sus poblaciones en cada una de ellas (Figura 3.1; Tabla 3.1). La isla de El Hierro no fue considerada en este estudio debido a la práctica inexistencia de poblaciones de *P. canariensis* en esta isla. De cada población, se colectaron muestras foliares procedentes de 20 a 40 ejemplares a la vez que eran georreferenciados individualmente, excepto en la población CAC (Acusa Verde; Tabla 3.1) donde se muestrearon todos los individuos presentes en la población, y para la cual, se fueron utilizando diferentes submuestras según el diseño experimental. Dado que distribución espacial de los individuos dentro de los palmerales puede ser de forma agregada o dispersa (Sosa *et al.*, 2007), los ejemplares fueron aleatoriamente muestreados acorde a la configuración de cada población. Como resultado, las distancias medias de separación entre individuos variaron aproximadamente entre 80m (distribución agregada) y 390m (distribución dispersa).

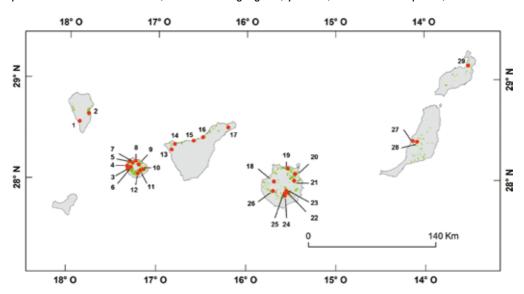


Figura 3.1 Localización de las 29 poblaciones de palmera canaria (*Phoenix canariensis*) consideradas en los diferentes diseños experimentales del presente trabajo. Las áreas verdes representan el rango de distribución actual de esta especie (obtenido a partir de datos ofrecidos por M. Márquez y A. Naranjo). Ver correspondencia entre los índices y códigos de las poblaciones en Tabla 3.1.

Isla	Población	Código	Coordenadas geográficas	Altitud (m)	Ехро.	N
La Palma	Jedey - El Paso	1 _{PEP}	28°34'32"N 17°52'33"O	569	0	22
	Cuatro Caminos - Breña Alta	² PBA	28°39'12"N 17°46'24"O	225	E	22
La Gomera	Valle Gran Rey	3GVR	28°06'28"N 17°19'18"O	188	so	40
	Taguluche	⁴GTG	28°08'32"N 17°20'31"O	179	NO	40
	Tazo	⁵ GTZ	28°11'14"N 17°18'56"O	367	NO	40
	Las Hayas	⁶ GLH	28°07'44"N 17°17'46"O	995	S	30
	Los Bellos - Macayo	⁷ GMA	28°10'15"N 17°16'25"O	284	0	40
	Tamargada - Simancas	8GSI	28°11'22"N 17°14'24"O	357	0	40
	El Estanquillo - Hermigua	9GHE	28°09'10"N 17°12'21"O	424	E	38
	Cañada La Becerra - El Langrero	¹⁰ GEL	28°06'30"N 17°09'02"O	170	NE	40
	Jerduñe	¹¹ GJE	28°05'44"N 17°11'18"O	788	E	40
	Pastrana	¹² GPA	28°03'51"N 17°12'58"O	202	so	34
Tenerife	Masca	¹³ TMA	28°18'11"N 16°50'20"O	557	so	40
	Interián - Los Silos	¹⁴ TLS	28°21'47"N 16°48'11"O	264	0	40
	Rambla de Castro	15TCA	28°23'50"N 16°35'42"O	80	E	40
	Bco. de La Cruz - Santa Úrsula	¹⁶ TSU	28°26'09"N 16°29'14"O	222	N	40
	El Cercado - San Andrés	¹⁷ TEC	28°31'51"N 16°12'27"O	166	0	40
Gran Canaria	Hoya de La Palma - Acusa Verde	¹⁸ CAC	27°59'52"N 15°41'32"O	554	0	182
	La Hacienda - Arucas	¹⁹ CAR	28°07'46"N 15°32'03"O	135	N	40
	Salvago - Tafira	²⁰ CTF	28°04'28"N 15°27'17"O	285	E	40
	San Roque - Telde	²¹ CTE	28°00'30"N 15°28'07"O	294	E	40
	Presa de Sorrueda	²² CSO	27°53'11"N 15°32'08"O	455	S	40
	Casas Blancas - Santa Lucía	²³ CST	27°54'15"N 15°33'06"O	514	SE	40
	Baranda de Arteara	²⁴ CAT	27°50'46"N 15°34'04"O	359	s	33
	Bco. de Fataga	²⁵ CFA	27°52'52"N 15°34'04"O	525	NO	40
	Cañada de La Cuesta - Mogán	²⁶ CMO	27°54'20"N 15°41'49"O	449	s	40
Fuerteventura	Madre del Agua	²⁷ FMA	28°24'04"N 14°08'01"O	50	N	22
	Betancuria	²⁸ FBT	28°23'32"N 14°05'25"O	224	N	22
Lanzarote	Valle del Rincón - Haría	²⁹ LHA	29°08′35″N 13°30′13″O	296	E	22

NOTA: los índices superiores en los códigos hacen referencia a la localización de las poblaciones en la Figura 3.1

Tabla 3.1 Características geográficas de las 29 poblaciones de palmera canaria (*Phoenix canariensis*) consideradas en los diferentes diseños experimentales del presente trabajo, así como el número de muestras colectadas en cada una de ellas (*N*). NOTA: Expo., exposición.

3.1.1 Sistema de reproducción y función de dispersión polínica

La población natural elegida para desarrollar los estudios del sistema reproductor y flujo polínico de *P. canariensis* fue CAC (Acusa Verde; Figura 3.1 y Tabla 3.1), localizada en el noroeste de la isla de Gran Canaria en el municipio de Artenara. La elección de esta población se justifica por su pequeño tamaño (aproximadamente 10 hectáreas), que permitió realizar un muestreo individual exhaustivo con el que abordar los análisis de paternidad, y por su grado de aislamiento geográfico con respecto a otras poblaciones (aunque la población más cercana está tan sólo a 600 m de lejanía, se encuentran separadas en diferentes barrancos). La vegetación circundante consiste principalmente en matorral de transición y pastizales, que no suponen resistencia alguna al movimiento del polen de las palmeras a través del viento. Los individuos de la población se distribuyen de forma agregada,

a excepción del límite norte del área estudiada que se encuentra fragmentada por cultivos (Figura 3.2). Este palmeral es uno de las cuatro poblaciones incluidas en el Catálogo Nacional de materiales de base para la reproducción de los materiales forestales de reproducción identificados, o comúnmente denominadas 'fuente semillera' (BOE, 2006).

Se muestrearon y georreferenciaron todos los individuos presentes en la población (*N*=182; Tabla 3.1) para determinar sus genotipos mediante los análisis moleculares. Con el fin de establecer el estatus reproductor de cada ejemplar, se revisaron las copas de cada palmera en busca de alguna evidencia de inflorescencia emergentes o pasadas (el raquis y las raquillas de la inflorescencia marchita pueden permanecen en la palmera incluso años). De los 182 individuos muestreados, se registraron: 56 hembras, 47 machos y 79 individuos no reproductores (referidos en lo sucesivo como 'juveniles') (Figura 3.2). Entre los juveniles (independientemente de su altura y edad) fueron incluidos todos aquellos ejemplares sin rastros de inflorescencias presentes o pasadas, por lo que se asume que no han participado en el ciclo reproductor contemplado en el presente estudio.

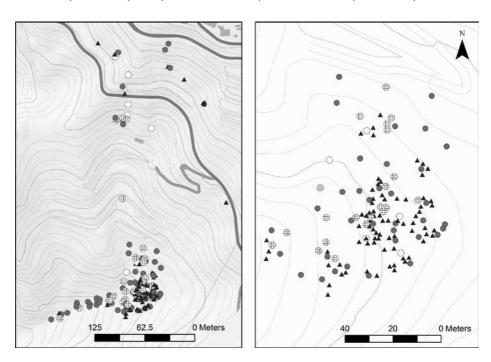


Figura 3.2 Distribución espacial de las palmeras presentes en la población de Acusa Verde (CAC): hembras muestreadas como 'madres' (círculos cruzados), hembras no muestreadas como 'madres' (círculos blancos), machos (círculos grises) y 'juveniles' (triángulos negros). El mapa de la izquierda es el área total estudiada (las líneas grises discontinuas representan los bordes de los cultivos), y el mapa de la derecha contiene una ampliación del núcleo más denso de la población, localizado al suroeste de la misma.

Además, 50 semillas fueron aleatoriamente muestreadas de frutos en avanzado estadio de maduración, directamente colectados desde las infrutescencias de 28 palmeras hembras (referidas en lo sucesivo como 'madres'). Las progenies de cada una de estas familias maternas fueron

almacenadas en bolsas independientes junto a la muestra foliar de la madre de la cual procedían. De esta manera, la contribución genética materna a cada embrión puede obtenerse a través de la muestra foliar la madre, y solo hay que deducir la contribución paterna mediante los análisis de paternidad. La parte carnosa de los frutos fue extraída para acelerar la germinación de las semillas, las cuales fueron sembradas en el Vivero Forestal del Cabildo de Gran Canaria y mantenidas hasta que la plántula tuviera un mes de crecimiento (Figura 3.3), para obtener una muestra suficiente de tejido vegetal procedente del embrión con el fin de aumentar la eficacia de los análisis moleculares. De las 50 semillas germinaron exitosamente entre un 60-90% entre las diferentes madres, para las cuales se estandarizó una muestra de 22 semillas procedentes de cada una de ellas. Las 616 plántulas colectadas se usaron en los posteriores análisis moleculares, aunque éstas seguirán siendo referidas en lo sucesivo como 'semillas'.



Figura 3.3 Procedimiento (ver de izquierda a derecha) de la colecta, almacenaje y siembra de las progenies de cada una de las 28 'madres' muestreadas, manteniendo controlado el origen materno de las mismas durante todo el proceso.

3.1.2 Diversidad y estructura genética a escala regional (i.e. archipiélago)

Las Islas Canarias comprenden 7 islas volcánicas de diferentes edades geológicas (Figura 3.4; Carracedo *et al.*, 2008), a lo largo de las cuales se seleccionaron 15 palmerales de *P. canariensis* y 22 ejemplares en cada uno de ellos como submuestra del total de poblaciones e individuos indicados en la Figura 3.1 y Tabla 3.1, tratando de cubrir la distribución y representatividad de esta especie a lo largo del archipiélago (Figura 3.4). Además, a esta escala de análisis también se incluyeron 22 individuos de *Phoenix dactylifera* L. procedentes de diferentes cultivos de Marruecos, que fueron utilizados como grupo externo.

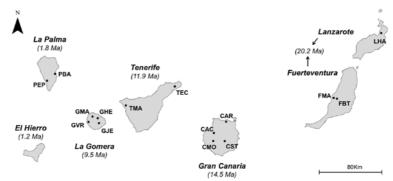


Figura 3.4 Localización de las 15 poblaciones de palmera canaria (*Phoenix canariensis*) consideradas para el análisis de la diversidad y estructura genética a escala regional (*i.e.* archipiélago). Las edades geológicas de las islas están en paréntesis (*Ma*, millones de años). Ver correspondencia de los códigos de las poblaciones en Tabla 3.1.

3.1.3 Diversidad y estructura genética a escala insular y local

Los análisis a escala insular se llevaron a cabo en las tres islas centrales del archipiélago (Gran Canaria, Tenerife y La Gomera), por ser las más pobladas por *P. canariensis*. Se seleccionaron todas las poblaciones y muestras colectadas en estas islas (ver Tabla 3.1): 9 poblaciones y 353 individuos en Gran canaria (para CAC se escogió una submuestra aleatoria con 40 individuos), 5 poblaciones y 200 individuos en Tenerife, y 10 poblaciones y 382 individuos en La Gomera (Figura 3.5).

Los análisis de estructura genética espacial a escala fina se llevaron a cabo en todas las poblaciones indicadas en la Figura 3.5, excepto en CTF, CAT, CSO y CFA, porque no se disponía de las coordenadas geográficas individuales de los ejemplares muestreados en estas poblaciones. En este caso, para cada análisis se empleó el número total de muestras adquiridas en cada población (ver Tabla 3.1).

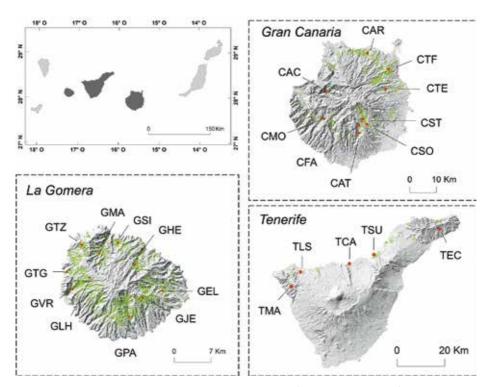


Figura 3.5 Localización de las poblaciones de palmera canaria (*Phoenix canariensis*) consideradas en las islas centrales para el análisis de la diversidad y estructura genética a escala insular, y estructura genética espacial a escala fina. Las áreas verdes representan el rango de distribución actual de esta especie (obtenido a partir de datos ofrecidos por M. Márquez y A. Naranjo). Ver correspondencia de los códigos de las poblaciones en Tabla 3.1.

Por otro lado, también se contó con una base de datos georreferenciados (formato SHP de ArcGIS) de los especímenes naturales de *P. canariensis* a lo largo del paisaje en las distintas islas del archipiélago (datos generados por M. Márquez y A. Naranjo), cuya distribución fue registrada

sobre ortofotos con una resolución de 0,5cm/píxel y un error planimétrico medio cuadrático inferior a 1.5m. La extensión espacial resultante de *P. canariensis* fue representada mediante clases de polígonos (Figura 3.5), mediante técnicas de SIG implementadas en la plataforma ArcGIS v10.2 (ESRI, USA).

3.2 ANÁLISIS CON MARCADORES MOLECULARES

El ADN de todas las muestras destinadas al estudio del flujo genético vía polen (foliolos procedentes de ejemplares adultos y plántulas obtenidas de la siembra de las semillas), fue extraído siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983) y modificado para P. dactylifera por Corniquel y Mercier (1994). Al final del procedimiento obtenemos una solución madre o 'stock', con cantidades de ADN comprendidas entre 20 y 100 ngr/µl. Para la correcta amplificación con la 'reacción en cadena de la polimerasa' (PCR, polymerasa chain reaction, en inglés), el ADN "stock" es purificado eliminando restos de proteínas y polisacáridos mediante el 'GenElute Plant Genomic DNA Kit' de SIGMA, que sigue un procedimiento de ligado-lavado-elución mediante centrifugación en microcolumnas. En el caso de las muestras colectadas para los estudios de asociación y estructura genética regional, insular y local, la extracción y purificación de ADN se realizó simultáneamente mediante el KIT comercial 'Invisorb® DNA Plant HTS 96 kit'.

Para el genotipado de las muestras se probaron 15 loci SSR nucleares y dinucleótidos (GA) desarrollados para *P. dactylifera* por Billotte *et al.* (2004), y para los que se demostró que podían ser transferidos a otras especies del género *Phoenix* (nSSRs: *mPdCIR010, mPdCIR015, mPdCIR016, mPdCIR025, mPdCIR035, mPdCIR044, mPdCIR048, mPdCIR050, mPdCIR057, mPdCIR063, mPdCIR070, mPdCIR078, mPdCIR085, mPdCIR090 y mPdCIR093). Algunos de los riesgos de trabajar con microsatélites son los errores de lectura de los picos o los alelos nulos, que pueden ocasionar errores en la discriminación entre homocigotos y heterocigotos, y por tanto, pueden sesgar las conclusiones biológicas que se obtengan de los datos. Entre los errores de lectura más usuales está el ocasionado por la amplificación preferencial de los alelos de pequeño tamaño frente a los de mayor tamaño en un mismo locus, resultando en un patrón denominado 'tartamudeo de picos' (<i>Stuttering*, en inglés; DeWoody *et al.*, 2006). Mediante el programa MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004), se evaluó la frecuencia de alelos nulos, según el método de Brookfield (1996), y se detectaron posibles errores de lectura en cada uno de los loci trasferidos desde *P. dactylifera*.

La amplificación del ADN se llevó a cabo en reacciones de PCR multiplex (amplificación simultánea de los loci de interés) mediante el kit comercial 'QIAGEN® Multiplex PCR Kit', ajustando las proporciones de los reactivos indicadas en el protocolo del fabricante a un volumen final de 15 µl. Los productos de las reacciones se corrieron en un secuenciador capilar ABI3730 y los tamaños de los fragmentos amplificados fueron contados mediante el uso de GENEMAPPER v4.0 (Applied Biosystem, CA, USA). Del total, un 5% de las muestras fueron sometidos a un segundo análisis para confirmar irregularidades observadas durante la lectura de los picos, y así evitar errores de

genotipado. Concretamente para el caso de las 'semillas' analizadas, mediante el uso de CERVUS v3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007) se comprobó la correspondencia de la contribución materna con los genotipos de sus progenies, repitiendo el análisis en aquellos casos incompatibles hasta obtener una tasa de error igual a cero.

3.3 ANÁLISIS DE DATOS

3.3.1 Sistema de reproducción y función de dispersión polínica

Sistema reproductor

La caracterización del sistema reproductor de P: canariensis se efectuó mediante el método multilocus de máxima verosimilitud aplicado en MLTR v3.2 (Ritland, 2002). Considerando el escenario detallado en Material and Methods del Anexo I, se estimaron únicamente las tasas de paternidad correlacionada (r_p) a nivel poblacional y familiar (cada madre y su respectiva progenie), ya que la especie es dioica (no existe posibilidad de que se reproduzca por autogamia), y en análisis preliminares no se detectaron evidencias de endogamia biparental, para la cual se obtuvo una probabilidad mínima de t_m - t_s =-0,022 (desviación estándar=0,021; donde t_m es la tasa de cruzamiento multi-locus y t_s es la tasa de cruzamiento uni-locus). El número efectivo de padres que participó en la descendencia de cada madre (N_{ep}) fue calculado siguiendo la relación N_{ep} =1/ r_p .

Asignación de parentesco

Con objeto de inferir en la distribución de las distancias de dispersión efectiva, definidas como la distancia de separación entre los progenitores de cada uno de los embriones analizados ('semillas'), se aplicó el método de asignación fraccional implementado en el programa PATRI (Nielsen et al., 2001; Signorovitch y Nielsen, 2002) para estimar la paternidad de toda la progenie colectada en las 28 madres (n= 606 semillas sin datos perdidos, según lo requerido por el programa). Se eligió el método de asignación fraccional (frente al de asignación categórica) de paternidad porque no requiere información previa del tamaño poblacional de adultos masculinos que están participando en el ciclo de reproducción analizado. También, porque el principal objetivo no era trazar las relaciones de parentesco en sí mismas, sino inferir en la distribución de las distancias de apareamiento, para las cuales se puede considerar la muestra entera de semillas sin incurrir en las altas tasas de semillas no asignadas típicas del análisis categórico de paternidad (Oddou-Muratorio et al., 2003). Por tanto, mediante el uso de PATRI se estimaron:

 El tamaño poblacional de adultos masculinos o 'padres' (M) que ha participado en la descendencia estudiada, estimada a partir de una distribución uniforme.

- Las probabilidades posteriores (por máxima verosimilitud) de paternidad de cada candidato masculino, es decir, todas las probabilidades posteriores de que un macho muestreado en la población haya fertilizado cada una de las semillas examinadas.
- La proporción de semillas muestreadas que se espera que hayan sido fertilizadas por cada candidato masculino incluido en el análisis.

Una vez obtenida la muestra de los cruzamientos potenciales producidos dentro de la población, las distancias de *polinización efectiva* (d_{el}) fueron calculadas para cada una de las semillas como una media ponderada de las distancias entre la madre correspondiente y cada uno de los potenciales padres (candidatos masculinos), y usando como ponderación las probabilidades posteriores de paternidad.

Con el fin de determinar si la distribución de las distancias de apareamiento observadas se desvían significativamente de la hipótesis nula basada en una reproducción aleatoria entre individuos, se aplicó un test no paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov* mediante el uso de R (R Development Core Team, 2008). Para ello, se construyó un histograma con las distribuciones de las frecuencias de distancias potenciales (todas las distancias de separación físicas entre los pares de machos y 'madres') y distancias efectivas, y ambas distribuciones se compararon mediante el test K-S.

Correlaciones demográficas de los parámetros locales del sistema reproductivo

Se evaluó el posible efecto de la localización relativa de las madres dentro de la masa poblacional en la composición del polen que fertilizó a sus progenies. Para ello se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman (usando el paquete estadístico SPSSv.19) entre parámetros del sistema reproductivo y otros demográficos (en relación a la densidad) estimados para cada madre. Los parámetros del sistema reproductivo considerados fueron la tasa de paternidad correlacionada en las progenies maternas individuales (r_p familiar estimado con MLTR) y las distancias medias de dispersión polínica efectiva ($d_{\rm ef}$) en cada familia (estimadas a partir de la asignación de paternidad obtenida con PATRI). Los parámetros demográficos calculados en relación a cada madre fueron: la distancia media ($d_{\rm media}$) con todos los machos presentes en la población, la distancia con el macho más cercano ($d_{\rm min}$), y el número de machos incluidos a una distancia x o inferior ($N_{\rm mx}$), considerando diferentes radios (x) de 5, 15, 20, 30, 40 y 50m en torno a cada madre y estimados mediante ArcGIS v10.2.

Modelo espacialmente explícito de la reproducción

El *kernel* de dispersión polínica de la población se ajustó mediante un modelo espacialmente explícito de la reproducción, o 'modelo de vecindario' (*Neighbourhood model*, en inglés; introducido por Adams y Birkes [1991] y mejorado por Burczyk *et al.* [2002] y Oddou-Muratorio *et al.*

[2005], entre otros), aplicado en el programa NM+ v1.1 (Chybicki y Burczyk, 2010), el cual se basa en los genotipos de los adultos reproductores y las semillas, así como en la ubicación geográfica de los mismos. Los patrones de dispersión analizados con este procedimiento no derivan de las asignaciones de paternidad individuales, sino que se caracterizan por la estimación de parámetros del 'modelo de vecindario' (usando métodos de máxima verosimilitud basados en las probabilidades de transición mendelianas), el cual fue diseñado para describir los patrones de paternidad en la descendencia distribuida espacialmente en el área del estudio. Como el análisis está enfocado en semillas colectadas en las madres (*i.e.* previa a la dispersión de semillas), sólo se calcularon las variables relacionadas con la migración y dispersión de polen.

Los parámetros estimados a partir del kernel de dispersión fueron:

- · La distancia media de dispersión (d_p) .
- · La escala (a) y forma (b) del kernel de dispersión.
- · La dirección prevalente de la dispersión efectiva, siguiendo un método basado en la distribución de von Misses (análoga circular de la distribución normal), y la cual se contextualiza en los parámetros $\theta_{\rm p}$, que son los ángulos desde el verdadero norte hacia donde prevalece la polinización efectiva, y $K_{\rm p}$ que mide la intensidad de la misma.

El efecto de las covariables en el éxito reproductivo entre los machos locales es incorporado al modelo siguiendo la siguiente función: $\varphi i \propto e^{(\beta \chi i)}$, donde φi es el éxito reproductivo de los i machos contemplados en el estudio, β es el gradiente de selección que será estimado conjuntamente con el resto de parámetros del modelo, y χi es la covariable (fenotípica o demográfica) contemplada en los i individuos masculinos de la población. Las variables consideradas por su potencial efecto en el éxito reproductivo de los machos, al dificultar o beneficiar el movimiento del polen hasta una mayor cantidad de hembras, fueron la altura de los machos (h) y la densidad

local alrededor de los mismos. La densidad local fue medida como el número de palmeras localizadas alrededor de cada macho ($N_{\rm px}$), en base a radios (x) de 5, 15 y 30m creados con herramientas de geoprocesamiento del ArcGIS v10.2.

El modelo que mejor se ajustó a los datos genéticos se seleccionó usando el 'criterio de información de Akaike' (*Akaike information criterion*, en inglés; AIC = 2K - 2Ln [L], donde K es el número de parámetros contemplados en el modelo estadístico y L es el valor estimado de máxima verosimilitud).

Variabilidad genética dentro de la población y la descendencia analizada

Con el fin de estimar los niveles de diversidad genética en la población estudiada (CAC), así como la variación genética capturada en la descendencia tras la reproducción, se comprobó si las frecuencias alélicas se ajustaban al equilibrio de Hardy-Weinberg y se estimaron algunos de los parámetros estándar de diversidad genética mediante el uso de GenAlEx v6.5 (Peakall y Smouse, 2006): número efectivo de alelos por locus (N_e), heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) y el coeficiente de endogamia (F_{IS}). La riqueza alélica fue estimada usando el método de rarefacción aplicado en HP-RARE 1.0 (Kalinowsli, 2005), para dar cuenta a los tamaños muestrales desiguales contemplados para adultos y semillas.

3.3.2 Diversidad y estructura genética a escala regional (i.e. archipiélago)

Diversidad genética y estructura de las poblaciones

Para cada una de las 15 poblaciones analizadas a esta escala geográfica se calcularon los estadísticos estándares de la diversidad genética mediante el uso de GenAlEx v6.5: número de alelos diferentes (N_a), número efectivo de alelos por locus (N_e), número de alelos privados (N_{ap}), heterocigosidad esperada (H_e ; Nei, 1978) y observada (H_o). Se estimó el coeficiente de endogamia (F_{IS} ; Weir y Cockerham, 1984) a lo largo de los loci, así como la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de las poblaciones mediante el software GENEPOP v4.2 (Raymond y Rousset 1995), usando el test de probabilidad (Test exacto de Fisher). Además, FSTAT v2.9.3 (Goudet, 1995) fue usado para estimar los valores medios por isla de los índices de diversidad genética, riqueza alélica (A) y heterocigosidad genética balanceada (H_s), así como de la diferenciación genética (F_{ST} ; Weir y Cockerham, 1984) y compararlos entre las diferentes islas, calculando el valor de significancia en base a 10.000 permutaciones. También se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman (usando SPSSv.19) entre H_e y tanto la edad geológica de las islas (ver Figura 3.4) como la distancias de las mismas con respecto al continente.

Por otro lado, las relaciones genealógicas entre las poblaciones fueron inferidas a partir de matrices de distancias genéticas, aplicando dos métodos: (i) un análisis multivariante de

coordenadas principales (PCoA) basado en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, usando GenAlEx v6.5, y (ii) un dendrograma o árbol Neighbour-Joining (NJ) construido con PHYLIP v3.6 (Felsenstein, 2005) a partir de 100 matrices basadas en la distancia de Nei (1978), generadas con el programa MSAT (Dieringer y Schlötterer, 2003) y usadas para dar valores de soporte estadístico a los nodos del árbol NJ. Además, mediante las comparaciones de los valores pareados de R_{ST} y F_{ST} según el método desarrollado por Hardy $et\ al.$ (2003), basado en permutaciones alélicas e implementado en SPAGeDI v1.3 (Hardy y Vekemans, 2002), se evaluó si existe una señal filogeográfica entre las poblaciones de P. Canariensis. Este procedimiento analiza la distribución de los valores de R_{ST} bajo la hipótesis nula de que no existe un patrón filogeográfico y los tamaños alélicos no contribuyen a la diferenciación genética de las poblaciones (Hardy y Vekemans, 2002).

También, se comprobó la existencia de una posible estructura poblacional a nivel regional mediante el método de agrupación bayesiana implementado en el programa STRUCTURE v2.2 (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa asigna los individuos de una muestra a una población genética de manera probabilística, mediante iteraciones de cadenas de Markov y métodos Monte Carlo (MCMC, *Markov Chain Monte Carlo*, en inglés), sin ser necesaria a *priori* la información de la localización geográfica de dichos individuos. Para las simulaciones se asumió un modelo de mezcla genética y frecuencias alélicas independientes entre las poblaciones, explorando que las muestras pertenecieran a diferentes números de unidades genéticas o grupos (K), desde K=1 (probando la hipótesis nula de una panmixia) hasta K=15 (el total de poblaciones físicas muestreadas), las cuales fueron simuladas 10 veces cada una usando 10⁵ períodos de prueba y una longitud de carrera de 10⁶ réplicas. Los individuos fueron asignados a un grupo o unidad genética si su proporción de pertenencia (q_i) a ese grupo era igual o mayor que el umbral de 0,05. El número óptimo de unidades genéticas presentes en la muestra (K) se determinó siguiendo el método descrito en Evanno *et al.* (2005) y aplicado en el servicio web STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt, 2012).

Patrones espaciales de la estructura genética

Con el fin de explorar los patrones espaciales de la estructuración genética de las poblaciones se aplicaron tres métodos diferentes. El primero consistió en un análisis espacial de la varianza molecular (SAMOVA) aplicado en SAMOVA v2.0 (Dupanloup *et al.*, 2002), que permite evaluar la partición de la variación genética sin definir a *priori* la agrupación de las poblaciones en base a características físicas o ecológicas del sistema. El procedimiento consiste en definir los grupos de poblaciones o unidades genéticas (*K*) geográficamente homogéneas y máximamente diferenciadas (*i.e.* aquella combinación para la cual la proporción de variación genética total debida a las diferencias entre grupos es máxima). Las localidades muestreadas son conectadas mediante un algoritmo de máxima diferenciación (algoritmo de *Monmonier*) usando una red de triangulación *Delaunay* para representar gráficamente las poblaciones sobre un mapa, calculando las

distancias pareadas de $F_{s\tau}$ entre las poblaciones conectadas por los bordes de dicha red. Finalmente, la combinación con valores máximos de $F_{c\tau}$ y valores mínimos de F_{sc} (i.e. diferenciación genética entre subpoblaciones dentro grupos), tras 100 simulaciones de procesos anillados fue seleccionada como la subdivisión geográfica más probable de las muestras, para la cual se obtienen los valores de significancia tras 1023 permutaciones.

Por otro lado se aplicó una técnica de superposición para evaluar el efecto de las barreras oceánicas y geográficas en la distribución de la variabilidad genética, según viene implementado en BARRIER v2.2 (Manni *et al.*, 2004). En este caso también se modela la organización espacial de las poblaciones mediante la triangulación *Delaunay*, y a través del algoritmo de *Monmonier*, son identificados los bordes entre poblaciones vecinas que exhiben los mayores niveles de diferenciación genética. Para fortalecer la consistencia de las barreras detectadas, se utilizó un método de remuestreo siguiendo la técnica de *bootstrap*, en el cual se repitió el análisis para 100 matrices de distancias genéticas pareadas (basadas en la distancia de Nei). Se tuvieron en cuenta sólo las barreras con mayor fortaleza estadística (aquellas con un boostrap >75 matrices), aunque también se prestó atención a aquellas barreras con un soporte moderado (50 < X< 75 matrices).

Finalmente, se aplicó un test de Mantel usando el servicio web IBDWS (Jensen *et al.*, 2005), para evaluar si el patrón de diferenciación genética de las poblaciones a lo largo del archipiélago se ajusta a un patrón de aislamiento por distancia (IBD). Dicho test se basa en la correlación entre la distancia genética (usando los valores del F_{ST} linearizado, expresado como $F_{ST}L = F_{ST}/(1 - F_{ST})$) y la distancia geográfica entre pares de poblaciones, obteniendo el valor de significancia tras 10.000 permutaciones.

Historia demográfica de P. canariensis a lo largo del archipiélago

El análisis demográfico de las poblaciones se realizó mediante el método de computación bayesiana aproximada (ABC, *approximate Bayesian computation*, en inglés), según viene aplicado en el programa DIYABC v1.0 (Cornuet *et al.*, 2008, 2010). El programa utiliza herramientas de coalescencia para
generar la distribución de miles de datos simulados desde un conjunto de escenarios demográficos
definidos por el usuario, para los cuales se construye una 'tabla de referencia' en base a diferentes
estadísticos de diversidad genética. Luego, el método ABC utiliza un criterio de similitud sobre los estadísticos estimados, midiendo las distancias entre el conjunto de datos simulados y observados para
inferir en la distribución posterior de los parámetros demográficos y mutacionales, y generando una
aproximación de la probabilidad posterior mediante iteraciones de MCMC. Con el fin de simplificar los
escenarios testados y a la luz de los patrones generales observados en la asociación de las poblaciones (ver sección de 'resultados'), se representó la muestra colectada en cada isla como poblaciones
únicas y se excluyó del análisis la isla de Lanzarote. Se propusieron 4 escenarios igualmente probables para testar el patrón con mayor soporte estadístico en la divergencia de *P. canariensis* a lo largo
del archipiélago (ver representación gráfica de los escenarios en Figura 2 del **Anexo II**).

- · Escenario 1: Todas las poblaciones divergen en un único evento común.
- · Escenario 2: Ancestralmente, las islas orientales divergen de las occidentales, las cuales posteriormente se diferencian en las distintas poblaciones actuales.
- · Escenario 3: Divergencia secuencial de Fuerteventura y Gran Canaria en el transcurso de distintas generaciones, y posteriormente, las islas occidentales divergen en un evento común.
- Escenario 4: Divergencia secuencial de cada población en diferentes y consecutivos tiempos generacionales desde el pasado hasta el presente y siguiendo una 'regla de progresión' desde el este al oeste.

A su vez, los 4 escenarios ignoran los eventos de migración entre las poblaciones y asumen tamaños poblacionales efectivos (N) potencialmente diferentes entre las poblaciones muestreadas (islas), las cuales han experimentado una reducción del mismo con respecto a las poblaciones ancestrales (NA) como resultado del proceso de divergencia. Por un lado, los parámetros demográficos estimados a partir del escenario más probable fueron los tamaños poblacionales efectivos (N y NA) y los tiempos generacionales entre cada evento de divergencia (t), y por otro lado, los parámetros mutacionales en relación con los microsatélites fueron la tasa media de mutación (μ) y el coeficiente medio de la distribución geométrica (P) del modelo de mutación escalonada generalizado (GMS, generalized stepwise mutation model, en inglés; Estoup et al., 2002). Ver los valores y límites de partida de los parámetros del modelo, número de simulaciones, y estadísticos utilizados como criterio de similitud entre datos simulados y observados en el apartado de M aterial and M ethods del M anexo M La bondad del ajuste de los cuatro escenarios se evaluó mediante un análisis de componentes principales (M principal component analysis, en inglés) en el espacio de los estadísticos de referencia (M Cornuet et al., 2010).

Un parámetro de interés para interpretar los resultados de los análisis demográficos es la tasa generacional de la especie. No obstante, en el caso de las especies de palmeras es difícil proporcionar una estimación precisa de la edad de los ejemplares (Choo *et al.*, 2012). Además *P. canariensis* en particular, muestra diferentes ritmos de crecimiento según el ambiente en el que se encuentre, por lo que se suele usar rangos de alturas como indicador de la edad, asumiendo que los ejemplares crecen 1m cada 5-10 años (Sosa *et al.*, 2007). Luego, siguiendo esta correspondencia, la categoría de alturas más frecuente es la que varía entre 5-10m, a las cuales los ejemplares alcanzan el dosel arbóreo y sus máximas capacidades reproductivas, por lo que se asumirá una tasa generacional aproximada de 25 años por generación.

3.3.3 Diversidad y estructura genética a escala insular

Varios de los análisis mencionados a lo largo del apartado 3.3.2 se repitieron de manera independiente en cada una de las islas utilizadas para inferir en los patrones genéticos a escala insular (Gran Canaria, Tenerife y La Gomera). Por un lado, con el fin de detectar el posible efecto de la variación del tamaño muestral en las estimaciones de diversidad, mediante el uso de GenAlEx v6.5 se calcularon los estadísticos estándares de diversidad genética (N_a , N_e , H_e y H_o) para cada una de las poblaciones. El cálculo del valor de F_{IS} , así como la comprobación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) de las poblaciones mediante el test exacto de Fisher, se efectuó con el uso de GENEPOP v4.2.

Por otro lado, el análisis de la estructuración geográfica de la variación molecular se inició estimando la diferenciación genética entre las poblaciones de cada isla (valores pareados de F_{sr}) mediante GENEPOP v4.2. Además, para examinar el grado de divergencia exhibido por cada población, se calculó el valor promedio de los pares de F_{ST} de cada población con respecto al resto de poblaciones del sistema estudiado (i.e. resto d poblaciones albergadas en la isla). También, se aplicó el método bayesiano de agrupación implementado en STRUCTURE v2.2, asumiendo un modelo de mezcla genética y frecuencias alélicas correlacionadas entre las poblaciones, el cual es más robusto detectando diferencias genéticas entre grupos cercanos que comparten un ancestro común o que han experimentado considerables eventos de migración (Falush et al., 2003). En cada isla se ejecutaron 10 repeticiones de cada valor de K, desde K=1 hasta el número máximo de poblaciones muestreadas en cada isla (K=9 en Gran Canaria, K=5 en Tenerife y K=10 en La Gomera). Para el resto de características del análisis, así como para la detección del número óptimo de K en cada isla, se siguió el mismo procedimiento aplicado a escala regional. Por otro lado, los patrones espaciales también se evaluaron en cada isla mediante el uso de BARRIER, SAMOVA v1.0 y aplicando un test de Mantel mediante IBDWS, siguiendo las indicaciones comentadas en el punto 3.3.2.

