



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de  
Especies Vegetales Amenazadas: *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*  
(Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria*  
(Rosaceae). Resultados Preliminares.

**Edna Amada González González**

Becaria MAEC-AECID  
Departamento de Biología  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Biología

El Doctor José Mario González Pajuelo, Director del Programa de Doctorado “Ecología y Gestión de los Recursos Vivos Marinos” del Departamento de Biología de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

INFORMA:

Que el Trabajo de Investigación que presenta la Licenciada en Biología, Dña. Edna Amada González González, para completar el Programa de Doctorado, ha sido realizado en este Departamento bajo la dirección y tutela de los Doctores Pedro Antonio Sosa Henríquez y Miguel Ángel González Pérez.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Las Palmas de Gran Canaria, 09 de diciembre de 2008.

Fdo.: José Mario González Pajuelo

# CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>- 5 -</b>
<b>MARCADORES MOLECULARES</b>	<b>- 6 -</b>
<b>MARCADORES DE ADN</b>	<b>- 7 -</b>
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	- 7 -
SSR o <i>Microsatélites</i>	- 8 -
<b>GENÉTICA DE POBLACIONES</b>	<b>- 9 -</b>
<b>1. ANÁLISIS INTRAPOBLACIONAL</b>	<b>- 9 -</b>
1.1. RIQUEZA ALÉLICA	- 9 -
1.2. POLIMORFISMO	- 10 -
1.3. HETEROCIGOSIDAD ESPERADA	- 10 -
<b>2. ANÁLISIS INTERPOBLACIONAL</b>	<b>- 11 -</b>
2.1. DISTANCIA GENÉTICA	- 11 -
2.2. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	- 12 -
2.3. DENDROGRAMAS UPGMA Y NJ	- 12 -
<b>DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS</b>	<b>- 14 -</b>
<b><i>ILEX PERADO SSP. LOPEZLILLOI (G. KUNKEL) A. HANSEN &amp; SUNDING</i></b>	<b>- 14 -</b>
MORFOLOGÍA	- 14 -
DISTRIBUCIÓN	- 15 -
ECOLOGÍA	- 16 -
<b><i>SILENE NOCTEOLENS WEBB &amp; BERTHEL</i></b>	<b>- 16 -</b>
MORFOLOGÍA	- 17 -
DISTRIBUCIÓN	- 18 -
ECOLOGÍA	- 19 -
<b><i>SORBUS ARIA (L.) CRANTZ</i></b>	<b>- 19 -</b>
MORFOLOGÍA	- 20 -
DISTRIBUCIÓN	- 20 -
ECOLOGÍA	- 22 -
<b>OBJETIVOS</b>	<b>- 23 -</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>- 23 -</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>- 23 -</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>- 24 -</b>
<b>MUESTREO</b>	<b>- 24 -</b>
<b><i>ILEX</i></b>	<b>- 24 -</b>
<b><i>SILENE NOCTEOLENS</i></b>	<b>- 26 -</b>
<b><i>SORBUS ARIA</i></b>	<b>- 27 -</b>
<b>EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN</b>	<b>- 29 -</b>
<b>EXTRACCIÓN</b>	<b>- 29 -</b>

<i>PURIFICACIÓN</i>	- 29 -
<i>CEBADORES</i>	- 29 -
PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN	- 31 -
<i>ILEX</i>	- 31 -
<i>SORBUS ARIA</i>	- 31 -
ANÁLISIS DE DATOS	- 33 -
<b>RESULTADOS</b>	<b>- 34 -</b>
<b>CEBADORES FUNCIONALES</b>	<b>- 34 -</b>
<i>ILEX</i>	- 34 -
<i>SILENE NOCTEOLENS</i>	- 34 -
<i>SORBUS ARIA</i>	- 35 -
VARIABILIDAD GENÉTICA	- 36 -
<i>RIQUEZA ALÉLICA</i>	- 36 -
<i>POLIMORFISMO</i>	- 37 -
<i>HETEROCIGOCIDAD ESPERADA</i>	- 37 -
IDENTIDAD Y DISTANCIA GENÉTICA	- 39 -
ESTRUCTURACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA	- 43 -
ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	- 45 -
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>- 46 -</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>- 47 -</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>- 48 -</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>- 55 -</b>
ANEXO I: COMPENDIO DEL MUESTREO DE <i>SILENE NOCTEOLENS</i> .	- 55 -
ANEXO II: GENOTIPOS OBTENIDOS CON LOS 8 MICROSATÉLITES EN EL GÉNERO <i>ILEX</i> ANALIZADOS HASTA JUNIO DEL 2008.	- 56 -

## INTRODUCCIÓN

Es un hecho ampliamente reconocido que las islas oceánicas, como las Canarias, son extensiones territoriales que atesoran una gran diversidad biológica; muchas veces exclusiva de cada isla en particular. Esa amplia diferenciación biológica no evita que las poblaciones de especies singulares y el número de individuos en cada población sean muy bajos, razón por la cual es inminente actuar antes de que la erosión genética nos impida conservar su riqueza alélica (Fernández-Palacios y Martín Esquivel, 2001; Francisco-Ortega y Santos, 2001).

Uno de los más recientes instrumentos utilizados en la conservación genética de las poblaciones naturales son los microsatélites. Estos marcadores genéticos son capaces de medir la diversidad genética en una amplia variedad de especies mostrando muy altos niveles de polimorfismo y muchos alelos por locus. Además, su carácter codominante desvela el genotipo completo de los individuos, sin encubrimientos a causa de características dominantes (Goldstein y Scholötterer, 1999; Frankham *et al.*, 2002).

Son muchos los estudios que aplican esta técnica en especies amenazadas y, de ellos, gran cantidad se centra en el descubrimiento y comparación de genotipos de especies vegetales. En las islas Canarias esta metodología se ha implementado para la caracterización genética de plantas en peligro como *Bencomia exstipulata* (González-Pérez *et al.*, 2004; Sosa, 2008), *Myrica rivas-martinezii* (González-Pérez *et al.*, 2008) y *Sambucus palmensis* (Sosa *et al.*, 2008), entre otros.

En esta investigación se ha escogido la técnica de análisis de microsatélites para estudiar las poblaciones naturales de tres endemismos vegetales canarios: *Ilex perado* ssp. *lopezilloi*, *Silene noctolens* y *Sorbus aria*; cada uno en una perspectiva diferente.

Uno de los tópicos que se aborda es la comparación de varias especies o subespecies del género *Ilex* que habitan en Canarias y Azores a fin de establecer un análisis comparativo entre ellas y determinar así si *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* posee la singularidad genética necesaria para ser catalogada como una especie o taxón diferenciado.

En el caso de *Silene nocteolens* existen dos enfoques principales. Primero, analizar la diversidad genética poblacional y comparar los niveles de variación y diferenciación genética existente entre sus poblaciones naturales, separadas unos tres kilómetros en

línea recta. Por otro lado, se pretende conocer la dinámica reproductiva de la especie a través de la variación molecular detectada por microsatélites.

El análisis genético de *Sorbus aria* está encaminado a la comparación genética de los individuos de esta especie, dado que por su pequeño número en Canarias es posible que se haga necesaria su restitución en un futuro.

Se presentará el análisis de los resultados preliminares para el primer caso. Sin embargo, y pese a las numerosas pruebas realizadas, hasta el momento no se han podido encontrar microsatélites funcionales o en la proporción adecuada para las dos últimas especies.

## MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable que, además, puede detectarse fácilmente. Sin embargo, se habla de marcadores genéticos cuando éstos se transmiten según las leyes básicas de la herencia mendeliana; por lo que no todos los marcadores moleculares se consideran marcadores genéticos (Nuez y Carrillo, 2000).

Como es muy bien sabido, en los procesos de replicación el ADN es susceptible a pequeños errores en su secuencia y esto propicia la variabilidad entre los individuos de una población. Dichos cambios (mutaciones) pueden ser el resultado de la sustitución, inserción, delección, traslocación o inversión de uno o más de los nucleótidos de la doble hélice. En consecuencia, el número y grado de mutaciones en el ADN son indicadores de la variabilidad genética entre especies, poblaciones e individuos. Estas modificaciones en el genoma pueden ser detectadas por análisis de secuencia del ADN y, una vez definidas, pueden ser utilizadas como marcadores genéticos (Frankel *et al.*, 1995).

Por lo tanto, los marcadores genéticos son regiones del ADN que presentan variación en su secuencia sin que, necesariamente, se aprecien cambios sustanciales en las funciones del organismo. Por ello, se consideran herramientas útiles que han servido de base para la identificación de especies, cepas, híbridos, análisis de diversidad, recursos genéticos, determinación de paternidad, mapeo genómico con aplicación a genética de poblaciones, biología evolutiva, ecología molecular, genética de la conservación, etc. (Avice, 1994; Goldstein y Schlötterer, 1999).

Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados; pero cuando un marcador presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción se dice que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariables (Frakham *et al.*, 2002).

Los marcadores moleculares pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo y se pueden aplicar usando a todo el individuo o sólo parte de él. En términos generales existen dos tipos de marcadores moleculares: **Marcadores Bioquímicos** y **Marcadores de ADN** (Nuez y Carrillo, 2000).