3.3.4 Estructura genética espacial (SGS) a escala fina

Estimación de los índices relacionados con la SGS a escala fina

La SGS a escala fina se llevó a cabo mediante la construcción de correlogramas basados en las relaciones genéticas entre los individuos de la muestra en relación a la distancia que los separa. Para ello se utilizó el coeficiente de parentesco (o estimador de coancestro F_{ij}), aplicado según lo descrito por Loiselle *et al.* (2005). Dicho estimador se calcula como la correlación entre estados alélicos en pares de individuos, o dicho de otro modo, está definido por la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar (i y j) en dos individuos sean idénticos por descendencia. F_{ij} fue medido a lo largo de 10 clases de distancias geográficas, automáticamente definidas en cada análisis para contener el mismo número de pares de comparaciones entre individuos en cada intervalo. Luego, mediante la regresión de los valores de F_{ij} frente a la distancia espacial entre individuos (d_{ij} ; calculada de forma lineal y logarítmica) se estima la pendiente de regresión (b_{lin} ó b_{log}), que informará de si los individuos están estructurados genéticamente a nivel espacial. Los intervalos al 95% de confianza estadística en torno a la hipótesis nula de una distribución

aleatoria de los genotipos, se obtuvieron a partir de los errores estándar aproximados para las estimaciones multi-locus en cada clase de distancia, siguiendo un procedimiento de remuestreo (*jackknife*) que elimina la información de un locus en cada iteración. Todos los cálculos de SGS fueron llevados a cabo con el programa SPAGeDi v1.3 (Hardy y Vekemans, 2002).

Dado que el esquema de muestreo, especialmente el número y distribución de los individuos muestreados, afecta fuertemente las estimaciones de SGS (Degen *et al.*, 2001; Vekemans y Hardy, 2004; Cavers *et al.*, 2005), la fortaleza de la SGS puede ser mejor evaluada a través del estadístico S_p , desarrollado por Vekemans y Hardy (2004) y estimado como el radio $-b_F/(1-F_{(1)})$, donde b_F es la pendiente de la regresión de los coeficientes F frente a la distancia, y $F_{(1)}$ es la media del coeficiente F_{ij} entre los individuos incluidos en el primer intervalo de distancia y que suele contener a todas las parejas de vecinos (Vekemans y Hardy, 2004). Por tanto, el estadístico S_p representa la tasa de disminución del coeficiente de parentesco con respecto a la distancia, pero con la ventaja de estar poco influenciado por el tipo de estrategia de muestreo utilizada.

Efecto de la ocupación del hábitat en los patrones genéticos locales

Debido a que el hábitat de *P. canariensis* puede ser encontrado fuera de los márgenes del dominio potencial del bosque termófilo en las Islas Canarias (Del Arco *et al.*, 2006; Sosa *et al.*, 2007; Fernández-Palacios *et al.*, 2008), se estableció la hipótesis de que las poblaciones localizadas fuera de los límites de este ecosistema pudieran ser consideradas en cierto modo marginales, y que por tanto, la ocupación del hábitat pudiera tener un efecto sobre los patrones genéticos de las poblaciones como consecuencia de estar más o menos aisladas a lo largo del paisaje.

A través de las ubicaciones georreferenciadas de los especímenes naturales de P. canariensis a lo largo de las islas (ver Figura 3.5), se estimó la abundancia de la especie en el paisaje próximo a las poblaciones analizadas genéticamente. Concretamente, se calculó el número de palmeras localizadas en un radio de 600 m (N_{palm}) desde el centroide de las poblaciones estudiadas usando herramientas de geoprocesamiento del ArcGIS v10.2. Luego, se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman (según viene implementado en R) entre parámetros genéticos locales como la diversidad genética (H_o , H_e), nivel de endogamia (F_{IS}) y grado de diferenciación genética de cada población (promedio de F_{ST}), estimados según lo indicado en el apartado 3.3.3, así como los parámetros de SGS a escala fina (Sp_{lin} y Sp_{log}), y los que caracterizan la ocupación del hábitat de P. canariensis en el paisaje, como el número de ejemplares de P. canariensis alrededor de las poblaciones estudiadas (N_{palm}) y la altitud media (ALT) a la que se encuentran.



4. RESULTADOS

4.1 TESTADO DE LOS MARCADORES MOLECULARES

De los 15 marcadores microsatélites nucleares probados sobre un 20% del total de las muestras, se observó que los marcadores *mPdCIR016, mPdCIR035, mPdCIR044, mPdCIR090 y mPd-CIR093* fueron monomórficos para *Phoenix canariensis* y que el locus mPdCIR015 mostró una duplicación de los fragmentos amplificados, por lo que terminó siendo excluido del análisis para evitar interpretaciones erróneas en la lectura de los genotipos de este locus. Por otro lado, el resto de loci analizados con el programa MicroCHEKER mostraron estar en equilibrio de H-W y carecer de alelos nulos, excepto el locus *mPdCIR078*, que exhibió una deficiencia significativa de heterocigosis sin potenciales errores de lectura, por lo que se atribuye únicamente a la presencia de alelos nulos. Para evitar que las desviaciones de las frecuencias alélicas de este microsatélite debidas a la existencia de alelos nulos se confundan con procesos genéticos de interés, como los niveles de endogamia de las poblaciones, éste locus también se eliminó del resto de los análisis. Finalmente, el resto de muestras fueron analizadas con los 8 loci nSSR restantes (*mPdCIR010, mPdCIR025, mPdCIR048, mPdCIR050, mPdCIR057, mPdCIR063, mPdCIR070, mPdCIR085*) siguiendo las indicaciones del punto 3.2, los cuales presentaron un poder de exclusión conjunto del 98%, según lo indicado en el resumen de estadísticos obtenidos con CERVUS v3.0.

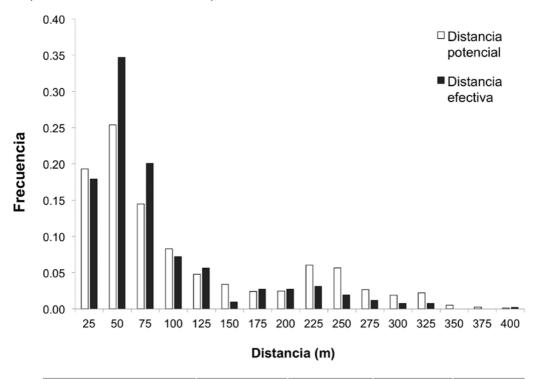
4.2. SISTEMA DE REPRODUCCIÓN Y FUNCIÓN DE DISPERSIÓN POLÍNICA

Parámetros del sistema reproductor y correlaciones demográficas

El grado de paternidad correlacionada a nivel poblacional fue moderado ($r_p = 0,173 \pm 0,032$), lo que puede ser traducido en una media poblacional aproximada de 5,8 padres efectivos por hembra ($N_{ep} = 1/r_p$). No obstante, las estimaciones de la tasa de paternidad correlacionada a nivel familiar oscilaron fuertemente entre 0 y 0,9 en las diferentes progenies maternas analizadas (rango de N_{ep} : 1,1 - 45,4; Tabla 4.1).

El análisis de asignación fraccional de la paternidad reveló que en las 606 semillas recogidas de las 28 madres muestreadas participó un tamaño poblacional de 74,3 machos reproductores (IC-95%: 70,8 - 79,6), indicando también que un 25% de la descendencia no fue engendrada por los candidatos masculinos muestreados en la población. Dentro de la población, la distribución observada de frecuencias de las distancias de polinización efectiva se desvió significativamente de la obtenida bajo la hipótesis de una dispersión aleatoria (D = 0,145, P < 0,001), siendo moderadamente leptocúrtica. La media y mediana de las distancias efectivas de dispersión de polen estimadas con PATRI fueron 71,5m y 47,9m, respectivamente, pero ambos valores fueron menores que los obtenidos para las distancias entre pares de palmeras presentes

en la población (ver tabla a pie de gráfico en Figura 4.1). Así pues, el 70% de los eventos de polinización efectiva ocurren a distancias menores de 75m entre los progenitores, con una disminución de la frecuencia con la distancia, pero manteniéndose frecuencias observables a medias y largas distancias (hasta 200 - 400m; Figura 4.1). Considerando las familias maternas por separado, las correspondientes distancias efectivas medias de dispersión de polen fueron muy variables, oscilando entre 26,6 y 192m (Tabla 4.1).



	Media	Mediana	Mínima	Máxima
Distancia potencial	96,2	58,5	2,2	391,6
Distancia efectiva	71,5	47,9	4,6	377,2

Figura 4.1 Comparación entre la distribución de las frecuencias de las distancias potenciales de dispersión entre machos y hembras (barras blancas) y las distancias de polinización efectivas (barras negras) observadas mediante asignaciones fraccionales de la paternidad, en la población de *Phoenix canariensis* de Acusa Verde (CAC). La tabla a pie de gráfico contiene el resumen de los valores medios, medianas, mínimos y máximos para ambos tipos de distancias estimadas a nivel poblacional.

Respecto a las correlaciones demográficas de los parámetros reproductivos a nivel familiar, de manera global se observó que la posición relativa y densidad local de los machos alrededor de las madres tiene un efecto sobre las medidas de distancias efectivas, pero sin influir en las tasas de paternidad correlacionadas. Concretamente, las tasas de paternidad correlacionada (r_p) no se mostraron relacionadas ni con la distancia media hacia todos los machos (d_{media} : r_s =0,125; P>0,05)

ID		r p	N ep	d _{pot} (m)	d _{ef} (m)
M002		0,155 ± 0,074	6,5 ± 3,1	121,68	85,03
M009		$0,110 \pm 0,053$	9,1 ± 4,4	98,70	77,14
M020		$0,186 \pm 0,088$	$5,4 \pm 2,5$	76,65	59,83
M024		-0.084 ± 0.042	NA	74,04	58,90
M028		$0,095 \pm 0,045$	$10,5 \pm 5,0$	74,59	39,58
M038		$0,056 \pm 0,027$	$17,9 \pm 8,6$	73,79	51,95
M039		$0,064 \pm 0,031$	$15,6 \pm 7,6$	72,32	65,14
M040		$0,342 \pm 0,143$	$2,9 \pm 1,2$	70,13	44,02
M049		$0,110 \pm 0,052$	$9,1 \pm 4,3$	70,07	42,57
M051		$0,330 \pm 0,156$	3.0 ± 1.4	69,34	40,61
M073		$0,022 \pm 0,011$	45,4 ± 22,7	69,68	91,06
M081		$0,195 \pm 0,093$	$5,1 \pm 2,4$	70,24	41,99
M082		$0,037 \pm 0,018$	27,0 ± 13,1	70,35	55,01
M083		$0,067 \pm 0,033$	$14,9 \pm 7,4$	69,86	67,63
M095		$0,073 \pm 0,035$	13,7 ± 6,6	70,58	26,67
M104		$0,147 \pm 0,070$	6.8 ± 3.2	74,58	48,31
M125		$0,371 \pm 0,018$	$2,7 \pm 0,1$	72,13	61,28
M130		$0,126 \pm 0,061$	7.9 ± 3.8	70,74	54,54
M140		$0,126 \pm 0,061$	$7,9 \pm 3,8$	126,24	116,43
M141		$0,065 \pm 0,031$	$15,4 \pm 7,3$	86,92	85,19
M144		$0,085 \pm 0,041$	11,8 ± 5,7	79,36	92,94
M146		$0,120 \pm 0,058$	$8,3 \pm 4,0$	80,50	61,75
M149		$0,113 \pm 0,054$	$8,8 \pm 4,2$	78,97	66,04
M150		$0,061 \pm 0,030$	16,4 ± 8,1	77,85	62,45
M157		$0,902 \pm 0,428$	1,1 ± 0,5	195,71	47,97
M160		$0,353 \pm 0,168$	2.8 ± 1.3	196,15	123,74
M162		$0,130 \pm 0,063$	$7,7 \pm 3,7$	197,38	175,23
M167		$0,087 \pm 0,042$	11,5 ± 5,5	204,25	192,04
	Media	-	-	96,17	72,68

NA: no puede ser calculado,

Tabla 4.1 Variación a nivel familiar de los parámetros del sistema reproductor y dispersión polínica de *Phoenix canariensis* en la población de Acusa Verde (CAC): ID, código de identificación de las familias maternas; $r_{p'}$ tasa de paternidad correlacionada; $N_{\rm ep}$, número efectivo de donantes de polen; $d_{\rm pot}$, distancia de separación media entre cada palmera 'madre' y todos los machos (distancia de dispersión potencial); y $d_{\rm eff}$ distancia de separación media entre cada palmera 'madre' y los machos que han fertilizado sus progenies (distancias de dispersión efectiva).

ni con la distancia hacia el macho más cercano (d_{\min} : r_s =0,160; P>0,05). Tampoco lo hicieron con la densidad local de machos estimada en diferentes radios alrededor de las hembras (todos las pruebas en base a N_{\max} , $r_s \le$ -0,02 y P>0,05). Aún más, incluso se muestran independientes a las medias de las distancias efectivas de dispersión de polen observadas en cada familia materna

 $(d_{\rm ef}: r_{\rm s} = -0,146; P>0,05)$. Por otro lado, sin embargo, los valores medios de distancias efectivas de polinización parecen guardar relación con la posición relativa de los machos respecto a cada madre $(d_{\rm media}: r_{\rm s}=0,608 \text{ y } P<0,001; d_{\rm min}: r_{\rm s}=0,476 \text{ y } P<0,05)$. Asimismo, se observa que a mayor densidad de machos alrededor de las madres, menores son las distancias medias de polinización efectiva detectadas en sus progenies, aumentando la fortaleza de la correlación a partir de radios superiores a 15m $(r_{\rm s} \le -0,498; P \le 0.01)$.

Kernel de dispersión polínica de la población

La estimación máximo-verosímil del kernel de dispersión polínica usando NM+, indicó que el peor ajuste al modelo se produce al asumir una reproducción panmíctica, apoyando lo observado mediante las estimaciones del análisis de paternidad, y que los mejores ajustes (i.e. menores valores de AIC) se alcanzan cuando se asume un kernel biparamétrico leptocúrtico, tanto de cola delgada (siguiendo una distribución de Weibull con b=1,24) como abultada (siguiendo una distribución potencial-exponencial con b=0,03). No obstante, las estimaciones de las distancias de dispersión de polen convergen en valores irrealistas, indicando que con los datos utilizados a nivel local no se puede inferir con precisión en la cola del kernel (ver más detalle de los valores alcanzados en los parámetros a, b y d_p para las 6 funciones testadas en la Tabla 3 del **Anexo I**). Por tanto, las estimaciones del resto de los parámetros del modelo se llevaron a cabo asumiendo un kernel exponencial (i.e monoparamétrico, fijando el valor de b según recomendaciones del autor del programa, I. Chybicki), el cual resultó en un 12% de inmigración de polen (m_s) , una distancia media de dispersión de polen (d_n) aproximada a 200m, una dispersión prevalente hacia el noroeste de la población, y con la altura de los machos influenciando positivamente en el éxito reproductivo. Los ajustes de la función exponencial, incorporando paso a paso la estimación de los parámetros del modelo, vienen reflejadas en la Tabla 4.2.

m_p	d_{ρ}	а	b	Kρ	a _p	h	N _{p5}	N _{p15}	N _{p30}	LogL	AIC
0,123 (0,018)	197,3 (22,8)	98,6	1*	0,59 (0,10)	297,92 (8,58)	-	-	-	-	-6760,7	13531,4
0,124 (0,018)	205,6 (25,2)	102,8	1*	0,55 (0,10)	296,32 (9,21)	0,26 (0,07)	-	-	-	-6753,8	13519,6
0,125 (0,018)	198,5 (23,9)	99,2	1*	0,48 (0,11)	294,04 (10,6)	0,24 (0,07)	-0,16 (0,11)	-	-	-6752,6	13519,2
0,125 (0,018)	199,9 (24,6)	99,9	1*	0,49 (0,12)	294,64 (10,5)	0,24 (0,07)	-0,19 (0,13)	0,04 (0,12)	-	-6752,5	13521
0,125 (0,018)	195,2 (24,1)	99,1	1*	0,47 (0,13)	293,84 (11,4)	0,24 (0,07)	-0,18 (0,14)	0,11 (0,16)	-0,09 (0,15)	-6752,3	13522,6

NOTA: (-) el parámetro no fue estimado; (*) valor fijado,

Tabla 4.2 Parámetros de dispersión polínica estimados con NM+ (Chybicki y Burczyk, 2010) en la población de Acusa Verde (CAC) mediante el ajuste de un kernel exponencial: m_{ρ} , tasa de inmigración de polen; d_{ρ} , distancia media de dispersión de polen; parámetros de escala (a) y forma (b) del kernel, intensidad (K_{ρ}) y ángulos desde el verdadero norte (a_{ρ}) de la dirección prevalente de polinización efectiva; gradiente de éxito reproductivo entre los machos [β] calculado para la altura (h) y la densidad de palmeras en torno a cada ejemplar masculino, medido en radios de 5m ($N_{\rho,b}$), 15 m ($N_{\rho,15}$) and 30 m ($N_{\rho,20}$). Las desviaciones estándar de las estimaciones se muestran en paréntesis. LogL, es el logaritmo del valor estimado de máxima verosimilitud y AIC es el 'criterio de información de Akaike'.

Diversidad genética en la población adulta y descendencia

Los niveles observados de diversidad genética ($H_{\rm e}$, $N_{\rm a}$ y $N_{\rm e}$) fueron moderadamente altos tanto en las palmeras presentes en la población como en las semillas. No se detectaron evidencias de endogamia ni en la población ni la cosecha de semillas, sino más bien un exceso de heterocigotos, aunque $H_{\rm o}$ fue algo inferior (y $F_{\rm IS}$ algo mayor) para la muestra de semillas, sugiriendo cierto grado de endogamia biparental que disminuye en el estadio adulto (Tabla 4.3).

Nivel de análisis	n	N a	N _e	Но	H _e	F _{IS}
Media poblacional	182	3,18	3,23	0,664	0,598	-0,108 *
Media del conjunto de semillas	616	3,08	2,94	0,597	0,578	-0,031*

NOTA: significación del equilibrio de HW: *P < 0,05

Tabla 4.3 Estimadores de variación genética calculados con 8 loci microsatélites nucleares en los ejemplares de *Phoenix canariensis* presentes en la población de Acusa Verde (CAC) y el conjunto de semillas colectadas desde las palmeras 'madres': n, número de muestras; N_a , rarefacción de la riqueza alélica; N_e , número efectivo de alelos; $H_{o'}$, heterocigosidad observada; H_a , heterocigosidad esperada; F_{isr} coeficiente de endogamia.

4.3 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA A ESCALA REGIONAL

Diversidad genética y estructura de las poblaciones

Para los 8 loci polimórficos analizados en los 330 individuos, se detectaron un total de 105 alelos diferentes (desde 4 a 24 alelos por locus) pero con frecuencias bastante desiguales entre locus y poblaciones, siendo superiores a 0,5 sólo en el 9% de ellos. El patrón general observado indica una disminución de la variabilidad genética desde las islas más orientales (Fuerteventura y Gran Canaria) hasta las más occidentales (Tenerife, La Gomera y La Palma). Ésta tendencia es expresada por la reducción de los niveles medios por isla de riqueza alélica (A) y heterocigosidad esperada balanceada (H_s), los cuales fueron significativamente diferentes al compararlos entre islas (Tabla 4.4), así como en la disminución del número de alelos privados (N_{ap} ; Tabla 4.5) detectados en las poblaciones albergadas en cada isla, a excepción de Lanzarote. Igualmente a nivel poblacional, los valores de diversidad genética (H_e) oscilaron fuertemente desde 0,621 en CAC (Gran Canaria) hasta 0,273 en PEP (La Palma) (Tabla 4.5), mostrándose significativamente relacionados con la edad geológica de las islas (r_s =0,606; P=0,019), y guardando una relación negativa con la distancia hasta el continente (r_s =-0,606; P=0,018).

El grado de diferenciación genética entre las poblaciones a lo largo del archipiélago también fue notable, variando desde 0,021 (entre GJE y GHE, ambas localizadas en La Gomera) hasta 0,285 (entre PEP en La Palma y FBT en Fuerteventura); todos los valores pareados de F_{ST} para las 15 poblaciones analizadas vienen reflejados en *Online Resource 1* del **Anexo II**. Los dos métodos utilizados para

Isla	Α	Н _е	F _{ST}
La Palma	2,75	0,30	0,047
La Gomera	4,80	0,49	0,102
Tenerife	3,81	0,43	0,241
Gran Canaria	5,60	0,57	0,127
Fuerteventura	5,23	0,52	0,092
<i>p</i> -valor	0,014*	0,014*	0,625

NOTA: *P < 0,05.

Tabla 4.4 Comparación de los valores medios por isla de riqueza alélica (A), heterocigosidad genética balanceada (H_s) y diferenciación genética (F_{sr}) Weir y Cockerham, 1984), calculados en FSTAT (Goudet, 1995) y utilizando 10.000 permutaciones para estimar la significancia. La isla de Lanzarote fue excluida del análisis porque sólo se muestreó una población en esta isla.

Isla	Código	Na	Ne	N _{ap}	H₀(ES)	H _e (ES)	Fıs
La Palma	PEP PBA	2,37 3,00	1,55 1,84	0	0,318 (0,10) 0,386 (0,13)	0,273 (0,09) 0,325 (0,10)	- 0,16 (ns) - 0,13 (ns)
La Gomera	GMA	4,12	2,57	1	0,500 (0,13)	0,485_(0,12)	0,02 (ns)
	GHE	4,62	2,74	0	0,472 (0,12)	0,458 (0,12)	- 0,03 (ns)
	GJE	4,50	2,65	1	0,472 (0,13)	0,446 (0,12)	- 0,02 (ns)
	GVR	5,00	2,70	0	0,528 (0,12)	0,514 (0,10)	0,06 (ns)
Tenerife	TMA	2,75	1,84	1	0,364 (0,10)	0,356 (0,10)	0,01 (ns)
	TEC	4,62	2,83	1	0,545 (0,11)	0,528 (0,10)	- 0,02 (ns)
Gran Canaria	CAR	6,00	3,39	4	0,648 (0,10)	0,597 (0,09)	- 0,06 (ns)
	CAC	5,87	3,34	4	0,670 (0,10)	0,621 (0,09)	- 0,05 (ns)
	CMO	4,62	2,95	0	0,568 (0,11)	0,528 (0,10)	- 0,05 (ns)
	CST	4,37	2,10	0	0,517 (0,08)	0,481 (0,07)	- 0,05 (ns)
Fuerteventura	FMA	5,00	2,62	4	0,597 (0,08)	0,563 (0,07)	- 0,04 (ns)
	FBT	5,25	2,27	3	0,523 (0,09)	0,469 (0,08)	- 0,08 (ns)
Lazarote	LHA Promedio	4,12 4,41	2,57 2,53	0	0,540 (0,11) 0,510	0,503 (010) 0,476	- 0,06 (ns)

NOTA: ns, no significativo. ES, error estándar. Se utilizo una muestra constante de 22 individuos en todas las poblaciones.

Tabla 4.5 Estimadores de variación genética calculados con 8 loci microsatélites nucleares en 15 poblaciones naturales de *Phoenix canariensis* seleccionadas a lo largo del archipiélago canario. $N_{\rm p}$, número de alelos diferentes; $N_{\rm e}$, número efectivo de alelos; $N_{\rm ap}$, número de alelos privados, $H_{\rm o}$, heterocigosidad observada; $H_{\rm e}$, heterocigosidad esperada; $F_{\rm is}$ coeficiente de endogamia calculado acorde a Weir y Cockerham, 1984. Ver correspondencia de los códigos de las poblaciones en Tabla 3.1.

evaluar las relaciones genealógicas de las poblaciones, PCoA (Figura 4.2) y el árbol NJ (ver *Online Resource 2* del **Anexo II**), mostraron esencialmente el mismo patrón de estructuración geográfica, que se resume en: (i) la agrupación de las poblaciones por su isla de origen, con excepción de las poblaciones de La Gomera y Tenerife, las cuales se mostraron muy próximas unas a las otras, (ii) una clara separación entre las poblaciones albergadas en las islas orientales y occidentales, siendo éste último conjunto de poblaciones menos distantes entre sí, (ii) las muestras de LHA (Lanzarote) ocupando una posición central entre el grupo oriental y occidental, y (iv) una evidente separación de las muestras de P. canariensis con respecto a las de P. dactylifera. Por otro, la comparación entre las matrices de F_{ST} y R_{ST} siguiendo el método de Hardy et al. (2003), no reveló una señal filogeográfica en el patrón de diferenciación de P. canariensis.

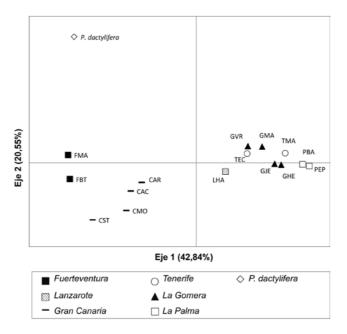


Figura 4.2 Análisis multivariante de coordenadas principales (PCoA) basado en las frecuencias alélicas obtenidas con 8 loci microsatélites nucleares en 15 poblaciones naturales de *Phoenix canariensis* seleccionadas a lo largo del archipiélago canario. La proporción de variación genética explicada por cada eje es mostrada entre paréntesis. Ver correspondencia de los códigos de las poblaciones en Tabla 3.1.

El método de agrupación bayesiana implementado en STRUCTURE sugirió un óptimo de 8 grupos genéticos (K; Figura 4.4), los cuales dejan entrever algunos aspectos destacables: (i) aunque algunos individuos muestran una ascendencia compartida entre diferentes grupos, la mayoría son asignados con una alta probabilidad al grupo genético dominante en la población y/o isla a la cual pertenecen, (ii) las islas centrales (Gran Canaria, Tenerife y La Gomera) contienen un considerable nivel de subestructura insular, siendo coherente con los valores medios de diferenciación genética (F_{ST}) observados en estas islas (Tabla 4.5), (iii) LHA (Lanzarote) mostró un patrón complejo de estructura genética con una ascendencia mezclada de los grupos observados en las islas orientales y occidentales.

Patrones espaciales en la distribución de la diversidad genética

La partición de la variabilidad genética de P. canariensis revelada por SAMOVA fue máxima cuando las poblaciones se separan en tres grupos ($F_{c\tau}$ =0,191, P< 0,001; F_{sc} =0,145, P< 0,001), entre los cuales se acumula un 19% de la variación genética total: Grupo 1, incluye las poblaciones procedentes de Fuerteventura (FBT y FMA); Grupo 2, conformado por las poblaciones de Gran Canaria (CST, CMO, CAR y CAC); y Grupo 3, contiene el resto de poblaciones procedentes de las islas occidentales así como a LHA de Lanzarote. No obstante, la mayor proporción de variación genética es acumulada dentro de las poblaciones (69,2%). Las barreras genéticas más consistentes detectadas por BARRIER (con valores de bootstrap > 75) apoyaron el patrón definido por el SAMOVA (Figura 4.3), además de trazar otras barreras de menor fortaleza estadística (50 < bootstrap < 75) que son

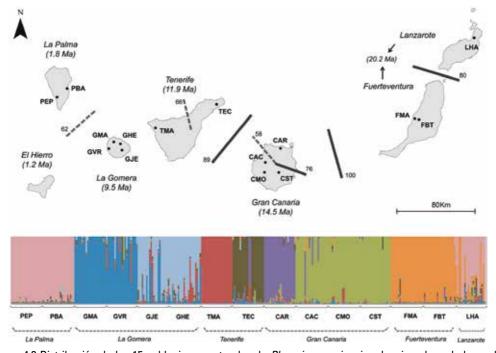


Figura 4.3 Distribución de las 15 poblaciones naturales de *Phoenix canariensis* seleccionadas a lo largo del archipiélago canario con los límites de diferenciación genética detectados por BARRIER (Manni *et al.*, 2004) sobre el contexto espacial: *'líneas sólidas y negras'* representan un nivel alto de soporte estadístico (con valores de *bootstrap* >75), y *'líneas discontinuas'* muestran barreras con soporte moderado (50<*bootstrap* <75). Debajo, diagrama resumiendo los resultados del análisis de agrupación bayesiana de STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), con la proporción de asignación de los individuos a cada grupo genético dentro de las poblaciones muestreadas, asumiendo como número óptimo de agrupaciones K=8. La edad geológica de las islas se muestra entre paréntesis (Ma, millones de años). Ver correspondencia de los códigos de las poblaciones en Tabla 3.1.

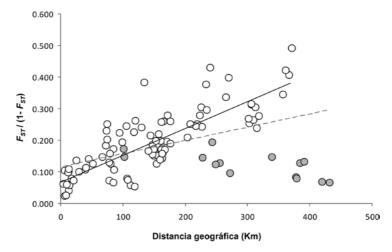
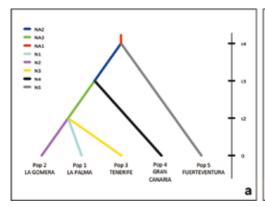


Figura 4.4 Correlación entre los valores pareados de diferenciación genética entre las 15 poblaciones de *Phoenix canariensis* seleccionadas a lo largo del archipiélago canario, representada como F_{ST} linearizado [expresado como F_{ST} /(1- F_{ST})], y la distancia geográfica. Los 'puntos grises' representan los pares de comparaciones incluyendo la población LHA (Lanzarote). La función lineal de la correlación es representada como una 'línea negra continua' cuando LHA es excluida del test (con una pendiente de 16x10-4) y como una 'línea gris discontinua' cuando LHA se incluye en el test (con una pendiente de 6x10-4).

acordes al patrón de subestructura genética a nivel insular sugerido por los resultados del STRUC-TURE (Figura 4.3). De manera global, el test de Mantel reveló un patrón de diferenciación genética de las poblaciones a lo largo del archipiélago según un IBD (r=0,474; P<0,001), siendo aún más evidente al excluir a LHA del test (r=0,811; P<0,001; Figura 4.4).

Modelo demográfico

El análisis demográfico realizado con DIYABC refleja que las poblaciones de *P. canariensis* divergieron secuencialmente en el caso de Fuerteventura y Gran Canaria tras el transcurso de diferentes generaciones, y más recientemente, las islas occidentales se diferencian en un evento común (*i.e* escenario 3; Figura 4.5a). La elección del escenario más probable se obtuvo a partir de la regresión logística de la probabilidad de cada escenario en las desviaciones entre el 10% del conjunto de datos simulados y observados (Fagundes *et al.*, 2007; Figura 4.5b), la cuál estimó una probabilidad posterior marcadamente superior para el escenario 3 (0,8555; IC-95%: 0,8322-0,8788; ver las probabilidades posteriores estimadas en cada escenario en la Tabla 3 del **Anexo II**). Asimismo, el PCA corroboró la seguridad del ajuste al mostrar los datos observados junto a los datos obtenidos de las distribuciones posteriores para el escenario 3 (ver *Online Resource 3* del **Anexo II**).



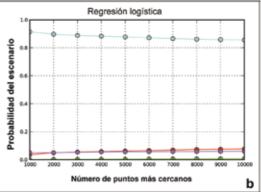


Figura 4.5 Análisis demográfico de *Phoenix canariensis* a lo largo del archipiélago canario usando el método ABC implementado en DIYABC (Cornuet *et al.*, 2008, 2010). a) Representación del escenario más probable (*i.e.* escenario 3); las islas excepto Lanzarote (ver detalles en 'Material y Métodos') fueron consideradas como poblaciones muestreadas. t_i , escala del tiempo entre los eventos de divergencia, medido en generaciones desde el presente (t=0), y donde i varía de 2 a 4; N_i , tamaño poblacional efectivo de las poblaciones actuales, donde i varía de 1 a 5; NA_i , tamaño poblacional efectivo de las poblaciones ancestrales, donde i varía de 1 a 3. b) Probabilidad de cada escenario sobre el 10% de los datos simulados y observados más cercanos usando el método de regresión logística implementado en DIYABC: la 'línea verde' representa el escenario 1, 'línea roja' el escenario 2, 'línea azul' el escenario 3, y 'línea lila' el escenario 4. Ver los escenarios demográficos testados en Figura 2 del Anexo II.

Según el escenario 3, considerando un modelo mutacional GSM en las poblaciones y un valor estimado para la tasa de mutación media de los microsatélites de μ = 2,52 x 10⁻³, la distribución posterior obtenida para los parámetros demográficos sugiere que (Tabla 4.6): (i) Fuerteventura (Pop 5) pudo haber divergido de la colonia ancestral hace 5.560 generaciones (valor medio de t_a ; IC-95%:

1.640 - 9.670), o hace 139.000 años, si consideramos para la palmera canaria una tasa generacional de 25 años/generación; (ii) la divergencia de Gran Canaria (Pop 4) de la población de Fuerteventura pudo haber tenido lugar hace 3.450 generaciones (valor medio de t_3 ; IC-95%: 1.050 - 7.400), que se traduce en 86.250 años atrás; (iii) la separación de las poblaciones occidentales (Tenerife, La Gomera y La Palma) fue considerablemente reciente y simultánea, a un tiempo t_2 = 1.115 (IC-95%: 219 - 2.840) que equivale a aproximadamente 27.875 años atrás; (iv) Los tamaños poblacionales efectivos de las poblaciones en el presente muestran valores de la mediana que oscilan desde N_1 =546 (Pop1; La Palma) hasta N_4 =7.660 (Pop4; Gran Canaria); (v) las poblaciones de las islas centrales (Gran Canaria, Tenerife y La Gomera) exhiben una moderada expansión de sus tamaños efectivos con respecto a los de sus respectivas poblaciones antecesoras (NA_2 para Gran Canaria y NA_3 para Tenerife y La Gomera), contrariamente a los que se observa para Fuerteventura (NA_1 =7.140 pasa a N_2 =4.580) y, de forma más acusada, en La Palma (NA_3 =1.100 pasa a N_4 =546).

Parámetros	Media	Mediana	Modo	Cuantil 2,5%	Cuantil 97,5%
Tamaño poblacional efectivo					
N₁ (La Palma)	$8,45 \times 10^{2}$	$5,46 \times 10^{2}$	$4,08 \times 10^{2}$	$1,36 \times 10^{2}$	$3,76 \times 10^3$
N ₂ (La Gomera)	$6,07 \times 10^3$	$6,13 \times 10^3$	$6,13 \times 10^3$	$2,29 \times 10^3$	$9,63 \times 10^3$
N₃ (Tenerife)	$6,55 \times 10^3$	$6,67 \times 10^3$	$6,76 \times 10^3$	$2,65 \times 10^3$	$9,74 \times 10^3$
N₄ (Gran Canaria)	$7,47 \times 10^3$	$7,66 \times 10^3$	$8,14 \times 10^3$	$4,09 \times 10^3$	$9,84 \times 10^3$
N₅ (Fuerteventura)	$4,76 \times 10^3$	$4,58 \times 10^3$	$4,22 \times 10^3$	$1,81 \times 10^3$	$8,93 \times 10^3$
NA ₁	$6,87 \times 10^3$	$7,14 \times 10^3$	$8,61 \times 10^3$	$2,31 \times 10^3$	$9,88 \times 10^3$
NA ₂	$4,02 \times 10^3$	$3,78 \times 10^3$	$3,16 \times 10^3$	$9,08 \times 10^{2}$	$8,24 \times 10^3$
NA ₃	$1,32 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$9,10 \times 10^{2}$	1,31 x10 ²	$3,67 \times 10^3$
Escala de tiempo en generaciones					
t_2	$1,15 \times 10^3$	1,01 x10 ³	8.69 x10 ²	2.19×10^{2}	2.84×10^{3}
<i>t</i> ₃	3.45×10^3	3.15×10^3	2.23×10^3	1.05×10^3	$7,40 \times 10^3$
t ₄	$5,56 \times 10^3$	$5,13 \times 10^3$ $5,43 \times 10^3$	4.98×10^3	1,63 x 10 1.64 x 10 ³	$9,67 \times 10^3$
Tasa de mutación de los nSSR	3,30 X 10	5,43 X 10	4,90 X 10	1,04 × 10	9,07 × 10
Media_µmic	2,52 x10 ⁻⁴	2,27 x10 ⁻⁴	1,65 x10 ⁻⁴	1,17 x10 ⁻⁴	5.33 x10 ⁻⁴
Media_P	2,38 x10 ⁻¹	2,46 x10 ⁻¹	3,00 x10 ⁻¹	1,28 x10 ⁻¹	3,00 x10

Tabla 4.6 Estimaciones de los parámetros demográficos del escenario 3 mediante el método ABC implementado en DIYABC (Cornuet et~al., 2008, 2010). Se indican la media, mediana y modo de la distribución posterior para cada parámetro, junto con los intervalos al 95% de confianza. t_j , escala del tiempo entre los eventos de divergencia, medido en generaciones desde el presente (t=0) y donde i varía de 2 a 4; N_i , tamaño poblacional efectivo de las poblaciones actuales, donde i varía de 1 a 5; NA_i , tamaño poblacional efectivo de las poblaciones ancestrales, donde i varía de 1 a 3; Media $_i$ µmic, tasa de mutación media de los microsatélites; Media $_i$ P, es el parámetro promedio de la distribución geométrica del modelo de mutación GSM.