### **MARCADORES DE ADN**

Son porciones específicas de ADN formadas de secuencias cortas que se repiten. Ya que el número de repeticiones en estos marcadores es altamente variable entre los individuos, son efectivos para fines de caracterización. Existen varias técnicas para identificar marcadores de ADN, las cuales se pueden agrupar en tres categorías: las que aplican Hibridación, las que conllevan Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y las que combinan ambas metodologías (Nuez y Carrillo, 2000; Picca *et al.*, 2002).

---

#### **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

La técnica PCR, o reacción en cadena de la polimerasa, fue introducida por Sanger *et al.* (1977) y es una tecnología utilizada para multiplicar (sintetizar) *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen conocido o desconocido en el genoma del individuo en estudio. Se basa en la amplificación de fragmentos de ADN a partir de secuencias de nucleótidos denominadas “cebadores”, que son capaces de reconocer una secuencia blanco para la cual el cebador es complementario.

Una vez extraído el ADN del material a utilizar, los principales pasos del PCR son los siguientes:

1. Se separan las dos hebras (cadenas) de ADN; es decir, se promueve su desnaturalización a través de altas temperaturas (comúnmente 95 °C).
2. Se induce el alineamiento o reconocimiento del cebador con las secuencias complementarias o molde del ADN. Esto se conoce como hibridación y ocurre al bajar la temperatura (p.e. 55 °C).

3. Por medio de la enzima Taq polimerasa se lleva a cabo la extensión o alargamiento de la molécula iniciadora (cebador); o sea, la síntesis de la cadena complementaria. La temperatura de elongación suele ser de 72 °C.
4. Los ciclos se repiten la cantidad de veces que sea necesario hasta obtener el número de copias de ADN que se requiere (Avisé, 1994).

Estos procesos tienen lugar en un termociclador, el cual se encarga de realizar los cambios de temperatura necesarios para que se desarrollen las etapas o ciclos pertinentes. Los RAPD's y los microsatélites (entre otros marcadores) utilizan esta metodología (Tautz, 1989; Williams *et al.*, 1990).

#### SSR O MICROSATÉLITES

---

Los microsatélites son secuencias repetitivas de nucleótidos con una amplia ocurrencia, particularmente en organismos multicelulares; también se les conoce como SSR (Simple Sequence Repeats). La técnica fue descrita por Tautz en 1989 y se basa en regiones hipervariables constituidas por repeticiones en tándem de unos pocos pares de bases (1 a 6). El número de repeticiones puede variar, por lo que las diferencias o polimorfismos se detectan con una disparidad de tamaños (Tautz, 1989; Engel *et al.*, 1996; Ramel, 1997; Hoelzen, 1998).

Una de las grandes desventajas de este método es que antes de ser utilizados por primera vez, las regiones microsatelitales deben ser detectadas, secuenciadas y definidas; lo que incrementa los tiempos y costes. Además, su implementación en un laboratorio requiere considerable infraestructura y presupuesto.

No obstante, los microsatélites se heredan siguiendo las leyes de Mendel y presentan un alto polimorfismo por locus (multialelismo) superior al observado por otros marcadores; por esto, por ser codominantes y genoma-específicos se les considera los marcadores ideales para la identificación genética individualizada (Tautz, 1989; Engel *et al.*, 1996).

## GENÉTICA DE POBLACIONES

Cuando el énfasis de los estudios genéticos se trasladó de los individuos a las poblaciones, los cambios evolutivos se contemplaron como consecuencia de los cambios genéticos en las poblaciones. Estos cambios también se vislumbraron como resultado del estudio formal predictivo de los cambios de las frecuencias alélicas y genotípicas basadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg. Por lo tanto, la genética de poblaciones incluye el estudio de varias fuerzas que dan como resultado los cambios evolutivos en las especies a través del tiempo (Hartl y Clark, 1997; Fontdevila y Moya, 1999).

Según Hartl y Clark (1997), en genética poblacional el término “población” viene referido a un grupo de organismos de la misma especie que viven en un área geográfica suficientemente restringida para que cada miembro tenga la oportunidad potencial de aparearse con algún otro miembro. No obstante, la definición precisa de esta unidad es difícil y varía de especie en especie debido a la presencia casi universal de algún tipo de estructuración geográfica en las mismas.

Uno de los aspectos principales en genética de poblaciones es, precisamente, descubrir la arquitectura genética de las poblaciones naturales e identificar las fuerzas y factores evolutivos que expliquen dicha variación.

### 1. ANÁLISIS INTRAPOBLACIONAL

La diversidad genética de las poblaciones que se revela mediante marcadores moleculares se mide a través de diversos índices de cuantificación; siendo los más utilizados la riqueza alélica (A), el polimorfismo (P) y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ).

Por otro lado, y debido a la que la diversidad total de una especie consta de componentes intra e interpoblacional, se hace necesario analizar cómo se distribuye y se estructura la variabilidad genética global en y entre distintas poblaciones naturales (Sosa *et al.*, 2002). En este caso, podemos cuantificar y determinar el grado de diferenciación genética y la distribución de esta variación a nivel interpoblacional.

---

#### 1.1. RIQUEZA ALÉLICA

La riqueza alélica (A) es el número medio de alelos por locus y cuantifica el número total de alelos diferentes detectado en cada uno de los loci de una población.

Dependiendo de su historia, cada población pudo haber sufrido mayor o menor reducción en su variación genética original debido al “efecto fundador” o “cuello de botella”, fenómeno natural que afecta principalmente a aquellos alelos de más baja frecuencia (Sytsma y Schaal, 1985).

A pesar de su importancia, éstos alelos no tienen mucha influencia en la medida de la heterocigosis (Zapata, 1987); así que la riqueza alélica basa su utilidad en la medición de estas reducciones de variación genética y en la detección del efecto producido por la deriva genética (Sosa *et al.*, 2002).

---

## 1.2. POLIMORFISMO

De acuerdo a Hedrick (1983), la definición más útil de polimorfismo fue dada por Cavalli-Sforza y Bodmer en 1971 quienes propusieron que “*el polimorfismo genético es la ocurrencia en la misma población de dos o más alelos en un locus, cada uno con frecuencia apreciable*”.

El polimorfismo o la proporción de loci polimórficos (P) es una medida del número de loci variable en una población y se calcula dividiendo el número de loci polimórficos de ésta entre el número total de loci analizados (Sosa *et al.*, 2002).

Varios autores coinciden en que es necesario el uso de un criterio arbitrario a fin de precisar el polimorfismo de un locus de acuerdo a su frecuencia alélica; ya que, cuando se aumenta en número de individuos muestreados en una población, la probabilidad de encontrar un nuevo alelo también aumenta. Este criterio suele fijarse en 95% o 99% (cuando la frecuencia del alelo más común es menor o igual que 0,95 ó 0,99, respectivamente); siendo la última opción la más utilizada, principalmente cuando el número de muestras se adecúa al 100% (Ayala, 1982; Hedrick, 1983; Fontdevila y Moya, 1999; Sosa *et al.*, 2002).

---

## 1.3. HETEROCIGOSIDAD ESPERADA

Nei (1987) asegura que el promedio de heterocigosidad o diversidad genética es el método de medición más adecuado de la variación genética, pues no depende la arbitrariedad de la definición de polimorfismo y puede ser definida sin ambigüedad en términos de frecuencias alélicas.

La heterocigosidad esperada de una población ( $H_e$ ) es la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población. Cuando las poblaciones están bajo

equilibrio Hardy-Weinberg, la heterocigosidad puede ser calculada a partir de la frecuencia alélica. Por lo tanto, la heterocigosidad esperada cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en los loci (Hoelzel, 1998; Sosa *et al.*, 2002).

Además, la comparación entre la heterocigosis observada ( $H_o$ ) y la heterocigosis esperada ( $H_e$ ) permite evaluar la estructura genética de las poblaciones (Nei, 1987).

## 2. ANÁLISIS INTERPOBLACIONAL

Los estudios realizados por Hamrick y Godt (1989) revelan que la diversidad genética puede verse afectada de forma diferente por distintos procesos evolutivos y ecológicos o reproductivos de acuerdo a la actuación que éstos tengan al nivel de las poblaciones o de la especie. Empero, la partición del total de la diversidad genética de una especie en sus componentes intra- e inter poblacional nos permite conocer su organización en el espacio (Sosa *et al.*, 2002).

La estructura genética intrapoblacional consiste en los diferentes tipos de alelos y sus frecuencias en dicha población. Existe una estructuración genética dentro de una población cuando las frecuencias alélicas no se distribuyen al azar, sino que siguen un determinado patrón o arquitectura que bien puede ser espacial o temporal. Por su parte, la estructura genética interpoblacional es el resultado de la distribución geográfica y en el espacio de subpoblaciones entre las cuales existen diferencias genéticas (Sosa *et al.*, 2002).

### 2.1. DISTANCIA GENÉTICA

El concepto de distancia genética fue desarrollado hacia 1953 por Sanghvi en un estudio de diferenciación genética de poblaciones humanas, extendiéndose y ampliándose posteriormente por otros autores como Cavalli-Sforza y Edwards en 1967; pero fue sólo hasta que los experimentos con electroforesis se hicieron populares que pudo desarrollarse una medida de esta distancia adecuada al estudio de la evolución de las proteínas.