4.4 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA A ESCALA INSULAR

El aumento del tamaño muestral empleado en las islas centrales (Gran Canaria, Tenerife y La Gomera) con respecto a la muestra utilizada en los análisis a nivel regional, prácticamente no produjo cambios en las estimaciones de diversidad genética (H_s), obteniendo valores que oscilaron de 0,512 (CST) a 0,692 (CTF) en Gran Canaria, de 0,350 (TMA) a 0,524 (TLS) en Tenerife, y de 0,458 (GSI) a 0,529 (GEL) en La Gomera. En cada población, los valores de H_o y H_s fueron muy similares, y las únicas poblaciones que se desviaron significativamente de las proporciones esperadas para el equilibrio de HW fueron CSO y CST en Gran Canaria (Tabla 4.7).

Tal y como se dejó entrever en los análisis a escala regional, se confirma un notable grado de diferenciación genética a nivel insular en los tres casos analizados, que se traduce en una considerable divergencia de la mayoría de las poblaciones (Tabla 4.7), especialmente en Tenerife donde todos los valores promedio de F_{ST} fueron superiores a 0,160. En el caso de La Gomera existe un patrón geográfico, siendo las poblaciones localizadas en el noreste, este y sureste de la isla las más diferenciadas genéticamente del resto (promedios de F_{ST} >0,101), mientras que en Gran Canaria las poblaciones CAR, ubicada en el norte (promedio de F_{ST} =0,156), y CTE, localizada en el este (promedio de F_{ST} =0,147), son las que muestran un mayor grado de divergencia con respecto a las demás. Todos los valores pareados de F_{ST} entre las poblaciones de cada isla están referidos en la Tabla 4.8.

Isla	Código	n	ALT(m)	N_{palm}	Na	N _e	H_o (ES)	H₅(ES)	FIS	promedio F _S
La Gomera	GVR	40	188	1.808	5,1	2,7	0,515 (0,12)	0,515 (0,11)	0,001 (ns)	0,092
	GTG	40	179	2.018	4,6	2,9	0,485 (0,13)	0,485 (0,13)	0,004 (ns)	0,080
	GTZ	40	367	2,873	5,2	2,7	0,495 (0,12)	0,482 (0,12)	-0,027 (ns)	0,082
	GLH	30	995	1.288	4,8	2,8	0,545 (0,12)	0,508 (0,12)	-0,075 (ns)	0,085
	GMA	40	284	1.001	5,2	2,6	0,488 (0,12)	0,495 (0,12)	0,015 (ns)	0,080
	GSI	40	357	1.366	4,6	2,6	0,491 (0,13)	0,458 (0,12)	-0,073 (ns)	0,096
	GHE	38	424	1.845	4,8	2,9	0,461 (0,12)	0,468 (0,12)	0,016 (ns)	0,109
	GEL	40	170	1.073	5,7	2,9	0,516 (0,08)	0,529 (0,08)	0,023 (ns)	0,157
	GJE	40	788	2,096	4,7	2,8	0,469 (0,13)	0,466 (0,13)	-0,007 (ns)	0,101
	GPA	34	202	2.171	5,1	2,6	0,412 (0,11)	0,447 (0,12)	0,081 (ns)	0,114
			Media i	nsular	5,02	2,8	0,487 (0,04)	0,485 (0,04)	-0,004	0,105
Tenerife	TMA	40	557	784	3,1	1,8	0,350 (0,10)	0,355 (0,10)	0,026 (ns)	0,197
	TLS	40	264	172	5,1	2,9	0,572 (0,12)	0,524 (0,10)	-0,079 (ns)	0,159
	TCA	40	80	352	3,1	2,0	0,396 (0,08)	0,426 (0,08)	0,082 (ns)	0,191
	TSU	40	222	437	3,4	1,8	0,344 (0,10)	0,348 (0,10)	0,025 (ns)	0,237
	TEC	40	166	355	4,9	2,6	0,506 (0,10)	0,503 (0,10)	0,006 (ns)	0,184
			Media i	nsular	3,9	2,3	0,434 (0,05)	0,437 (0,04)	0,007	0,198
Gran Canaria	CAC	40	554	187	6,2	3,2	0,684 (0,10)	0,619 (0,09)	-0,107 (ns)	0,100
	CAR	40	135	952	7,0	3,5	0,618 (0,09)	0,613 (0,09)	-0,008 (ns)	0,156
	CTF	40	285	1.595	7,8	4,3	0,697 (0,08)	0,692 (0,08)	0,008 (ns)	0,093
	CTE	40	294	831	5,4	2,9	0,544 (0,11)	0,523 (0,10)	-0,031 (ns)	0,147
	CSO	40	455	1.571	5,6	2,9	0,569 (0,09)	0,600 (0,09)	0,053 (***)	0,062
	CST	40	514	2.345	5,1	2,2	0,550 (0,08)	0,512 (0,07)	-0,074 (ns)	0,090
	CAT	33	359	313	5,7	2,8	0,548 (0,09)	0,583 (0,08)	0,064 (**)	0,079
	CFA	40	525	1.135	6,0	2,3	0,548 (0,09)	0,532 (0,08)	-0,029 (ns)	0,079
	CMO	40	449	441	5,2	3,0	0,578 (0,11)	0,545 (0,10)	-0,061 (ns)	0,113
			Media i	nsular	6,02	3,05	0,593 (0,03)	0,580 (0,03)	-0,024	0,105

Tabla 4.7 Estimadores de variación genética calculados con 8 loci microsatélites nucleares en 24 poblaciones naturales de *Phoenix canariensis* seleccionadas a lo largo de las islas centrales del archipiélago canario (Gran Canaria, Tenerife y La Gomera): $N_{\rm g}$, número de alelos diferentes; $N_{\rm e}$, número efectivo de alelos; $H_{\rm o}$, heterocigosidad observada; $H_{\rm s}$, heterocigosidad esperada balanceada; $F_{\rm is}$, coeficiente de endogamia; el promedio de los valores pareados de diferenciación genética entre cada población y el resto de poblaciones albergadas en la misma isla fue expresado como 'promedio $F_{\rm sy}$ '. También se indican el tamaño muestral utilizado (n), altitud media (ALT) y número de palmeras en un radio próximo de 600m ($N_{\rm palm}$), en cada población estudiada. Ver correspondencia de los códigos de las poblaciones en Tabla 3.1.

El análisis de agrupación bayesiana de los individuos realizado con STRUCTURE bajo el modelo de mezcla genética y frecuencias alélicas correlacionadas, mostró un considerable nivel de estructura genética en cada isla analizada. Los resultados muestran dos grupos genéticos (K) tanto en Tenerife como en La Gomera (Figura 4.6), coincidiendo con el patrón observado en estas islas con el análisis regional bajo un modelo de frecuencias independientes entre poblaciones (ver Figura 4.3). Contrariamente, en Gran Canaria se detectó un incremento a 6 unidades o grupos genéticos, revelando un patrón de divergencia producido en muy pocas generaciones de aislamiento (Falush *et al.*, 2003; Rosenberg *et al.*, 2005). Concretamente, se observa que: (i) la mayoría de individuos muestreados en CAC, CAR, CTF y CTE fueron asignados con una alta probabilidad al grupo genético dominante en cada una de estas poblaciones, y (ii) tanto CMO, localizada al suroeste, como las poblaciones ubicadas al sur de la isla, y distribuidas entre la cuenca de Fataga (CFA y CAT) y cuenca de Tirajana (CSO y CST; Figura 4.6), exhibieron un considerable nivel de mezcla genética en la ascendencia de los individuos.

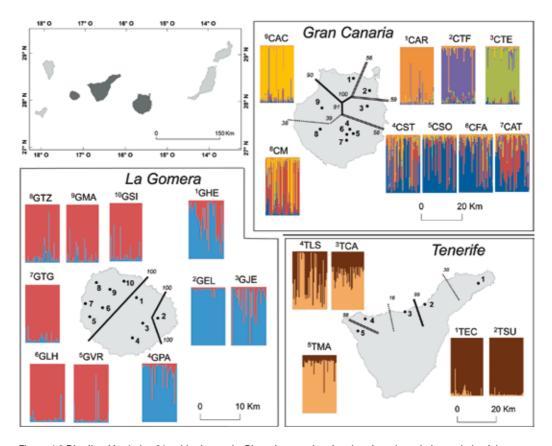


Figura 4.6 Distribución de las 24 poblaciones de *Phoenix canariensis* seleccionadas a lo largo de las islas centrales del archipiélago canario, analizadas de forma independiente, con los límites de diferenciación genética detectados por BARRIER (Manni *et al.*, 2004) sobre el contexto espacial: *'líneas sólidas y negras'* representan un nivel alto de soporte estadístico (con valores de *bootstrap* >75), *'líneas dobles'* muestran barreras con soporte moderado (50 < bootstrap < 75) y *'líneas discontinuas'* indican barreras de débil soporte (bootstrap < 50). También, se indican los patrones insulares de agrupación bayesiana estimados en STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), asumiendo un modelo de mezcla genética y frecuencias correlacionadas. Los diagramas representan la proporción de asignación de los individuos a cada grupo genético dentro de las poblaciones muestreadas, asumiendo como número óptimo de agrupaciones K=6 en Gran Canaria, y K=2 en Tenerife y La Gomera. Ver correspondencia de los códigos de las poblaciones en Tabla 3.1.

9	GVR GTG GTZ GLH GMA GSI GHE GEL GJE GPA		
GVR			
<u>1</u> G	0,026		
ZI	0,039 0,012		
GLH	0,004 0,013 0,028		
GMA	0,019 0,019 0,009 0,016		
GSI	0,078 0,062 0,051 0,068 0,053		
GHE	0,140 0,133 0,145 0,141 0,136 0,116		
GEL	0,208 0,184 0,185 0,198 0,195 0,180 0,096		
GJE	0,142 0,124 0,126 0,138 0,125 0,130 0,033 0,089		
GPA	0,171 0,146 0,139 0,161 0,149 0,130 0,047 0,082 0,005	TMA TLS TCA TSU TEC	
	TMA		
	TLS	0,170	
	TCA	0,068 0,138	
	TSU	0,310 0,188 0,331	
	TEC	0,241 0,145 0,230 0,121	CAC CAR CTF CTE CSO CST CAT CFA CMO
		CAC	
		CAR	CAR 0,127
		CTF	0,077 0,099
		CTE	0,140 0,218 0,125
		CSO	0,082 0,135 0,054 0,111
		CST	0,100 0,194 0,120 0,152 0,029
		CAT	0,108 0,178 0,074 0,120 0,008 0,042
		CFA	0,092 0,175 0,096 0,149 0,015 0,000 0,029
		CMO	0,076 0,167 0,100 0,157 0,057 0,085 0,073 0,074

Tabla 4.8 Matrices de valores pareados de diferenciación genética (F_{sr}. Weir y Cockerham, 1984), calculados con 8 microsatélites entre las poblaciones de *Phoenix canariensis* muestreadas en la misma isla (de izquierda a derecha: La Gomera, Tenerife y Gran Canaria). Ver correspondencia de los códigos de las poblaciones en Tabla 3.1.

Por otra parte, el patrón de diferenciación genética observado en las poblaciones de las islas más habitadas por P. canariensis se ajusta significativamente a un IBD, observando una correlación aún más fuerte entre las distancias genéticas y geográficas en el caso de La Gomera (Test de Mantel: r =0,780; P<0,001) que en Gran Canaria (r = 0,652; P<0,001). Inversamente, en Tenerife la distancia genética entre las poblaciones no guarda relación con la distancia geográfica entre las mismas (r =-0,078; P>0,05). La configuración espacial de las discontinuidades genéticas detectadas con el uso de BARRIER (Figura 4.6), coincide considerablemente con la agrupación de poblaciones máximamente diferenciadas obtenida con SAMOVA (Tabla 4.9), así como con el patrón resultante en STRUCTURE para el caso de Gran Canaria (Figura 4.6). Globalmente, la estructura genética espacial observada explica una proporción significativa de la variación genética total detectada en cada isla, estimada en un 10,13% en La Gomera, 11,89% en Gran canaria, y en un 15,85% en Tenerife (Tabla 4.9). En este último caso, la falta de significancia estadística en la diferenciación genética estimada entre los grupos (F_{cT} 16%, P>0,05; Tabla 4.10), podría estar relacionada con el calculo del p-valor disponiendo de prácticamente el mismo número de muestras que de grupos (I. Dupanloup, comunicación personal).

Fuente de variación	g,l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje variaciór				
(a) La Gomera (K= 3): [GEL] [GPA-GJE-G	HE] [GS	SI-GMA-GTG-G	rz-glh-gvr]					
Entre grupos	2	122,41	0,271	11,89	F _{CT} = 0,12 ***			
Entre poblaciones dentro de grupos	7	45,69	0,063	2,78	F _{SC} = 0,03 ***			
Dentro de las poblaciones	722	1.402,21	1,942	85,33	F _{S7} = 0,15 ***			
Total	731	1.570,32	2,276					
(b) Tenerife (K=4): [TEC] [TSU] [TCA-TMA] [TLS]								
Entre grupos	3	133,95	0,351	15,85	<i>F_{CT}</i> = 0,16 ns			
Entre poblaciones dentro de grupos	1	10,92	0,114	5,17	F _{SC} = 0,06			
Dentro de las poblaciones	395	691,58	1,751	78,98	F _{S7} = 0,21 ***			
Total	399	836,46	2,216					
(c) Gran Canaria (K=6): [CAR] [CTF] [CTI	E] [CST-	CSO-CFA-CAT	[CMO][CAC]					
Entre grupos	5	149,24	0,265	10,13	F _{C7} = 0,10 **			
Entre poblaciones dentro de grupos	3	14,95	0,038	1,45	F _{SC} = 0,02 ***			
Dentro de las poblaciones	625	1.445,68	2,313	88,41	F _{S7} = 0,11 ***			
Total	633	1.609,87	2,616					

NOTA: p-valor: ns, no significativo; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (Test de significación utilizando 1023 permutaciones)

Tabla 4.9 Resultados del análisis jerárquico espacial de la varianza molecular (SAMOVA), realizado de forma independiente en cada una de las islas centrales (Gran Canaria, Tenerife y La Gomera) mediante SAMO-VAv2.0 (Dupanloup *et al.*, 2002), y basado en los datos genéticos obtenidos en *Phoenix canariensis* con 8 loci microsatélites nucleares.

4.5 ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL A ESCALA FINA

Los análisis de autocorrelación espacial revelaron diferentes patrones de estructura genética espacial (SGS) a escala fina dependiendo de la población considerada, con valores del coeficiente de co-ancestro en la primera clase de distancia (F_1) que oscilaron fuertemente entre -0,011 (GSI) y 0,072 (TEC; Tabla 4.10 y Figura 4.7). En el caso de CAC, al ser la única población que incluyó todos los ejemplares presentes en la población (n=182), fue posible estimar con mayor fortaleza estadística la significancia del F_{ij} en cada clase de distancia. Luego, el autocorrelograma de CAC mostró una distribución no aleatoria de los genotipos sólo en la primera clase de distancia (F_1 =0,021; P<0,001), con las palmeras localizadas hasta 21m de separación entre ellas estando genéticamente más relacionadas que la media (Figura 4.7). Para el resto de poblaciones que se analizaron con una submuestra de entre 30 y 40 individuos cada una, sólo se observó una clara significación de la SGS en TLS y TEC (Tenerife), GEL (La Gomera) y CTE (Gran Canaria; Tabla 4.10; Figura 4.7).

La cuantificación de la SGS mediante el estadístico S_{ρ} reveló resultados similares a los mostrados en los autocorrelogramas, obteniendo valores significativos de las pendientes de regresión (b_{lin} y b_{log}) en las poblaciones mencionadas anteriormente, además de en CMO (Gran Canaria). No obstante, en general es notable que la gran mayoría de poblaciones muestran valores negativos en b_{lin} y b_{log} (Tabla 4.10), indicando que los individuos espacialmente cercanos entre sí están, en términos medios, más relacionados genéticamente que aquellos que están separados por mayores distancias mayores. Los valores medios de S_{ρ} obtenidos a partir de la regresión lineal de F_{ij} , se mostraron considerablemente elevados en 11 de las 24 poblaciones analizadas ($S_{\rho lin}$ >0,016; Tabla 4.10), mostrando valores superiores a los esperados para árboles con dispersión anemófila y zoócora (valores de S_{ρ} entre 0,0064 y 0,0088; ver Vekemans y Hardy, 2004). Sin embargo, este patrón varía al considerar la regresión logarítmica de F_{ij} , y los valores de $S_{\rho log}$ solo se mantienen superiores a 0,015 en las poblaciones que también mostraron valores significativos en el resto de parámetros de la SGS, aunque siendo notable que $S_{\rho lin}$ y $S_{\rho log}$ se mantienen casi constantes sólo en CAC, indicando un posible efecto del tamaño muestral en las estimaciones (Tabla 4.10).

La caracterización de la ocupación del hábitat de P. canariensis según la altitud media (ALT) a la que se encuentran las poblaciones de estudio, no se mostró significativamente relacionada con alguno de los parámetros genéticos locales analizados ($H_{o'}$, $H_{s'}$, $F_{ls'}$ promedio de $F_{ST'}$, S_{plin} y S_{plog}). No obstante, la abundancia de P. canariensis en el paisaje próximo a las poblaciones estudiadas (N_{palm} en un radio de 600m) afecta relativamente a los niveles de variabilidad y estructura genética local. Por un lado, la diversidad genética de las poblaciones (H_o y H_s) no guarda relación con la abundancia de la especie en los alrededores, y tampoco está asociada con la diferenciación genética y alcance de la SGS local observada (todas las correlaciones fueron P>0,05). Por otro lado, parece existir cierta relación negativa y significativa entre el número de palmeras en el entorno próximo, y tanto la SGS (S_{plin} y S_{plog}) como el grado de divergencia observado en cada población (promedio de F_{sr}). Asimismo, los niveles

Isla	Código	n	F ₁	b_{lin}	$\mathcal{S}p_{blin}$	b_{log}	Sp_{blog}
La Gomera	GVR	40	0,0211 ns	-0,000037 ns	0,0211	-0,0082 ns	0,0084
	GTG	40	-0,0039 ns	-0,000019 ns	0,0039	-0,0054 ns	0,0054
	GTZ	40	0,0166 ns	0,000003 ns	0,0166	-0,0037 ns	0,0038
	GLH	30	-0,0034 ns	0,000026 ns	-0,0034	0,0044 ns	-0,0044
	GMA	40	0,0045 ns	-0,000002 ns	0,0045	0,0011 ns	-0,0011
	GSI	40	-0,0105 ns	-0,000041 ns	0,0105	-0,0018 ns	0,0018
	GHE	38	0,0374 ns	0,000011 ns	-0,0374	-0,0070 ns	0,0073
	GEL	40	0,0418 ***	-0,000186 **	0,0420	-0,0283 ***	0,0295
	GJE	40	0,0250 ns	-0,000029 ns	0,0250	-0,0063 ns	0,0064
	GPA	34	0,0013 ns	0,000016 ns	-0,0013	0,0066 ns	-0,0066
Tenerife	TMA	40	0,0273 ns	-0,000062 ns	0,0274	-0,0175 ns	0,0180
	TLS	40	0,0346 **	-0,000240 ***	0,0716	-0,0303 ***	0,0314
	TCA	40	0,0229 ns	-0,000067 ns	0,0230	-0,0083 ns	0,0085
	TSU	40	0,0163 ns	0,000062 ns	-0,0162	0,0023 ns	-0,0024
	TEC	40	0,0715 ***	-0,000102 ***	0,0348	-0,0238 ***	0,0256
Gran Canaria	CAC	182	0,0212 ***	-0,000057 ***	0,0212	-0,0059 ***	0,0271
	CAR	40	-0,0008 ns	-0,000036 ns	0,0008	-0,0059 ns	0,0059
	CTE	40	0,0588 ***	-0,000102 ***	0,0589	-0,0267 ***	0,0283
	CST	40	0,0037 ns	0,000033 ns	-0,0037	0,0021 ns	-0,0021
	СМО	40	0,0236 ns	-0,000093 *	0,0237	-0,0149 *	0,0153

NOTA: ns, no significativo; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001

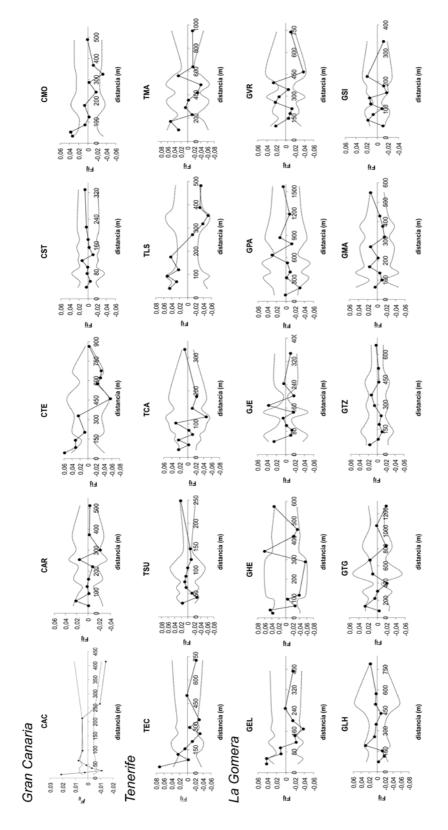
Tabla 4.10 Estructura genética espacial (SGS) a escala fina, analizada con 8 loci microsatélites nucleares en 20 poblaciones de *Phoenix canariensis*: 5 poblaciones en Gran Canaria, 5 poblaciones en Tenerife y 10 poblaciones en La Gomera. F_1 , promedio del coeficiente de co-ancestro (F_{ij}) en la primera clase de distancia; b_{lin} y b_{log} , pendientes de la regresión de los valores de F_{ij} en la distancia espacial lineal y logarítmica, respectivamente; estadísticos S_p (S_{plin} y S_{plog}), indicador del alcance de la SGS, calculado como -b (1 - F_1), y usando ambos tipos de pendientes (b_{lin} y b_{log}).

de SGS dentro de las poblaciones están positiva y significativamente relacionados con los niveles de endogamia y divergencia exhibidos por las poblaciones. En la Tabla 4.11 están todos los coeficientes de correlación de Spearman y su significancia entre las variables estudiadas.

	H _o	H _s	F_{IS}	promedio F_{ST}	$\mathcal{S} ho_{lin}$	$\mathcal{S} ho_{log}$
ALT	0,163	0,077	-0,377	-0,325	-0,104	-0,254
N_{palm}	-0,194	-0,214	-0,044	-0,507*	-0,475*	-0,481*
H_{\circ}	-	-	-	-0,243	0,226	0,188
H_{s}	-	-	-	-0,296	0,298	0,332
Sp_{lin}	0,226	0,298	0,465*	0,415	-	-
Sp_{log}	0,188	0,332	0,534*	0,589**	-	-

NOTA: p-valor, * P < 0,05; ** P < 0,01

Tabla 4.11 Correlaciones de Spearman entre los estadísticos de variación genética y los parámetros que caracterizan la ocupación del hábitat de *Phoenix canariensis* en el paisaje. ALT, altitud media de las poblaciones; $N_{\rm palm'}$, número de palmeras en un radio de 600m en torno a las poblaciones analizadas; $H_{\rm o'}$ heterocigosidad observada; $H_{\rm s'}$ heterocigosidad esperada balanceada; $F_{\rm ls'}$ coeficiente de endogamia; promedio $F_{\rm SP}$ grado de divergencia de las poblaciones; estadísticos $S_{\rm plin}$ y $S_{\rm plog'}$ indicadores del alcance de la SGS. Los coeficientes de correlación que mostraron una relación significativa se muestran en negrita.



tados en relación a la distancia geográfica de separación entre los individuos (d/). Las líneas discontinuas representan los intervalos al 95% de confi^anza, y los puntos que salen de estos márgenes indican una desviación significativa de la distribución espacial aleatoria (P<0,05). Figura 4.7 Autocorrelogramas de las 20 poblaciones de Phoenix canariensis analizadas a escala fina. Los promedios del coeficiente de co-ancestro (F.) están represen-



5. DISCUSIÓN

5.1 SISTEMA DE REPRODUCCIÓN Y FUNCIÓN DE DISPERSIÓN POLÍNICA

Los análisis moleculares de la nube polínica de *Phoenix canariensis* en la población de Acusa verde (CAC), revelaron una dispersión restringida con contribuciones paternas desiguales, que resultan en un nivel de moderado a bajo de diferenciación genética de los gametos masculinos que engendraron a las diferentes progenies maternas. A nivel poblacional, la estimación del número efectivo de padres que polinizan a cada madre ($N_{\rm ep}$ =5,8), se sitúa en la mitad del rango de valores obtenidos para especies polinizadas por animales, y en el límite inferior del indicado para especies anemófilas (Smouse y Sork, 2004), aunque siendo muy similar al valor observado en *Oenocarpus bataua*, una especie de palmera de amplia distribución ($N_{\rm ep}$ =5,4; Ottewell *et al.*, 2012). Las tasas de paternidad correlacionada variaron substancialmente entre las progenies maternas (oscilando entre 0 y 0,9), sin guardar relación con la distribución espacial de los machos con respecto a las hembras analizadas como 'madres'. Otros factores como la variación individual en la fecundidad masculina y la asincronía de la floración podrían haber determinado la variación observada en los parámetros reproductivos individuales.

La distribución de las distancias de apareamiento dentro de la población revelaron una reproducción no aleatoria, con un rápido decrecimiento de las frecuencias de dispersión efectiva de polen a cortas distancias pero al mismo tiempo, revelando frecuencias no despreciables (10%) de eventos de apareamientos a más de 200m, así como una distancia máxima de polinización efectiva que coincide con la distancia máxima de separación física entre individuos. Este patrón leptocúrtico se asemeja a los reportados para diferentes especies arbóreas anemófilas (Dow y Ashley, 1998; Streiff et al., 1999; Robledo-Arnuncio y Gil, 2005; Pakkad et al., 2008; Pluess et al., 2009). Teniendo en cuenta la geometría (con un núcleo más denso) y el pequeño tamaño de la población estudiada, las distancias medias de dispersión efectiva observadas (71m) indican que el polen se mueve a lo largo de toda el área estudiada, siendo acorde también con la contribución de la mayoría de machos muestreados en la paternidad de la cosecha de semillas. No obstante, las distancias medias de cruzamiento para P. canariensis son algo menores que las reportadas para especies arbóreas anemófilas en poblaciones pequeñas, como ocurre en Araucaria angustifolia (83m; Bittencourt y Sebben, 2007) o Pinus sylvestris (83m; Robledo-Arnuncio y Gil, 2005), pero mayores que las estimaciones obtenidas dentro de fragmentos de bosque de la especie anemófila Fagus sylvatica (42-59m; Piotti et al., 2012). A parte de la variación intraespecífica en la capacidad de dispersión, no sorprende encontrar en la literatura variaciones en la estimación de las distancias de dispersión en árboles, ya que la distribución de las distancias de apareamiento puede depender fuertemente de las propiedades geométricas y espaciales de la población como el tamaño, densidad, continuidad, forma, etc. (Hanson et al., 2008; Piotti et al., 2012). Serían necesarios otros estudios de dispersión polínica en P. canariensis dentro de áreas más continuas para

contrastar los patrones que se han observado en el palmeral de pequeño tamaño sobre el que se ha enfocado el presente estudio. Aún más, dado que muchos palmerales de *P. canariensis* se encuentran fragmentados por cultivos, o bajo diferentes tipos de manejo, sería interesante evaluar las consecuencias de la transformación del hábitat sobre los patrones de dispersión polínica de la especie (Hanson *et al.*, 2008; Piotti *et al.*, 2012).

En general, las correlaciones demográficas de los parámetros reproductivos revelaron que la paternidad correlacionada no está asociada con las distancias de polinización efectiva a nivel de las familias maternas, a diferencias de lo observado previamente en especies arbóreas (Robledo-Arnuncio y Gil, 2005; Fuchs et al., 2003). Tal y como fue sugerido por Ottewell et al. (2012), la independencia entre ambos parámetros reproductivos pone en entredicho las predicciones generales del número efectivo de padres como una simple función de la distancia efectiva de dispersión. Además, se espera que otros factores independientes a la distancias de dispersión afecten al número efectivo de contribuciones paternas bajo una dispersión pasiva, como es la densidad local y las asincronías fenológicas (Robledo-Arnuncio y Austerlitz, 2006; Hanson et al., 2008). Por un lado, no se detectó que la densidad local medida alrededor de las madres afectara al número efectivo de padres que engendraron las diferentes progenies. Sin embargo, aunque los patrones fenológicos de la floración no fueron medidos durante el ciclo de reproducción analizado, se ha observado cierto patrón difuso en la floración de P. canariensis, observando periodos de floración que abarcan entre 6 y 7 meses que contrastan con los cortos periodos de antesis de las inflorescencias, así como una considerable variabilidad individual en el esfuerzo reproductivo (Saro et al., 2015b). Toda esta variabilidad influye en la tasa diaria de solapamientos en la floración entre ambos sexos y podría explicar la diferenciación entre las nubes de polen efectivo recibidas por las diferentes madres (Streiff et al., 1999; Kitamoto et al., 2006). Por otra parte, las asincronías en la floración entre ambos sexos dentro de la población podrían incrementar las proporciones de inmigración de genes desde otros palmerales, si las hembras locales están receptivas mientras no hay polen local disponible. Más investigaciones en los solapamientos de los eventos de floración entre poblaciones, lo suficiente como para poder capturar la variación esperada a lo largo de los años (Pakkad et al., 2008), podrían ayudar a comprender el potencial del flujo de polen efectivo a largas distancias y su variación temporal en *P. canariensis*.

El modelo espacialmente explicito del sistema reproductor también rechazó el modelo nulo de una reproducción aleatoria, alcanzando los mejores ajustes con *kernels* de dispersión polínica biparamétricos y leptocúrticos. Varias de las funciones leptocúrticas (como las distribuciones potencial-exponencial y Weibull) podrían ser apropiadas para modelar la dispersión polínica de las especies a corta distancia, al menos sobre la escala del área estudiada, aunque extrapolar estos modelos sobre largas distancias es arriesgado, tal y como indican las medidas irrealistas obtenidas bajo estos ajustes (Tabla 3 del **Anexo I**). Es bien sabido que modelos que difieren considerablemente en las colas del *kernel* pueden igualmente ajustarse sobre los datos observados

(Austerlitz et al., 2004; Pluess et al., 2009), lo que denota la problemática caracterización de las distancias de dispersión polínica a corto y largo alcance de forma conjunta en una simple función ajustada sólo sobre cortas distancias (Goto et al., 2006). Independientemente de la incertidumbre en torno a las estimaciones de la cola del kernel obtenido (como se espera al utilizar datos obtenidos con análisis de paternidad; ver Niggemann et al., 2012), el modelo reproductivo mostró claramente una cantidad moderada de dispersión a larga distancia, con una tasa de inmigración estimada del 12% procedente de áreas externas a la estudiada. Esta estimación demuestra la potencial conectividad entre poblaciones de P. canariensis geográficamente asilados entre sí, y sugiere que la dispersión polínica efectiva en las especies puede ser mejor descrita por la combinación de los dos procesos: dispersión local y transporte hasta largas distancias (Streiff et al., 1999; Oddou-Muratorio et al., 2005; Pluess et al., 2009). Comparado con otras especies anemófilas, las tasas de inmigración de polen estimadas se sitúan por debajo de los valores observados en poblaciones continuas o ligeramente fragmentadas (Dow y Ashley, 1998; Streiff et al., 1999), pero similar a las estimaciones reportadas en poblaciones fuertemente aisladas (Robledo-Arnuncio y Gil, 2005). Esta cantidad significativa de inmigración de polen, en la medida en que pueda traducirse en flujo genético efectivo entre las plántulas reclutadas, podría contribuir considerablemente en la diversidad genética de las poblaciones, evitando la erosión de la variabilidad genética inducida por la deriva, tal y como se espera en poblaciones de pequeño tamaño (Hamrick, 2004; Bittencourt y Sebben, 2007; Pakkad et al., 2008). Al mismo tiempo, se esperaría que tal cantidad de flujo genético vía dispersión polínica a largas distancias, fuera suficiente para homogeneizar la variación genética neutral a mayores escalas, al menos entre subpoblaciones dentro de la misma isla. En este sentido, sería interesante evaluar la contribución de la dispersión de semillas en el flujo genético total y conectividad demográfica entre palmerales distantes.

Por otra parte, también se observó que la dispersión polínica no fue homogénea hacia todas las direcciones (*i.e.*, patrón anisotrópico), prevaleciendo el movimiento de polen efectivo hacia el noroeste de la población. Este patrón en una especie anemófila puede ser explicado por factores como el efecto de las direcciones de los vientos predominantes a escala regional y local, o por las turbulencias de aire generadas dentro del dosel arbóreo. No obstante, estudios previos en especies anemófilas han detectado una débil influencia de los vientos regionales sobre las direcciones de la dispersión polínica (Pluess *et al.*, 2009; Austerlitz *et al.*, 2007), sugiriendo que los vientos locales, probablemente variables a lo largo de los años, pueden determinar en mayor medida el movimiento del polen. En concreto, la población de Acusa Verde crece dentro de un pequeño barranco a sotavento de los vientos predominantes en la isla, siendo improbable que éstos impacten sobre los movimientos locales del polen. Asimismo, la estación en la que se produce la polinización de la palmera canaria (el verano) es climáticamente la más estable en las Islas Canarias, pudiendo encontrar la capa de inversión térmica en su menor cota altitudinal, entre 800-1000m, y creando un fuerte contraste climático entre las vertientes a barlovento y sotavento. Se podría esperar que el movimiento de polen en la población estuviera bajo la influencia de las

corrientes de aire altitudinales, ascendentes durante el día (vientos anabáticos) y descendientes por la noche (vientos catabáticos), a lo largo del barranco de orientación norte a noroeste (Figura 3.2), con la capa de inversión térmica actuando de cota altitudinal y la alta flotabilidad del polen de esta especie (con un diámetro máximo de 30 μ m, y generalmente entre 12 y 25 μ m (Reille, 1998)) favoreciendo su transporte aéreo altitudinal. De hecho, valdría la pena probar la posibilidad de que el intercambio de polen entre poblaciones estuviera restringido principalmente a palmerales localizados dentro del mismo barranco, o entre barrancos vecinos, siempre y cuando no se encuentren en extremos opuestos de la capa de inversión térmica. Asimismo, el hecho de que la mayor parte del polen efectivo se mueva hacia áreas localizadas en el noroeste de la población podría estar indicando que la polinización tiene lugar entrada la noche o al alba, siendo consistente con el momento de la antesis, en el hipotético caso que los patrones altitudinales de las corrientes de aire puedan verdaderamente afectar los patrones de apareamiento. En el núcleo más denso de la población, por otro lado, el polen probablemente está sujeto a turbulencias estocásticas verticales y laterales dentro del dosel arbóreo (Levin y Kerster, 1974; Di-Giovanni y Kevan, 1991; Streiff *et al.*, 1999), sin un resultado direccional predecible.

Finalmente, los niveles de diversidad genética observados en la población permanecen igualmente altos en la cosecha de semillas (valores de $H_{\rm e}$: 0,59 y 0,57, respectivamente), con niveles de riqueza alélica también parecidos (valores de $N_{\rm a}$: 3,18 y 3,08, respectivamente). Éstos resultados parecen ser consistentes con la idea de que el flujo genético en P. canariensis a través de la dispersión polínica contribuye a mantener los niveles de diversidad genética a lo largo de las generaciones. Por otro lado, se detectó un exceso de heterocigotos tanto en los adultos como en la cosecha de semillas, que podría ser debido a las tasas de inmigración de polen, ya que si esta ocurre entre poblaciones genéticamente divergentes puede incrementar los niveles de heterocigosis en las semillas. Aún más, en poblaciones pequeñas de especies estrictamente alógamas se puede esperar cierto grado de exceso de heterocigotos, explicando los niveles observados tanto en adultos como semillas (Balloux, 2004).

5.2 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA A ESCALA REGIONAL

Los resultados obtenidos con 8 loci microsatélites a nivel regional no respaldan la idea de que P. canariensis posee niveles altos de diversidad genética, contrastando con lo observado en estudios previos en otros endemismos canarios mediante a el uso de isoenzimas (Francisco-Ortega et al., 2000; González-Pérez et al., 2004; Pérez de Paz y Caujapé-Castells, 2013). A pesar de varias de las características de esta especie como ser perenne, dioica, reproducirse necesariamente por cruzamiento y poseer el potencial para dispersar sus propágalos reproductivos a largas distancias, la media de diversidad genética poblacional observada ($H_{\rm e}$ =0,48) es relativamente baja. Aunque se trata de un valor medio de heterocigosidad esperada similar al indicado para

especies endémicas analizadas con marcadores microsatélites (H_a =0,42; Nybom, 2004), fue menor que los valores detectados con este tipo de marcador en otras especies arbóreas endémicas de islas oceánicas y que portan frutos carnosos como Picconia azorica (H_e=0,57; Martins et al., 2013), Morella rivas-martinezii (H_o=0,56; González-Pérez et al., 2009), Olea europea ssp. guanchica $(H_{\rm p}$ =0,63; García-Verdugo et al., 2010), Sambucus palmensis $(H_{\rm p}$ =0,50; Sosa et al., 2010) o Sorbus aria (H_a=0,68; Sosa et al., 2014), las cuales exhiben niveles moderados de diversidad genética como los que frecuentemente son descritos para especies alógamas y longevas (Nybom, 2004). No obstante, es notable la fuerte varianza detectada en las estimaciones de diversidad genética poblacional a lo largo del archipiélago (Tabla 4.5), las cuales además, se mostraron significativamente relacionadas a factores como la distancia hasta el continente y la edad geológica de las islas. Así pues, las islas más antiguas (y más cercanas al continente), Fuerteventura y Gran Canaria, albergan poblaciones que exhiben los mayores niveles de diversidad genética, y contrariamente, las poblaciones muestreadas en la isla de La Palma (la isla más occidental y reciente, entre las consideradas) muestra los menores niveles de diversidad genética. Este patrón puede ser explicado por el hecho de que ha pasado mucho más tiempo desde el establecimiento de las poblaciones en las islas más antiguas, lo que representa mayores oportunidades para superar el efecto fundador asociado a la colonización de las islas, así como la posibilidad de acumular una mayor cantidad de variación genética por mutación, recombinación y flujo genético desde otras poblaciones (Stuessy et al., 2014).

Según el procedimiento de permutación alélica descrito en Hardy et al. (2003), y en base a la batería de microsatélites utilizados en este estudio, no se detectó una señal filogeográfica a lo largo de las poblaciones de P. canariensis, indicando altas tasas de migración y/o relativamente pocas generaciones de aislamiento (Hardy et al., 2003). La detección de un fuerte patrón de 'aislamiento por distancia' (Figura 4.4) y la similitud observada entre las islas occidentales (según los resultados de BARRIER y SAMOVA), están en concordancia con la última idea: considerables niveles de flujo genético y/o que una reciente divergencia de las poblaciones aún juega un importante papel en las estructura de las poblaciones insulares a nivel regional. Si las poblaciones hubieran estado sujetas a muchas generaciones de aislamiento reproductivo, se esperaría una mayor estructura genética regional, particularmente entre islas (Bottin et al., 2005). No obstante, todos los análisis aplicados en base a las distancias genéticas entre poblaciones (SAMOVA, PCoA y árbol NJ) mostraron una consistente agrupación de las mismas en 3 grupos: 'Fuerteventura', 'Gran Canaria' y el tercer grupo compuesto por el resto de las islas estudiadas (Tenerife, La Gomera, La Palma y Lanzarote), entre los cuales se mantiene el 19% de la variación genética total de la especie. En este sentido, la estructura genética mencionada también es acorde con el patrón de distribución de los alelos privados, los cuales principalmente aparecen en las poblaciones muestreadas en Fuerteventura y Gran Canaria (Tabla 4.5), sugiriendo un mayor grado de asilamiento en las islas orientales, tal y como se ha observado en especies como Rumex bucephalophorus subs canariensis (Talavera et al., 2013) o Olea europaea subsp. guanchica (García-Verdugo et al., 2009).

La implicación potencial del flujo genético mediado por el hombre sobre la estructura genética observada merece cierta atención. A diferencia de otras especies arbóreas de relevante interés económico (Logossa et al., 2011; Balaquer et al., 2011), el patón observado de decrecimiento de la variación genética desde el este al oeste, así como la significativa estructuración de las poblaciones localizadas en las islas orientales, difícilmente pudo haber sido el resultado de la propagación mediada por el ser humano. No obstante, la única población muestreada en Lanzarote (LHA) es una excepción, ya que no se ajusta a ninguno de los patrones generales que se han descrito. En primer lugar, dada la cercanía geográfica con Fuerteventura (sólo 10,6 Km separan ambas islas) y la historia biológica (Reyes-Betancort et al., 2008) y geológica que comparten (ambas islas constituyeron una única unidad hace 10.000 años; Fernández-Palacios et al., 2011), se podría esperar que ambas islas también estuvieran genéticamente emparentadas, lo cual no ha sido el caso de acuerdo con todos los análisis realizados (Figura 4.2, Figura 4.3 y Online Resource 2 del Anexo II). Además, el ajuste de los datos genéticos a un modelo IBD claramente mejoró al excluir esta población, confirmando que se trata de un caso atípico en los patrones generales. En segundo lugar, los registros históricos disponibles en relación a la presencia de P. canariensis en las Islas Canarias también son coherentes con la idea del origen antrópico de esta población. Por ejemplo, si bien la Historia Natural de Plinio señala la presencia de palmeras en las Islas Afortunadas (Hatic et palmeris caryotas ferentibus (libro 6, Capítulo 32), las primeras referencias históricas fiables se encuentran en Le Canarien, en la cual Le Bontier y Le Verrier (~1402) documentan la relación de la Conquista y exploraciones realizadas por los normandos a principios del siglo XV en las Islas Canarias, y no incluyen a P. canariensis en las descripciones de la vegetación de Lanzarote. Tampoco existen referencias de P. canariensis en los trabajos escritos de George Glas (1764), quien describió detalladamente las Islas Canarias, y especialmente la isla de Lanzarote donde permaneció un tiempo. La primera cita de esta especie es por parte de un autor anónimo que compiló escritos sobre Lanzarote y fue publicado en 1776, en donde se menciona la presencia de algunas palmeras en la población de Haría (Reyes-Betancort et al., 1998, y las referencias allí incluidas). Las evidencias escritas sugieren que la población de P. canariensis muestreada en Haría pudo haberse plantado en las postrimerías del siglo XVIII a partir de especímenes portados desde otras islas, con el objetivo de proveer la materia prima para la cestería, una de las actividades artesanales más importantes en la época (Madoz, 1845-1850). Sin embargo, estos hechos no descartan la posibilidad de que pequeños parches o individuos aislados de P. canariensis se encuentren actualmente en Lanzarote como resultado de eventos naturales de dispersión y colonización, o que la alta transformación geológica que ha experimentado esta isla a lo largo de sus historia, pudiera haber extinguido o reducido drásticamente las poblaciones naturales en esta isla.

Por otro lado, los resultados del análisis demográfico mediante el método ABC, apoyaron consistentemente el escenario en el cual la población genética ancestral de *P. canariensis* divergió siguiendo una progresión de este a oeste acorde con la configuración de lineal del archipiélago canario. Es más, la reducción progresiva de las estimaciones de los tamaños poblacionales efectivos

ancestrales, tal y como indicó el análisis ABC (NA3 < NA2 < NA1), así como el patrón de IBD observado, sugieren que P. canariensis colonizó inicialmente el archipiélago canario siguiendo un modelo steppina-stone. Este patrón de colonización ha sido descrito en varios taxones canarios (Juan et al., 2000; Emerson, 2002; Talavera et al., 2013) así como en otros archipiélagos oceánicos (Harbaugh et al., 2009; Yamada y Maki, 2012). Sin embargo, las simulaciones de ABC, en concordancia con los resultados obtenidos con BARRIER y SAMOVA, también sugieren que el modelo de diferenciación stepping-stone no se sostiene en las islas occidentales, indicando claramente una divergencia común para estas islas (i.e. escenario 3) más que la diferenciación secuencial completa de este a oeste en el archipiélago (i.e. escenario 4). Estudios adicionales basados en información obtenida con marcadores plastidiales ayudarán a dilucidar el patrón y la ruta de colonización seguida por esta especie. Por otra parte, la señal moderada de expansión de las poblaciones observada en las islas centrales (Gran Canaria, Tenerife y La Gomera) coincide con el hecho de que estas islas albergan el mayor número de palmerales de P. canariensis. Así pues, la expansión demográfica detectada podría estar indicando expansión geográfica de la especie en cada isla. Las expansiones geográficas, unido al patrón general de IBD detectado a lo largo del archipiélago, podría generar la genealogía más agrupada que se ha observado en los resultados del STRUCTURE (Excoffier et al., 2009b; Logossa et al., 2011) para las islas centrales (Figura 4.3).

En relación a los tiempos de divergencia estimados para los principales grupos genéticos de P. canariensis en el archipiélago, el tiempo inferido para la divergencia de la isla más oriental del supuesto ancestro continental fue bastante reciente (en torno a los 139.000 años atrás), en el periodo Pleistoceno. Estas estimaciones deben ser tomadas con cautela ya que el modelo aplicado asumió distribuciones de partida para las parámetros bastante flexibles por la falta de información previa en aspectos demográficos y evolutivos de P. canariensis, así como las mismas tasas de mutación para todos los loci, factores que pueden causar sesgos en las estimaciones. No obstante, independientemente de la incertidumbre en torno a la datación exacta de la colonización inicial de P. canariensis en las islas, el método ABC apoyó fuertemente un patrón reciente de divergencia comenzando en la isla de Fuerteventura. Además, la colonización de P. canariensis en las islas durante el Pleistoceno tardío es coherente por varias razones. Primero, es un taxón ampliamente distribuido a lo largo del archipiélago sin haber experimentado eventos de especiación, a pesar de poder estar bajo fuertes presiones selectivas a lo largo de su distribución teniendo en cuenta el amplio rango de zonas ecológicas que habita. Alternativamente, la falta de especiación podría ser explicada por un flujo genético extensivo a lo largo de las subpoblaciones debilitando la estructura genética a lo largo del archipiélago (García-Verdugo et al., 2014), pero los resultados no apoyan este escenario, al menos para las islas orientales. Segundo, otros taxones leñosos de amplia distribución que muestran considerables niveles de variación genética en las islas se cree que han colonizado esta región durante el Pleistoceno (Fernández-Mazuecos y Vargas, 2010). Sin embargo, P. canariensis muestra niveles moderados o bajos de variación genética, los cuales pueden ser explicados por una presencia reciente en el archipiélago. Además, el patrón de distribución de esta especie, con un bajo número de individuos dispersos en la isla de El Hierro (y potencialmente en Lanzarote), unido con una reciente diferenciación genética entre poblaciones de las islas occidentales, sugieren que han sucedido pocos eventos de dispersión desde el establecimiento de las poblaciones a lo largo del archipiélago.

5.3 DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA A ESCALA INSULAR

Uno de los objetivos del diseño experimental a escala insular consistió en aumentar el tamaño muestral de individuos y poblaciones analizadas con el propósito de incrementar la precisión de los análisis establecidos, y en todos los casos no dio lugar a variación en los niveles de diversidad genética de las poblaciones de P. canariensis. En la mayoría de los casos, las poblaciones alcanzan valores de diversidad genética de bajos a moderados (Tabla 4.7), comparables a los obtenidos con microsatélites nucleares para P. dactylifera en diversos cultivos de esta especie en el norte de África (rango observado de H_e : 0,476- 0,614; Zehdi et al., 2015). Por otro lado, las estimaciones confirman el fuerte patrón decreciente de este a oeste (correlación de Spearman entre la Longitud and H_a : r=0,604; P<0,01), por lo que el valor de diversidad genética alcanzado en las distintas islas y poblaciones es un reflejo de la colonización secuencial y relativamente reciente de P. canariensis a lo largo del archipiélago, tal y como se mencionó en apartados anteriores. Además, prácticamente todas las poblaciones siguen ajustándose a las proporciones esperadas según el equilibrio de HW, con sólo dos excepciones que muestran un déficit de heterocigosidad (GSO y CAT), aunque posiblemente relacionado con la incidencia del efecto Wahlund debido a que los ejemplares se distribuyen en grupos relativamente distanciados entre sí (González-Pérez et al., 2004).

En general, los resultados señalan que *P. canariensis* responde a lo esperado para una especie alógama y longeva (Petit y Hampe, 2006), en la cual existe solapamiento de generaciones y se mantiene la mayor proporción de la variabilidad genética (> 79%) dentro de las poblaciones (Tabla 4.9). Incluso, con su aparente habilidad para la dispersión y establecimiento de las poblaciones en una gran amplitud de hábitats, deberíamos quizás esperar un menor grado de estructuración genética y menores niveles de diferenciación genética a los encontrados (>10%; ver Nybom, 2004). No obstante, el patrón observado en *P. canariensis* es acorde a varios estudios basados en endemismos canarios de amplia distribución y habilidades para la dispersión a larga distancia, que muestran una considerable estructura genética a nivel intra-insular (Gómez *et al.*, 2003; García-Verdugo *et al.*, 2010; Mairal *et al.*, 2015).

De forma general y para *P. canariensis*, se puede trazar un paralelismo entre los patrones observados en Gran Canaria y La Gomera. En primer lugar, ambas islas albergan el 86% del total de los ejemplares naturales de *P. canariensis* presentes en las Islas Canarias (42% en Gran Canaria y 44%, en La Gomera). Además, presentan una topografía similar, caracterizada por una

cadena de profundos barrancos conectados en sus cumbres como resultado de la predominancia de los procesos erosivos (ver ontogenia de las islas formadas por puntos calientes descrita en Fernández-Palacios et al., 2011). Las condiciones de humedad edáfica ofrecida en los fondos de barrancos favorecen considerablemente el establecimiento y crecimiento de las poblaciones de esta especie, por lo que posiblemente, la mayor disponibilidad de hábitats apropiados para P. canariensis en ambas islas, pudo favorecer una rápida expansión geográfica a lo largo del territorio insular. En este sentido, y aunque la distribución actual de la especie representa un vestigio de la existente en el pasado, las evidencias paleoecológicas sugieren una importante representación de P. canariensis en estas dos islas durante el comienzo del Holoceno (Nogué et al., 2013; de Nascimento et al., 2015). En segundo lugar, el patrón de diferenciación genética de las poblaciones se ajusta a un modelo de 'aislamiento por distancia' (Test de Mantel: r =0,652 en Gran Canaria y r=0.780 en La Gomera, en ambos casos P<0.001). Teniendo en cuenta el potencial dispersivo a largas distancias de P. canariensis, así como la abundancia de palmerales naturales en estas dos islas, se podría esperar un gran alcance del flujo genético y una débil estructura genética de las poblaciones, al menos a escala insular. Sin embargo, el hecho de que P. canariensis haya colonizado recientemente el archipiélago, y el posible efecto restrictivo que pueda tener la orografía insular sobre la dispersión de la especie, favoreciendo el intercambio genético entre palmerales ubicados en el mismo barranco o en las cercanías, parecen factores potenciales en el trazado de un cambio gradual de las frecuencias alélicas de las poblaciones con respecto a la distancia geográfica.

La genealogía más agrupada que se observa en el caso de Gran Canaria, además de exhibir un patrón de IBD más débil que en La Gomera, sugieren que la historia demográfica de las poblaciones ha podido estar influenciada por un contexto más complejo de aislamiento reproductivo, pudiendo ser resultado de la divergencia producida entre las poblaciones en sólo pocas generaciones de aislamiento (Falush *et al.*, 2003). Un escenario que coincide con el fuerte impacto que ha ocasionado el ser humano sobre los bosques canarios desde su llegada a las Islas Canarias (Naranjo, 2002; Morales, 2009), afectando al hábitat de la palmera canaria y fragmentando la continuidad espacial de sus poblaciones, aunque con menor alcance en la isla de La Gomera. Esta idea es coherente con recientes investigaciones paleoecológicas en la isla de Gran Canaria, que confirman una importante disminución de los registros de polen fósil de *P. canariensis* durante el Holoceno tardío asociado a los cambios humanos (de Nascimento *et al.*, 2009, 2015), en comparación con La Gomera, donde el decremento de *P. canariensis* durante el mismo periodo es menos pronunciado, y en cualquier caso debido a cambios climáticos (Noqué *et al.*, 2013).

Finalmente, la fuerte separación de la población GEL (La Gomera) recreada en todos los análisis responde posiblemente a un grado de introgresión genética de la especie congénere y alóctona, *Phoenix dactylifera*, masivamente introducida en el archipiélago canario, incrementado la diversidad y diferenciación genética observada en este palmeral. Los resultados obtenidos con

un análisis exploratorio en STRUCTURE con toda la base de datos e incluyendo muestras de diferentes especies congéneres de *Phoenix* así lo indican (datos aún sin publicar), respondiendo al patrón observado en otros estudios focalizados en palmerales mixtos de ambas especies (González-Pérez *et al.*, 2004).

Por el contrario, es posible que los procesos demográficos sobrellevados por P. canariensis en Tenerife estén marcados por un escenario de mayor aislamiento reproductivo, desarrollando un cambio discontinuo y desigual de las frecuencias alélicas con independencia de la distancia geográfica (Test de Mantel: r=-0,078; P>0,05). A diferencia de las islas anteriores, la parte central de la isla de Tenerife ha sufrido una intensa transformación debida a numerosos episodios de vulcanismo secundario y mega deslizamientos gravitacionales (Ancochea et al., 1999; Boulesteix et al., 2013) que han determinado su forma actual, caracterizada por una fuerte pendiente pero sin profundos barrancos en la parte central por el poco tiempo que ha pasado de exposición erosiva. Además, la mayor parte del sur de la isla esta cubierta por lavas fonolíticas, originadas por el vulcanismo post-erosivo del volcán Las Cañadas (Ancochea et al., 1999), sobre las cuales se han desarrollado suelos de propiedades ácidas y de gran permeabilidad. Todo ello ha dado lugar a un contexto de menor disponibilidad del hábitat necesario para el establecimiento de P. canariensis, siendo coherente con la escasa representación de esta especie en la isla (≈5% del total de ejemplares presentes en el archipiélago canario), así como la práctica inexistencia de palmerales naturales en el sur de la isla (ver Figura 3.5). En este sentido, las pruebas paleoecológicas también apoyan lo comentado para esta isla, apuntando hacia una baja representación de P. canariensis al comienzo del Holoceno a diferencia de La Gomera y Gran Canaria, mostrando además un importante decremento tras el establecimiento de los asentamientos humanos en esta isla (de Nascimento et al., 2009). Es posible que el efecto del impacto humano sobre la continuidad espacial de las poblaciones de palmera canaria, hayan acrecentado aún más el aislamiento geográfico de las poblaciones en Tenerife, conduciendo por un lado a mayores niveles de diferenciación genética y a una reducción de los niveles de diversidad genética de las poblaciones en esta isla (Tabla 4.7).

5.4 ESTRUCTURA GENÉTICA ESPACIAL (SGS) A ESCALA FINA

Los niveles de la SGS detectados a escala fina fueron notablemente diferentes entre las poblaciones analizadas, aunque es posible que las estimaciones puedan estar sujetas a cambios al aumentar los tamaños muestrales (Vekemans y Hardy, 2004; Cavers *et al.*, 2005). No obstante, a la luz del parámetro más robusto S_{ρ} , más de la mitad de las poblaciones analizadas exhibieron valores considerablemente elevados ($S_{\rho lin}$ >0,016; Tabla 4.10), comparables con aquellos referidos para especies con restricciones en la dispersión de polen y semillas, especialmente similares al de las especies barócoras (S_{ρ} =0,028; Vekemans y Hardy, 2004). No obstante, también fueron semejantes a los observados en especies de gran potencial dispersivo pero en áreas fragmentadas, como

ocurre en *Pinus pinaster* (S_p =0,026; De Lucas *et al.*, 2009), o en masas de baja densidad local, como en *Sorbus torminalis* (S_p =0,017; Oddou-Morutorio *et al.*, 2004). Los patrones de SGS a escala fina surgen principalmente de una compleja interacción de factores como la magnitud de la dispersión de polen y semillas, la estructura genética de la nube polínica y el conjunto de semillas dispersadas, y la densidad poblacional (Vekemans y Hardy, 2004). No obstante, los niveles de SGS entre individuos próximos también pueden variar fuertemente entre los estadios de crecimiento, siendo generalmente más potentes en los primeros estadios de vida y disminuyendo en el tiempo. De esta manera, en especies arbóreas se pueden observar niveles bajos de SGS a escala fina a pesar de llevar a cabo una dispersión polínica predominantemente a cortas distancias, gracias a procesos de reducción demográfica de plántulas genéticamente emparentadas ya sea por depresión endogámica (Nakanishi *et al.*, 2015), competencia intraespecífica o acción de enemigos naturales cerca de los parentales (Hampe *et al.*, 2010; Choo *et al.*, 2012).

En el caso de *P. canariensis*, aunque la mayor proporción de eventos de dispersión polínica ocurran a corta distancia, las medias y largas distancias de polinización efectiva detectadas en Acusa Verde (CAC) sugieren que la especie exhibe un amplio rango de dispersión polínica, y por tanto, se esperaría una mezcla eficiente de los genes dentro de la población que impidiese la formación de la SGS entre individuos próximos. No obstante, esta población exhibió una clara agregación de genotipos emparentados a menos de 20m de separación entre ejemplares, y en otras poblaciones o se confirma o se intuye la existencia de estructuras familiares locales (Tabla 4.10; Figura 4.7). Varios estudios han sugerido que la formación de la SGS dentro de las poblaciones es mayormente desencadenada por las restricciones en la dispersión de semillas que en el flujo de polen (Chung et al., 2003; Hampe et al., 2010; Choo et al., 2012; Heer et al., 2015). Especialmente en árboles que portan una gran cantidad de semillas y muchas caen por gravedad, como es el caso de la palmera canaria, se puede producir una agregación de la progenie cerca de las plantas madres incluso exhibiendo una dispersión polínica de gran alcance (Wang et al., 2011; Heer et al., 2015). No obstante, esta idea no es suficiente para explicar la variabilidad observada en las estimaciones de SGS entre poblaciones, exhibiendo en muchos casos un señal prácticamente nula de SGS. Además, por lo que se sabe hasta ahora, en la dispersión de semillas de la palmera canaria también participan las aves y los lagartos, que generalmente dispersan a largas y medias distancias, favoreciendo un solapamiento de las sombras de semillas dispersadas por diferentes vectores. Asimismo la notable acción de los escolítidos de las semillas de palmeras (Coccotrypes dactyliperda y Dactylotrypes uyttenboogaarti) podría tener un potencial efecto en la reducción de genotipos emparentados, impidiendo el establecimiento de los mismos cerca de la madre. Un análisis que aborde conjuntamente los sistemas de dispersión de polen y semillas, así como de los factores que operan en los procesos post-dispersivos de P. canariensis, podría revelar más información acerca de la contribución relativa de cada componente de la dispersión en el flujo genético efectivo entre las plántulas reclutadas y en los patrones de SGS a escala fina.

Por otro lado, los cambios físicos producidos sobre la distribución espacial de la especie por pérdida y/o fragmentación del hábitat, también pueden promover variaciones en los patrones de SGS a escala fina, a pesar de que la especie tenga de forma intrínseca gran habilidad para la dispersión (Oddou-Morutorio et al., 2004; Wang et al., 2011). Los resultados en P. canariensis muestran una correlación significativa entre el grado de divergencia genética de las poblaciones (promedio de $F_{s,t}$) y el alcance de la SGS a escala fina en cada una de ellas (según los valores de S_a ; Tabla 4.11), así como una relación negativa entre ambos parámetros y la abundancia de esta especie en el paisaie próximo a las poblaciones estudiadas. Estas tendencias deian entrever que las trasformaciones demográficas que ha podido sufrir el hábitat de P. canariensis como consecuencia del impacto humano (sin descartar otros factores), resultando en cambios de densidad y aislamiento geográfico de las poblaciones, podría haber causado un incremento de la estructura genética a diferentes escalas geográficas. En este sentido, la fragmentación y reducción del hábitat, puede llevar implícito la erosión de la diversidad genética, la pérdida de sitios favorables para el establecimiento de las plántulas, y variaciones en los kernels de dispersión de polen y semillas (suscitando un movimiento no aleatorio de los dispersores), que de forma conjunta promueven la distribución espacial de genotipos emparentados, y por tanto, el aumento del alcance de la SGS a escala fina (Oddou-Morutorio et al., 2004; Mayol et al., 2012). No obstante, los niveles de diferenciación genética y SGS a escala fina en las distintas poblaciones, no se corresponden con una pérdida de diversidad genética de las poblaciones (Tabla 4.11), o al menos en la isla de Gran Canaria que exhibe poblaciones genéticamente muy diversas pero también notablemente diferenciadas del resto (Tabla 4.7), y con patrones de SGS a escala fina. Tampoco parece que los niveles de diversidad genética estén influenciados por la continuidad espacial de la distribución de P. canariensis a lo largo del paisaje, sugiriendo cierta resiliencia de la diversidad genética frente a las perturbaciones demográficas. Éste patrón es coherente con resultados previos que apuntan a un débil efecto de la fragmentación sobre las estimaciones de diversidad genética en especies longevas y anemófilas (Hamrick, 2004; Hampe y Petit, 2006; Wang et al., 2011), o al menos en pocas generaciones después de producirse los cambios demográficos, a diferencia de la SGS a escala fina que se establece en pocas generaciones (De Lucas et al., 2009; Browne et al., 2015). Además, el efecto de los cambios demográficos dependerá de la historia de la perturbación y de las características del hábitat y las poblaciones, pudiendo una misma especie exhibir diferentes respuestas en la SGS (Wang et al., 2011). Teniendo en cuenta la amplitud ecológica que abarca la distribución de P. canariensis, no sería ilógico pensar que determinadas poblaciones fueran más vulnerables que otras a sufrir los efectos de la fragmentación y/o reducción del hábitat en la formación de la SGS entre individuos próximos. En definitiva, las características genéticas de las poblaciones varían en su sensibilidad frente a las perturbaciones demográficas, y particularmente la SGS a escala fina puede ser un útil indicador de los cambios genéticos producidos en áreas recientemente fragmentadas (Wang et al., 2011; Browne et al., 2015). En el caso de P. canariensis, sería conveniente investigar más a fondo las causas que determinan la SGS entre individuos próximos así como las características de las poblaciones y el hábitat que pudieran acrecentar la sensibilidad de la especie ante cambios demográficos.

5.5 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

Los niveles de diversidad y estructuración genética de las poblaciones naturales, deben constituirse como elementos a tener en cuenta en los posibles programas y planes de conservación y obtención de recursos genéticos de *P. canariensis*.

Por un lado, ya que la población de Acusa Verde es la única catalogada como fuente semillera para la isla de Gran Canaria, han de tenerse en cuenta algunos de los patrones genéticos observados en el diseño de estrategias de muestreo para las colectas de germoplasma destinado a la conservación *ex situ*. La estructura genética de la nube polínica y la gran variabilidad detectada en las tasas de paternidad correlacionadas entre familias maternas, sugieren que las colectas deben establecerse de forma abundante y diversificada, y colectando semillas procedentes tanto de distintas hembras de la población como entre las diferentes infrutescencias de cada hembra. Por otro lado, la estructura genética espacial observada y las distancias medias de polinización efectiva estimadas, apuntan a que se debería respectar una distancia mínima de separación de entre 20m y 70m entre las madres con objeto de reducir el grado de parentesco entre familias maternas. Al mismo tiempo, esta medida debería combinarse con una colecta que alterne entre germoplasma procedente de distintas hembras entre los diferentes ciclos reproductivos.

Por otro lado, dada la evidencia de una cantidad significativa de polen inmigrante procedente de larga distancia, no puede descartarse la posibilidad de que se puedan producir procesos de introgresión genética desde especies alóctonas del género *Phoenix*. Ello hace que la presencia de ejemplares de *Phoenix dactylifera*, cultivados y plantados extensamente en parques y jardines, y asilvestrados en muchas áreas de las Islas Canarias próximas a poblaciones naturales de *P. canariensis*, supongan una gran amenaza para la conservación de este endemismo insular, por lo que se torna necesario evaluar el nivel de intercambio de polen entre áreas naturales y plantadas.

Uno de los intereses en la conservación de especies de amplia distribución, es mantener la representación de sus poblaciones a lo largo del gradiente ambiental que habitan, ya que puede llevar implícitos procesos de adaptación local de las poblaciones a diferentes condiciones climáticas y medioambientales. La mayor proporción de variabilidad genética de *P. canariensis* fue observada dentro de las poblaciones, aunque a la vez exhibiendo un considerable nivel de estructura genética a escala insular. Ello sugiere que se deba conservar una amplia representación de palmerales naturales, respetando el número mínimo de unidades genéticas detectadas en cada isla, y evitando tanto el trasiego de ejemplares entre islas (especialmente para el caso de Haría por su carácter antropogénico) como la plantación masiva de especímenes de palmera canaria sin mantener un control sobre la procedencia del material de base utilizado. Finalmente,

y ya que los procesos de diferenciación y estructuración genética de las poblaciones muestran una mayor sensibilidad a la continuidad espacial de la especie a lo largo del paisaje, se debe evitar los procesos de fragmentación, especialmente en islas donde la especie se ha establecido recientemente como en La Palma, ya que pueden comprometer la estabilidad evolutiva de las poblaciones naturales.



CONCLUSIONES

- 1. El sistema de reproducción de la palmera canaria (*Phoenix canariensis* H. Wildpret) en un palmeral pequeño y relativamente aislado, se caracteriza por una dispersión restringida y unas tasas de paternidad fuertemente variables entre las diferentes progenies maternas. La distribución espacial de los machos con respecto a las hembras no explican estas marcadas diferencias, y son necesarios otros factores como la variación individual de la fecundidad masculina o la asincronía de la floración para poder explicar el patrón observado.
- 2. La palmera canaria muestra una distribución de las distancias de polinización efectiva claramente leptocúrtica, aunque con un flujo de polen efectivo que abarca gran parte de la extensión del área estudiada y en el que participa la mayoría de ejemplares masculinos presentes en la población. Éste patrón se traduce en una distancia media de dispersión polínica efectiva de 71m, según los análisis de paternidad individuales, o de 200m, según el modelo espacialmente explícito de la reproducción, lo que proporciona un dato de partida a la hora de definir las distancias mínimas a respetar en la conservación de zonas que se destinan a la recolección de materiales de base de reproducción.
- 3. La capacidad de la especie para el flujo polínico a larga distancia se manifestó en la presencia de una frecuencia perceptible de eventos de fertilización a mas de 200m (10%), así como en una moderada tasa de inmigración de polen (12%) procedente de áreas externas a la estudiada, demostrando la potencial conectividad entre palmerales geográficamente separados.
- 4. La distribución espacial de los eventos de polinización efectiva revelaron un patrón direccional que parece consistente con los movimientos altitudinales de las corrientes de aire, así como un gradiente de éxito reproductivo entre los ejemplares masculinos que participan en la reproducción. Dicho gradiente se ve influenciado positivamente por la altura de los individuos pero muestra independencia a la posición de los mismos dentro de la masa poblacional.
- 5. Los niveles de variación genética detectados con marcadores moleculares no coinciden con trabajos previos reportados para la palmera canaria mediante el uso de isoenzimas, los cuales indicaron niveles elevados de diversidad genética y una moderada diferenciación genética con independencia de la distancia geográfica. En oposición, la variación genética detectada en esta especie mediante microsatélites, presenta un claro patrón de diferenciación genética acorde a un modelo de 'aislamiento por distancia' a lo largo del archipiélago, decreciendo desde las islas más antiguas y orientales (Fuerteventura y Gran Canaria) hasta las más recientes y occidentales (Tenerife, La Gomera y La Palma).

- 6. La considerable similitud y reciente divergencia genética de las poblaciones albergadas en las islas occidentales, unido a un patrón de diferenciación secuencial en el transcurso de diferentes generaciones en las islas orientales, sugieren que la palmera canaria debió de colonizar el archipiélago canario recientemente, explicando el nivel de estructura genética observado a nivel regional.
- 7. La población de Haría (Lanzarote) no se ajusta a ninguno de los patrones genéticos observados a lo largo del archipiélago, siendo congruente con la idea de que esta población posee un origen antrópico.
- 8. Se detectó un notable grado de subestructura genética en las islas centrales (Gran Canaria, Tenerife y La Gomera) que no responde a lo esperado para una especie arbórea, alógama y con potencial dispersivo. Mientras que el patrón de diferenciación genética en las islas más pobladas (La Gomera y Gran Canaria) se ajusta a un 'aislamiento por distancia', en el caso de Tenerife, el grado de diferenciación genética podría ser el resultado de un fuerte aislamiento histórico de las poblaciones.
- 9. El patrón de diferenciación genética observado en cada isla, posiblemente sea el resultado de la interacción entre factores como una corta historia evolutiva, la historia demográfica y/o la disponibilidad de hábitats apropiados para el establecimiento de las poblaciones. Dado el nivel de estructura genética existente a nivel insular, sería recomendable incluir nuevas fuentes semilleras en cada isla para garantizar un material de base acorde con el pool genético de la zona.
- 10. El nivel de estructura genética espacial observada a escala fina depende de la población analizada. Los resultados dejan entrever que el alcance de la misma podría estar influenciada por el grado de aislamiento geográfico o continuidad espacial que presentan las poblaciones de la palmera canaria a lo largo del paisaje, indicando una posible mayor sensibilidad de este proceso genético a las transformaciones del hábitat de la especie.



BIBLIOGRAFÍA

- Adams WT, Birkes DS (1991). Estimating mating patterns in forest tree populations. In: *Biochemical markers in the population genetics of forest tres.* SPB Academic Publishing, The Hague, the Netherlands, pp. 157-172.
- Ancochea E, Huertas MJ, Cantagrel JM *et al.* (1999). Evolution of the Cañadas edifice and its implications for the origin of the Cañadas Caldera (Tenerife, Canary Islands). *J Volcanol Geotherm Res* 88: 177-199.
- Ashley MV (2010). Plant parentage, pollination, and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. *Crit Rev Plant Sci* 29: 148-161.
- Asmussen CB, Dransfield J, Deickmann V, Barfod AS, Pintaud JC, Baker WJ (2006). A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. Bot J Linn Soc 151: 15-38.
- Austerlitz F, Smouse PE (2001). Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between Φ ft, pollen dispersal and interfemale distance. *Genetics* 157: 851-857.
- Austerlitz F, Dick CW, Dutech C, Klein EK, Oddou-Muratorio S, Smouse PE *et al.* (2004). Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Mol Ecol* 13: 937-954.
- Austerlitz F, Dutech C, Smouse P, Davis F, Sork V (2007). Estimating anisotropic pollen dispersal: a case study in *Quercus lobata*. *Heredity* 99: 193-204.
- Avise JC (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, Inc. New York, USA.
- Balaguer L, Arroyo-García R, Jiménez P, Jiménez MD *et al.* (2011). Forest restoration in a fog oasis: evidence indicates need for cultural awareness in constructing the reference. *PLoS One* 6: e23004.
- Ballardini M, Mercuri A, Littardi C, Abbas S, Couderc M, Ludeña B, Pintaud JC (2013). The chloroplast DNA locus psbZ-trnfM as a potential barcode marker in *Phoenix* L. (Arecaceae). *ZooKeys* 365: 71-82.
- Balloux F (2004). Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. *Evolution* 58: 1891-1900.
- Barfod AS, Hagen M, Borchsenius F (2011). Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). *Ann Bot* 108: 1503-1516.
- Barrett SCH, Harder LD (1996). Ecology and evolution of plant mating. Trends Ecol Evol 11(2): 73-79.
- Barrett SCH (1996). The reproductive biology and genetics of island plants. *Phil Trans R Soc London, Ser B* 351: 725-733.
- Barrow SC (1998) A monograph of Phoenix L. (Palmae: Coryphoideae). Kew Bull 53: 513-575.
- Beaumont MA, Zhang W, Balding DJ (2002). Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics* 162: 2025-2035.

- Beaumont MA, Rannala B (2004). The Bayesian revolution in genetics. Nature Rev Genet 5: 251-261.
- Bertorelle G, Benazzo A, Mona S (2010). ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: some cons, many pros. *Mol Ecol* 19(13): 2609-2625.
- Billotte N, Marseillac N, Brottier P, Noyer JL, Jacquemoud-Collet JP, Moreau C *et al.* (2004). Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. *Mol Ecol Notes* 4: 256-258.
- Bittencourt JVM, Sebbenn AM (2007). Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity* 99: 580-591.
- BOC (1991) Orden de 20 de Febrero: protección de especies de la flora vascular silvestre de las Islas canarias. *Bol Oficial Canarias* 35: 1324-1334.
- BOE (2006) Resolución de 18 de Abril: ampliación del catálogo de Base ampliación del Catálogo Nacional de materiales de base de diversas especies forestales para la producción de los materiales forestales de reproducción identificados. *Bol Oficial Español* 113: 18466-18471.
- Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, Olivieri I, Vaillant A, Bouvet J (2005). Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Mol Ecol* 14: 1979-1989.
- Boulesteix T, Hildenbrand A, Soler V, Quidelleur X, Gillot PY (2013). Coeval giant landslides in the Canary Islands: implications for global, regional and local triggers of giant flank collapses on oceanic volcanoes. *J Volcanol Geotherm Res* 257, 90-98.
- Bramwell D, Caujapé-Castells J (2011). *The biology of islands floras*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Brown RP, Hoskisson PA, Welton JH, Baez M (2006). Geological history and within-island diversity: a debris avalanche and the Tenerife lizard *Gallotia galloti. Mol Ecol* 15(12): 3631-3640.
- Browne L, Ottewell K, Karubian J (2015). Short-term genetic consequences of habitat loss and fragmentation for the neotropical palm *Oenocarpus bataua*. *Heredity*, 115: 389-395.
- Brookfield JFY (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* 5: 453-455.
- Burczyk J, Adams WT, Moran GF, Griffin AR (2002). Complex patterns of mating revealed in a Eucalyptus regnans seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. Mol Ecol 11: 2379-2391.
- Burczyk J, Adams WT, Birkes DS, Chybicki IJ (2006). Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. *Genetics* 173: 363-372.
- Carlquist S (1974). Island Biology. Columbia University Press, New York.
- Carracedo JC, Perez-Torrado FJ, Rodríguez-Badiola E (2008). Canarias: islas volcánicas intraplaca. *Geo-Guías* 5: 11-25.