Uno de los índices más utilizados es el de la distancia genética de Nei que puede estimar el número de genes o codones sustituidos por locus entre poblaciones (Nei, 1987). Nei (1972) definió el concepto de "identidad genética" entre dos poblaciones como la probabilidad de que dos alelos (uno de cada población) sean idénticos. Estos valores pueden variar entre cero (para poblaciones completamente distintas) hasta uno (si son

genéticamente idénticas). Una vez calculado el valor para la identidad genética, la distancia genética se obtiene mediante el logaritmo de la primera:

$$D = -\ln I$$

De esta manera, la distancia genética toma valores que oscilan entre cero y el infinito.

Chakravorty y Jin (1995) desarrollaron un método para medir la distancia entre los alelos compartidos por los individuos de dos poblaciones, DAS (*Distance of Allele Shared*):

$$D_i = 1 - [n_b / (n_{w1} + n_{w2})]$$

donde  $n_{w1}$  y  $n_{w2}$  son el número medio de alelos compartidos entre individuos en las dos poblaciones, y  $n_b$  es el número medio de alelos compartidos entre dos individuos extraídos cada uno de las dos poblaciones. Se estima que las medias de todos los posibles pares de individuos pueden mostrar una evolución dinámica similar a la distancia genética estándar de Nei sobre la base locus-específica de frecuencia de alelos cuando el tiempo de divergencia entre dos poblaciones es pequeño.

## 2.2. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis de componentes principales (PCA) es un análisis estadístico multivariante que se utiliza como un método de disminución de las dimensiones de los datos de un estudio (Hernández, 1992).

En genética de poblaciones se utiliza para reducir el número de variables asignadas a cada población y/o especie de manera tal que, con la menor pérdida de información posible, puedan ajustarse los resultados a dos o tres dimensiones y lograr así representaciones gráficas para determinar las relaciones genéticas en el espacio de los individuos, las poblaciones y/o especies estudiadas.

## 2.3. DENDROGRAMAS UPGMA Y NJ

Los árboles son diagramas que pueden ser inferidos a partir de diversos tipos de datos. En el caso de la Filogenia Molecular esos datos son normalmente secuencia de genes o proteínas en forma de un alineamiento múltiple. Las metodologías utilizadas para la estimación de árboles evolutivos se dividen en cuatro categorías: matriz de distancias, parsimonia, invariantes y máxima probabilidad (Swofford y Olsen, 1990).

Los dendrogramas UPGMA y NJ son métodos de reconstrucción filogenética basados en distancias; es decir, resumen la información de un alineamiento múltiple en una matriz

de distancias entre secuencias. Utilizan el alineamiento o diferenciación genética para calcular las distancias entre secuencias y posteriormente tratan de reconstruir un árbol evolutivo a partir de dichas distancias.

El UPGMA (siglas en inglés de “*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means*”) es el método más sencillo de todos. Es un algoritmo de agrupamiento *de abajo a arriba* que recibe una matriz de distancias y a partir de ella genera un dendrograma. Inicialmente cada entidad de la matriz tiene su propio grupo. Cuando se unen los dos grupos más cercanos, se vuelven a calcular las distancias y se define la distancia entre los grupos como la media (sin ponderar) de las distancias que hay entre los miembros de cada grupo. Es decir, el nivel de agrupamiento es determinado por la media aritmética de las distancias entre cada individuo y el grupo previo (Avice, 1994); de ahí su nombre.

Este tipo de gráfico asume la existencia de un “*reloj molecular*” evolutivo; una hipótesis propuesta por Zuckerkandl y Pauling hacia 1965 que afirma que para una determinada molécula el ritmo de cambio ha sido similar a lo largo de la historia en diversos organismos, por lo que existe una relación directa entre el tiempo y la cantidad de cambios (Avice, 1994). El principal problema del UPGMA es que, en la mayoría de los casos, la hipótesis del reloj molecular no se aplica. Estos dendrogramas son enraizados.

El NJ (*Neighbor joining*) también es un algoritmo de agrupamiento *de abajo a arriba*, pero no asume la existencia de un reloj molecular. Fue desarrollado por Saitou y Nei en 1987, su base es el principio de la evolución mínima en el cual el mejor árbol es aquel que minimiza la suma de las longitudes de todas las ramas; ya que frecuentemente se logra minimizar la longitud global del árbol al minimizarla a cada paso del análisis, aunque no siempre (Swofford y Olsen, 1990; Avice, 1994).

Esta técnica considera el concepto de vecinos en el cual para cada par debe existir una cercanía mutua y, a la vez, un alejamiento considerable hacia el resto. Los dendrogramas NJ no tienen raíz, así que para situar el ancestro común es necesario introducir un grupo externo como punto de referencia que bien puede ser un gen homólogo u otra familia o especie cercana, pero distinta a la que se analiza (Swofford y Olsen, 1990).

Sus virtudes más apreciadas están ligadas al hecho de ser extremadamente rápido y a que suele dar buenos resultados como aproximación preliminar.

## DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

### ***ILEX PERADO SSP. LOPEZLILLOI (G. KUNKEL) A. HANSEN & SUNDING***

El género *Ilex* L. (Aquifoliaceae) consta de alrededor de 500 especies de árboles y arbustos que pueden encontrarse en amplias zonas templadas y tropicales alrededor de Mundo (Galle, 1997).

En las islas de La Macaronesia, se han reportado varias especies y subespecies distribuidas en los distintos archipiélagos. Así, *Ilex canariensis* Poir. es endémico de las Islas Canarias y Madeira e *Ilex perado* Aiton aparece en las Azores, Madeira e Islas Canarias. También se distingue *Ilex platyphylla* Webb & Berth. como una forma muy parecida a *Ilex perado* en las Islas Canarias (Kunkel, 1977b).

En Canarias, se han descrito dos subespecies de *I. perado*: *Ilex perado* ssp. *platyphylla*, que se distribuye en las Islas de La Gomera, La Palma y Tenerife e *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*, endemismo exclusivo de la isla de La Gomera (Izquierdo *et al.*, 2004). La principal diferencia entre estas subespecies estriba en la longitud de los pedúnculos de las inflorescencias, que suelen ser extremadamente largos en *I. perado* ssp. *lopezlilloi* (Kunkel, 1977b; Andrews, 1983).

El bojo o Naranja salvaje, *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*, es un taxón fuertemente amenazado debido al bajo número de sus ejemplares (3); la causa de su escasez puede estar relacionada con su aprovechamiento maderero e interés forrajero. Se encuentra incluido en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (CEAC, 2000) como “En Peligro de Extinción”, en el Libro Rojo de la Flora Vasculare de España (Bañares *et al.*, 2004) y se propone su inclusión en la Directiva de Hábitats como especie prioritaria (VVAA, 2000; Bañares *et al.*, 2003).

---

### MORFOLOGÍA

*Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* es una especie cuyos individuos pueden ser arbustos de gran tamaño o árboles de hasta 10 m de altura. Los troncos suelen ser cortos y muy ramificados desde la base. Las ramas son horizontales o ascendentes, de color verde brillante con lenticelas cuando jóvenes.

Las hojas son coriáceas (Fig. 1), de color verde oscuro brillante y con nervaduras prominentes de color marfil. Tienen forma oblonga, ovada o subespatulada; ápice cortamente mucronado, base cuneada y borde generalmente entero, incluso en los brotes basales y en los chupones. Poseen pecíolos de 1,5 a 2 cms de largo, ligeramente canaliculados (Bañares *et al.*, 2004).



Fig. 1 *Ilex perado* ssp. *lopezilloi*.

Florece de mayo a junio y fructifica de julio a septiembre. Las flores son de color blanco y crecen en racimos axilares. Son plantas diocas y su reproducción sexual está limitada por el hecho de que los ejemplares naturales que se conocen produzcan flores pistiladas. Los frutos son subglobosos, rojos, indehiscentes, tipo baya, de aproximadamente 9 a 10 cms de diámetro (Bañares *et al.*, 2004).

Se ha observado que los frutos submaduros son consumidos por aves, principalmente las palomas endémicas del Monteverde; sin embargo, es probable que exista una dispersión de las diásporas con la consecuente escarificación química de las semillas debido a los procesos gástricos de las aves. Aunque la propagación por semillas puede ser viable, dada la ausencia de patrones estaminados fértiles, la mayor parte de éstas son vanas (Bañares *et al.*, 2003).

#### DISTRIBUCIÓN

El área de ocupación real de *I. perado* ssp. *lopezilloi* es muy reducida, pues no alcanza los 1000 m<sup>2</sup>.

Hasta el momento se conocen sólo pocos individuos naturales (tres) dentro del Parque Nacional Garajonay en La isla de La Gomera, donde es un endemismo exclusivo. No obstante, las actuaciones de conservación realizadas han logrado incrementar por métodos de reproducción asexual el número efectivo hasta 21 individuos (Bañares *et al.*, 2004), ubicados en las localidades de El Bailadero y Pajarito-Las Cancelas (Fig. 2).