- Cavers S, Degen B, Caron H, Lemes MR, Margis R *et al.* (2005). Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity* 95: 281-289.
- Charlesworth B, Nordborg M, Charlesworth D (1997). The effects of local selection, balanced polymorphism and background selection on equilibrium patterns of genetic diversity in subdivided populations. *Genet Res* 70(2): 155-174.
- Charlesworth B (2009). Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nat Rev Genet* 10(3): 195-205.
- Chiang TY, Schaal BA (2006). Phylogeography of plants in Taiwan and the Ryukyu Archipelago. Taxon 55: 31-41.
- Chiang YC, Hung KH, Schaal BA, Ge XJ, Hsu TW, Chiang TY (2006). Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex. *Mol Ecol* 15(3): 765-779.
- Choo J, Juenger TE, Simpson BB (2012). Consequences of frugivoremediated seed dispersal for the spatial and genetic structures of a neotropical palm. *Mol Ecol* 21:1019-1031
- Chung MY, Nason JD, Epperson BK, Chung MG (2003). Temporal aspects of the fine-scale genetic structure in a population of *Cinnamomum insularimontanum* (Lauraceae). *Heredity* 90: 98-106.
- Chybicki IJ, Burczyk J (2010). NM+: software implementing parentage-based models for estimating gene dispersal and mating patterns in plants. *Mol Ecol Resour* 10: 1071-1075.
- Coates DJ, Byrne M (2005) Genetic variation in plant populations: assessing cause and pattern.

 In: *Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants.* CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 139-164.
- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin JM, Balding DJ *et al.* (2008). Inferring population history with DIYABC: a user friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinform* 24 (23): 2713-2719.
- Corniquel B, Mercier L (1994). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar identification by RFLP and RAPD. *Plant Scienc* 101(2): 163-172.
- Cornuet JM, Ravigne V, Estoup A (2010). Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). *Bioinform* 11: 401.
- Crawford DJ (1984). The estimation of neighbourhood parameters for plant population. *Heredity* 52: 273-283.
- de-Lucas AI, Robledo-Arnuncio JJ, Hidalgo E, González-Martínez SC (2008). Mating system and pollen gene flow in Mediterranean maritime pine. *Heredity*, 100(4): 390-399.
- de-Lucas AI, González-Martínez SC, Vendramin GG, Hidalgo E, Heuertz M (2009). Spatial genetic structure in continuous and fragmented populations of *Pinus pinaster* Aiton. *Mol Ecol* 18: 4564-4576.
- de-Nascimento L, Willis KJ, Fernández-Palacios JM *et al.* (2009). The long-term ecology of the lost forests of La Laguna, Tenerife (Canary Islands). *J Biogeogr* 36: 499-514.

- de-Nascimento L, Nogué S, Criado C, Ravazzi C, Whittaker RJ, Willis K, Fernández-Palacios JM (2015) Reconstructing Holocene vegetation on the island of Gran Canaria before and after human colonization. *The Holocene* 1-13. DOI: 10.1177/0959683615596836.
- Degen B, Caron H, Bandou E, Magia L, Chevallier MH, Leveau A, Kremer A (2001). Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. *Heredity* 87: 497-507.
- Del Arco MJ, Wildpret W, Pérez-de-Paz PL, Rodríguez-Delgado O, Acebes JR, García-Gallo A *et al.* (2006). Mapa de vegetación de Canarias. GRAFCAN, Santa Cruz de Tenerife, España.
- Degen B, Bandou E, Caron H (2004) Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity* 93(6): 585-591.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *J Plant Mol Biol Report* 1: 19-21.
- Désamoré A, Laenen B, González-Mancebo JM, Jaén-Molina R, Bystriakova N, Martinez-Klimova E *et al.* (2012) Inverted patterns of genetic diversity in continental and island populations of the heather *Erica scoparia* s.l. *J. Biogeogr* 39: 574-584.
- Dewoody J, Nason JD, Hipkins VD (2006). Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Mol Ecol Notes* 6(4): 951-957.
- Di-Giovanni F, Kevan P (1991). Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination: a review. *Can J For Res* 21: 1155-1170.
- Díaz-Bertrana M (2005). Dimorfismo en las palmeras. V Jornadas de la palmera canaria. Ayuntamiento de Santa Lucía de Tirajana, Gran Canaria, España.
- Dieringer D, Schlötterer C (2003) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Mol Ecol Notes* 3: 167-169.
- Dobzhansky T (1950) Mendelian populations and their evolution. Am Nat 401-418.
- Dow B, Ashley M (1998). High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *J Heredity* 89, 62-70.
- Dransfield J, Uhl NW, Asmussen C, Baker W, Harley M, Lewis C (2008). Genera palmarum. *The evolution and classification of palms*. Royal Botanic Gardens Kew. Kew, UK.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11: 2571-2581.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4: 359-361.
- Eckert CG, Samis KE, Lougheed SC (2008). Genetic variation across species geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Mol Ecol* 17, 1170-1188.
- Ellstrand NC (1992). Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos* 63: 77-86.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 217-242.

- Ellstrand NC (2014). Is gene flow the most important evolutionary force in plants?. Am J Bot 101(5): 737-753.
- Elshibli S, Korpelainen H (2008). Microsatellite markers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. *Genetica* 134: 251-260.
- Emerson BC (2002). Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Mol Ecol* 11: 951-966.
- Ennos RA (1994). Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250-259.
- Epperson BK (2003). Geographical genetics. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Escudero A, Iriondo JM, Torres ME (2003). Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biol Conserv* 113(3): 351-365.
- Estoup A, Angers B (1998). Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: *Advances in Molecular Ecology*, Ed GR Carvalho. IOS Press, Amsterdam. pp. 55-86.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol Ecol* 11: 1591-1604.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes-application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier L, Hofer T, Foll M (2009a). Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity*, 103(4): 285-298.
- Excoffier L, Foll M, Petit RJ (2009b). Genetic consequences of range expansions. *Ann Rev Ecol Evol Syst* 40: 481-501.
- Excoffier L, Heckel G (2006). Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat Rev Genet* 7(10): 745-758.
- Excoffier L, Ray N (2008). Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends Ecol Evol* 23(7): 347-351.
- Fagundes NJR, Ray N, Beaumont MA, Neuenschwander S, Salzano FM, et al. (2007). Statistical evaluation of alternative models of human evolution. *Proc Nat Acad Sci* 104:17614-17619.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Felsenstein J (2005). PHYLIP (phylogeny inference package) versión 3.6. Distributed by the author, Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fernández-Palacios JM, Otto R, Delgado JD, Arévalo JR, Naranjo A, González-Artiles FG *et al.* (2008). Los Bosques Termófilos de Canarias. Proyecto LIFE04/NAT/ES/000064. Excmo. Cabildo Insular de Tenerife. Santa Cruz de Tenerife.

- Fernández-Palacios JM, de-Nascimento L, Otto R, Delgado JD, García-del-Rey E, Arévalo JR, Whittaker RJ (2011). A reconstruction of Palaeo-Macaronesia, with particular reference to the long-term biogeography of the Atlantic island laurel forests. *J Biogeogr* 38: 226-246.
- Fernández-Mazuecos M, Vargas P (2011). Genetically depauperate in the continent but rich in oceanic islands: *Cistus monspeliensis* (Cistaceae) in the Canary Islands. *PLoS One* 6(2): e17172.
- Fogelqvist J (2008) Genetic structure and dispersal in plant populations. *Acta Universitatis Upsaliensis*. ISBN 978-91-554-7262-7.
- Foll M, Gaggiotti O (2006) Identifying the environmental factors that determine the genetic structure of populations. *Genetics* 174(2): 875-891.
- Ford MJ (2002) Applications of selective neutrality test to molecular ecology. Mol Ecol 11: 1245-1262.
- Franceschinelli EV, Bawa KS (2000) The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). *Heredity* 84(1): 116-123.
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Kim SC, Crawford DJ (2000) Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *Am J Bot* 87: 909-919.
- François O, Durand E (2010) Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics. *Mol Ecol Resour* 10(5): 773-784.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv Biol* 10:1500-1508.
- Frankham R (1997) Do island populations have less genetic variation than mainland populations?. *Heredity* 78: 311-327.
- Frankham R (2007) Efective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genet Res* 89(5-6): 491-503.
- Fuchs EJ, Lobo JA, Quesada M (2003). Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. *Conserv Biol* 17: 149-157.
- Garcia C, Arroy JM, Godoy JA, Jordano P (2005) Mating patterns, pollen dispersal, and the ecological maternal neighbourhood in a *Prunus mahaleb* L. population. *Mol Ecol* 14(6): 1821-1830.
- García-Verdugo C, Fay MF, Granado-Yela C, De Casas RR, Balaguer L, Besnard G, Vargas P (2009). Genetic diversity and differentiation processes in the ploidy series of *Olea europaea* L.: a multiscale approach from subspecies to insular populations. *Mol Ecol* 18: 454-467.
- García-Verdugo C, Forrest AD, Fay MF, Vargas P (2010). The relevance of gene flow in metapopulation dynamics of an oceanic island endemic, *Olea europaea* subsp. *guanchica. Evolution* 64: 3525-3536.

- García-Verdugo C, Calleja J, Vargas P, Silva L, Moreira O, Pulido F (2013). Polyploidy and microsatellite variation in the relict tree *Prunus lusitanica* L.: how effective are refugia in preserving genotypic diversity of clonal taxa? *Mol Ecol* 22: 1546-1557.
- García-Verdugo C, Baldwin BG, Fay MF, Caujapé-Castells J (2014) Life history traits and patterns of diversification in oceanic archipelagos: a meta-analysis. *Bot J Linn Soc* 3: 334-348.
- Gillespie JH (1994) The causes of molecular evolution. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Gitzendanner MA, Soltis PS (2000). Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot* 87(6): 783-792.
- Glas G (1764). Descripción de las Islas Canarias. IEC, La Laguna, Tenerife, España.
- Glémin S, Bazin E, Charlesworth D (2006). Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. *Proc R Soc London, Ser B* 273(1604): 3011-3019.
- Goldstein DB, Ruiz Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.
- Gómez A, González-Martínez SC, Collada C, Climent J, Gil L (2003). Complex population genetic structure in the endemic Canary Island pine revealed using chloroplast microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 107: 1123-1131.
- González Pérez MA (2001). Caracterización molecular de la Palmera Canaria (*Phoenix canariensis*) como base para su conservación. Tesis Doctoral. Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- González-Pérez MA, Caujape-Castells J, Sosa PA (2004a) Allozyme variation and structure of the Canarian endemic palm tree *Phoenix canariensis* (Arecaceae): implications for Conservation. *Heredity* 93: 307-315.
- González-Pérez MA, Caujapé-Castells J, Sosa PA (2004b). Molecular evidence of hybridisation between the endemic *Phoenix canariensis* and the widespread *P. dactylifera* with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Plant Syst Evol* 247: 165-175.
- González-Pérez MA, Sosa PA, Rivero E, González-González EA, Naranjo A (2009). Molecular markers reveal no genetic differentiation between *Myrica rivas-martinezii* and *M. faya* (Myricaceae). *Ann Bot* 103: 79-86.
- Goto S, Shimatani K, Yoshimaru H, Takahashi Y (2006). Fat-tailed gene flow in the dioecious canopy tree species *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* revealed by microsatellites. *Mol Ecol* 15: 2985-2996.
- Goudet J (1995) FSTAT: a computer program to calculate F-statistics. J Heredity 86:485-486.
- Govaerts R, Dransfield J, Zona SF, Hodel DR y Henderson A (2011) *World Checklist of Arecaceae*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on Internet; http://apps.kew.org/wcsp/. Consultado 10/10/15.
- Griffin CA, Eckert CG (2003) Experimental analysis of biparental inbreeding in a self-fertilizing plant. *Evolution* 57(7): 1513-1519.

- Hampe A, El-Masri L, Petit RJ. (2010) Origin of spatial genetic structure in an expanding oak population. *Mol Ecol* 19: 459-471.
- Hamrick JL, Loveless, MD (1989) The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. *The evolutionary ecology of plants*, 129-146.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil Trans R Soc London, Ser B* 351(1345): 1291-1298.
- Hamrick JL (2004). Response of forest trees to global environmental changes. For Ecol Manage 197: 323-335.
- Hanson T, Brunsfeld S, Finegan B, Waits L (2008). Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. *Mol Ecol* 17: 2060-2073.
- Harbaugh DT, Wagner WL, Allan GJ, Zimmer EA (2009) The Hawaiian Archipelago is a stepping stone for dispersal in the Pacific: an example from the plant genus *Melicope* (Rutaceae). *J Biogeogr* 36: 230-241.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2: 618-620.
- Hardy OJ, Charbonnel N, Fréville H, Heuertz M (2003). Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163: 1467-1482.
- Hartl DL, AG Clark (1997) *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA.
- Hedrick PW (2005). *Genetics of populations*. 3° edition. Jones & Bartlett Publishers. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Heer K, Kalko EKV, Albrecht L, García-Villacorta R, Staeps FC, Herre EA, et al. (2015) Spatial Scales of Genetic Structure in Free-Standing and Strangler Figs (*Ficus*, Moraceae) Inhabiting Neotropical Forests. *PLoS One* 10(7): e0133581.
- Henderson SA, Billotte N, Pintaud JC (2006). Genetic isolation of Cape Verde Island *Phoenix atlantica* (Arecaceae) revealed by microsatellite markers. *Conserv Genet* 7: 213-223.
- Henderson A (1986). A review of pollination studies in the Palmae. Bot Rev 52: 221-259.
- Holderegger R, Wagner HH (2008). Landscape genetics. Bioscience 58(3): 199-207.
- Holderegger R, Buehler D, Gugerli F, Manel S (2010) Landscape genetics of plants. *Trends Plant Sci* 15(12): 675-683.
- Honnay O, Jacquemyn H (2007) Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conserv Biol* 21(3): 823-831.
- Inoue K, Kawahara T (1990) Allozyme differentiation and genetic structure in island and mainland Japanese populations of *Campanula punctata* (Campanulaceae). *Am J Bot* 77 (11): 1440-1448.
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service, BMC Genet 6: 13.
- Jombart T, Devillard S, Dufour AB, Pontier D (2008). Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity* 101(1): 92-103.

- Jombart T, Pontier D, Dufour AB (2009). Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity* 102(4): 330-341.
- Jones A, Small C, Paczolt K, Ratterman N (2010). A practical guide to methods of parentage analysis. *Mol Ecol Resour* 10: 6-30.
- Juan C, Emerson BC, Oromí P, Hewitt GM (2000). Colonization and diversification: towards a phylogeographic synthesis for the Canary Islands. *Trends Ecol Evol* 15: 104-109.
- Jump AS, Peñuelas J (2006) Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *PNAS* 103: 8096-8100.
- Kalinowski ST (2005). HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol Ecol Notes* 5: 187-189.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol 16*: 1099-1106.
- Kaneko S, Isagi Y, Nobushima F (2008). Genetic differentiation among populations of an oceanic island: the case of *Metrosideros boninensis*, an endangered endemic tree species in the Bonin Islands. *Plant Spec Biol* 23: 119-128.
- Kawecki TJ, Ebert D (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology letters* 7(12): 1225-1241.
- Kawecki TJ (2008). Adaptation to marginal habitats. *Ann Rev Ecol Evol Syst* 39: 321-342.
- Kim SC, Crawford DJ, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A (1999). Adaptive radiation and genetic differentiation in the woody *Sonchus* alliance (*Asteraceae*: Sonchinae) in the Canary Islands. *Plant Syst Evol* 215(1-4): 101-118.
- Kimura M, Weiss GH (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49(4): 561-576.
- Kimura M (1953). "Stepping-stone" model of population. Ann Rep Natl Inst Genet Japan 3: 62-63.
- Kingman JFC (1982) The coalescent. Stoch Proc Appl 13(3): 235-248.
- Kitamoto N, Ueno S, Takenaka A, Tsumura Y, Washitani I, Ohsawa R (2006). Effect of flowering phenology on pollen flow distance and the consequences for spatial genetic structure within a population of *Primula sieboldii* (Primulaceae). *Am J Bot* 93: 226-233.
- Klein E, Lavigne C, Gouyon P (2006). Mixing of propagules from discrete sources at long distance: comparing a dispersal tail to an exponential. *BMC Ecol* 6: 3.
- Kremer A, Ronce O, Robledo-Arnuncio JJ, Guillaume F, Bohrer G, Nathan R *et al.* (2012). Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecol Lett* 15: 378-392.
- Kunkel G, Kunkel MA (1974). Flora de Gran Canaria. Arboles y arbustos arbóreos. Las Palmas de Gran Canaria, *Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria* 1: 4-5.
- Kwon J, Morden C (2002). Population genetic structure of two rare tree species (*Colubrina oppositifolia* and *Alphitonia ponderosa*, *Rhamnaceae*) from Hawaiian dry and mesic forests using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol Ecol* 11: 991-1001.

- Lander TA, Klein EK, Stoeckel S, Mariette S, Musch B, Oddou-Muratorio S (2013). Interpreting realized pollen flow in terms of pollinator travel paths and land-use resistance in heterogeneous landscapes. *Landscape Ecol* 28(9): 1769-1783.
- Le Bontier and Le Verrier (~1402) *Le Canarien*. En: Pico, Aznar y Corbella (2003) (eds.). IEC, La Laguna, Spain.
- Leffler EM, Bullaughey K, Matute DR, Meyer WK, Segurel L, Venkat *et al.* (2012). Revisiting an old riddle: what determines genetic diversity levels within species. *PLoS Biol* 10(9): e1001388.
- Leimu R, Mutikainen PIA, Koricheva J, Fischer M (2006). How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation?. *J Ecol* 94(5): 942-952.
- Lenormand T (2002). Gene flow and the limits to natural selection. Trends Ecol Evol 17(4): 183-189.
- Levin DA, Kerster HW (1974). Gene flow in seed plants. *Evol Biol* 7: 139-220.
- Logossa ZA, Camus-Kulandaivelu L, Allal F, Vaillant A *et al.* (2011) Molecular data reveal isolation by distance and past population expansion for the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn) in West Africa. *Mol Ecol* 20: 4009-4027.
- Luikart G, England PR (1999) Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends Ecol Evol* 14(7): 253-256.
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995). Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am J Bot* 82: 1420-1425.
- López-Sepulveda P, Takayama K, Greimler J, Penailillo P, Crawford DJ, Baeza M *et al.* (2013). Genetic variation (AFLPs and nuclear microsatellites) in two anagenetically derived endemic species of *Myrceugenia* (Myrtaceae) on the Juan Fernandez Islands, Chile. *Am J Bot* 100: 722-734.
- Loveless M, Hamrick J (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Ann Rev Ecol Syst 15: 65-95.
- Lowe A, Harris S, Ashton P (2004) *Ecological genetics: design, analysis, and application.* Blackwell Publishing, Malden, MA, USA.
- Lu SY, Hong KH, Liu SL, Cheng YP, Wu WL, Chiang TY (2002). Genetic variation and population differentiation of *Michelia formosana* (Magnoliaceae) based on cpDNA variation and RAPD fingerprints. *J Plant Res* 115:203-216.
- Luikart G, Sherwin WB, Steele BM, Allendorf FW (1998). Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Mol Ecol* 7(8): 963-974.
- Madoz P (1845-1850). *Diccionario geográfico-estadístico-histórico de Canarias*. Estudio introductorio Ramón Pérez González (1986) (Ed. facs.) Santa Cruz de Tenerife, Spain.
- Mairal M, Sanmartin I, Aldasoro JJ, Culshaw V, Manolopoulou I, Alarcón M (2015). Palaeo-islands as refugia and sources of genetic diversity within volcanic archipelagos: the case of the widespread endemic *Canarina canariensis* (Campanulaceae). *Mol Ecol* 24(15): 3944-3963.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol Evol* 18(4): 189-197.

- Manni F, Guerard E, Heyer E (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Hum Biol* 76: 173-190.
- Mantel N (1967). The detection of disease clustering and a generalizated regression approach. Cancer Research 27: 209-220.
- Marshall T, Slate J, Kruuk L, Pemberton J (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* 7: 639-655.
- Martins JM, Moreira OC, Sardos J, Maciel MG, Silva L, Moura MM (2013). Population genetics and conservation of the Azorean tree *Picconia azorica*. *Biochem Syst Ecol* 49: 135-143.
- Mayol M, Palau C, Rossello JA, González-Martínez SC, Molins A, Riba M (2012). Patterns of genetic variability and habitat occupancy in *Crepis triasii* (Asteraceae) at different spatial scales: insights on evolutionary processes leading to diversification in continental islands. *Ann Bot* 109: 429-441.
- McKay JK, Latta RG (2002). Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends Ecol Evol* 17: 285-291.
- Medina-Macedo L, Sebbenn AM, Lacerda AE, Ribeiro JZ, Soccol CR, Bittencourt JV (2015). High levels of genetic diversity through pollen flow of the coniferous *Araucaria angustifolia*: a landscape level study in Southern Brazil. *Tree Genet Genomes* 11(1): 1-14.
- Meekijjaroenroj A, Anstett MC (2003). A weevil pollinating the Canary Islands date palm: between parasitism and mutualism. *Naturwissenschaften* 90: 452-455.
- Morales J, Rodríguez A, Alberto V, Machado C, Criado C (2009). The impact of human activities on the natural environment of the Canary Islands (Spain) during the pre-Hispanic stage (3rd-2nd Century BC to 15th Century AD): An overview. *Environ Archaeol* 14: 27-36.
- Morici C (1998). *Phoenix* in the wild. Principes 42: 85-89.
- Morici C (2006). La Palmera canaria: Phoenix canariensis. Rincones del Atlántico 3:134-143
- Muller F, Voccia M, Bà A, Bouvet JM (2009). Genetic diversity and gene flow in a Caribbean tree Pterocarpus officinalis Jacq.: a study based on chloroplast and nuclear microsatellites. Genetica. 135:185-198.
- Nakanishi A, Yoshimaru H, Tomaru N, Miura M, Manabe T, Yamamoto SI (2015). Inbreeding depression at the sapling stage and its genetic consequences in a population of the outcrossing dominant tree species, *Castanopsis sieboldii*. *Tree Genet Genomes* 11(3): 1-10.
- Naranjo J (2002). Los aprovechamientos forestales. En: Fernández-Palacios JM, Martín JL (Eds.) Naturaleza de las Islas Canarias: ecología y conservación. 2º Edition. Turquesa Ediciones, Santa Cruz de Tenerife, pp. 269-274.
- Nathan R, Muller-Landau HC (2000). Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends Ecol Evol* 15(7): 278-285.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

- Nielsen R, Mattila DK, Clapham PJ, Palsbøll PJ (2001). Statistical approaches to paternity analysis in natural populations and applications to the North Atlantic humpback whale. *Genetics* 157: 1673-1682.
- Nielsen R, Williamson S, Kim Y, Hubisz MJ, Clark AG, Bustamante C (2005). Genomic scans for selective sweeps using SNP data. *Genome Res* 15(11): 1566-1575.
- Niggemann M, Wiegand T, Robledo-Arnuncio JJ, Bialozyt R (2012). Marked point pattern analysis on genetic paternity data for uncertainty assessment of pollen dispersal kernels. *J Ecol* 100: 264-276.
- Nogales M, Hernández EC, Valdés F (1999). Seed dispersal by common ravens *Corvus corvax* among island habitats (Canarian Archipelago). *Ecoscience* 6: 55-61.
- Nogué S, de-Nascimento L, Fernández-Palacios JM, Whittaker RJ, Willis KJ (2013). The ancient forests of La Gomera, Canary Islands, and their sensitivity to environmental change. *J Ecol* 101: 368-377.
- Nunney L (1993). The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution* 47: 1329-2341.
- Nybom H (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol* 13: 1143-1155.
- O'Connell LM, Mosseler A, Rajora OP (2006). Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97: 418-426.
- Oddou-Muratorio S, Houot ML, Demesure-Musch B, Austerlitz F (2003). Pollen flow in the wild-service tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Mol Ecol* 12: 3427-3439.
- Oddou-Muratorio S, Demesure-Musch B, Pélissier R, Gouyon PH (2004). Impacts of gene flow and logging history on the local genetic structure of a scattered tree species, *Sorbus torminalis* L. Crantz. *Mol Ecol* 13: 3689-3702.
- Oddou-Muratorio S, Klein E, Austerlitz F (2005). Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent-offspring analysis. *Mol Ecol* 14: 4441-4452.
- Olangua-Corral M, González-Pérez MA, Sosa PA y Saro I (2015). I'm a girl, you're a boy: may we go on a date?. Reproductive phenology of a dioecious endemic palm, *Phoenix canariensis*. Póster presentado en FLORAMAC 2015, Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, España.
- Ottewell K, Grey E, Castillo F, Karubian J (2012). The pollen dispersal kernel and mating system of an insect-pollinated tropical palm, *Oenocarpus bataua*. *Heredity* 109: 332-339.
- Ouborg NJ, Angeloni F, Vergeer P (2010). An essay on the necessity and feasibility of conservation genomics. *Conserv Genet* 11(2): 643-653.
- Pakkad G, Ueno S, Yoshimaru H (2008). Gene flow pattern and mating system in a small population of *Quercus semiserrata* Roxb. (Fagaceae). *For Ecol Manage* 255: 3819-3826.

- Palstra FP, Fraser DJ (2012). Effective/census population size ratio estimation: a compendium and appraisal. *Ecol Evol* 2(9): 2357-2365.
- Parisod C, Joost S (2010). Divergent selection in trailing-versus leading-edge populations of Biscutella laevigata. *Ann Bot* 105(4): 655-660.
- Payn KG, Dvorak WS, Janse BJ, Myburg AA (2008). Microsatellite diversity and genetic structure of the commercially important tropical tree species *Eucalyptus urophylla*, endemic to seven islands in eastern Indonesia. *Tree Genet Genomes* 4(3): 519-530.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- Pérez de Paz J, Caujape-Castells J (2013). A review of the allozyme data set for the Canarian endemic flora: causes of the high genetic diversity levels and implications for Conservation. *Ann Bot* 111: 1059-1073.
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG (2005). Invited review: comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol Ecol* 14(3): 689-701.
- Petit RJ, Hampe A (2006). Some Evolutionary Consequences of Being a Tree. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:187-214.
- Pfosser M, Jakubowsky G, Schlüter P, Fer T, Kato H, Stuessy T, Sun B (2006) Evolution of *Dystaenia takesimana* (Apiaceae), endemic to Ullung Island, Korea. *Plant Syst Evol* 256: 159-170.
- Pintaud JC, Zehdi S, Couvreur T, Barrow S, Henderson S, Aberlenc-Bertossi *et al.* (2010). Species delimitation in the genus *Phoenix* (Arecaceae) based on SSR markers, with emphasis on the identity of the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). In: Seberg O, Petersen G, Barford A, Davis J, (Eds.) *Diversity phylogeny, and evolution in the monocotyledons*. Aarhus Univ Press, Denmark, pp. 267-286.
- Pintaud JC, Ludeña B, Aberlenc-Bertossi F, Zehdi S, Gros-Balthazard M, Ivorra S *et al.* (2013). Biogeography of the date palm (*Phoenix dactylifera* L., *Arecaceae*): insights on the origin and on the structure of modern diversity. *Acta Hortic* 994: 19-38.
- Piotti A, Leonardi S, Buiteveld J, Geburek T, Gerber S, Kramer K *et al.* (2012). Comparison of pollen gene flow among four European beech (*Fagus sylvatica* L.) populations characterized by different management regimes. *Heredity* 108: 322-31.
- Pluess AR, Sork VL, Dolan B, Davis FW, Grivet D, Merg K *et al.* (2009). Short distance pollen movement in a wind-pollinated tree, *Quercus lobata* (Fagaceae). *For Ecol Manage* 258: 735-744.
- Pons O, Petit RJ (1996). Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237-1245.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.
- Queller DC, Strassman JE, Hughes CR (1993). Microsatellites and kinship. Trends Ecol Evol 8: 285-288.

- R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria. http://www.R-project.org/
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248-249.
- Reed DH, Frankham R (2001). How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55: 1095-1103.
- Reed DH, Frankham R (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Cons Biol* 17: 230-237.
- Reille M (1998). Pollen Et Spores D'Europe Et D'Afrique Du Nord. Supplément 2, Laboratoire de Botanique historique et Palynologie, Marseille.
- Reusch TB, Wood TE (2007). Molecular ecology of global change. Mol Ecol 16(19): 3973-3992.
- Reyes-Betancort JA, León-Arencibia MC, Wildpret W (1998) El paisaje vegetal de Lanzarote a partir de fuentes escritas (siglos XV-XX). *Anuario del Instituto de Estudios Canarios* 43: 31-54.
- Reyes-Betancort JA, Santos Guerra A, Guma IR, Humphries CJ, Carine MA (2008) Diversity, rarity and the evolution and conservation of the Canary Islands endemic flora. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 65: 25-45.
- Ritland K (1989). Correlated-matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus. Evolution* 43: 848-859.
- Ritland K (2002). Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88: 221-228.
- Rivera D, Obón C, Alcaraz F, Egea T, Carreño E, Laguna E *et al.* (2013) A review of the nomenclature and typification of the Canary Islands endemic palm, *Phoenix canariensis* (Arecaceae). *Taxon* 62:1275-1282.
- Rivera D, Obón C, García-Arteaga J, Egea T, Alcaraz F, Laguna E *et al.* (2014). Carpological analysis of *Phoenix* (Arecaceae): contributions to the taxonomy and evolutionary history of the genus. *Bot J Linn Soc* 175(1): 74-122.
- Robledo-Arnuncio JJ, Alia R, Gil L (2004). Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Mol Ecol* 13(9): 2567-2577.
- Robledo-Arnuncio JJ, Gil L (2005). Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* 94: 13-22.
- Robledo-Arnuncio JJ, Austerlitz F (2006). Pollen dispersal in spatially aggregated populations. *Am Nat* 168: 500-511.
- Robledo-Arnuncio JJ, Austerlitz F, Smouse PE (2006). A new method of estimating the pollen dispersal curve independently of effective density. *Genetics* 173: 1033-1045.
- Rosas-Escobar P, Gernandt DS, Piñero D, Garcillán PP (2011). Plastid DNA diversity is higher in the island endemic Guadalupe cypress than in the continental Tecate cypress. *PLoS One* 6: e16133.

- Rosenberg NA, Mahajan S, Ramachandran S, Zhao C, Pritchard JK, Feldman MW (2005) Clines, clusters, and the effect of study design on the inference of human population structure. *PLoS Genet* 1 (6): e70.
- Rousset F (2000) Genetic differentiation between individuals. *J Evol Biol* 13: 58-62.
- Saro I, Olangua-Corral M, González-Pérez MA y Sosa PA (2015b). Are there any palm flowering out there?...: an overview of phenology and pollination dynamics of Canarian date palm populations. Póster presentado en FLORAMAC 2015, Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, España.
- Schoen DJ, Brown AH (1991). Intraspecific variation in population gene diversity and effective population size correlates with the mating system in plants. *Proc Natl Acad Sci* 88(10): 4494-4497.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Letters* 9(5): 615-629.
- Shepherd LD, Perrie LR (2011). Microsatellite DNA analyses of a highly disjunct New Zealand tree reveal strong differentiation and imply a formerly more continuous distribution. *Mol Ecol* 20: 1389-1400.
- Signorovitch J, Nielsen R (2002). PATRI: paternity inference using genetic data. *Bioinformatics* 18: 341-342.
- Slatkin M, Voelm L (1991). FST in a hierarchical island model. *Genetics* 127: 627-629.
- Slatkin M (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139(1): 457-462.
- Smouse PE, Dyer RJ, Westfall RD, Sork VL (2001). Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* 55: 260-271.
- Smouse PE, Sork VL (2004). Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *For Ecol Manage* 197: 21-38.
- Sosa PA, Bouza N, Cabrera-Pérez MA, Luque A (1998). Genetic variation in *Phoenix canariensis* and *P. dactylifera* (Arecaceae) populations of Gran Canaria using isoezyme electroforesis. *Bol Mus Mun Funchal* 5: 443-338.
- Sosa PA, Naranjo A, Márquez M, Escandell A, González-Pérez MA (2007). *Atlas de los palmera- les de Gran Canaria*. Obra Social de La Caja de Canarias, Gran Canaria, Islas Canarias, España.
- Sosa PA, González-Pérez MA, Moreno C, Clarke JB (2010). Conservation genetics of the endangered endemic *Sambucus palmensis* Link (Sambucaceae) from the Canary Islands. *Conserv Genet* 11: 2357-2368.
- Sosa PA, González-González EA, González-Pérez MA, Naranjo-Cigala A, Carqué E, Acevedo A (2014). Reproductive strategy and ploidy determine the genetic variability of *Sorbus aria*. *Tree Genet Genomes* 10(3): 679-888.
- Squirrell J, Hollingsworth PM, Woodhead M, Russell J, Lowe AJ, Gibby M *et al.* (2003). How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants?. *Mol Ecol* 12(6): 1339-1348.

- Storz JF (2005). Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Mol Ecol* 14(3): 671-688.
- Streiff R, Ducousso A, Lexer C, Steinkellner H, Gloessl J, Kremer A (1999). Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Mol Ecol* 8: 831-841.
- Stuessy TF (2007). Evolution of Specific and Genetic Diversity during Ontogeny of Island Floras: The Importance of Understanding Process for Interpreting Island Biogeographic Patterns. In: *Biogeography in a changing world* (Eds.) MC Ebach, RS Tangney. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 117-133.
- Stuessy TF, Takayama K, López-Sepúlveda P, Crawford DJ (2014). Interpretation of patterns of genetic variation in endemic plant species of oceanic islands. *Bot J Linn Soc* 174: 276-288.
- Talavera M, Navarro-Sampedro L, Ortiz PL, Arista M (2013). Phylogeography and seed dispersal in islands: the case of *Rumex bucephalophorus* subsp. *canariensis* (Polygonaceae). *Ann Bot* 111: 249-260.
- Templeton AR (2006). *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, USA.
- Trakhtenbrot A, Nathan R, Perry G, Richardson DM (2005). The importance of long-distance dispersal in biodiversity conservation. *Divers Distrib* 11: 173-181.
- Uhl NW, Moore HE (1971). The palm gynoecium. Am J Bot 58: 945-992.
- Uhl NW, Moore HE (1977). Correlations of inflorescence, flower structure, and floral anatomy with pollination in some palms. *Biotropica* 9: 170-190.
- Valido A (1999) Ecología de la dispersión de semillas por los lagartos endémicos canarios (g. *Gallotia*, Lacertidae). Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna, La Laguna, España.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4(3): 535-538.
- Vargas P, Heleno R, Traveset A, Nogales M (2012). Colonization of the Galápagos Islands by plants with no specific syndromes for long-distance dispersal: a new perspective. *Ecography* 35(1): 33-43.
- Vekemans X, Hardy O (2004). New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol Ecol* 13: 921-935.
- Walter R, Epperson BK (2001). Geographic pattern of genetic variation in *Pinus resinosa*: area of greatest diversity is not the origin of postglacial populations. *Mol Ecol* 10(1): 103-111.
- Wang R, Compton SG, Chen XY (2011). Fragmentation can increase spatial genetic structure without decreasing pollen-mediated gene flow in a wind-pollinated tree. *Mol Ecol* 20: 4421-4432.
- Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38(6): 1358-1370.

- Weis AE (2015). On the potential strength and consequences for nonrandom gene flow caused by local adaptation in flowering time. *J Evol Biol* 28(3): 699-714.
- Whittaker RJ, Fernández-Palacios JM (2007) *Island Biogeography: ecology, evolution, and Conservation*, 2° Ed. Oxford University Press, Oxford.
- Wright S (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright S (1943). Isolation by distance. Genetics 28: 114-138.
- Wright S (1946). Isolation by distance under diverse systems of mating. Genetics 31: 39-59.
- Wright S (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Yamada T, Maki M (2012) Impact of geographical isolation on genetic differentiation in insular and mainland populations of *Weigela coraeensis* (Caprifoliaceae) on Honshu and the Izu Islands. *J Biogeogr* 39: 901-917.
- Young A, Boyle T, Brown T (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol* 11: 413-418.
- Zehdi S, Trifi M, Billotte N, Marrakchi M, Pintaud JC (2004). Genetic diversity of Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by nuclear microsatellite polymprohism. *Hereditas* 141(3): 278-287.
- Zehdi S, Cherif E, Moussouni S, Gros-Balthazard M, Naqvi SA, Ludeña B *et al.* (2015). Genetic structure of the date palm (*Phoenix dactylifera*) in the Old World reveals a strong differentiation between eastern and western populations. *Ann Bot* 116(1): 101-112.





ORIGINAL ARTICLE

Patterns of pollen dispersal in a small population of the Canarian endemic palm (*Phoenix canariensis*)

I Saro¹, JJ Robledo-Arnuncio², MA González-Pérez¹ and PA Sosa¹

The genetic diversity of small populations is greatly influenced by local dispersal patterns and genetic connectivity among populations, with pollen dispersal being the major component of gene flow in many plants species. Patterns of pollen dispersal, mating system parameters and spatial genetic structure were investigated in a small isolated population of the emblematic palm *Phoenix canariensis* in Gran Canaria island (Canary Islands). All adult palms present in the study population (n= 182), as well as 616 seeds collected from 22 female palms, were mapped and genotyped at 8 microsatellite loci. Mating system analysis revealed an average of 5.8 effective pollen donors ($N_{\rm ep}$) per female. There was strong variation in correlated paternity rates across maternal progenies (ranging from null to 0.9) that could not be explained by the location and density of local males around focal females. Paternity analysis revealed a mean effective pollen dispersal distance of ~71 m, with ~70% of effective pollen originating from a distance of <75 m, and 90% from <200 m. A spatially explicit mating model indicated a leptokurtic pollen dispersal kernel, significant pollen immigration (12%) from external palm groves and a directional pollen dispersal pattern that seems consistent with local altitudinal air movement. No evidence of inbreeding or genetic diversity erosion was found, but spatial genetic structure was detected in the small palm population. Overall, the results suggest substantial pollen dispersal over the studied population, genetic connectivity among different palm groves and some resilience to neutral genetic erosion and subsequently to fragmentation.