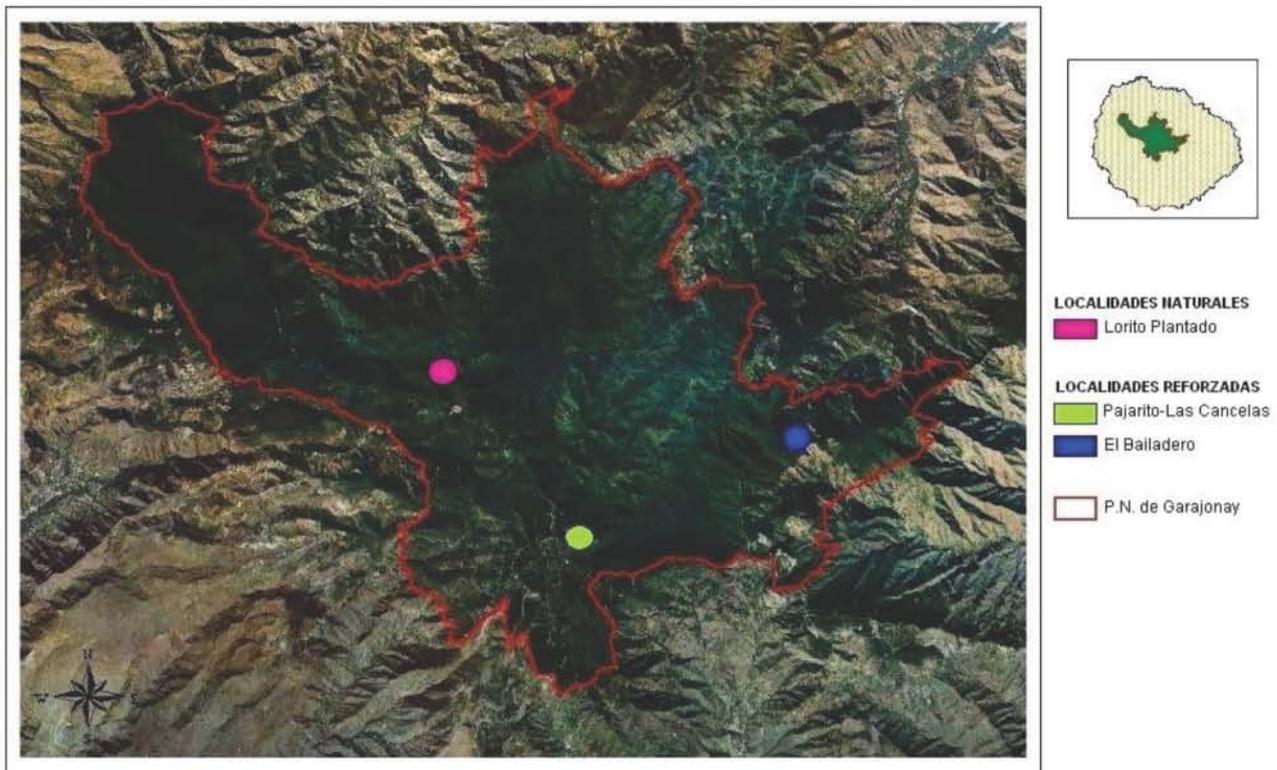


Fig. 2 Distribución de *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* en Parque Nacional Garajonay.

## ECOLOGÍA

Esta subespecie parece optar por ambientes con precipitaciones anuales que rondan los 800 mm y consigue parte de la humedad requerida a partir de la lluvia horizontal propia del Monteverde mesofítico donde la humedad ambiental es elevada casi todo el año y las temperaturas son más bien bajas (15 °C en promedio anual). Requiere cierta luminosidad para progresar adecuadamente, por lo menos en los primeros estadios de vida.

En cuanto a los requerimientos edáficos, prefiere suelos húmicos de carácter ándico bien desarrollados y abundante materia orgánica, los cuales se forman sobre sustrato geológico de tipo basáltico; y casi siempre crece al borde de los acantilados.

Es común encontrar otras especies como *Laurus azorica* (Laurel), *Myrica faya* (Faya), *Erica arborea* (Brezo), *Ilex canariensis* (Cresta de gallo), *Dryopteris oligodonta* (Helecho macho), *Asplenium onopteris* (Chinobre), *Heredia canariensis*, *Adenocarpus foliolosus* (Codeso) e *Hypericum inodorum* (Hipérico) como flora acompañante (Bañares *et al.*, 2004).

## SILENE NOCTOLENS WEBB & BERTHEL

Se estima que el género *Silene* L. (Caryophyllaceae) contiene cerca de 700 especies alrededor del mundo, distribuidas en las regiones templadas del hemisferio norte. El

principal centro de su diversidad es el Mediterráneo (donde crece cerca de la mitad de las especies) y también el suroeste de Asia, especialmente Turquía que cuenta con 135 especies (Melzheimer, 1988; Oxelman y Lidén, 1995; Duran y Menemen, 2003).

La conejera de risco, *Silene nocteolens*, es un endemismo exclusivamente tinerfeño. Llegó a pensarse que también crecía en la isla de Gran Canaria (Bramwell, 1995); sin embargo, se trataba de la especie *S. tamaranae* Bramwell (Izquierdo *et al.*, 2004). Además de *S. nocteolens* se han descrito otros endemismos canarios congéneres como *S. berthelotina* Webb (en Tenerife y el Hierro), *S. bourgeaui* Webb *ex* Christ (la Gomera), *S. canariensis* Willd. (Gran Canaria), *S. lagunensis* C. Sm. *ex* Christ (Tenerife) y *S. sabinosae* (el Hierro) (Izquierdo *et al.*, 2004).

La especie en estudio se encuentra catalogada como “En Peligro Crítico” por la UICN. Dispone, además, de otras figuras de protección en el Convenio de Berna y en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias donde aparece como “Sensible a la Alteración del Hábitat”. También se incluye en el Anexo I de la Orden del Gobierno de Canarias 20/02/91 (Bañares *et al.*, 2004). Se cree que las poblaciones se han visto mermadas debido a depredación por los herbívoros (muflón y conejos) que destruyen las plantas en búsqueda de sus raíces rizomatosas (Informe técnico, Parque Nacional El Teide; sin publicar).

#### MORFOLOGÍA

Planta herbácea con base leñosa (Fig. 3); hemicriptófita de raíz perenne y tallos floríferos de unos 50 cms de largo, vellosos hacia sus extremos y pegajosos.

Caducifolia o con follaje subpersistente. Hojas de estrechamente lanceoladas a linear-lanceoladas, agudas, tomentosas, de hasta de 10 cms de largo, agrupadas o subverticiladas, formando rosetas en la base.



Fig. 3 *Silene nocteolens*. Foto de A. Hernández en Bañares *et al.*, 2004.

Florece de mayo a junio y fructifica en agosto. Las inflorescencias son largas, con 2 a 12 flores blancas o ligeramente rosáceas, hermafroditas, que exhalan durante la noche un

suave perfume propio de un sistema de polinización por insectos nocturnos (el epíteto de la especie hace referencia a esta particularidad). Los frutos son cápsulas ovadas, de 8 a 10 mm, dehiscentes por 6 dientes y contiene una media de 35 semillas.

Las semillas son muy pequeñas (1 a 1,4 x 1 a 1,5 mm), reniformes; caras reticuladas ligeramente convexas y con la zona basal cóncava. Normalmente la dispersión es anemófila y las semillas no se alejan más de 10 metros de la planta madre. No parecen tener problemas en la germinación (Kunkel, 1977a; Bañares *et al.*, 2004).

#### DISTRIBUCIÓN

Como ya se mencionó, esta especie se encuentra únicamente en la Isla de Tenerife; específicamente en dos localidades de alta montaña dentro del Parque Nacional del Teide.

El número de efectivos en ambas poblaciones es relativamente bajo. En Montaña Blanca se han detectado unos 750 individuos y en Pico Viejo un centenar de ejemplares, aproximadamente (Bañares *et al.*, 2004) (Fig.4). Entre una y otra población existe una distancia cercana a los 3 Kms en línea recta.

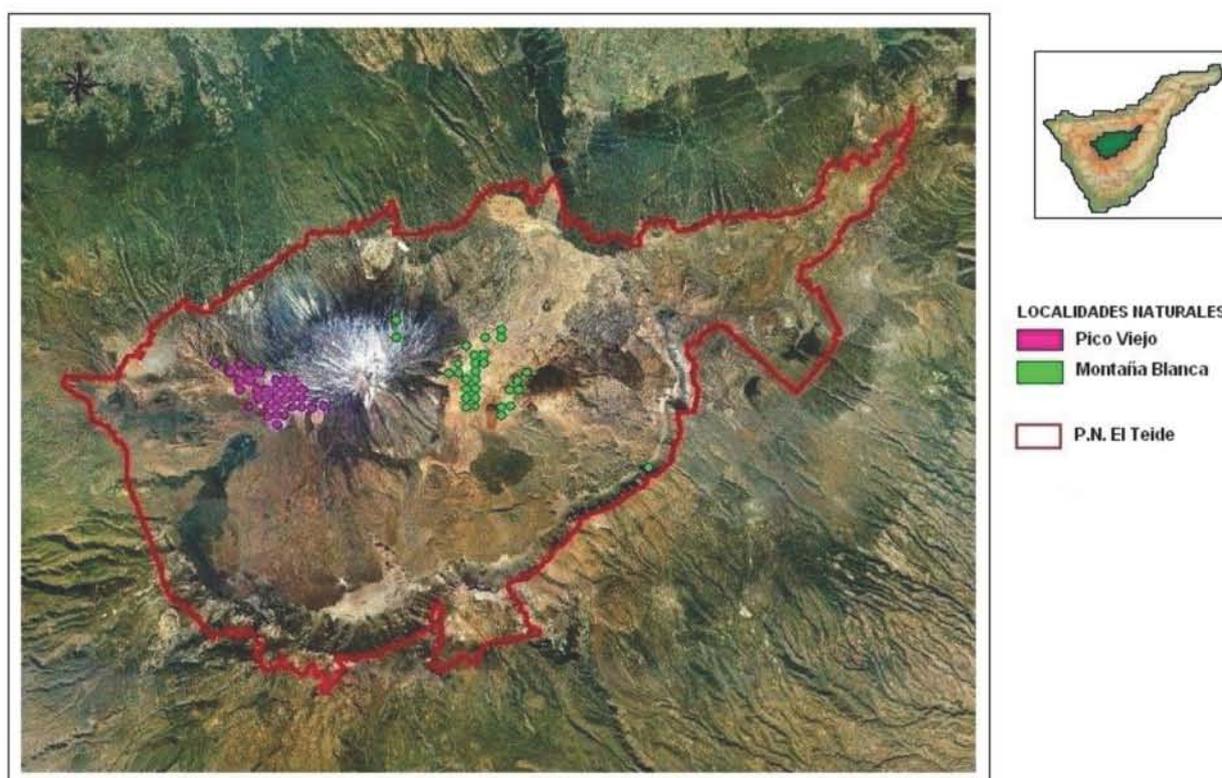


Fig. 4 Distribución de *Silene nocteolens* en el Parque Nacional del Teide.

## ECOLOGÍA

Ambas poblaciones reportadas existen sobre los 2500 m.s.n.m. y en ambientes donde los piroclastos constituyen el sustrato dominante. Es esta capa de piedra pómez, de varios centímetros de espesor sobre suelos más o menos profundos, la que le facilita a las plantas el mantenimiento de la humedad edáfica; ya que sufren heladas en invierno y se mantienen en ausencia de lluvias hasta entrado el verano.

Los factores abióticos anteriormente expuestos hacen de este ambiente un lugar inhóspito para la mayor parte de la vegetación. De hecho, pueden describirse como matorrales laxos en donde la especie dominante es la violeta del Teide (*Viola cheiranthifolia*). También prosperan otras especies acompañantes como *Erysimum scoparium* (Alhelí del Teide), *Argyranthemum teneriffae* (Margaza), etc. (Bañares *et al.*, 2004).

## **SORBUS ARIA (L.) CRANTZ**

El género *Sorbus* L. (Rosaceae) está constituido por árboles de pequeño a mediano tamaño de las zonas templadas del hemisferio norte (Robertson *et al.*, 1991). Son miembros de la subfamilia Maloideae y están relacionados con los géneros comerciales *Malus* y *Pyrus* (Campbell *et al.*, 1995).

*Sorbus* contiene cinco especies diploides en Europa: *Sorbus aria*, *Sorbus aucuparia*, *Sorbus torminalis*, *Sorbus chamaemespilus* y *Sorbus domestica*, clasificadas en cinco subgéneros distintos (Nelson-Jones *et al.*, 2002).

El peralillo de cumbre, *Sorbus aria*, se distribuye por las zonas montañosas de casi toda Europa y parte de Asia; desde la Península Ibérica e Irlanda, hasta el Himalaya. También está presente en Argelia, Marruecos y Canarias (Cabezudo *et al.*, 2000).

A pesar de su amplia distribución, generalmente se le encuentra de forma escasa y aislada. Es esta la principal razón por la que se le haya incluido como “Vulnerable” por la UICN, en el Anexo I según la orden del 20 de febrero de 1991 sobre Protección de la Flora Vasculare Silvestre de la Comunidad Autónoma de Canarias y también en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (CEAC, 2000) en la categoría “De Interés Especial”. Además, se la ha incluido en el Plan de Conservación del Hábitat de Cumbre del Parque Nacional de la Caldera de Taburiente (Cabezudo *et al.*, 2000; MMA, 2003).

## MORFOLOGÍA

Árboles que pueden alcanzar los 20 m de altura, aunque su porte suele ser menor. Las ramas jóvenes son tomentosas, con abundantes lenticelas; la corteza es lisa y gris con yemas de 5-16 mm, cónico ovoideas.

Las hojas son simples (Fig. 5), obovadas u ovado-lanceoladas de entre 4-12 x 2-9 cms; bordes serrados con dientes irregulares, lóbulos laterales marcados, base cuneada o redondeada, no coriáceas, verdes oscuras y glabras en el haz y blanco tomentosas en el envés donde la nerviación es destacable.

Florece entre abril y mayo, los frutos maduran entre septiembre y octubre. Produce inflorescencias corimbiformes terminales con ramas densamente pelosas en la floración y casi glabras en la fructificación. Las flores hermafroditas, blancas de cinco pétalos con tricomas, sufren polinización entomófila (sobre todo abejas, dípteros y coleópteros).



Fig. 5 *Sorbus aria*.

El fruto es un pomo subgloboso de aproximadamente 10-17 x 8-15 mm, a veces periforme, rojo, con lenticelas y agrupaciones de células taníferas muy evidentes. Es posible que algunos frutos se formen por apomixis y partenocarpia. Semillas de 5-8 x 2-4,5 mm; de sección transversal anchamente elípticas, lisas, pardo rojizas. La dispersión de semillas se lleva a cabo por aves frugívoras. La tasa de germinación en condiciones experimentales no supera el 15% (Cabezudo *et al.*, 2000; MMA, 2003).

## DISTRIBUCIÓN

En Canarias se distribuye exclusivamente en las islas de Tenerife y La Palma, por su preferencia a las zonas de alta montaña. En ambas islas el número de ejemplares es muy escaso, siendo más abundante en La Palma (Fig. 6) donde hasta ahora se conocen unos 49 individuos muy aislados y ampliamente separados tanto dentro como cerca del Parque Nacional de la Caldera de Taburiente (MMA, 2003). En Tenerife (Fig. 7), los individuos también están muy separados unos de otros, se localizan dentro del Parque Nacional del Teide y, hasta donde se sabe, no se ha realizado un censo de esta especie.

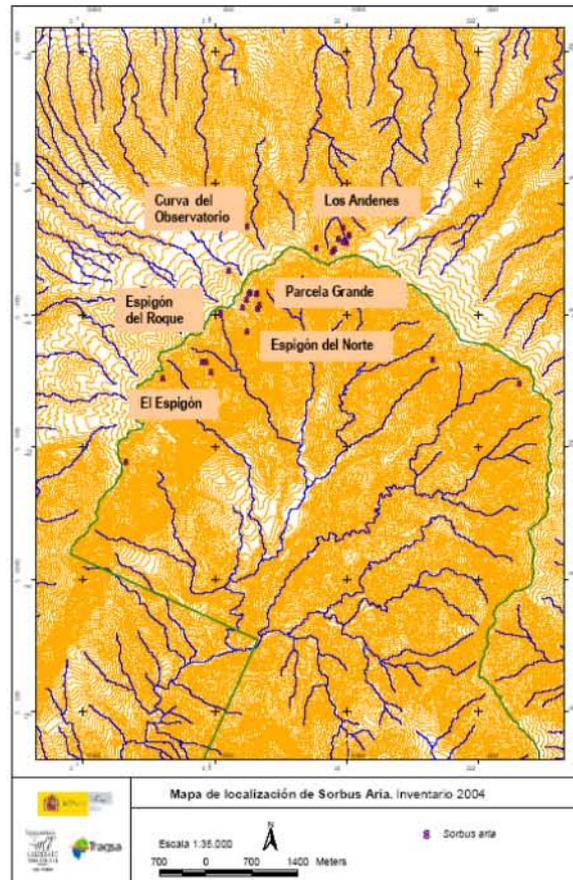


Fig. 6 Ubicación de *Sorbus aria* en el Parque Nacional Caldera de Taburiente.



Fig. 7 Localización de *Sorbus aria* en el Parque Nacional del Teide.

---

## ECOLOGÍA

*Sorbus aria*, es característica de los bosques frondosos de altura (entre 2000 y 3000 m.s.n.m.) pudiendo soportar temperaturas por debajo de los 3 °C. Prefiere suelos calizos, frescos y profundos; pero que sean sueltos y no demasiado húmedos. A veces crece en lapiaces, en zonas más rocosas y secas, en ocasiones como rupícola en roqueados. Soporta el pleno sol y la semisombra.