Heredity (2014) 113, 215-223; doi:10.1038/hdy.2014.16; published online 12 March 2014

INTRODUCTION

The evolutionary dynamics of plants depends on gene flow within and among populations, the patterns of which largely influence spatial genetic structuring (Loveless and Hamrick, 1984; Smouse and Sork, 2004). At the microevolutionary level, gene flow by pollen dispersal is a major determinant of mating patterns, within-population genetic diversity and among-population connectivity in spatially structured plant species, counteracting the effect of isolation by distance (Wright, 1943). Of particular concern is the loss of genetic diversity potentially resulting from mate limitation and gene flow disruptions associated with population size reduction (Jump and Peñuelas, 2006). However, some mechanisms such as effective pollen and seed dispersal and traits such as the longevity of trees could increase their resilience to the negative effects of small population size (Hamrick, 2004; Jump and Peñuelas, 2006). Thus, assessing spatial patterns of pollen movement, as well as their interaction with mating systems, pollination syndromes and ecological and demographic factors has become an important topic in experimental ecological and evolutionary studies, especially with the availability of highly polymorphic microsatellite markers (Smouse et al., 2001; Burczyk et al., 2002; Robledo-Arnuncio et al., 2006). Mating distance distributions typically exhibit an excess of nearby events (Levin and Kerster, 1974), a short-distance component of effective pollen dispersal that greatly determines correlated paternity rates (that is,

the fraction of sibling pairs that share the same father) and the probability of identity of two uniting gametes within a population (that is, the inverse of the 'neighbourhood size', sensu Wright, 1943; see Crawford, 1984; Robledo-Arnuncio and Austerlitz, 2006; Pluess et al., 2009). Short-distance pollen dispersal can be efficiently assessed via paternity analysis of parent-offspring genotypic samples (Jones et al., 2010) that also allows investigating the effect of phenotypic traits and ecological variables on individual male reproductive success (Nielsen et al., 2001; Oddou-Muratorio et al., 2003). Rare long-distance pollen dispersal events, on the other hand, although much harder to detect and quantify, are the vector of genetic connectivity among populations, especially across fragmented landscapes (Trakhtenbrot et al., 2005; Klein et al., 2006), that bears potentially important consequences for local adaptation in changing environments (Kremer et al., 2012).

Although accurately estimating the frequency and origin of longdistance effective pollen dispersal events remains an enormous experimental challenge (Kremer et al., 2012), local paternity analysis can provide some hints on its frequency through the estimation of pollen immigration rates into isolated populations and the examination of the shape of the tail of (locally) estimated dispersal functions (Burczyk et al., 2002; Austerlitz et al., 2004; Oddou-Muratorio et al., 2005; Klein et al., 2006). One of the most frequent approaches to estimate local mating patterns is maximum-likelihood categorical

¹Grupo de Biogeografía, Conservación y Territorio, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, Canary Islands, Spain and ²Department of Forest Ecology and Genetics, Forest Research Center (CIFOR), INIA, Madrid, Spain

Correspondence: I Saro, Departamento de Biología, Campus de Tafira, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, Canary Island 35017, Spain.

E-mail: isaro@proyinves.ulpgc.es

Received 29 June 2013; revised 20 December 2013; accepted 23 January 2014; published online 12 March 2014



paternity assignment (see, for example, Marshall et al., 1998) that enables individually explicit characterization of effective pollen dispersal at the cost of frequently large numbers of unassigned offspring and substantial type II errors (Oddou-Muratorio et al., 2003). Fractional paternity analysis (see, for example, Nielsen et al., 2001) alleviates sample size reductions inherent in the categorical analysis and, although it does not identify fathers categorically, it provides an alternative way to estimate the distribution of mating distances. Finally, spatially explicit mating models (Burczyk et al., 2002; Oddou-Muratorio et al., 2005) provide an inclusive tool to jointly estimate the pollen dispersal kernel, pollen immigration rates into the study area and phenotypic and ecological correlates of male reproductive success.

Phoenix canariensis Chabaud (Arecaceae) is an endemic and very representative palm species in the Canary Islands. Like all other species belonging to the Canarian thermophilous woodland, Canarian palm populations suffered severe fragmentation after the Spanish conquest and colonization in the fifteenth century because the fertile areas that it inhabited were rapidly deforested for agriculture. Thermophilous woodlands of the Canary islands grow preferentially between 300 and 500 m above sea level on windward wetter slopes, and between 500 and 900 m on leeward drier slopes, as determined by the east-west distribution of the main mountain chains and the predominant northeastern trade winds (Fernández-Palacios and Whittaker, 2008). The current natural distribution of P. canariensis consists of palm groves that remain of a bygone wider natural distribution, being mainly restricted to the bottom of ravines and slopes with high moisture. It is most abundant in La Gomera and Gran Canaria islands, but it can be found across the entire archipelago. Besides fragmentation, P. canariensis is affected by several factors of disturbance such as several pests (like the weevils Rhynchophorus ferrugineus and Diocalandra frumenti), infections (especially that caused by the fungus Fusarium oxysporum) and hybridization with the allochthonous congener Phoenix dactylifera, massively introduced into the Canarian archipelago and with which it forms fertile hybrids (González-Pérez et al., 2004). Nowadays, the Canarian palm groves are catalogued as priority habitats of European Union Natura 2000 network of protection areas, and the Canarian Government has designated the species as vegetal symbol of the archipelago. However, despite the importance of the species and the potential reduction in population viability posed by fragmentation and other human-induced disturbances, there are few scientific studies about the genetic structure and reproductive biology of P. canariensis, and none about the extent of pollen dispersal within or between its natural populations that would be instrumental to understand and manage the genetic consequences of fragmentation.

This study investigates effective pollen dispersal patterns of P. canariensis using fractional paternity analysis and spatially explicit mating models, based on microsatellite markers. The general goal is to provide information on Canarian palm grove mating patterns and genetic connectivity, and on potential phenotypic and ecological correlates of individual dispersal parameters. Such information could serve as reference for future investigations in other palms in the genus Phoenix, for which similar studies are absent in the literature, despite their economic and ecological relevance in their natural habitats (Dransfield et al., 2008). There are indeed few effective pollen dispersal studies for palms in general (Gaiotto et al., 2003; Sezen et al., 2007; Ottewell et al., 2012), and to our knowledge no pollen dispersal kernel has ever been estimated for an oceanic island plant. Our specific aims were to: (1) estimate mating system and effective pollen dispersal parameters within and into an isolated Canarian

palm population; (2) investigate phenotypic and ecological correlates of individual mating system parameters; and (3) assess patterns of fine-scale spatial genetic structure of a small natural isolated Canarian palm population.

MATERIALS AND METHODS

Study species and study site

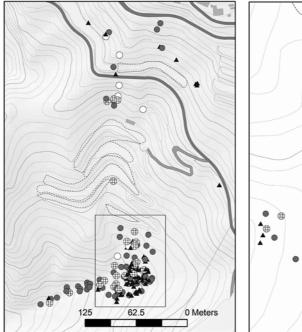
P. canariensis is a diploid (n = 18), long-lived, slow-growing, arborescent monocot with a solitary trunk that grows up to $\sim 20 \,\mathrm{m}$, but most frequently between 5 and 10 m. Numerous small yellowish male and female flowers cluster in spadices that develop on separate plants, being a dioecious species with dimorphic flower and crown morphology traits. Flower anthesis happens at night or dawn and the flowering period lasts from few hours to 3 days in males and from 2 to 5 days in females, whereas fruit ripening takes 1 year after fertilization. There is substantial flowering asynchrony between individuals within populations, being frequent to find at least some flowering individuals through all the summer and autumn, that should facilitate outcrossing with palms from other groves. Although traditionally described as anemophilous, this pollination syndrome has been questioned because of male inflorescence traits and the presence of insects as flower visitors, both characters suggesting entomophily pollination (Meekijjaroenroj and Anstett, 2003). Our recent observations failed to detect any insect entering in female flowers, and therefore we favour the hypothesis that pollination is mainly by wind and that insects are just flower visitors (I Saro, unpublished data).

The study area was the Acusa Verde population, located on a leeward slope in northwestern Gran Canaria island (27° 59.85' N, 15° 41.33' O; at elevations from 505 to 686 m above sea level). This stand is one of the only four populations registered as pure basic material for the collection of P. canariensis forest reproductive material (BOE, 2006). It was chosen for its small size (~10 ha), which allowed exhaustive individual sampling, and its isolation from other populations by deep ravines (the closest population is 600 m away, with an abrupt landscape between the two). The surrounding vegetation consists mainly of transition scrubland and pastures, with some vegetable crops grown between the northern limit of the stand and the denser core of the population in the south (Figure 1).

Sample collection and genetic analysis

Sampling. We mapped with a GPS (GPSmap 76CS, Garmin, Kansas City, USA) and collected leaf material from all 182 palms found in the study population. In order to assess reproductive status, we checked the crowns of every palm for evidence of old or emerging inflorescences (withered inflorescences typically remain in the palm for several years). We thus found 56 males, 47 females and 79 nonreproductive palms. The latter bore no trace of inflorescences, and hence we assumed that they did not participate in the reproductive cycle under study. A total of 22 seeds were randomly collected from well-ripened fruits born in the reproductive branches of each of 28 female palms; these palms are referred to as 'mothers' hereafter. Seeds from each maternal family were stored in separate bags along with leaf tissue from the corresponding mother, used to determine the maternal gametic contribution to the embryos. Seeds were first treated by removing the outer fleshy covering and were then sowed in an outdoor nursery at the Forest Nursery of Gran Canaria island Council until seedlings had 1 month of growth. All 616 collected seeds germinated successfully and were used for molecular analysis.

DNA isolation and microsatellite analysis. Total genomic DNA was extracted from ~1 g of silica-dried leaf tissue from each sampled adult and germinated seedling, following Dellaporta et al. (1983), after grinding plant material with a Mixer Mill MM300 (RETSCH, Haan, Germany). The obtained DNA solution was purified using GenElute PCR Clean-Up Kit (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA). DNA concentration was evaluated on a spectrophotometer to verify a minimum of 20 ng µl⁻¹. We tested 14 dinucleotide (GA) microsatellite loci previously developed for P. dactylifera (Billotte et al., 2004), finding that only 8 of them (mPdCIR010, mPdCIR025, mPdCIR048, mPdCIR050, mPdCIR057, mPdCIR063, mPdCIR070 and mPdCIR085) amplified and were polymorphic in P. canariensis (results not shown). DNA fragments were amplified in two PCR multiplex reactions with four loci each, using the Qiagen



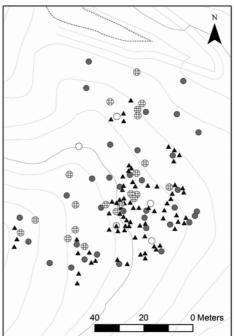


Figure 1 Spatial distribution of palms present in Acusa Verde population: sampled mother female palms (crossed circles), unsampled female palms (white dots), male palms (grey dots) and immature palms (black triangles). (a) The whole study area (dark grey lines are roads and dashed lines represent crop boundaries), is shown. (b) A zoom of the denser core on the southeast side of study area (inner rectangle within left panel).

Multiplex PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and following the manufacturer's instructions, but accommodating reagent proportions to a final volume of 15 ml. Amplification products were run on an ABI3730 capillary sequencer using an internal size standard (GS500 (-250) LIZ) and fragment sizes were manually scored using GENEMAPPER software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Samples with dubious scorings at particular loci, including mother-offspring mismatches identified by CERVUS v 3.0 (Kalinowski et al., 2007), were regenotyped to minimize genotyping errors (yielding a final zero mother-offspring mismatch rate) (Data available from the Dryad Digital Repository doi:10.5061/dryad.1pb6t).

Data analysis

Mating system. We estimated correlated paternity rates $(r_{\rm p})$ at the population and individual-mother level with MITR v3.2 (Ritland, 2002), using the following settings: outcrossing rate fixed at $t_m=1$ (as P. canariensis is dioecious and because no evidence of biparental inbreeding was detected in preliminary analyses; results not shown), known maternal genotype (obtained from maternal leaf tissue), ovule and pollen gene frequencies estimated separately, Newton–Raphson optimization algorithm and 1000 bootstrap resamples of maternal families to obtain standards errors for the population estimate. The effective number of fathers per mother $(N_{\rm ep})$ was then calculated as $N_{\rm ep}=1/r_{\rm p}$. We also quantified the genetic differentiation among the male gametes pollinating each of the 28 mothers by calculating the $\Phi_{\rm FT}$ intraclass correlation parameter of the TwoGener method, as implemented in GENALEX v6.5 (Smouse and Sork, 2004; Peakall and Smouse, 2006).

Paternity assignment. In order to infer the mating distance distribution, we assessed paternity for sampled seeds from the 28 mothers through fractional assignment methods in PATRI (Nielsen et al., 2001; Signorovitch and Nielsen, 2002). We chose to use fractional (rather than categorical) paternity assignment because it does not need independent information about the breeding male population size, and because our primary goal was not to delineate

parental relationships, but to infer the mating distance distribution, for which it is desirable to use the full seed sample, without incurring the high unassignment rates typical of categorical parentage analysis (Oddou-Muratorio et al., 2003). We jointly estimated (1) the male population size (N), assuming a uniform prior distribution in the (56, 1000) interval, (2) posterior probabilities of paternity for every candidate male and (3) the posterior expectation of the proportion of sampled seeds sired by sampled fathers. We initially included nonreproductive individuals (as indicated by the absence of flowers) as candidate males, but null or virtually null posterior probabilities of paternity confirmed their nonreproductive status, and hence they were excluded from the final paternity analysis. The effective pollination distance within the population was then calculated for each of the 606 seeds without missing data (not allowed by PATRI) as the weighted average of the distances between the corresponding mother and every candidate male, using the posterior probabilities of paternity as weights.

We used nonparametric Kolmogorov–Smirnov tests implemented in 'R' (R Development Core Team, 2008) to assess whether the observed mating distance distribution departed significantly from the null hypothesis of random mating, and we did this by comparing the frequency distribution of effective pollination distances and the frequency distribution of all pairwise distances among all sampled males and the 28 mother palms.

Spatially explicit mating model. We fit within-population pollen dispersal kernels using a spatially explicit mating model, or NEIGHBOURHOOD model (Burczyk et al., 2002; Oddou-Muratorio et al., 2005), implemented in the software NM + v 1.1 (Chybicki and Burczyk, 2010). Besides the pollen dispersal kernel parameters, this method jointly estimates the pollen immigration rate into the study population and correlations between male reproductive success and phenotypic and ecological variables (Burczyk et al., 2006; Chybicki and Burczyk, 2010). Basically, the model assumes that each offspring sampled from a mother palm was sired by a paternal gamete either via self-pollination (with probability s), pollen immigration from outside the study area



(with probability m_0) or pollen from a sampled male within the study area (with probability $1-m_p-s$); the dispersal kernel parameters are estimated jointly with m_p and s following a maximum-likelihood method based on Mendelian transition probabilities, without discarding ambiguous-paternity cases and considering the effect of cryptic gene flow (Burczyk et al., 2006). As program settings, we fixed the neighbourhood parameter to 'infinite' in order to include all sampled adults as candidate fathers (Chybicki and Burczyk, 2010), and the selfing rate s at zero, and we jointly estimated genotyping error rates. We assumed five different pollen dispersal kernels: exponential, exponential-power, Weibull, geometric and 2Dt. We included male height and local palm density around male individuals (measured in radii of 5, 15 and 30 m) as variables potentially affecting male reproductive success. In this way we tested whether high total local densities around males could reduce their mating success by hampering free pollen movement to a larger number of distant females. Given that the software assumes a monoecious species, we additionally assumed a fictitious phenotypic trait that forced the male reproductive success of females to zero while not affecting the relative success of different males. Finally, we tested for directional effective pollen dispersal using the von Misses distribution with prevalent direction parameter θ_p (measured from true north) and rate (intensity) parameter Kp (Chybicki and Burczyk, 2010). To avoid local optima, we manually tested different initial values for all parameters. Moreover, following NM+ user's manual instructions, we obtained initial estimates for each parameter by adding parameters one at a time, although we jointly estimated all parameters in the final fit. Akaike information criterion (AIC) was used to evaluate relative goodness of fit, calculated as AIC = $-2(\log L) + 2K$, with $\log L$ being the logarithm of the maximized likelihood and K the number of estimated parameters.

Demographic correlates of local mating parameters. We assessed the influence of demographic variables on local variation in the effective pollen cloud by estimating Spearman's rank correlation coefficients using SPSS Statistic v.19 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) between mating and density parameters for individual maternal plants. For each mother palm, we considered the correlated paternity rate (r_p) and the mean effective dispersal distance (d_{eff}) as mating parameters (as estimated by MLTR v3.2 software and paternity assignment, respectively) and the following local density variables: mean distance to all male palms (d_{mean}), distance to the nearest male palm (d_{min}) and number of males at distance x or less from the mother (N_{mx}) . We considered different values for the radius x, 5, 15, 20, 30, 40 and 50 m, that encompassed the different clump sizes found in the study population.

Genetic diversity and spatial genetic structure. We tested for Hardy-Weinberg equilibrium and calculated the following standard genetic diversity parameters for the adult population and the seed sample separately as implemented in GENALEX v6.5 (Peakall and Smouse, 2006): mean effective number of alleles per locus (N_e) , observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity and inbreeding (F_{IS}) . The allelic richness (N_a) was estimated using the rarefaction method implemented in HP-RARE 1.0 (Kalinowski, 2005) in order to account for the unequal sample sizes of adult and seed samples. We assessed fine-scale spatial genetic structure among adult trees using the spatial autocorrelation analysis implemented in SPAGeDi 1.3 (Hardy and Vekemans, 2002), with the kinship coefficients (Fii) of Loiselle et al. (1995). We set 10 distance classes containing equal numbers of pairwise comparisons each, and conducting 1000 random permutations of individual locations among plants to obtain 95% confidence intervals around the null hypothesis of random genetic structure. Standard errors of observed kinship values were estimated using Jackknife procedure over loci 1000 times. The extent of spatial genetic structure was quantified using the Sp statistics proposed in Vekemans and Hardy (2004), estimated by the ratio $-b_{\rm F}$ (1 - F₁), where $b_{\rm F}$ is the mean slope of the regression of kinship coefficient on Ln (distance) and F1 is the average kinship coefficient over the first distance interval.

RESULTS

Mating system and paternity assignment

The MLTR correlated mating model estimated a moderate degree of correlated paternity within maternal progeny arrays (population

Table 1 Population-level estimates of mating system and pollen dispersal statistics for Phoenix canariensis

Mating system	
Parental F-estimate	-0.179 ± s.e. 0.032
Correlated paternity (rp)	0.173 ± s.e. 0.032
Effective number of pollen donors (Nep)	5.78 ± s.e. 1.07
Genetics differentiation of seed families ($\phi_{ extsf{FT}}$)	0.057, P=0.001
Paternity analysis	
Mean/median/minimum/maximum	96.2/58.5/2.2/391.6 m
potential pollen dispersal distance	
Mean/median/minimum/maximum	71.5/47.9/4.6/377.2 m
pollen dispersal distance on PATRI	

Methods section contains details on each analysis

Table 2 Family-level mating system for Phoenix canariensis

	-				
Maternal tree ID	n _{progeny}	rρ	N _{ep}	Mean PDD	Mean EDD
liee ID				(m)	(m)
02	22	0.155±0.074	6.5±3.1	121.68	85.03
09	22	0.110 ± 0.053	9.1 ± 4.4	98.70	77.14
20	22	0.186 ± 0.088	5.4 ± 2.5	76.65	59.83
24	22	-0.084 ± 0.042	NA	74.04	58.90
28	22	0.095 ± 0.045	10.5 ± 5.0	74.59	39.58
38	22	0.056 ± 0.027	17.9 ± 8.6	73.79	51.95
39	22	0.064 ± 0.031	15.6 ± 7.6	72.32	65.14
40	22	0.342 ± 0.143	2.9 ± 1.2	70.13	44.02
49	22	0.110 ± 0.052	9.1 ± 4.3	70.07	42.57
51	22	0.330 ± 0.156	3.0 ± 1.4	69.34	40.61
73	22	0.022 ± 0.011	45.4 ± 22.7	69.68	91.06
81	22	0.195 ± 0.093	5.1 ± 2.4	70.24	41.99
82	22	0.037 ± 0.018	27.0 ± 13.1	70.35	55.01
83	22	0.067 ± 0.033	14.9 ± 7.4	69.86	67.63
95	22	0.073 ± 0.035	13.7 ± 6.6	70.58	26.67
104	22	0.147 ± 0.070	6.8 ± 3.2	74.58	48.31
125	22	0.371 ± 0.018	2.7 ± 0.1	72.13	61.28
130	22	0.126 ± 0.061	7.9 ± 3.8	70.74	54.54
140	22	0.126 ± 0.061	7.9 ± 3.8	126.24	116.43
141	22	0.065 ± 0.031	15.4 ± 7.3	86.92	85.19
144	22	0.085 ± 0.041	11.8 ± 5.7	79.36	92.94
146	22	0.120 ± 0.058	8.3 ± 4.0	80.50	61.75
149	22	0.113 ± 0.054	8.8 ± 4.2	78.97	66.04
150	22	0.061 ± 0.030	16.4 ± 8.1	77.85	62.45
157	22	0.902 ± 0.428	1.1 ± 0.5	195.71	47.97
160	22	0.353 ± 0.168	2.8 ± 1.3	196.15	123.74
162	22	0.130 ± 0.063	7.7 ± 3.7	197.38	175.23
167	22	0.087 ± 0.042	11.5 ± 5.5	204.25	192.04
Average	22	_	_	96.17	72.68

Abbreviation: NA, cannot be computed.

Number of seeds sampled for each mother (n_{progeny}) , correlated paternity (r_p) as calculated by MLTR (Ritland, 2002), effective number of pollen donors (K_{Pol}) , mean separation distance between the focal maternal palm and all male palms (potential dispersal distance; PDD) and mean distance between pollen donors and the focal maternal palm (effective dispersal distance; EDD), as calculated from paternity analysis results using PATRI (Nielsen et al., 2001), are show

average $r_p = 0.173$), indicating that ~17% of seed pairs were fullsibs. This paternal identity rate within progeny arrays translated into an average estimate of $N_{\rm ep}\!=\!5.8$ effective pollen donors per female (Table 1). Family-level estimates of correlated paternity showed high

13561.8

13499.4 13499.1 13540.4 13531.4 13519.2

45.5

13581.4 13519.6

60.7

13521

was

variation, ranging from negative values (suggesting null parametric values) to 0.902 (Nep range: 1.1-45.4) (Table 2). The TwoGener approach showed moderate to low but significant global differentiation among the pollen pools fertilizing different mother palms $(\Phi_{\rm FT} = 0.057, P = 0.001;$ Table 1) that translates into an estimate of $1/2\Phi_{\rm FT} = 8.8$ effective pollen donors per female, assuming null correlated paternity among mother pairs (see Equation 27 in Austerlitz and Smouse, 2001). The latter assumption is probably not true among the nearby females of the study population, which would explain the positive bias of TwoGener $N_{\rm ep}$ estimate relative to that of MLTR.

Assuming no genotyping errors, PATRI fractional paternity analysis estimated 25% of sampled offspring not sired by sampled candidate fathers, and a breeding male population size of 74.3 (95% confidence interval: 70.8-79.6). In particular, estimated mean mating distances were 71 m for PATRI, and the minimum, median and maximum values ranging from 3 to 377 m (Table 1). At the level of individual maternal progenies, there was substantial variation in the mean mating distance that ranged from 26.6 to 192 m according to PATRI results (Table 2). The mating distance distribution exhibited an excess of short-distance pollination (Figure 2); ~70% of effective pollen has its origin in a distance of <75 m, and 90% from <200 m. The range of effective pollen dispersal was lower than expected under random mating: the mean and median pairwise distance between mothers and all candidate males were 96.2 and 58.5, respectively, that are larger than the estimated mean and median mating distances (Table 1). Kolmogorov-Smirnov tests confirmed that the observed and potential frequency distributions of mating distances were significantly different to effective distances calculated from PATRI results (D=0.145, P < 0.001).

Spatially explicit mating model

NM+ software yielded pollen immigration estimates that were slightly sensitive to the assumed dispersal kernel, ranging from 12 to 14% (Table 3). This rate (12% of seeds sired by immigrant pollen) is smaller than the 25% estimate from PATRI, which should be regarded as a maximum estimate because it assumes no genotyping errors. The within-population random dispersal assumption yielded the worst fit, indicating that a panmictic mating model is unlikely, whereas the best model fits were achieved assuming biparametric leptokurtic pollen dispersal kernels with either thin (Weibull with

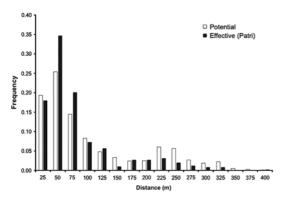


Figure 2 Frequency distribution of potential distances among females and males (white bars) and intermate distances observed by fractional assignments (black bars).

Table 3 Dispersal parame	al parameters e	eters estimated with NM $+$ (Chybicki and Burczyk, 2010)	ıybicki and E	3urczyk, 2010	((
Model	$m_{ ho}$	$d_{ ho}$	в	q	K_{ρ}	ďe	h	Np5	Np15	Np30	Bo7
Random dispersal	0.139 (0.019)	Infa	5 × 10 ^{299 a}	1a	ı	ı	ı	ı	ı	ı	-683
Exponential	0.126 (0.018)	184.9 (22.0)	92.5	19	I	I	I	I	I	I	-677
Exponential-power	0.121 (0.018)	6.44×10^{16}	I	0.03 (0.01)	I	I	I	I	I	I	-674
Weibull	0.121 (0.018)	$32 \times 10^4 (34 \times 10^6)$	34×10^{4}	1.24 (0.05)	I	I	I	I	I	I	-674
Geometric	0.126 (0.018)	$8.46 \times 10^3 (4.06 \times 10^3)$	122.7	3.03 (0.014)	ı	I	ı	I	I	I	-676
2Dt	0.129 (0.019)	$4.11 \times 10^3 (1.81 \times 10^3)$	100.8	1.51 (0.006)	I	I	I	I	I	I	-678
Exponential	0.123 (0.018)	197.3 (22.8)	98.6	la	0.59 (0.10)	297.92 (8.58)	I	I	I	I	-676
	0.124 (0.018)	205.6 (25.2)	102.8	19	0.55 (0.10)	296.32 (9.21)	0.26 (0.07)	Ι	I	I	-675
	0.125 (0.018)	198.5 (23.9)	99.2	1a	0.48 (0.11)	294.04 (10.6)	0.24 (0.07)	-0.16 (0.11)	I	I	-675
	0.125 (0.018)	199.9 (24.6)	6.66	1^{a}	0.49 (0.12)	294.64 (10.5)	0.24 (0.07)	-0.19(0.13)	0.04 (0.12)	I	-675
	0.125 (0.018)	195.2 (24.1)	99.1	la	0.47 (0.13)	293.84 (11.4) 0.24 (0.07)	0.24 (0.07)	-0.18 (0.14) 0.11 (0.16)	0.11 (0.16)	-0.09(0.15)	-675

directionality effect (K_b) and direction at angle (a_b) of pollen dispersal are shown. Male reproductive success gradient the dispersal kernel, direction (Np15) and 30 m (Np30). e (b) parameters of the sof 5 m (Np5), 15 m and e (a) a palms scale distance of pollen dispersal $(d_{\rm p})$, ms (h) and local density around mpalms (h) ion rate (mp), mean theight of male paln indicates that the p assessed for the Passessed for

Heredity



b>1) or fat (exponential-power with b<1) tails (Table 3; see Austerlitz et al., 2004). However, all biparametric kernels considered yielded unrealistically large mean pollen dispersal distances. This is a possible behaviour of the model for biparametric kernels when dispersal is leptokurtic and the spatial scale of analysis (beyond which we are implicitly extrapolating) is limited, being advisable in this case to fix the shape parameter in order to estimate other parameters (I Chybicki, personal communication). We thus assumed an exponential kernel for subsequent estimation of anisotropy and reproductive success parameters. Under the exponential kernel assumption, adding both palm height (as correlate of male reproductive success) and anisotropic dispersal kernel parameters substantially reduced AIC, whereas local density parameters around males did not significantly improve or even worsened the fit (Table 3). The model with smaller AIC vielded a mean pollen dispersal distance of 198 ± 24 m and a 12% pollen immigration rate, with a prevalent dispersal direction to the northwest (296.32° ± 9.21° from the true north), and with the height of male palms positively influencing their mating success ($\beta = 0.24 \pm 0.07$).

Demographic correlates of local mating parameters

Neither the mean distance to all males nor the distance to the nearest male were significantly associated with correlated paternity rates of focal maternal palms (respectively: $r_s = 0.125$, P = 0.53 and $r_s = 0.160$, P = 0.415). Neither did the number of nearby males explained variation in correlated paternity among maternal families for any of the radii considered (all tests with $r_s \leq -0.02$ and P > 0.26). Variation in mean mating distance among maternal families, on the other hand,

Table 4 Mean values of genetic diversity statistics for adult individuals of Phoenix canariensis at Acusa Verde population and seeds collected from mother palms

Analysis level	Ν	N_{a}	N_e	Но	H _e	F_{IS}
Mean population	182	3.18	3.23	0.664	0.598	-0.108*
Mean seeds	616	3.08	2.94	0.597	0.578	-0.031*

Abbreviations: Number of samples (N), rarefied allelic richness (Na), number of effective alleles (N_e) , observed heterozygosity (H_o) , expected heterozygosity (H_e) and inbreeding coefficient (F_{IS}) are shown. *P<0.05

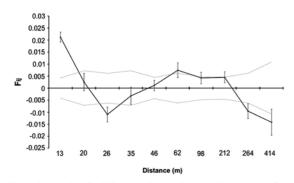


Figure 3 Analysis of within-population spatial genetic structure of P. canariensis. Mean kinship coefficient (F_{ij}) and 95% confidence intervals (vertical lines) between adult individual pairs for 10 distance classes. The two dashed lines delimit 95% confidence intervals around the null hypothesis of spatial randomness, as determined by permutations.

was not associated with correlated paternity values ($r_s = -0.146$, P = 0.458). There was however a significant negative correlation between mean effective pollination distance and local male density. The relationship was stronger for radii $> 15 \,\mathrm{m}$ ($r_{\rm s} \le -0.498$, $P \leq 0.007$). Overall, lower the local male density around females, the longer their mean mating distance, without an effect on correlated paternity rates.

Genetic diversity and spatial genetic structure

We found similar moderately high levels of genetic diversity (He, Na and Ne) among the adults and the seeds (Table 4). There was no evidence of inbreeding in natural palms or in the seed pool, with both actually exhibiting heterozygote excess, although Ho was somewhat lower (and F_{IS} somewhat larger) for the seed sample, suggesting some degree of (biparental) consanguineous mating that diminishes at the adult stage (Table 4). The spatial autocorrelations analysis revealed weak but significant spatial genetic structure in the first distance class only, with palms located up to 21 m from each other being genetically more related than the average (Figure 3).

DISCUSSION

Our study provides new insights about the mating system and dispersal patterns of P. canariensis. Here, we provide detailed information about a major component of the dispersal process, focussing on pollen gene flow within and into an isolated population of the species.

The analysis of the effective pollen pool revealed restricted dispersal and uneven paternal contributions, resulting in moderate to low differentiation among pollen gametes siring different maternal progenies. The estimated effective number of fathers per maternal plant $(N_{\rm ep} = 5.8)$ lies, respectively, in the medium and lower range of studied animal- and wind-pollinated trees (Smouse and Sork, 2004), although being very similar to the value obtained for the only other palm species studied so far ($N_{\rm ep} = 5.4$ for the widespread Oenocarpusbataua; Ottewell et al., 2012). Correlated paternity rates varied substantially among maternal progenies (ranging from null to 0.902), a variation that could not be explained by the spatial distribution of males relative to focal females. Other factors such as individual male fecundity variation and asynchronous flowering phenology could have determined the observed variation in individual mating system parameters.

The estimated within-population mating distance distributions revealed nonrandom mating, with a rapid decrease of effective pollen dispersal frequency over short distances but at same time a nonnegligible (10%) frequency of mating events over 200 m and a maximum mating distance that matched the maximum distance between individuals in the population. This leptokurtic pattern resembles the ones reported for different wind-pollinated tree species (Dow and Ashley, 1998; Streiff et al., 1999; Robledo-Arnuncio and Gil, 2005; Pakkad et al., 2008; Pluess et al., 2009). Considering the small size and geometry (with a densest main core) of the studied population, the observed mean dispersal distance (71 m) indicates that effective pollen moves across the whole population area, consistently with the contribution of most sampled males to the seed crop. The mean mating distance for P. canariensis is somewhat lower than values reported for some small population of wind-pollinated trees, such as Araucaria angustifolia (83 m; Bittencourt and Sebbenn, 2007) or Pinus sylvestris (83 m; Robledo-Arnuncio and Gil, 2005), but greater than estimates obtained within forest fragments of the anemophilous Fagus sylvatica (42-59 m; Piotti et al., 2012). Besides potential interspecific variation in dispersal capacity, variation in tree



dispersal distance estimates in the literature is not surprising, given that the mating distance distribution can be expected to depend strongly on the spatial geometry of the population (size, density, continuity, shape and so on), as confirmed by several empirical studies (Hanson et al., 2008; Piotti et al., 2012). Further studies of pollen dispersal within more continuous areas of P. canariensis would be necessary to contrast the pattern observed in the small grove studied here. Moreover, many population of P. canariensis are limited to isolated crop boundaries, and it would be interesting to assess the consequences for pollen dispersal of this and other habitat changes (Hanson et al., 2008), as well as different kind of managements (Piotti et al., 2012).

Overall, the analysis of the correlation between local population demography and mating patterns showed no association between correlated paternity and effective pollination distance at the maternal progeny level, unlike previous observations for other tree species (Fuchs et al., 2003; Robledo-Arnuncio and Gil, 2005). As suggested by Ottewell et al. (2012), this independence puts into question simplistic general predictions of the effective number of fathers as simple functions of effective dispersal distance. Other factors independent of dispersal distance are indeed expected to affect effective paternal numbers under passive dispersal, such as local density and phenological asynchronies (Robledo-Arnuncio and Austerlitz, 2006; Hanson et al., 2008). We failed to detect any effect of local density around females on the effective number of males they mate with, and this would suggest that asynchronous phenology may be the key determinant of the latter and would be worthy of further investigation. Although flowering phenology was not measured during the study period, we have observed a temporally diffuse pattern of flowering in some other populations of P. canariensis during 2011 and 2012, with a 6- to 7-month long flowering period at the population level that contrasts with the short anthesis of inflorescences. In addition, the number of inflorescences per individual observed at any given time varies substantially, from approximately 1 to 6 in females and from 1 to 10 in males (I Saro, unpublished data). All this variability influences the daily rate of flowering overlap among the sexes and could explain the differentiation between effective pollen clouds received by different mother palms (Streiff et al., 1999; Kitamoto et al., 2006). Flowering asynchronies among sexes within populations, on the other hand, might increase the proportion of gene immigration from other groves, if local females become receptive when no local pollen is available. Further investigation on flowering phenology overlap among populations, sufficiently replicated to capture the expected variation across years (Pakkad et al., 2008), could help better understand the potential for long-distance effective pollen flow and its temporal variation in

The spatially explicit mating model also rejected the random mating null model, yielding the best fits for biparametric leptokurtic pollen dispersal kernels. Several of these leptokurtic functions (such as the exponential-power and Weibull) could be suitable for modelling short-distance pollen dispersal for the species, at least over the scale of our study area, although extrapolation of these models over long distances would be risky, as indicated by their unrealistic means. It is well known that models with fairly different tails can fit about equally well the observed data (Austerlitz et al., 2004; Pluess et al., 2009), exemplifying the problematic characterization of both short- and long-distance pollination with a simple phenomenological function fitted over short distances only (Goto et al., 2006). Even if there was high uncertainty around our kernel's tail estimates (as is expected when using paternity data, see Niggemann et al., 2012), however, the

mating model clearly supported a moderate amount of long-distance dispersal, with an estimated 12% of pollen immigration from outside the population. This estimate demonstrates potential for genetic connectivity among P. canariensis remnant populations, and it suggests that effective pollen dispersal can be better described by a combination of two processes in the species: local dispersion and long-distance transport, as found in other wind-pollinated species (Streiff et al., 1999; Oddou-Muratorio et al., 2005; Pluess et al., 2009). Compared with other wind-pollinated species, the estimated pollen immigration rate lies below values found in continuous or weakly fragmented populations (Dow and Ashley, 1998; Streiff et al., 1999), and above estimates reported for more strongly isolated populations (Robledo-Arnuncio and Gil, 2005). This significant quantity of immigrant pollen, to the extent that it were translated into effective gene flow among established seedlings, could greatly contribute to population genetic diversity, avoiding the drift-induced erosion of genetic variability expected for such a small local population size (Hamrick, 2004; Bittencourt and Sebbenn, 2007; Pakkad et al., 2008). Gene flow among palm groves would tend at the same time to homogenize neutral genetic variation over greater scales, at least among fragments within islands. An interesting topic for future studies would be to assess whether distant groves are also demographically connected via seed dispersal.

The mating model also revealed a significant pattern of anisotropic pollen flow, with a predominant northwest direction. Several factors may be invoked to explain anisotropic pollen flow, such as prevailing wind directions at the regional and local scales, and air turbulences within the canopy. The Acusa Verde population grows within a ravine to leeward of the prevailing northeastern winds in the island that are thus unlikely to have a large impact on local air movement. Previous studies for wind-pollinated species have found a similarly weak influence of prevailing regional winds on pollen dispersal direction (Austerlitz et al., 2007; Pluess et al., 2009), suggesting that local winds, probably variable across years, may be major determinants of pollen movement. Altitude and orientation have a large influence on local climatic conditions in the Canary Islands; the pollination season (summer) is climatically the most stable, with an inversion layer at an altitude of 800-1000 m separating lower moist and cool from upper dry and warm air. Our study population is located at an elevation of 500-600 m, and hence we would expect local air movement being mainly determined by diurnal ascendant anabatic wind and nocturnal descendant katabatic wind, along the north to northwest oriented ravine (Figure 1), with the upper inversion layer acting as a barrier and the high buoyancy of P. canariensis pollen (maximum diameter of 30 µm, usually from 12 to 25 µm; Reille, 1998) favouring its altitudinal airborne transport. It would indeed be worth testing the possibility that among-population pollen exchange were restricted to palm groves within the same ravine, or at neighbouring ravines, as long as they are not on opposite extremes of the inversion layer. The fact that most effective pollen flows to northwestern areas might be indicating that pollination takes place largely at night or dawn (consistently with anthesis timing), to the extent that such altitudinal wind patterns are truly determining mating patterns. At the densest cores of the population, on the other hand, pollen will probably be subject to vertical and lateral stochastic turbulences within the canopy (Levin and Kerster, 1974; Di-Giovanni and Kevan, 1991; Streiff et al., 1999), with an unpredictable directional outcome.

Although we lack information on prefragmentation diversity levels, the moderate to high level of genetic variety observed might indicate some resilience of the genetic diversity of the species (neutral) to demographic disturbance. Moreover, the genetic diversity level found



in the adult individuals remained similarly high in the seed crop (He values of 0.59 and 0.57, respectively), with a similar allelic richness in the progeny ($N_a = 3.18$ versus 3.08, respectively), consistently with the maintenance of genetic diversity across generations (possibly enhanced by gene flow). On the other hand, we found heterozygote excess in both seeds and adults ($F_{IS} = -0.027$, P < 0.05, and $F_{IS} = -0.098$, P < 0.05, respectively). Selective factors are not likely to have affected the heterozygosity levels of the employed, putatively neutral, microsatellite markers. The observed pollen immigration rate, if originating in genetically divergent populations, could however have enhanced the heterozygosis of the seed crop. Moreover, heterozygote excess is expected in small populations of strictly outcrossing species that could explain the observed levels for both adults and seeds (Balloux, 2004).

Considering the relatively large range of pollen dispersal, one could have expected an effective mixing of genes by pollen flow within the study of P. canariensis population, hampering spatial genetic structuring. However, spatial genetic structure is also determined by restricted seed dispersal, all the more with large correlated paternity among seed progenies (Vekemans and Hardy, 2004). The seed dispersal system of P. canariensis is not well known. The common raven (Corvus corax) has been cited as an effective seed disperser of the species (Nogales et al., 1999), although there are possibly other dispersers. However, it seems that the vast majority of fruits fall and remain within few metres of the maternal palm (I Saro, personal observation), and it is likely that seed dispersal is more restricted than pollen movement in this palm species. The relatively high value of S_p is comparable with reported values for species with rather restricted pollen and seed dispersal, particularly similar to those of barochorous species (Vekemans and Hardy, 2004). A joint analysis of seed and pollen dispersal would be necessary to measure their relative contribution to effective gene flow among established seedlings.

Implications for conservation

The dispersal and genetic parameters estimated in this study may prove useful for eventual genetic conservation plans of P. canariensis. On one hand, the genetic structure of the effective pollen cloud and the large variability in correlated paternity rates among maternal families calls for abundant replication at the family level in any germplasm collection for ex situ conservation. Moreover, the observed spatial genetic structure among adult palms and the estimated average pollination distance suggest a minimum separation distance of 70 m among mothers for seed collection in order to reduce relatedness among maternal families. On the other hand, given the evidence of significant intraspecific pollen dispersal into an isolated P. canariensis population found in the present study, the possibility of interspecific genetic introgression via pollen flow from allochthonous Phoenix species cannot be disregarded, at least considering spatial factors alone. For instance, the presence of individuals of P. dactylifera in both urban gardens and cultivated populations, even if distant, could be more threatening than previously thought and renders necessary the assessment of pollen exchange between natural and allochthonous stands.

DATA ARCHIVING

Genotypes for the data set of 798 samples are available from the Dryad Digital Repository: doi:10.5061/dryad.1pb6t.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to all the people who offered helpful field assistance. We sincerely thank Agustín Naranjo (ULPGC) for assistance with geographical data analysis. We also thank Marcos Díaz-Bertrana for detailed information about the Canarian palm and the Acusa Verde population. Thanks to Elisabet Rivero, Cynthia Díaz, Josué Ramírez and Jorge Carnicer for their collaboration in lab work. We appreciate comments from anonymous reviewers that helped to improve earlier versions of this manuscript. We thank the Gran Canaria Island Council for allowing access to the outdoor Forest Nursery of the island Council for seed germination. This work was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Project Ref. CGL2009-10215).

- Austerlitz F, Dick CW, Dutech C, Klein EK, Oddou-Muratorio S, Smouse PE et al. (2004). Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. Mol Ecol 13: 937-954
- Austerlitz F, Dutech C, Smouse P, Davis F, Sork V (2007). Estimating anisotropic pollen dispersal; a case study in Quercus lobata, Heredity 99: 193-204.
- Austerlitz F, Smouse PE (2001). Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between Φft, pollen dispersal and interfemale distance. Genetics 157:
- Balloux F (2004). Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. Evolution 58: 1891-1900.
- Billotte N, Marseillac N, Brottier P, Noyer JL, Jacquemoud-Collet JP, Moreau C et al. (2004). Nuclear microsatellite markers for the date palm (Phoenix dactylifera L.): characterization and utility across the genus Phoenix and in other palm genera. Mol Ecol Notes 4: 256-258.
- Bittencourt JVM, Sebbenn AM (2007). Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree Araucaria angustifolia in southern Brazil. Heredity 99: 580-591.
- BOE (2006). RESOLUCIÓN de 18 de abril de 2006, de la Dirección General de Agricultura, no 8449. Bol Oficial del Estado 113: 18466-18471.
- Burczyk J, Adams WT, Birkes DS, Chybicki IJ (2006). Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. Genetics 173: 363-372.
- Burczyk J, Adams WT, Moran GF, Griffin AR (2002). Complex patterns of mating revealed in a Eucalyptus regnans seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. Mol Ecol 11: 2379-2391.
- Chybicki IJ, Burczyk J (2010). NM+: software implementing parentage-based models for estimating gene dispersal and mating patterns in plants. Mol Ecol Resour 10: 1071-1075.
- Crawford DJ (1984). The estimation of neighbourhood parameters for plant population. Heredity 52: 273-283
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983), A plant DNA minipreparation; version II, J Plant Mol Biol Report 1: 19-21
- Di-Giovanni F, Kevan P (1991). Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination: a review. Can J For Res 21: 1155-1170.
- Dow B, Ashley M (1998). High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. J Heredity 89: 62-70.
- Dransfield J, Uhl NW, Asmussen C, Baker W, Harley M, Lewis C (2008). Genera Palmarum. The Evolution and Classification of Palms. Royal Botanic Gardens Kew: Kew, UK.
- Fernández-Palacios JM, Whittaker RJ (2008). The Canaries: an important biogeographical
- meeting place. J Biogeogr 35: 379-387. Fuchs EJ, Lobo JA, Quesada M (2003). Effects of forest fragmentation and flowering
- phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree Pachira quinata, Conserv Biol 17: 149-157. Gaiotto FA, Grattapaglia D, Vencovsky R (2003). Genetic structure, mating system, and
- long-distance gene flow in heart of palm (Euterpe edulis Mart.), J Heredity 94: 399-406.
- González-Pérez MA, Caujape-Castells J, Sosa PA (2004). Molecular evidence of hybridisation between the endemic Phoenix canariensis and the widespread P. dactylifera with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Plant Syst
- Goto S, Shimatani K, Yoshimaru H, Takahashi Y (2006). Fat-tailed gene flow in the dioecious canopy tree species Fraxinus mandshurica var. japonica revealed by microsatellites. Mol Ecol 15: 2985-2996.
- Hamrick JL (2004). Response of forest trees to global environmental changes. For Ecol Manage 197: 323-335.
- Hanson T, Brunsfeld S, Finegan B, Waits L (2008). Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree Dipteryx panamensis in a fragmented Costa Rican landscape. Mol Ecol 17: 2060-2073.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Mol Ecol Notes 2: 618-620. Jones A, Small C, Paczolt K, Ratterman N (2010). A practical guide to methods of parentage analysis. Mol Ecol Resour 10: 6-30.
- Jump AS, Peñuelas J (2006). Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a windpollinated tree. PNAS 103: 8096-8100.



- Kalinowski ST (2005). HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. Mol Ecol Notes 5: 187-189.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol Ecol 16: 1099-1106.
- Kitamoto N, Ueno S, Takenaka A, Tsumura Y, Washitani I, Ohsawa R (2006). Effect of flowering phenology on pollen flow distance and the consequences for spatial genetic structure within a population of Primula sieboldii (Primulaceae). Am J Bot 93:
- Klein E, Lavigne C, Gouyon P (2006). Mixing of propagules from discrete sources at long distance: comparing a dispersal tail to an exponential. BMC Ecol 6: 3.
- Kremer A, Ronce O, Robledo-Arnuncio JJ, Guillaume F, Bohrer G, Nathan R et al. (2012). Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change, Ecol Lett 15: 378-392.
- Levin DA, Kerster HW (1974). Gene flow in seed plants. Evol Biol 7: 139-220.
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995). Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, Psychotria officinalis (Rubiaceae). Am J Bot 82: 1420-1425.
- Loveless M, Hamrick J (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Ann Rev Ecol Syst 15: 65-95.
- Marshall T, Slate J, Kruuk L, Pemberton J (1998). Statistical confidence for likelihoodbased paternity inference in natural populations. Mol Ecol 7: 639-655.
- Meekijjaroenroj A, Anstett MC (2003). A weevil pollinating the Canary Islands date palm: between parasitism and mutualism. Naturwissenschaften 90: 452-455.
- Nielsen R, Mattila DK, Clapham PJ, Palsbøll PJ (2001). Statistical approaches to paternity analysis in natural populations and applications to the North Atlantic humpback whale. Genetics 157: 1673-1682.
- Niggemann M, Wiegand T, Robledo-Arnuncio JJ, Bialozyt R (2012). Marked point pattern analysis on genetic paternity data for uncertainty assessment of pollen dispersal kernels. J Ecol 100: 264-276.
- Nogales M, Hernández EC, Valdés F (1999). Seed dispersal by common ravens Corvus corax among island habitats (Canarian Archipelago). Ecoscience 6: 55-61.
- Oddou-Muratorio S, Houot ML, Demesure-Musch B, Austerlitz F (2003). Pollen flow in the wildservice tree, Sorbus torminalis (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. Mol Ecol 12: 3427-3439.
- Oddou-Muratorio S, Klein E, Austerlitz F (2005). Pollen flow in the wildservice tree, Sorbus torminalis (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent-offspring analysis, Mol Ecol 14: 4441-4452.
- Ottewell K, Grey E, Castillo F, Karubian J (2012). The pollen dispersal kernel and mating system of an insect-pollinated tropical palm, Oenocarpus bataua. Heredity 109: 332-339.

- Pakkad G, Ueno S, Yoshimaru H (2008). Gene flow pattern and mating system in a small population of Quercus semiserrata Roxb. (Fagaceae). For Ecol Manage 255: 3819-3826.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6: 288-295.
- Piotti A, Leonardi S, Buiteveld J, Geburek T, Gerber S, Kramer K et al. (2012). Comparison of pollen gene flow among four European beech (Fagus sylvatica L.) populations characterized by different management regimes. Heredity 108: 322-331.
- Pluess AR, Sork VL, Dolan B, Davis FW, Grivet D, Merg K et al. (2009). Short distance pollen movement in a wind-pollinated tree, Quercus lobata (Fagaceae). For Ecol Manage 258: 735-744.
- R Development Core Team (2010). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0; URL. http://www.R-project.org/
- Reille M (1998). Pollen Et Spores D'Europe Et D'Afrique Du Nord. Supplément 2, Laboratoire de Botanique historique et Palynologie, Marseille.
- Ritland K (2002). Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. Heredity 88: 221-228.
- Robledo-Arnuncio JJ, Austerlitz F (2006). Pollen dispersal in spatially aggregated populations. Am Nat 168: 500-511.
- Robledo-Arnuncio JJ, Austerlitz F, Smouse PE (2006). A new method of estimating the pollen dispersal curve independently of effective density. Genetics 173: 1033-1045.
- Robledo-Arnuncio JJ, Gil L (2005). Patterns of pollen dispersal in a small population of Pinus sylvestris L. revealed by total-exclusion paternity analysis. Heredity 94: 13-22.
- Sezen UU, Chazdon RL, Holsinger KE (2007). Multigenerational genetic analysis of tropical secondary regeneration in a canopy palm. Ecology 88: 3065-3075.
- Signorovitch J, Nielsen R (2002). PATRI -paternity inference using genetic data. Bioinformatics 18: 341-342.
- Smouse PE, Dver RJ, Westfall RD, Sork VI. (2001). Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. Evolution 55: 260-271. Smouse PE, Sork VL (2004). Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. For Ecol Manage 197: 21-38.
- Streiff R, Ducousso A, Lexer C, Steinkellner H, Gloessl J, Kremer A (1999). Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of Quercus robur L. and Q. petraea (Matt.) Liebl. Mol Ecol 8: 831-841.
- Trakhtenbrot A, Nathan R, Perry G, Richardson DM (2005). The importance of longdistance dispersal in biodiversity conservation. Divers Distrib 11: 173-181.
- Vekemans X, Hardy O (2004). New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. Mol Ecol 13: 921-935.
- Wright S (1943), Isolation by distance, Genetics 28: 114-138



ORIGINAL PAPER

Patterns of genetic diversity in *Phoenix canariensis*, a widespread oceanic palm (species) endemic from the Canarian archipelago

Isabel Saro · Miguel A. González-Pérez · Carlos García-Verdugo · Pedro A. Sosa

Received: 17 April 2014/Revised: 21 October 2014/Accepted: 5 November 2014 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Understanding how genetic diversity is structured on oceanic island taxa requires the integration of physical, biological and anthropomorphic factors. Founder effects coupled with limited dispersal over sea barriers typically result in low levels of genetic variation in island populations. In widespread species, restriction in gene flow across large areas leads to patterns of isolation by distance (IBD), but recent population-based studies indicate that genetic structure on islands can be complex even at local scales. Here, we investigated the patterns of genetic variation in a widespread island palm (Phoenix canariensis) displaying reproductive syndromes associated with extensive dispersal (wind pollination and zoochory). Genetic variation was assessed at eight nuclear microsatellite loci in 330 individuals of 15 Canarian populations. Our results showed that levels of within-population genetic diversity in P. canariensis depend on the island considered, with a strong decreasing pattern from the easternmost and oldest island to the westernmost and youngest islands. A Mantel test supported a stepping-stone model of

configuration of the Canary Islands and a relatively recent pattern of differentiation across islands appear to have had a primary influence on the genetic structure of this island taxon. Keywords Arecaceae · Phoenix canariensis · Genetic diversity · Microsatellites · Isolation by distance · Oceanic

differentiation across the archipelago that fits the sequence

of island emergence, and results from ABC and clustering

analyses also corresponded with this progression rule. In

addition, our analyses were congruent with the idea that the

only large population found on Lanzarote has an anthropo-

genic origin. Despite the high dispersal potential of

P. canariensis, our analyses suggest that the geographical

islands · Canary Islands

Communicated by P. Ingvarsson

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11295-014-0815-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. Saro (☑) · M. A. González-Pérez · P. A. Sosa Departamento de Biología, Campus de Tafira, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain e-mail: isaro@proyinves.ulpgc.es

M. A. González-Pérez · C. García-Verdugo Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN, Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"- Unidad Asociada CSIC, Cabildo de Gran Canaria, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain

Introduction

There are general expectations regarding the effect of island colonization on the genetic structure of plant populations, such as that the populations of island endemic taxa often show reduced levels of variation in comparison with continental populations (Frankham 1997; Whittaker and Fernández-Palacios 2007). Low genetic variation can also be related to drastic changes in population number and size (Frankham 1996; Kaneko et al. 2008), which are frequently associated with the stochastic events inherent to islands and/or fragmentation (Stuessy et al. 2014). In the case of archipelagos, the presence of oceanic barriers restricts gene flow among islands, and widespread species are therefore expected to show a strong genetic structure (e.g. Bottin et al. 2005; Kaneko et al. 2008). Limited dispersal can prevent island species from forming a single panmictic unit across the archipelago, resulting in a gradual change in allele frequencies over geographical distance known as 'isolation by distance' (IBD)



(Wright 1943; Hedrick 2011). Isolation-by-distance patterns are expected to occur following the sequential (i.e. stepping stone) colonization of the archipelago, particularly in those island systems showing a linear configuration (Juan et al. 2000; Emerson 2002; Kwon and Morden 2002; Kaneko et al. 2008; Yamada and Maki 2012). This 'progression rule' typically leads to a decrease in within-population genetic diversity at the leading edge and an IBD pattern across the archipelago (Inoue and Kawahara 1990; Kaneko et al. 2008; Yamada and Maki 2012).

Because many population genetic studies have focused on the conservation of endangered, narrowly distributed elements of oceanic islands (e.g. Kwon and Morden 2002; González-Pérez et al. 2013; Sosa et al. 2013), we still have limited knowledge on the process-shaping patterns of genetic diversity at larger scales in island systems. Some genetic studies on widespread Macaronesian taxa have detected inverted patterns of genetic diversity when comparing island and mainland areas: i.e. similar or even higher levels of genetic variation in comparison to continental relatives have been reported for island taxa, probably due to higher extinction rates in mainland areas during the Pliocene and Pleistocene periods, coupled with multiple colonization events facilitated by the proximity of these archipelagos to the continent (Francisco-Ortega et al. 2000; Fernández-Mazuecos and Vargas 2011; Désamoré et al. 2012; García Verdugo et al. 2013). Population-based studies have further suggested that dispersal syndromes associated with high dispersal abilities, such as wind pollination or fleshy fruits, also ameliorate population subdivision resulting from geographical isolation and IBD across the archipelago (García-Verdugo et al. 2010; Martins et al. 2013; García-Verdugo et al. 2014), which is at odds with the general expectations for island taxa. In summary, the available information suggests that several factors account for levels of genetic variation within the populations of endemic island species (reviewed in Stuessy et al. 2014). Time since colonization, island ontogeny, species generation time, mode of reproduction and dispersal patterns (including human-mediated migration) appear to be the most influential factors in the distribution of genetic variation in oceanic biotas, and such conditions can modify the classical expectations of the low levels of genetic diversity and strong genetic structure for island taxa (Pfosser et al. 2006; López-Sepulveda et al. 2013; Stuessy et al. 2014).

Species with widespread distributions provide a useful framework in which to address questions relating to the factors responsible for the patterns of genetic variation in island taxa. Thus, widespread species allow investigations on the factors involved in multi-island colonization with the benefits associated with large sample sizes (Bottin et al. 2005; García-Verdugo et al. 2010; Martins et al. 2013). In this study, we investigate the patterns of genetic diversity in a widespread plant species, *Phoenix canariensis* H. Wildpret (Arecaceae;

Rivera et al. 2013), in the Canary Islands. This plant species is a diploid (n=18), long-lived, dioecious and arborescent palm endemic to this archipelago. It is a relatively frequent element within the region, although the most abundant palm groves are found on two central islands (La Gomera and Gran Canaria; Sosa et al. 2007). It is also a key representative species of the Canarian thermophilous woodland, particularly between 200 and 500 m a.s.l., occupying a wide range of habitats from semi-arid to humid areas just below the cloud forest belt. Since P. canariensis is wind-pollinated and bears fleshy fruits potentially dispersed by birds (Nogales et al. 1999; Saro et al. 2014), its widespread distribution could be associated with moderate-to-high levels of within-population genetic diversity and low population genetic structure (Nybom 2004; García-Verdugo et al. 2010; Martins et al. 2013). Previous results based on allozyme markers are consistent with this notion (González-Pérez et al. 2004), although broad-scale studies of this taxon are lacking. Additionally, P. canariensis is regarded as threatened by the Canarian government (BOC 1991), and it occurs in habitats protected by the European legislation (92/ 43/EEC). An examination of the distribution of genetic variation in natural populations would therefore be valuable for developing adequate management strategies. A representative number of P. canariensis populations were analyzed in this study with a set of nuclear microsatellite markers: i) to investigate the levels of genetic variation in *P. canariensis* across the Canarian archipelago, ii) to assess the impact of oceanic barriers on the genetic structure of P. canariensis and (iii) to infer the most plausible model of differentiation accounting for the observed patterns.

Material and methods

Study area and sampling

The Canary Islands comprise seven volcanic islands and four islets of considerable geological complexity, with a broad range of geological ages (Carracedo et al. 2008) (Fig. 1). Three hundred and thirty individuals from 15 populations of P. canariensis (22 individuals per population) were selected across six of the seven islands of the Canarian archipelago according to its distribution and abundance (Fig. 1, Table 1). The island of El Hierro was not considered because P. canariensis individuals are rare and do not constitute actual populations. Because the spatial distribution of *P. canariensis* individuals within populations can be scattered or clumped (Sosa et al. 2007; Saro et al. 2014), plants were randomly sampled for DNA analysis according to the configuration of each population. Mean distances between sampled individuals therefore ranged from 80 m (cluster) to 390 m (scattered individuals). All sampled individuals were mapped using a GPS (GPSmap 76CS, Garmin, Kansas City, USA). In

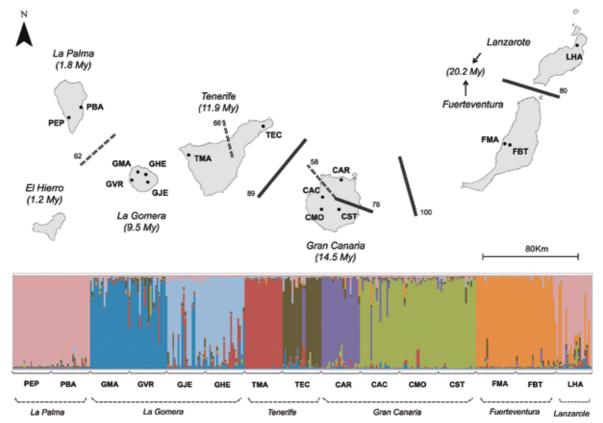


Fig. 1 Distribution of sampled populations of *P. canariensis* in the Canarian archipelago with boundaries of genetic differentiation detected by BARRIER in a spatial context: the *solid lines* represent a high level of support from 100 bootstrapped matrices (more than 75 % support), and *dotted lines* show barriers with moderate support (between 50 and 75 % support). Below, a diagram summarizing the clustering results obtained

with the Bayesian approach of STRUCTURE, where the proportional assignments of individuals to each cluster within each population, assuming eight clusters (K=8). The geological ages of the islands are present in parenthesis (My millions of years). Populations are coded in Table 1

addition, 22 individuals of *Phoenix dactylifera* representing different cultivars from Morocco (the closest mainland area) were included in some analyses as an external outgroup.

DNA isolation and microsatellite analysis

Total genomic DNA was extracted from 50 mg of dried leaf material using the Invisorb® DNA Plant HTS 96 Kit, following the manufacturer's protocol. DNA aliquots were adjusted to ensure a minimum concentration of 20 ng/μL. We tested 14 dinucleotide (GA) microsatellite loci previously developed for *P. dactylifera* (Billotte et al. 2004). Only eight of them (mPdCIR010, mPdCIR025, mPdCIR048, mPdCIR050, mPdCIR057, mPdCIR063, mPdCIR070 and mPdCIR085) were successfully amplified and were polymorphic in the study species. Microsatellite loci were amplified in two PCR multiplex reactions with four loci each, using the Multiplex PCR kit (Qiagen, CA, USA) and adjusting reagent proportions to a final volume of 15 μL. Amplification products were

run on an ABI3730 capillary sequencer using an internal size standard (GS500 (-250) LIZ) and fragment sizes were scored using GENEMAPPER v4.0 software (Applied Biosystems, CA, USA). Five percent of the samples were amplified twice to detect potential inconsistencies in amplification, and two people reviewed allele scoring to minimize genotyping errors.

Data analysis

Genetic diversity and structure of populations Standard genetic diversity statistics, including the number of different alleles (N_a), number of effective alleles (N_e), number of private alleles (N_p a), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e), were calculated using GenAlEx v6.5 (Peakall and Smouse 2006). The average across all loci for Weir and Cockerham's fixation index ($F_{\rm IS}$) was calculated, and departures from random mating for each population were tested using probability tests (Fisher exact tests) implemented in GENEPOP v4.2 (Raymond and Rousset 1995).



Table 1 Location, code and mean elevation of studied populations and summary of genetic diversity estimates obtained with eight nuclear microsatellites for P. canariensis in each population and island: number of different alleles (N_a) , number of effective alleles (N_e) , number of

private alleles $(N_{\rm pa})$, observed heterozygosity $(H_{\rm o})$, expected heterozygosity $(H_{\rm e})$ and fixation index $(F_{\rm IS})$ calculated according to Weir and Cockerham (1984)

Island	Population	Code	Mean elevation (m)	Coordinates	$N_{\rm a}$	$N_{\rm e}$	$N_{\rm pa}$	$H_{\rm o}({\rm SE})$	$H_{\rm e}$ (SE)	F_{IS}
La Palma	El Paso	PEP	569	28° 34′ 32″ N	2.37	1.55	0	0.318 (0.10)	0.273 (0.09)	-0.16 (ns)
				17° 52′ 33″ W	• • •					
	Breña Alta	PBA	225	28° 39′ 12″ N	3.00	1.84	0	0.386 (0.13)	0.325 (0.10)	-0.13 (ns)
La Gomera	Manaria	GMA	284	17° 46′ 24″ W 28° 10′ 15″ N	4.12	2.57	1	0.500 (0.13)	0.485 (0.12)	0.02 (ns)
La Gomera	Macayo	GMA	204	17° 16′ 25″ W	4.12	2.57	1	0.500 (0.15)	0.465 (0.12)	0.02 (ns)
	Hermigua	GHE	424	28° 09′ 10″ N	4.62	2.74	0	0.472 (0.12)	0.458 (0.12)	-0.03 (ns)
	Tiermigua	OHL	727	17° 12′ 21″ W	4.02	2.74	U	0.472 (0.12)	0.430 (0.12)	0.05 (115)
	Jerduñe	GJE	788	28° 05′ 44″ N	4.50	2.65	1	0.472 (0.13)	0.446 (0.12)	-0.02 (ns)
				17° 11′ 18″ W			-	(*****)	******	()
	Valle Gran Rey	GVR	188	28° 06′ 28" N	5.00	2.70	0	0.528 (0.12)	0.514 (0.10)	0.06 (ns)
	-			17° 19′ 18″ W						
Tenerife	Masca	TMA	557	28° 18′ 11″ N	2.75	1.84	1	0.364 (0.10)	0.356 (0.10)	0.01 (ns)
				16° 50′ 20″ W						
	El Cercado	TEC	166	28° 31′ 51″ N	4.62	2.83	1	0.545 (0.11)	0.528 (0.10)	-0.02 (ns)
				16° 12′ 27″ W						
Gran Canaria	Arucas	CAR	135	28° 07′ 46″ N	6.00	3.39	4	0.648 (0.10)	0.597 (0.09)	-0.06 (ns)
				15° 32′ 03″ W						
	Acusa	CAC	554	27° 59′ 52″ N	5.87	3.34	4	0.670 (0.10)	0.621 (0.09)	-0.05 (ns)
	34/	07.00	440	15° 41′ 32″ W	4.60	205		0.560 (0.11)	0.500 (0.10)	0.05()
	Mogán	CMO	449	27° 54′ 20″ N	4.62	2.95	0	0.568 (0.11)	0.528 (0.10)	-0.05 (ns)
	Santa Lucía	CST	514	15° 41′ 49″ W 27° 54′ 15″ N	4.37	2.10	0	0.517 (0.08)	0.481 (0.07)	-0.05 (ma)
	Santa Lucia	CSI	514	15° 33′ 06″ W	4.37	2.10	U	0.517 (0.08)	0.481 (0.07)	-0.05 (ns)
Fuerteventura	Madre del Agua	FMA	50	28° 24′ 04″ N	5.00	2.62	4	0.597 (0.08)	0.563 (0.07)	-0.04 (ns)
ruciteventuia	Madre del Agua	LIVIA	50	14° 08′ 01″ W	5.00	2.02	4	0.597 (0.00)	0.303 (0.07)	0.04 (IIS)
	Betancuria	FBT	224	28° 23′ 32″ N	5.25	2.27	3	0.523 (0.09)	0.469 (0.08)	-0.08 (ns)
	Demicana			14° 05′ 25″ W	0.20	2.27	-	0.020 (0.05)	0.105 (0.00)	0.00 (115)
Lazarote	Haría	LHA	296	29° 08′ 35″ N	4.12	2.57	0	0.540 (0.11)	0.503 (010)	-0.06 (ns)
			·	13° 30′ 13″ W		,	-	(****)	(***)	(110)
Average					4.41	2.53	_	0.510	0.476	-

A constant sampled size of 22 individuals for each population

P value: ns (non significant); SE standard error

Relationships between two variables (geological age and distance to mainland) and within-population genetic diversity (measured as H_e) were investigated by Spearman's rank correlations using the SPSS Statistic v19 package (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Principal coordinate analysis (PCoA) and neighbour-joining (NJ) trees were used to explore the relationship among populations inferred from genetic distances. The PCoA was based on allele frequencies of populations using GenAlEx v6.5, whereas the NJ consensus similarity tree was constructed in PHYLIP v3.6 (Felsenstein 2005) using 100 matrices based on Nei's distance (Nei 1978). Distance matrices were generated with the software MSAT (Dieringer and Schlötterer 2003) and were used as support values for the nodes of the NJ tree. A phylogeographic signal in the study species was tested with the permutation procedure described in Hardy et al. (2003) and implemented in SPAGeDi v1.3 (Hardy and Vekemans 2002). This approach analyzes the distribution of the differentiation index $R_{\rm ST}$ under the null hypothesis of no phylogeographic pattern (Hardy and Vekemans 2002). Population structure was inferred using the Bayesian clustering procedure implemented in STRUCTURE v2.2 (Falush et al. 2003) that identifies the K (unknown) genetic clusters of origin of the sampled individuals and assigns individuals to the inferred clusters. The algorithm uses Markov chain Monte Carlo (MCMC) iterations to explore a parameter space considering individual memberships of the K clusters, ranging from K=1 (thus testing the null hypothesis of panmixia) to K=15 (the total number of populations sampled). The optimum K (number of true clusters in the data) was obtained following the method described in Evanno et al. (2005) and implemented in STRU CTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt 2012).

To explore the distribution of genetic variance among different geographic and genetic clusters, we applied a spatial analysis of molecular variance (SAMOVA) using SAMOVA v1.0 (Dupanloup et al. 2002). The method used in SAMOVA



defines groups of populations geographically homogeneous and maximally differentiated from each other by testing different numbers of K groups until the percentage of explained variance between groups reaches a limit. The groupings with higher $F_{\rm CT}$ values (between group variance) and lower $F_{\rm SC}$ values (variance among population within groups) after 1023 permutations were assumed to be the most probable geographic subdivision. The effect of oceanic and geographical barriers on the distribution of genetic variation was investigated using the approach implemented in BARRIER v2.2 (Manni et al. 2004). The spatial organization of subpopulations was modelled by the Voronoi tessellation and, using the maximum-difference algorithm (Monmonier's algorithm), the borders between neighbouring populations that exhibited the highest levels of genetic differences (Manni et al. 2004) were identified. One hundred matrices of pairwise Nei's genetic distances (Nei 1978) were used to strengthen the consistency of the boundaries detected by the algorithm. Only barriers with strong support (>75) were considered significant, but attention was also paid to those barriers with moderate support (50 < X < 75). A pattern of IBD across the archipelago was tested by computing a Mantel test with the IBDWS software (Jensen et al. 2005), in which linearized F_{ST} values [expressed as $F_{ST}/(1-F_{ST})$] was represented vs. geographical distance.

Demographic history The approximate Bayesian computation (ABC) approach implemented in the DIYABC software (Cornuet et al. 2008, 2010) was used to infer the demographic history that may have shaped the pattern of genetic diversity in P. canariensis across the archipelago. This approach uses coalescence tools to generate thousands of simulated data points from sets of user-defined demographic scenarios. A similarity criterion based on summary statistics from simulated and observed data sets is applied to compare alternative scenarios and to infer distribution parameters without explicit likelihood calculations. In order to simplify the computations and to provide meaningful scenarios, populations were grouped by island following the general clusters detected in our analyses (see 'Results'). The only population sampled on Lanzarote (LHA) was excluded from this analysis due to its likely anthropogenic origin (see 'Results'). Four equiprobable scenarios were tested (Fig. 2): a common split for all populations (scenario #1); ancestral divergence of two genetic pools (Fuerteventura+Gran Canaria vs. the rest of the islands) and subsequent split into different populations (scenario #2); sequential split of Fuerteventura, Gran Canaria and simultaneous divergence of the rest of the islands (Tenerife, La Gomera and La Palma) (scenario #3); and lastly, sequential split of each population following the 'progression rule' from eastern to western populations (scenario #4). For all scenarios, we assumed both different effective population sizes for each population $(N_1, N_2, N_3, N_4 \text{ and } N_5)$ and a reduction in the

effective size of the non-sampled ancestral populations (NA) following each split event (i.e. NA₃<NA₂<NA₁). Importantly, the model assumed no migration among populations under any of the four scenarios. Since information on the evolutionary history of P. canariensis is scarce, we used noninformative priors, i.e. sampled from uniform distributions and taking default values (uniform distribution bounded between 10 and 10⁴). Concerning the parameters chosen for microsatellite markers, each locus was assumed to follow a generalized stepwise mutation model (GSM; Estoup et al. 2002) with a mutation rate drawn in a uniform distribution bounded between 10⁻⁴ and 10⁻³. In addition, single nucleotide indels (SNI) were allowed in the model, although mutation rate in this case was set at a lower frequency than that of the former (interval limits of prior distributions: 10^{-8} and 10^{-4}). Fifty-six summary statistics for the observed and simulated data sets were recorded as sample statistics to estimate scenario probability and parameter confidence intervals, as well as to assess confidence levels for the selection of a given scenario. Mean number of alleles, expected heterozygosity (H_e) and the mean allelic size variance were used for each population; pairwise F_{ST} , shared allele distance and the classification index were used for pairs of populations. One million simulations were performed for each scenario, and the most likely scenario was evaluated by comparing posterior probabilities with the logistic regression procedure, using the 10 % closest simulated points (Cornuet et al. 2008). The goodness-of-fit of the four scenarios was also assessed by a principal component analysis (PCA) using the option 'modelling checking' in DIYABC.