Las especies que la acompañan más frecuentemente en las zonas mediterráneas son *Berberis hispanica* (Agracejo), *Lonicera splendida* (Madreselva) y *Daphne laureola* (Torvisco macho) (Cabezudo *et al.*, 2000).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la variabilidad, el grado de diferenciación y el nivel de estructuración genética en las poblaciones naturales de *Ilex perado ssp. lopezlilloi*, *Silene nocteolens* y *Sorbus aria* del archipiélago Canario.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la relación filogenética entre varias especies y subespecies del género *Ilex* de la Macaronesia para verificar el grado de diferenciación existente entre *Ilex perado ssp. lopezlilloi* y sus congéneres más cercanos.
2. Determinar la diversidad genética poblacional de *Silene nocteolens* y comparar los niveles de variación y diferenciación genética entre sus poblaciones naturales.
3. Conocer la dinámica reproductiva de *Silene nocteolens* a través de la variación molecular, detectada por microsatélites, de varias generaciones sucesivas.
4. Conocer el grado de diversidad genética entre los individuos de *Sorbus aria* para establecer su acervo genético existente.
5. Buscar y/o desarrollar microsatélites que permitan identificar y diferenciar con rapidez, de forma objetiva y sin ambigüedades la identidad genética de los individuos de las especies analizadas.
6. Contribuir, desde la perspectiva genética, a la aplicación y desarrollo de los posibles planes de recuperación que se puedan establecer en estos endemismos amenazados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTREO

#### *ILEX*

Hasta la fecha se ha obtenido y analizado un total de ciento setenta y tres (173) individuos del género *Ilex*. Las muestras provienen de 16 localidades en cinco islas distintas e incluyen cuatro especies o subespecies descritas hasta el momento para Canarias y Azores: *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (32), *Ilex perado* ssp. *platyphylla* (93), *Ilex azorica* (39) e *Ilex canariensis* (9) (Tabla 1).

**Tabla 1** Número de individuos de *Ilex* analizado por especie, localidad e isla.

ESPECIE	LOCALIDAD	CÓDIGO	ISLA	Nº
<i>Ilex perado</i> ssp. <i>lopezlilloi</i>	Ancule	ANCU-L	La Gomera	12
	Ancón de Pajarito	ANPA-L	La Gomera	8
	Las Cancelas	CANC-L	La Gomera	4
	Lorito Plantado	LOPL-L	La Gomera	8
				<b>32</b>
<i>Ilex perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	Ancule	ANCU-P	La Gomera	1
	Bailadero	BAIL-P	La Gomera	2
	Zona de Parcelas	PARC-P	La Gomera	5
	Reventón Oscuro	REOS-P	La Gomera	1
	Apartacaminos	APAT-P	La Gomera	8
	El Moquinal	MOQU-P	Tenerife	28
	Casa Forestal	CAFO-P	Tenerife	17
	Cruz de Taganana	CRTA-P	Tenerife	31
				<b>93</b>
<i>Ilex azorica</i>	Troqueira	TROQ-A	San Miguel	10
	Lago de Fogo	LAFO-A	San Miguel	10
	Estrada do Mato	ESMA-A	Flores	10
	Descida para Ponta Delgada	PODE-A	Flores	9
				<b>39</b>
<i>Ilex canariensis</i>	La Galería del Barbusano	GABA-C	Gran Canaria	2
	Valle Hermoso	VAHE-C	La Gomera	7
				<b>9</b>
<b>TOTAL</b>				<b>173</b>

La totalidad de las muestras pertenecientes a *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* son propias de isla de La Gomera debido a su carácter endémico. Los representantes de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* pertenecen a siete localidades en la isla de La Gomera y tres de la isla de Tenerife. Se completará el muestreo de esta subespecie con los representantes de la isla

de La Palma. Los individuos pertenecientes a *Ilex azorica* provienen de dos localidades en la isla de San Miguel y dos localidades de la isla de Flores (Azores) y las muestras de *Ilex canariensis* proceden de La Gomera y Gran Canaria (Islas Canarias), una localidad por isla (Fig. 8). Se procederá a incrementar el número de ejemplares de esta especie.

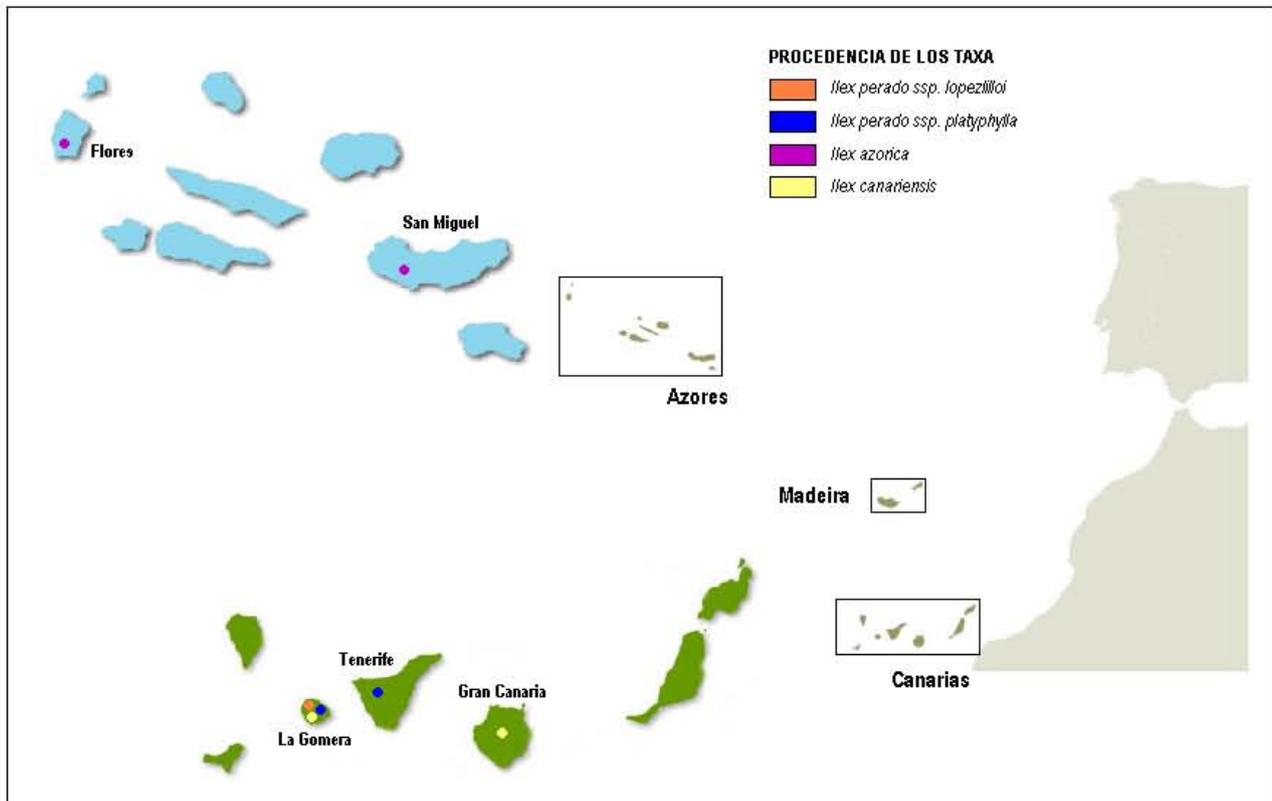


Fig. 8 Mapa de la procedencia de las muestras analizadas del género *Ilex*.

En el Anexo II se muestra la matriz de los genotipos obtenidos con los 8 microsatélites utilizados en el análisis genético del género *Ilex*. Esta matriz revela la naturaleza clónica de la mayoría de los miembros catalogados como *I. perado ssp. lopezilloi* y la existencia de tan solo 5 genotipos distintos entre los 39 testados. Debido a esto, y dado que los individuos proceden de restituciones realizadas a través de esquejes y, por tanto, mediante reproducción asexual por parte del personal del Parque Nacional de Garajonay; no todos los individuos fueron considerados en el análisis genético ya que podrían constituir una distorsión en los resultados. Así, los cinco genotipos encontrados de *Ilex perado ssp. lopezilloi* se consideraron en un mismo grupo de análisis que se denominó como la población ESGO-L.

Las poblaciones de *Ilex azorica* de Estrada do Mato (ESMA-A) y Descida para Ponta Delgada (PODE-A), además del primer individuo de *Ilex canariensis* de la población de La

Galería del Barbusano (GABA-C) no han sido considerados en el análisis estadístico ya que presentaban un alto porcentaje de microsatélites sin amplificar y alelos inciertos.

Por otro lado; las poblaciones Ancule (ANCU-P), Bailadero (BAIL-P) y Reventón Oscuro (REOS-P) de la subespecie *I. perado ssp. platyphylla* se han unificado en la población SUGO-P debido al bajo número de muestras y lo mismo se hizo para los individuos de *Ilex canariensis* que vienen a formar la población JACA-C. La reorganización establecida para efectos del análisis computacional se refleja en la tabla 2.

**Tabla 2** Detalle de las poblaciones sometidas al análisis estadístico. N°=Número de individuos.

ESPECIE	LOCALIDAD	CÓDIGO	ISLA	Nº
<i>Ilex perado ssp. lopezilloi</i>	La Gomera	ENGO-L	La Gomera	5
				<b>5</b>
<i>Ilex perado ssp. platyphylla</i>	Ancule, Bailadero y Reventón Oscuro	SUGO-P	La Gomera	4
	Zona de Parcelas	PARC-P	La Gomera	5
	Apartacaminos	APAT-P	La Gomera	8
	El Moquinal	MOQU-P	Tenerife	28
	Casa Forestal	CAFO-P	Tenerife	17
	Cruz de Taganana	CRTA-P	Tenerife	31
				<b>93</b>
<i>Ilex azorica</i>	Troqueira	TROQ-A	San Miguel	10
	Lago de Fogo	LAFO-A	San Miguel	10
				<b>20</b>
<i>Ilex canariensis</i>	La Galería del Barbusano y Valle Hermoso	JACA-C	Gran Canaria	8
			y La Gomera	
				<b>8</b>
<b>TOTAL</b>				<b>126</b>

El período de colecta osciló entre marzo del 2007 y mayo del 2008.

## **SILENE NOCTOLENS**

En el caso de *Silene nocteolens* existen dos enfoques principales. Primero, analizar la diversidad genética poblacional y comparar los niveles de variación y diferenciación genética existente entre sus poblaciones naturales que se separan unos tres kilómetros en línea recta (Fig. 4). Por otro lado, se pretende conocer la dinámica reproductiva de la especie a través de la variación molecular detectada por microsatélites. Debido a esto último, las campañas de muestreo se han dividido en tres fases.

En la primera fase, que tuvo lugar entre junio y julio del 2007, se tomaron muestras al azar en la localidad de Montaña Blanca para analizar la diversidad genética de la población (Tabla 3).

La segunda fase se llevó a cabo entre agosto y octubre del 2007 y las colectas se establecieron en dependencia de la aparición de los cinco estadios de vida reconocidos en esta especie, a saber:

1. Juveniles (Ju): individuos inmaduros, pequeños.
2. Virginales (Vi): individuos vegetativos sin rastro de previa floración.
3. Vegetativos (Ve): individuos vegetativos con reminiscencia de floraciones pasadas.
4. Reproductor Joven (RJ): individuos con flores, sin vestigios de floraciones pasadas.
5. Reproductor Adulto (RA): individuos con flores y evidencia de floraciones anteriores.

De esta primera etapa se tiene un total de 420 muestras pertenecientes a las dos únicas poblaciones conocidas, pues es endemismo exclusivo de la isla de Tenerife: Montaña Blanca (287) y Pico Viejo (133) (Anexo I).

**Tabla 3** Cantidad de muestras de *Silene nocteolens* recogidas al azar.

NOMBRE	TRANSEPTO	INDIVIDUOS	TOTAL
Montaña Blanca (La parcela) Zona1	1	1 → 20	19
	2	21 → 40	20
	3	41 → 54	13
	Núcleo 1	55 → 59	5
	Trans.	60 → 72	13
	<i>Sub-Total</i>		
Montaña Blanca (Carretera). Zona 2	<i>Sub-Total</i>	73 → 112	40
Montaña Blanca (Est. Sism.). Zona 3	<i>Sub-Total</i>	113 → 126	14
<b>TOTAL</b>			<b>124</b>

La tercera fase de muestreo aún continúa y corresponde a la obtención de los juveniles que sean cultivados a partir de las semillas colectadas en la fase anterior. En estos momentos nos encontramos germinando dichas semillas.

## **SORBUS ARIA**

Para *Sorbus aria* se tiene hasta el momento un total de 95 muestras procedentes de diez localidades. Las muestras de Tenerife (4) provienen de las dos únicas localidades

descritas. En La Palma se han registrado unos 49 ejemplares de seis localidades diferentes, separadas geográficamente. Finalmente disponemos de muestras recogidas en el Parque Nacional de Cabañeros (Extremadura) y Aigüestortes (Cataluña) (Tabla 4).

Los individuos colectados datan de junio a septiembre de 2007. En estos momentos estamos procediendo a incrementar el número de muestras de otras áreas geográficas de la Península Ibérica y del norte de África.

**Tabla 4** Cantidad de muestras de *Sorbus aria* por localidad

ESPECIE	CÓDIGO	LOCALIDAD	ISLA	Nº
<b><i>Sorbus aria</i></b>	GuT	Guajara	Tenerife	3
	CaT	Los Cachorros	Tenerife	1
	COT	Curva del Observatorio	La Palma	3
	ERP	Espigón del Roque	La Palma	5
	PGP	La Parcela Grande	La Palma	5
	EsP	El Espigón	La Palma	1
	AnP	Los Andenes	La Palma	32
	ENP	El Espigón del Norte	La Palma	3
	PNC	P.N. Cabañeros	Península	6
	PNA	P.N. Aigüestortes	Península	36
<b>TOTAL</b>				<b>95</b>

## EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Las muestras fueron transportadas y conservadas en bolsas plásticas de cierre hermético con sílica gel hasta la extracción del ADN. Cada bolsa fue etiquetada con el código correspondiente a cada individuo de cada especie. Los datos de colecta, extracción y purificación de ADN alimentaron matrices con referencia a este código individual.

### EXTRACCIÓN

Aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de hoja deshidratada de cada individuo fue macerado. En los primeros casos este procedimiento se hacía con la ayuda una pequeña cantidad de sílica gel, un mortero y un pistilo. Posteriormente, y gracias a la consecución de una machacadora (RETSCH MM 301), se hizo directamente en los tubos de ensayo de 1,5 ml de capacidad, con la ayuda de un par de balines de acero inoxidable.

En ambos casos el resultado es un polvo más o menos verdoso (dependiendo de la especie) que se sometió al protocolo de Doyle y Doyle (1987) y en casos extremos al de Dellaporta *et al.* (1983) modificado por Corniquel y Mercier (1994).

### PURIFICACIÓN

El procedimiento de purificación utiliza 150 µl del total ADN de la extracción y se hace mediante kits de purificación de la casa SIGMA (Gene Elute PCR Clean-Up Kit).

Las concentraciones y calidad del ADN fueron determinadas por absorbancia. La concentración de ADN fue medida espectrofotométricamente (BECKMAN Coulter DU 530) pues se conoce que esta molécula presenta la mayor absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 260 nm. Para verificar la pureza del ADN se hicieron lecturas a los 230 nm, región en la que se estima se encuentran las impurezas (fenol y urea).

Finalmente, se calculó la tasa de absorción a 260/280nm para determinar la proporción ADN/ARN. La concentración del ADN purificado de las muestras osciló en el rango de 20 a 64 ng/µl.

### CEBADORES

La técnica de microsatélites - con la que se está desarrollando este estudio - genera gran variabilidad de marcadores codominantes que permiten una alta reproducibilidad,

pero con la desventaja de que los cebadores utilizados deben ser propios para la especie analizada y por este motivo deben ser caracterizados para cada taxa.

Por el momento se ha procedido a ensayar cebadores obtenidos por diferentes autores para especies afines, logrando diferentes resultados según el taxón estudiado tal como se verá en el apartado correspondiente.

## PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN

Las amplificaciones de ADN se hicieron en placas Eppendorf de 96 pocillos. En cada pocillo se depositó aproximadamente 20 ng de ADN, 10 pmol de cada cebador y 24  $\mu$ l de solución Master Mix para PCR (Reddy-Mix, ABgene, Surrey, UK) que incluye 0,625 unidades de la enzima ADN Taq polimerasa, Tris-HCl 75mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20 mM, Tween20 0,01%, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 0,2 mM cada dNTP.

Pese a que todas las amplificaciones fueron hechas en el mismo termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient); existen diversos protocolos de amplificación y ciertas particularidades en las cargas dependiendo de la especie y el cebador utilizados. Se detallarán aquellas condiciones de las cuales se obtuvo resultados óptimos.

### **ILEX**

Con excepción de los cebadores ILE04-02 e ILE04-06 que requieren  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, las cargas fueron hechas con  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM.

El protocolo de amplificación (Fig. 9) es el mismo para todos los cebadores: 3 min de desnaturalización a 94 °C; 30 ciclos de 45 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s de hibridación a 56 °C y 45 s de elongación a 72 °C; seguidos de 5 min de elongación a 72 °C y un período de espera indefinido a 4 °C.

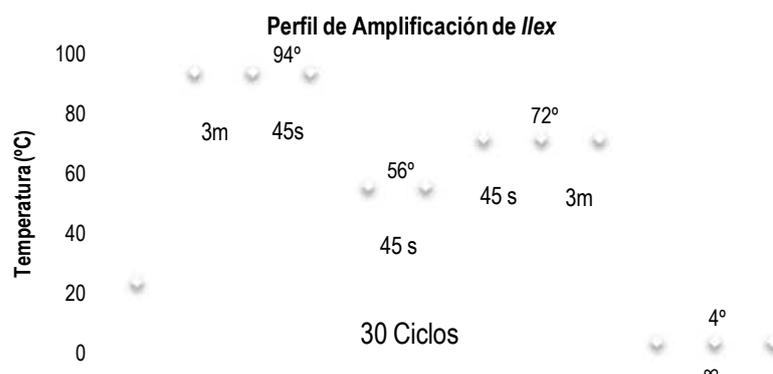


Fig. 9 Perfil de amplificación utilizado para el género *Ilex*.

### **SORBUS ARIA**

Los cebadores MSS 05 (Fig. 10) y MSS 06 (Fig.11) exigen condiciones de ciclado térmico distinto, variando en la temperatura de hibridación.

Tras los 4 minutos de desnaturalización a 94 °C; continúan 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 30 s de hibridación a 60 °C (MSS 05) ó 56 °C (MSS 06) y 1 minuto de elongación a 70 °C; seguidos de otros 5 min de elongación a 70 °C para finalizar con tiempo de espera indefinido a 4 °C.