Results

Within-population genetic diversity

A total of 105 different alleles were observed across the eight polymorphic loci, ranging from 4 to 24 alleles per locus. The distribution of allele frequencies was highly uneven among loci and populations (results not shown); only 9 % of the alleles had a frequency higher than 0.5. At the island level, a decline in the number of private alleles per population was observed from eastern (Fuerteventura and Gran Canaria) to western islands (Tenerife, La Gomera and La Palma), whereas no private alleles were detected on Lanzarote (Table 1). Overall, the levels of genetic diversity varied widely among populations. A decrease in expected heterozygosity across populations was detected from eastern to western islands, with values ranging from 0.621 in CAC (Gran Canaria) to 0.273 in PEP (La Palma) (Table 1). The average inbreeding coefficient $(F_{\rm IS})$ over all loci ranged from -0.16 to 0.06, but all of them fitted HWE proportions (Table 1). We found a significant

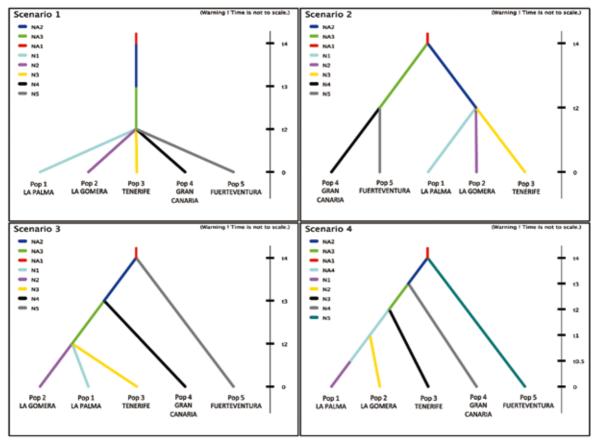


Fig. 2 The four scenarios of population demography of P. canariensis examined by ABC analysis as implemented in DIYABC (Cornuct et al. 2008). Sampled islands from the Canarian archipelago except Lanzarote (see details in 'Material and Methods') were considered in the scenarios as each sampled populations: Pop5 Fuerteventura, Pop4 Gran Canaria,

Pop3 Tenerife, Pop2 La Gomera and Pop1 La Palma. t_i time scale measured in generations, where i ranged from 1 to 4; N_i effective population size of actual populations, where i ranged from 1 to 5; NA_i effective population size of non-sampled ancestral populations, where i ranged from 1 to 4

correlation between geological age of islands and withinpopulation genetic diversity (H_c) (r=0.606, P=0.019) and a negative correlation between this latter variable and distance to the continent (r=-0.606, P=0.018).

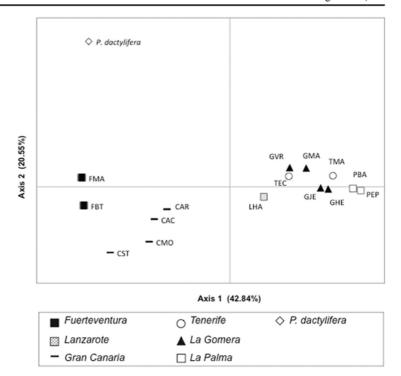
Genetic differentiation among populations

Only 3 alleles (out of 105) were shared by all populations, which suggest strong population differentiation at the archipelago scale. This fact was also reflected in pairwise $F_{\rm ST}$ values, which ranged from 0.021 (between GJE and GHE; both on La Gomera) to 0.285 (between PEP on La Palma and FBT on Fuerteventura) (Online Resource 1). The first two axes of the PCoA accounted for a high proportion of the total variance (63.4 %) (Fig. 3). Essentially, the PCoA showed a separation of populations from eastern to western islands, with LHA samples (Lanzarote) in a central position, as well as a clear separation of P. dactylifera and P. canariensis samples.

The neighbour-joining tree was consistent with the PCoA results, and populations were clustered by their island origin, with the exception of LHA (Online Resource 2). Most nodes were strongly supported (bootstrap support >75) (Online Resource 2). No phylogeographic signal was detected in P. canariensis. Neither the difference between global RST and mean permuted RST values $(R_{ST}=0.176, P=0.203)$ nor the slope of pairwise R_{ST} $(b=-5.82\times10^{-8}, P=0.925)$ were significant. According to the Bayesian clustering analysis using the total data set (330 individuals, 8 loci, 15 populations), the increase of the probability of the data was maximum for K=8(Fig. 1), which is consistent with the geographical pattern detected by the PCoA and the NJ tree. These eight clusters revealed some remarkable aspects: i) although several individuals showed admixed ancestry, most had a high probability of assignment to the dominant cluster of each population and/or island; ii) central islands



Fig. 3 PCoA analyses based on allele frequency of eight scored microsatellite loci genotypes on populations of *P. canariensis* sampled. Percentage of explained variance of each axis is given in *parenthesis*. Populations are coded in Table 1



(Gran Canaria, Tenerife and La Gomera) contained a considerable level of within-island structure, with one or two populations clearly differentiated from other clusters of the same island; and iii) LHA (Lanzarote) showed a complex structure with several admixed ancestries related to both eastern and western island groups.

Spatial patterns of genetic diversity

The best partitioning of the genetic variance computed by SAMOVA was achieved when populations were clustered into three groups (F_{CT} =0.191, P<0.001; F_{SC} =0.145, P<0.001): group 1 included populations from Fuerteventura (FBT and FMA), group 2 was formed by populations from Gran Canaria (CST, CMO, CAR and CAC), and group 3 included the remaining populations from Tenerife, La Gomera and La Palma (i.e. western islands), but also included LHA from Lanzarote, one of the easternmost islands. The largest proportion of genetic variation (69.2 %) was found within populations, although a significant proportion (19 %) was shared among groups (Table 2). In keeping with this result, the most consistent boundaries of genetic differentiation detected by BARRIER greatly supported these latter clusters (Fig. 1). However, a certain degree of genetic differentiation was obtained in this case within group 3, represented by barriers with only moderate support (<75 bootstrap

values). Such within-island differentiation is consistent with the STRUCTURE results (Fig. 1). The Mantel test showed a significant relationship between geographical distance and pairwise genetic differentiation, indicating a substantial IBD across the Canarian archipelago (r=0.474, P<0.001). When the test was applied excluding the Lanzarote population, such a relationship was much stronger (r=0.811, P<0.001; Fig. 4).

Demographic models

The DIYABC results showed that scenario #3, i.e. sequential split of Fuerteventura, Gran Canaria and final divergence of the three western islands at a similar time, obtained the highest estimated posterior probabilities using a logistic approach with 10 % closest point (0.8555, 95 % CI=0.8322-0.8788; Table 3). In contrast, the other three scenarios were poorly supported by the results obtained from the simulations. Considering scenario #3, we inferred the posterior distribution of the parameters for this model (Table 4). The results suggested that Pop5 (Fuerteventura) may have diverged from the ancestral colonist around 5560 generations ago (95 % CI= 1640–9670). Following the results of this scenario, divergence of Pop4 (Gran Canaria) from Pop5 took place at time t_3 =3450 (95 % CI=1050-7400). The split of western populations (Tenerife, La Gomera and La Palma) was considerably recent and simultaneous, at time t_2 =1115 (95 % CI=219–2840). An accurate estimation of age proves difficult in palms (Choo

Table 2 Results of hierarchical analysis of molecular variance (SAMOVA) conducted in all populations. Three groups ('Fuerteventura', 'Gran Canaria' and 'Tenerife-La Gomera-La Palma-Lanzarote') were revealed by the analysis. Test of significance were based on 1023 permutations

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	F
Between groups	2	228.29	58.811	19.1	$F_{\text{CT}}=0.19***$
Among populations within groups	12	197.52	73.787	11.7	F_{SC} =0.14***
Within populations	645	1256.43	301.976	69.2	$F_{ST}=0.31***$
Total	659	1682.245	434.574		

^{***}P<0.001

et al. 2012), so generation time (a parameter of interest for demographic analyses) was estimated based on plant size. Individuals of *P. canariensis* attain canopy sizes compatible with their full reproductive potential at around 25 years (I. Saro, personal observation). Assuming such an estimate for generation time, divergence times of the oldest, eastern populations could have occurred 139,000 years before present (YBP) and 86,250 YBP, for Pop5 (Fuerteventura) and Pop4 (Gran Canaria), respectively. More recently, the split of the youngest and westernmost populations (Pop1, Pop2 and Pop3; La Palma, La Gomera and Tenerife, respectively) may have occurred some 27,875 YBP. Regarding estimated effective population sizes for the sampled populations, the median values ranged from N_4 =7660 (Pop4; Gran Canaria) to N_1 = 546 (Pop1; La Palma) (Table 4). It is noteworthy that the actual estimated effective population sizes for Pop4 (Gran Canaria), Pop 3 (Tenerife) and Pop2 (La Gomera) seem to exhibit a moderate expansion signal with respect to their respective ancestral estimated effective population sizes, for which median values in ancestral populations were NA2= 3780, for the ancestral population of Pop4, and NA₃=1100,

for the ancestral population of Pop3 (N_3 =6670; Tenerife) and Pop2 (N_2 =6130; La Gomera) (Table 4; see Fig. 2 for populations considered in scenario #3). Conversely, the median value in the estimated effective size of Pop5 (Fuerteventura) is lower than that of the rest of the actual populations mentioned above (N_5 =4580) and notably decreased respect the common ancestral population of P. canariensis (the median value of $NA_1=7140$). Also, in this trend, a reduction of estimated effective population size is observed in Pop1 (La Palma), which was roughly one order of magnitude lower than the rest of the populations considered (Table 4). Observed values of summary statistics did not differ significantly from simulated values drawn from the posterior distribution for scenario #3 (results not shown). The PCA showed a wide cloud of data points simulated from the prior in which the observed data (big yellow dot; Online Resource 3) are among the values obtained from the posterior distribution (big blue dots), indicating a good fit of the posterior distribution based on the scenario chosen for the data (Cornuet et al. 2008).

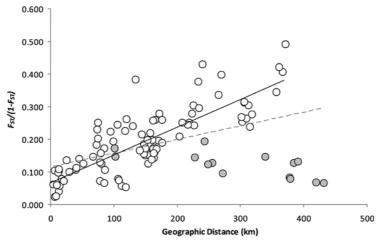


Fig. 4 Correlation between pairwise genetic differentiation of *P. canariensis* populations, represented as linearized $F_{\rm ST}$ [expressed as $F_{\rm ST}/(1-F_{\rm ST})$], and geographical distance accounting for the whole archipelago, excluding LHA. *Grey dots* represent the pairwise

comparisons including LHA population (Lanzarote). The linear function of plots is represented as a *continuous black line* when LHA is excluded from the test (with a slope of 16×10^{-4}) and as a *dashed grey line* when LHA is included in the test (with a slope of 6×10^{-4})



Table 3 Relative posterior probabilities with 95 % credibility intervals for each scenario based on the logistic regression procedure using the 10 % closest simulated points as implemented in DIYABC

Historical scenario	1.000 closest simulation	10.000 closest simulation
#1	0.0003 (0.0000-0.0032)	0.0074 (0.0025–0.0123)
#2	0.0360 (0.0000-0.0876)	0.0771 (0.0555-0.0987)
#3	0.9144 (0.8587-0.9700)	0.8555 (0.8322-0.8788)
#4	0.0494 (0.0239–0.0748)	0.0600 (0.0506-0.0693)

Discussion

Overall levels of genetic diversity in P. canariensis

Our results based on eight polymorphic microsatellite loci did not support the idea of high levels of genetic diversity in $P.\ canariensis$ populations, in contrast with earlier studies on other Canarian endemics using allozymes (Francisco-Ortega et al. 2000; González-Pérez et al. 2004; Pérez de Paz and Caujape-Castells 2013). Despite attributes such as being a perennial, dioecious and outcrossing tree with high dispersal abilities, our results showed that populations of $P.\ canariensis$ contain relatively low levels of genetic diversity, with a mean expected heterozygosity ($H_{\rm e}$) across populations of ca. 0.48. However, this figure is similar to those obtained with microsatellite markers across endemic species ($H_{\rm e}$ =0.42; Nybom 2004). Mean expected heterozygosity in $P.\ canariensis$ was lower than that detected by nuclear SSR markers in other

oceanic insular endemic trees with fleshy fruits such as Picconia azorica (H_e=0.57; Martins et al. 2013), Morella rivas-martinezii (H_e=0.56; González-Pérez et al. 2009), Olea europaea ssp. guanchica (H_e=0.63; García-Verdugo et al. 2010), Sambucus palmensis (H_e=0.50; Sosa et al. 2010) or Sorbus aria (H_e =0.68; Sosa et al. 2014), all of which exhibit the moderate levels of genetic diversity usually described for outcrossing, long-lived species (Nybom 2004). Nevertheless, we found a high variance in estimates of within-population genetic diversity across the archipelago (Table 1), which was found to be significantly related to factors such as distance to mainland and geological age of the substrate. Thus, the oldest (and closest to the continent) islands of Fuerteventura and Gran Canaria harboured the populations with the highest levels of genetic diversity, and conversely, populations sampled on La Palma (the westernmost and geologically most recent of the islands considered) showed the lowest. Such a pattern may be explained by the fact that more time has elapsed since the establishment of populations on older islands, which represents more opportunities to overcome initial founder effects and accumulate genetic variation by mutation, recombination and immigration events from other populations (Stuessy et al. 2014).

Patterns of differentiation across the archipelago

Using data extracted from our nuclear microsatellite loci, we did not detect a phylogeographic signal across *P. canariensis*

Table 4 ABC demographic parameters estimates for scenario #3. The mean, median and mode of the posterior distribution for each original parameter are given, along with 95 % credibility intervals

Parameters	Mean	Median	Mode	Quantile 2.5 %	Quantile 97.5 %
Effective population size					
N_1 (La Palma)	8.45×10^{2}	5.46×10^{2}	4.08×10^{2}	1.36×10^{2}	3.76×10^{3}
N ₂ (La Gomera)	6.07×10^{3}	6.13×10^{3}	6.13×10^3	2.29×10^{3}	9.63×10^{3}
N ₃ (Tenerife)	6.55×10^{3}	6.67×10^3	6.76×10^{3}	2.65×10^{3}	9.74×10^{3}
N ₄ (Gran Canaria)	7.47×10^{3}	7.66×10^{3}	8.14×10^{3}	4.09×10^{3}	9.84×10^{3}
N ₅ (Fuerteventura)	4.76×10^{3}	4.58×10^{3}	4.22×10^{3}	1.81×10^{3}	8.93×10^{3}
NA_1	6.87×10^{3}	7.14×10^{3}	8.61×10^{3}	2.31×10^{3}	9.88×10^{3}
NA ₂	4.02×10^{3}	3.78×10^{3}	3.16×10^{3}	9.08×10^{2}	8.24×10^{3}
NA ₃	1.32×10^{3}	1.10×10^{3}	9.10×10^{2}	1.31×10^{2}	3.67×10^{3}
Time scale in generations	s				
t_2	1.15×10^{3}	1.01×10^{3}	8.69×10^{2}	2.19×10^{2}	2.84×10^{3}
t_3	3.45×10^{3}	3.15×10^{3}	2.23×10^{3}	1.05×10^{3}	7.40×10^{3}
t_4	5.56×10^3	5.43×10^{3}	4.98×10^{3}	1.64×10^{3}	9.67×10^{3}
Mutation rate of nuclear	SSR				
Mean_µmic	2.52×10^{-4}	2.27×10^{-4}	1.65×10^{-4}	1.17×10^{-4}	5.33×10^{-4}
Mean P	2.38×10^{-1}	2.46×10^{-1}	3.00×10^{-1}	1.28×10^{-1}	3.00×10^{-1}

 t_i time scale measured in generations, where i ranged from 2 to 4; N_i effective population size of actual populations, where i ranged from 1 to 5; NA_i effective population size of non-sampled ancestral populations, where i ranged from 1 to 3; $Mean_\mu mic$ mean mutation rate; $Mean_P$ average parameter of the GSM geometric distribution



populations by applying the permutation procedure described in Hardy et al. (2003). Lack of signification suggests high migration rates among populations and/or a relatively low number of generations in isolation (Hardy et al. 2003). The detection of a strong pattern of IBD (see Mantel test results) and the similarity observed among western populations (SAMOVA and BARRIER results) is in agreement with this latter idea: gene flow and/or recent population divergence still play an important role in the structure of island populations at the archipelago scale. If populations had been subjected to strong isolation for a large number of generations, we would expect a high level of genetic structure, particularly among islands (e.g. Bottin et al. 2005). In contrast, all the analyses that were performed considering populations as units (SAMOVA, PCoA and the NJ tree based on genetic distances) showed that the 15 sampled populations can be arranged into 3 groups: 'Fuerteventura', 'Gran Canaria' and a group comprising the rest of the islands ('Tenerife, La Gomera, La Palma and Lanzarote'). Indeed, SAMOVA results showed that genetic diversity was significantly structured when these three groups were considered (19 % of variation among groups) (Table 2). The pattern of distribution of private alleles (mostly restricted to Gran Canaria and Fuerteventura populations; Table 1) is also congruent with a higher degree of isolation in the eastern islands than that observed in the western ones. Similar patterns have been reported in other widespread taxa in the archipelago, such as Rumex bucephalophorus subsp. canariensis (Talavera et al. 2013) or O. europaea subsp. guanchica (García-Verdugo et al. 2009).

The potential implication of human-mediated gene flow in the genetic structure of the sampled populations deserves some attention. Unlike other economically relevant tree species (Logossa et al. 2011; Balaguer et al. 2011), the patterns detected in this study (i.e. significant structuring of populations limited to eastern islands and significant decline in within-population genetic diversity from east to west) could hardly be the result of human-mediated propagation. The exception was the only population found on the island Lanzarote (LHA), which did not fit into the overall patterns previously described. Several lines of reasoning support the idea that this population may have an anthropogenic origin. First, given the close geographical proximity with Fuerteventura (both islands are separated by only 10.6 km) and shared biological (Reyes-Betancort et al. 2008) and geological history (both islands constituted a single unit until ca. 10,000 years ago; Fernández Palacios et al. 2011), we would expect a close genetic relationship between both areas, which is not the case according to all the analyses conducted (Figs. 1 and 3, Online Resource 2). In addition, the fit of the IBD model clearly improved when this population was not considered, which suggests that the Lanzarote population is an outlier of the overall patterns. Second, the available historical records regarding the presence of P. canariensis in the Canary

Islands also are congruent with a non-natural origin of this population. For instance, this species was not included in the descriptions of the vegetation of Lanzarote in the work Le Canarien, in which Le Bontier and Le Verrier (~1402) documented the stories of conquests and explorations carried out by the Normans at the beginning of the fifteenth century in this region. References to P. canariensis cannot be found either in the work written by Glas (1764), who gave detailed descriptions of the Canary Islands, especially of the island of Lanzarote, where he stayed. The first citation of P. canariensis is indeed found in an anonymously written compendium about Lanzarote published in 1776, where the presence of some palm trees at Haría is mentioned (Reyes-Betancort et al. 1998 and references therein). The available evidence suggests that the population of P. canariensis sampled in our study was not present on the island until the end of the eighteenth century, when it could have been planted with specimens brought from other islands with the aim of providing the raw material for basketmaking, one of the main economic activities of the area at that time (Madoz 1845–1850). However, these facts do not rule out the possibility that small patches or isolated individuals of P. canariensis currently found on Lanzarote are the result of natural events of dispersal and colonization.

Structure and demographic history of populations

Results from the ABC analysis strongly supported the scenario in which the initial P. canariensis genetic pool diverged following an east-west progression rule congruent with the linear configuration of the Canarian archipelago. Indeed, the progressive reduction of estimated effective sizes of ancestral populations showed by ABC analysis (NA₃<NA₂<NA₁) and the observed IBD pattern suggested that the archipelago was initially colonized by P. canariensis following a steppingstone model. Such a pattern of colonization has been described for several taxa in the Canary Islands (Juan et al. 2000; Emerson 2002 and references therein; Talavera et al. 2013) as well as in other oceanic archipelagos (Harbaugh et al. 2009; Yamada and Maki 2012). However, ABC simulations, in agreement with BARRIER and SAMOVA results, also suggested that the stepping-stone model of differentiation is not well-supported for western islands. Although STRU CTURE detected a certain level of population substructure within these islands, a recent, simultaneous divergence of western populations (scenario #3) rather than a complete sequential differentiation from east to west (scenario #4) appears to be the most likely pattern following ABC results. Further phylogeographical studies using the information provided by plastid markers will shed more light into the patterns and routes of colonization followed by this taxon.

Our analyses also revealed a moderate signal of population expansion in the central islands (Gran Canaria, Tenerife and La Gomera) which coincides with the fact that these harbour the highest number of large *P. canariensis* populations, especially Gran Canaria and La Gomera. Thus, the observed demographic expansion probably indicates population spreading over each island. Range expansion, coupled with the overall pattern of IBD detected across the archipelago, may generate a more clustered genealogy (Excoffier et al. 2009; Logossa et al. 2011) that could explain the substructure detected within these islands (Fig. 1). Analyses with a focus on the island level and considering a high number of populations in the large, central islands would be needed to disentangle the demographic processes that may have promoted population expansion only in these areas of the archipelago.

Concerning the estimated divergence times for the main genetic groups of P. canariensis in the archipelago, we inferred that the divergence of the easternmost island from the putative mainland ancestor was very recent (around 139,000 YBP), falling into the Pleistocene period. Such estimates should, however, be taken with caution. Due to the lack of prior information on some demographic and evolutionary aspects of P. canariensis, key variables of this approach were chosen based on some default options. Contrasting mutation rates among microsatellite loci, variation in generation time among populations and pooling of populations into islands are factors causing bias in these estimates. Regardless of the uncertainty around the exact dating of the initial island colonization (and the subsequent splits following the east-west progression rule), the ABC results strongly suggested a recent pattern of divergence starting on the island of Fuerteventura. Late Pleistocene colonization of the islands by P. canariensis ancestors is plausible for a number of reasons. First, it is one widespread taxon in the islands that, however, has not experienced any obvious speciation event. A certain degree of taxonomic differentiation within the archipelago could be expected in this species, since populations probably experience strong selective pressures across its distribution (i.e. high potential for colonization of a wide range of ecological zones). Alternatively, lack of speciation could be explained by extensive gene flow among subpopulations leading to weak population structure across the archipelago (García-Verdugo et al. 2014), but our results do not support this scenario, at least for eastern islands. Second, other widespread woody taxa showing considerable genetic variation in the islands are thought to have colonized this region also in the Pleistocene (Fernández-Mazuecos and Vargas 2011). P. canariensis, in contrast, displays moderate-to-low levels of genetic variation, which can be explained by a recent presence on the islands. Additionally, the pattern of distribution of this taxon, with a low number of scattered individuals on the island of El Hierro (and potentially, on Lanzarote), coupled with a recent genetic differentiation among populations of western islands detected by our analyses, suggests limited time for dispersal and population establishment across the archipelago. Our study shows that

population structure across islands is the result of complex patterns that need the integration of several potential factors. Particular aspects of *P. canariensis* revealed in recent studies (e.g. more efficient dispersal of pollen than seeds at low-medium distances; Saro et al. 2014) indicate that broad-scale patterns in this species (e.g. IBD pattern) are largely determined by population-level processes. Further studies on wide-spread island species showing no obvious signal of speciation are needed to reveal general patterns across large geographical

Acknowledgments The authors wish to thank to all those people who made possible the sampling of populations, especially the Company GESPLAN (specifically to Francisco Alarcón, Carlos Izquierdo, Yolanda Betancor and Lina Bonet), Cabildos Insulares (especially to José A. Delgado (Cabildo de Tenerife), Julio Leal (Cabildo de La Palma) and Marco Márquez (Cabildo de Gran Canaria)) and friends such as María J. Fernández, to offer their collaboration in this project during the sampling. Thanks to Isabelle Dupanloup (University of Bern) for her useful comments about spatial analysis of molecular variance performed by SAMOVA software. We also thank Oliver Hardy for his statistical advice in results from phylogeographical signal with our molecular markers. Constantino Criado (Departamento de Geografía, Universidad de La Laguna) and J. Alfredo Reyes-Betancort (Instituto Canario de Investigaciones Agrarias) provided useful information regarding the presence of P. canariensis in historical records about the Lanzarote island. This research was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Project CGL2009-10215) to Pedro A. Sosa as main researcher.

Ethical standards The research conducted was in compliance with the laws of the country in which the research was conducted.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Data archiving statement Genotype data are available at Research Gate (www.researchgate.net) (doi: 10.13140/2.1.4627.4248)

References

Balaguer L, Arroyo-García R, Jiménez P, Jiménez MD et al (2011) Forest restoration in a fog oasis: evidence indicates need for cultural awareness in constructing the reference. PLoS ONE 6:e23004

Billotte N, Marseillac N, Brottier P, Noyer JL, Jacquemoud-Collet JP, Moreau C et al (2004) Nuclear microsatellite markers for the date palm (Phoenix dactylifera L.): characterization and utility across the genus Phoenix and in other palm genera. Mol Ecol Notes 4:256–258

BOC (1991) Orden de 20 de Febrero: protección de especies de la flora vascular silvestre de las Islas canarias. Bol Canarias 35:1324–1334

Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, Olivieri I, Vaillant A, Bouvet J (2005) Genetic diversity and population structure of an insular tree, Santalum austrocaledonicum in New Caledonian archipelago. Mol Ecol 14:1979–1989

Carracedo JC, Perez-Torrado FJ, Rodríguez-Badiola E (2008) Canarias: islas volcánicas intraplaca. Geo-Guías 5:11–25

Choo J, Juenger TE, Simpson BB (2012) Consequences of frugivoremediated seed dispersal for the spatial and genetic structures of a neotropical palm. Mol Ecol 21:1019–1031

- Cornuet JM, Santos F, Beaumont MA et al (2008) Inferring population history with DIYABC: a user friendly approach to approximate Bayesian computation. Biogeosciences 24:2713–2719
- Cornuet JM, Ravigne V, Estoup A (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1.0). Bioinformatics 11:401
- Désamoré A, Laenen B, González Mancebo JM, Jaén-Molina R, Bystriakova N, Martinez Klimova E et al (2012) Inverted patterns of genetic diversity in continental and island populations of the heather Erica scoparia s.l. J. Biogeographica 39:574–584
- Dieringer D, Schlötterer C (2003) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Mol Ecol Notes 3:167–169
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. Mol Ecol 11: 2571–2581
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv Genet Resour 4:359–361
- Emerson BC (2002) Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. Mol Ecol 11: 951–966
- Estoup A, Jame P, Cornuet J-M (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. Mol Ecol 11:1591–1604
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14:2611–2620
- Excoffier L, Foll M, Petit RJ (2009) Genetic consequences of range expansions. Ann Rev Ecol Evol Syst 40:481–501
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics 164:1567–1587
- Felsenstein J (2005) PHYLIP (phylogeny inference package) versión 3.6.
 Distributed by the author, Department of Genome Sciences.
 University of Washington, Seattle
- Fernández Palacios JM, de Nascimento L, Otto R, Delgado JD, García del Rey E, Arévalo JR, Whittaker RJ (2011) A reconstruction of Palaeo Macaronesia, with particular reference to the long-term biogeography of the Atlantic island laurel forests. J Biogeogr 38:226–246
- Fernández-Mazuecos M, Vargas P (2011) Genetically depauperate in the continent but rich in oceanic islands: Cistus monspeliensis (Cistaceae) in the Canary Islands. PLoS ONE 6(2):e17172
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Kim SC, Crawford DJ (2000) Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. Am J Bot 87:909–919
- Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. Conserv Biol 10:1500–1508
- Frankham R (1997) Do island populations have less genetic variation than mainland populations? Heredity 78:311–327
- García-Verdugo C, Fay MF, Granado- Yela C, De Casas RR, Balaguer L, Besnard G, Vargas P (2009) Genetic diversity and differentiation processes in the ploidy series of Olea europaea L.: a multiscale approach from subspecies to insular populations. Mol Ecol 18:454–467
- García-Verdugo C, Forrest AD, Fay MF, Vargas P (2010) The relevance of gene flow in metapopulation dynamics of an oceanic island endemic, Olea europaea subsp. guanchica. Evolution 64:3525–3536
- García Verdugo C, Calleja J, Vargas P, Silva L, Moreira O, Pulido F (2013) Polyploidy and microsatellite variation in the relict tree Prunus lusitanica L.: how effective are refugia in preserving genotypic diversity of clonal taxa? Mol Ecol 22:1546–1557
- García-Verdugo C, Baldwin BG, Fay MF, Caujapé Castells J (2014) Life history traits and patterns of diversification in oceanic archipelagos: a meta analysis. Bot J Linn Soc 3:334–348
- Glas G (1764) Descripción de las Islas Canarias. IEC, La Laguna, Tenerife, Spain

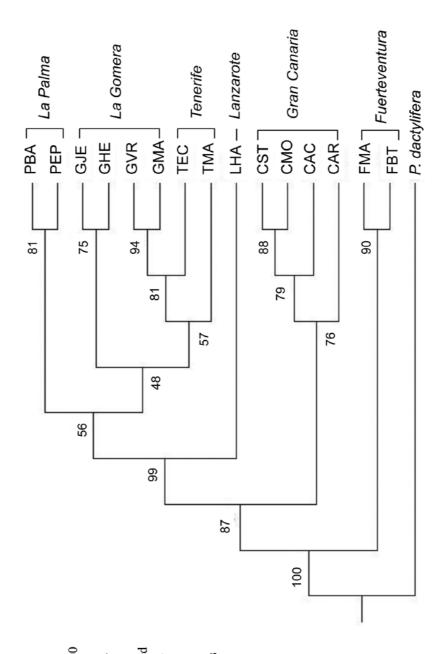
- González-Pérez MA, Caujape-Castells J, Sosa PA (2004) Allozyme variation and structure of the Canarian endemic palm tree Phoenix canariensis (Arecaceae): implications for conservation. Heredity 93: 307–315
- González-Pérez MA, Sosa PA, Rivero E, González-González EA, Naranjo A (2009) Molecular markers reveal no genetic differentiation between Myrica rivas-martinezii and M. faya (Myricaceae). Ann Bot 103:79–86
- González-Pérez MA, Batista FJ, Sosa PA (2013) Conservation genetics in two endangered endemics from the Canary Islands, Helianthemum gonzalezferreri Marrero (Cistaceae) and Kunkeliella subsucculenta Kämmer (Santalaceae): different life histories that involve different management strategies. Plant Syst Evol 299:1981–1990
- Harbaugh DT, Wagner WL, Allan GJ, Zimmer EA (2009) The Hawaiian Archipelago is a stepping stone for dispersal in the Pacific: an example from the plant genus Melicope (Rutaceae). J Biogeogr 36:230–241
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Mol Ecol Notes 2:618–620
- Hardy OJ, Charbonnel N, Fréville H, Heuertz M (2003) Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. Genetics 163:1467–1482
- Hedrick PW (2011) Genetics of populations. Jones & Bartlett Publishers, Arizona State University, Tempe, Arizona
- Inoue K, Kawahara T (1990) Allozyme differentiation and genetic structure in island and mainland Japanese populations of Campanula punctata (Campanulaceae). Am J Bot 77(11):1440–1448
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service, BMC genetics 13
- Juan C, Emerson BC, Oromi P, Hewitt GM (2000) Colonization and diversification: towards a phylogeographic synthesis for the Canary Islands. Trends Ecol Evol 15:104–109
- Kaneko S, Isagi Y, Nobushima F (2008) Genetic differentiation among populations of an oceanic island: the case of Metrosideros boninensis, an endangered endemic tree species in the Bonin Islands. Plant Spec Biol 23:119–128
- Kwon J, Morden C (2002) Population genetic structure of two rare tree species (Colubrina oppositifolia and Alphitonia ponderosa, Rhamnaceae) from Hawaiian dry and mesic forests using random amplified polymorphic DNA markers. Mol Ecol 11:991–1001
- Le Bontier and Le Verrier (~1402) Le Canarien. In: Pico, Aznar y Corbella (2003) (eds). IEC, La Laguna, Spain
- Logossa ZA, Camus-Kulandaivelu L, Allal F, Vaillant A et al (2011) Molecular data reveal isolation by distance and past population expansion for the shea tree (Vitellaria paradoxa C.F. Gaertn) in West Africa. Mol Ecol 20:4009–4027
- López-Sepulveda P, Takayama K, Greimler J, Penailillo P, Crawford DJ, Baeza M et al (2013) Genetic variation (AFLPs and nuclear microsatellites) in two anagenetically derived endemic species of Myrceugenia (Myrtaceae) on the Juan Fernandez Islands, Chile. Am J Bot 100:722–734
- Madoz P (1845–1850) Diccionario geográfico-estadístico-histórico de Canarias. Estudio introductorio Ramón Pérez González (1986) (Ed. facs.) Santa Cruz de Tenerife, Spain
- Manni F, Guerard E, Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. Hum Biol 76:173–190
- Martins JM, Moreira OC, Sardos J, Maciel MG, Silva L, Moura MM (2013) Population genetics and conservation of the Azorean tree Picconia azorica. Biochem Syst Ecol 49:135–143
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89:583–590
- Nogales M, Hernández EC, Valdés F (1999) Seed dispersal by common ravens Corvus corax among island habitats (Canarian Archipelago). Ecoscience 6:55–61

- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Mol Ecol 13: 1143–1155
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6:288–295
- Pérez de Paz J, Caujape-Castells J (2013) A review of the allozyme data set for the Canarian endemic flora: causes of the high genetic diversity levels and implications for conservation. Ann Bot 111: 1059–1073
- Pfosser M, Jakubowsky G, Schlüter P, Fer T, Kato H, Stuessy T, Sun B (2006) Evolution of Dystaenia takesimana (Apiaceae), endemic to Ullung Island, Korea. Plant Syst Evol 256:159–170
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Hered 86: 248–249
- Reyes-Betancort JA, León-Arencibia MC, Wildpret de la Torre W (1998) El paisaje vegetal de Lanzarote a partir de fuentes escritas (siglos XV-XX). Anu Inst Estud Canarios 43:31–54
- Reyes-Betancort JA, Santos Guerra A, Guma IR, Humphries CJ, Carine MA (2008) Diversity, rarity and the evolution and conservation of the Canary Islands endemic flora. An Jard Bot Madr 65:25–45
- Rivera D, Obón C, Alcaraz F, Egea T, Carreño E, Laguna E et al (2013) A review of the nomenclature and typification of the Canary Islands endemic palm, Phoenix canariensis (Arecaceae). Taxon 62:1275– 1282
- Saro I, Robledo-Arnuncio JJ, González-Pérez MA, Sosa PA (2014) Patterns of pollen dispersal in a small population of the Canarian endemic palm (Phoenix canariensis). Heredity. doi:10.1038/hdy. 2014.16

- Sosa PA, Naranjo A, Márquez M, Escandell A, González-Pérez MA (2007) Atlas de los palmerales de Gran Canaria, Obra Social de La Caja de Canarias. Gran Canaria, Islas Canarias, España
- Sosa PA, González-Pérez MA, Moreno C, Clarke JB (2010) Conservation genetics of the endangered endemic Sambucus palmensis Link (Sambucaceae) from the Canary Islands. Conserv Genet 11:2357–2368
- Sosa PA, González González EA, González Pérez MA, Pérez de Paz PL (2013) Contrasting patterns of genetic differentiation in Macaronesian lineages of Ilex (Aquifoliaceae). Bot J Linn Soc 173:258–268
- Sosa PA, González-González EA, González-Pérez MA, Naranjo-Cigala A, Carqué E, Acevedo A (2014) Reproductive strategy and ploidy determine the genetic variability of Sorbus aria. Tree Genet Genomes. doi:10.1007/s11295-014-0713-5
- Stuessy TF, Takayama K, López-Sepúlveda P, Crawford DJ (2014) Interpretation of patterns of genetic variation in endemic plant species of oceanic islands. Bot J Linn Soc 174:276–288
- Talavera M, Navarro-Sampedro L, Ortiz PL, Arista M (2013) Phylogeography and seed dispersal in islands: the case of Rumex bucephalophorus subsp. canariensis (Polygonaceae). Ann Bot 111: 249–260
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. Evolution 38(6):1358–1370
- Whittaker RJ, Fernández-Palacios JM (2007) Island biogeography: ecology, evolution, and conservation. Oxford University Press, London Wright S (1943) Isolation by distance. Genetics 28:114–138
- Yamada T, Maki M (2012) Impact of geographical isolation on genetic differentiation in insular and mainland populations of Weigela coraeensis (Caprifoliaceae) on Honshu and the Izu Islands. J Biogeogr 39:901–917

microsatellites. See Fig. 1 and Table 1 for details of the populations and their codes Online Resource 1 Matrix of F_{ST} values for pairwise comparisons of P. canariensis populations estimated from

CAC	CAR	CMO	CST	FBT	FMA	LHA	GJE	GVR	GMA	GHE	TMA	TEC	PBA	PEP	
0.192	0.197	0.205	0.282	0.285	0.267	0.071	0.078	0.171	0.176	0.075	0.140	0.111	0.037		PEP
0.178	0.178	0.179	0.260	0.268	0.241	0.073	0.057	0.148	0.149	0.046	0.127	0.090			PBA
0.105	0.125	0.130	0.158	0.185	0.164	0.078	0.055	0.040	0.045	0.057	0.098				TEC
0.167	0.182	0.202	0.268	0.247	0.238	0.121	0.081	0.096	0.102	0.075					TMA
0.123	0.129	0.114	0.175	0.223	0.193	0.070	0.021	0.074	0.075						GHE
0.123	0.154	0.180	0.218	0.219	0.201	0.117	0.085	0.025							GMA
0.111	0.146	0.164	0.203	0.200	0.183	0.114	0.086								GVR
0.126	0.135	0.148	0.198	0.220	0.206	0.078									GJE
0.096	0.112	0.104	0.154	0.133	0.124										LHA
0.111	0.134	0.118	0.135	0.058											FMA
0.126	0.170	0.138	0.151												FBT
0.062		0.052													CST
0.051	0.083														СМО
0.060															CAR
															CAC



Online Resource 2

Neighbour-joining tree using 100 matrices based on the Nei's distance between *P. canariensis* populations, as implemented in PHYLIP v3.6. *P. dactylifera* served as the outgroup taxon. Numbers beside nodes indicate bootstrap support percentage recovered after 100 replicates. Populations are coded as in Fig. 1

Online Resource 3 The principal component analysis (PCA) obtained by DIYABC to estimate the goodness-of-fit of scenario choice.