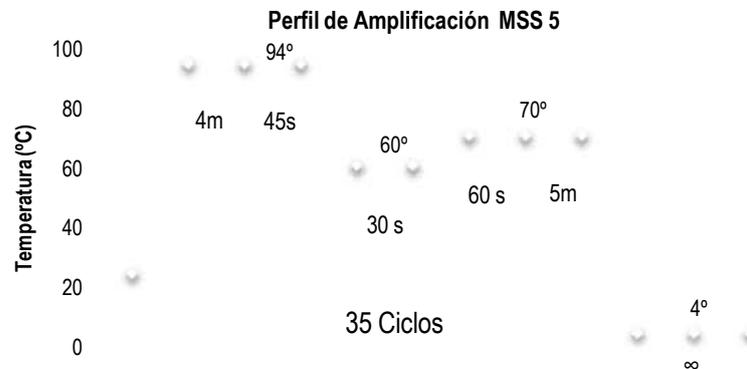


Fig. 10 Perfil de amplificación para *Sorbus aria* con el cebador MSS 5.

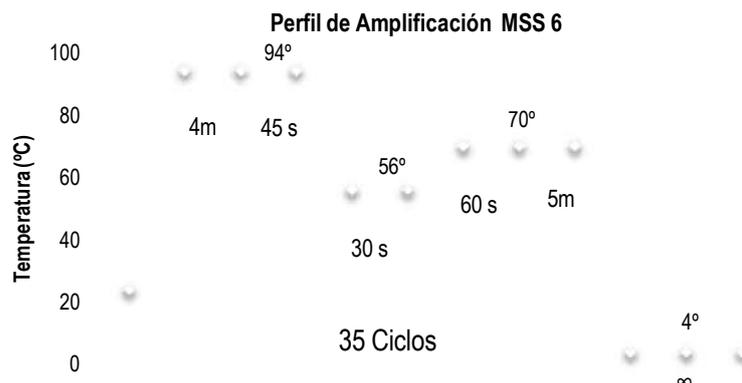


Fig. 11 Perfil de amplificación para *Sorbus aria* con el cebador MSS 6.

Los productos de la amplificación fueron detectados usando un Analizador Genético ABI 3100 y el tamaño de los fragmentos fue determinado utilizando los programas GENSCAN 2.02 y GENOTYPER 1.1 (Applied Biosystems, Inc.). Hemos identificado alelos del perfil de los picos de cada locus y asignado un genotipo a cada individuo.

## ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos para cada individuo y locus amplificado se incluyeron en una hoja de cálculo EXCEL y a partir de allí ha sido introducida en TRANSFORMER 3B.01 (Caujapé-Castells & Baccari-Rosas, 2005), el cual permite exportar los valores a otros programas de análisis genético.

La estadística elemental de variabilidad genética: número medio de alelos por locus ( $A$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y el porcentaje de loci polimórfico ( $P$ ) fueron calculados entre poblaciones y entre taxa utilizando POPGENE 3.2 (Yeh *et al.*, 1997). Este programa también sirvió para obtener los valores de identidad y distancia genética de Nei (Nei, 1973).

Las distancias entre poblaciones para la construcción de un dendrograma UPGMA, así como la distancia de alelos DAS (Chakravorty & Jin, 1993) entre poblaciones fueron calculadas utilizando POPULATION 1.2.30BETA (Langella, 2005) y los resultados fueron visualizados en MEGA4 (Kumar *et al.*, 2001).

Para evaluar la diferenciación genética entre las especies y subespecies tratadas, la estructura de las poblaciones fue inferida mediante un análisis Bayesiano implementado en el programa STRUCTUREN 2.2 (Falush *et al.*, 2007). Se asumió un modelo de mezcla de poblaciones y de frecuencia alélica independiente. Se obtuvo una serie de carreras independientes para cada valor de  $K$  (el número de sub poblaciones) entre 1 y 10. El análisis consistió en  $10^5$  períodos de prueba y una longitud de carrera  $10^6$  réplicas. Las poblaciones o los individuos fueron asignados a un “grupo” si su proporción de pertenencia ( $q_i$ ) a ese grupo era igual o mayor que el umbral arbitrario de 0,800.

El análisis de componentes principales (PCA) se obtuvo a partir de la matriz de frecuencia alélica utilizando GENETIX 4.05.2 (Belkir *et al.*, 2004).

## RESULTADOS

### CEBADORES FUNCIONALES

#### *ILEX*

En total se han probado 18 cebadores para el género *Ilex* (Tabla 5). Los primeros fueron doce de los trece cebadores descritos por Torimaru *et al.* (2004) para *Ilex leuococlada*. Los seis posteriores también pertenecen a la investigación hecha por estos autores, pero es información no publicada que corresponde a cebadores que no amplificaron en *Ilex leuococlada*.

Ocho cebadores (ILE03-01, ILE03-38, ILE03-53, ILE03-86b, ILE04-02, ILE04-06, ILE04-10 e ILE05-81) han dado resultados polimórficos y fueron seleccionados para el análisis del total de las muestras.

**Tabla 5** Microsatélites con amplificación positiva y polimorfismo para el género *Ilex*.

Nombre	Referencia	Especie	Motivo
ILE03-01	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(CT) <sub>9</sub>
ILE03-38	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(AG) <sub>22</sub>
ILE03-53	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(GA) <sub>12</sub>
ILE04-02	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(TA) <sub>11</sub> A(CA) <sub>10</sub>
ILE04-06	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(CT) <sub>24</sub>
ILE04-10	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(GA) <sub>22</sub>
ILE03-86b	Torimaru (Com. Pers.)	<i>Ilex leuococlada</i>	(GA) <sub>8</sub>
ILE05-81	Torimaru (Com. Pers.)	<i>Ilex leuococlada</i>	(AG) <sub>22</sub>

#### *SILENE NOCTOLENS*

Los ensayos de prueba para *Silene nocteolens* se han realizado con cebadores desarrollados para *Silene latifolia* (Teixeira y Bernasconi, 2007) y *Silene vulgaris* (Juillet *et al.*, 2003). Ninguno de los 11 cebadores utilizados hasta ahora ha dado resultados satisfactorios (Tabla 6).

**Tabla 6** Microsatélites ensayados para *Silene nocteolens* (ninguno positivo).

Nombre	Referencia	Especie	Motivo
SI 1	Teixeira y Bernasconi, 2007	<i>Silene latifolia</i>	(CA) <sub>31</sub>
SI 8	Teixeira y Bernasconi, 2007	<i>Silene latifolia</i>	(GA) <sub>37</sub>
SI 14	Teixeira y Bernasconi, 2007	<i>Silene latifolia</i>	(GT) <sub>41</sub>

Nombre	Referencia	Especie	Motivo
SI 15	Teixeira y Bernasconi, 2007	<i>Silene latifolia</i>	(GT) <sub>46</sub>
A2	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(CA) <sub>4</sub> TA(CA) <sub>3</sub>
A5	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(CA) <sub>21</sub> CT(CA) <sub>2</sub>
A11	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(CA) <sub>2</sub> A(CA) <sub>24</sub>
B12	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(CTT) <sub>2</sub> C(CTT) <sub>2</sub> T(CTT) <sub>2</sub> (CATT) <sub>5</sub>
B17	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(GA) <sub>22</sub> AA(GA) <sub>2</sub> AA(GA) <sub>9</sub>
B29	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(GA) <sub>16</sub>
G3	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(GA) <sub>20</sub>

## SORBUS ARIA

En la búsqueda de marcadores para *Sorbus aria* se han testado algunos individuos con 6 cebadores desarrollados para *Sorbus torminalis*, pero recomendados para la especie que nos interesa (Oddou-Muratorio *et al.*, 2001). También se probaron 7 cebadores desarrollados para los géneros comerciales *Malus* (Gianfranceschi *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002) y *Pyrus* (Yamamoto *et al.*, 2002); en total, 13 cebadores (Tabla 7).

Sólo dos de los primeros 6 (MSS 05 y MSS 06) han reflejado un carácter polimórfico aceptable.

**Tabla 7** Microsatélites ensayados en *Sorbus aria* (Marcadores con amplificación óptima en *S. aria* subrayados).

Nombre	Referencia	Especie	Motivo
MSS1	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	GA(15)
MSS3	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	CA(12)
<u>MSS5</u>	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	<u>GA(19)</u>
<u>MSS6</u>	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	<u>GT=CA(14)</u>
MSS13	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	CA(12)
MSS16	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	CT=GA(28)
CH01H01	Gianfranceschi <i>et al.</i> , 1998	<i>Malus x domestica</i>	(AG) <sub>25.5</sub>
CH01H10	Gianfranceschi <i>et al.</i> , 1998	<i>Malus x domestica</i>	(AG) <sub>21</sub>
CH02B03b	Gianfranceschi <i>et al.</i> , 1998	<i>Malus x domestica</i>	(GA) <sub>22</sub>
CH02c09	Liebhard <i>et al.</i> , 2002	<i>Malus x domestica</i>	?
CH02d08	Liebhard <i>et al.</i> , 2002	<i>Malus x domestica</i>	?
MS14h03	Liebhard <i>et al.</i> , 2002	<i>Malus x domestica</i>	?
BGT23b	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002	<i>Pyrus spp.</i>	(TC) <sub>18.5</sub>

## VARIABILIDAD GENÉTICA

Las tablas 8 y 9 muestran los diferentes índices de diversidad genética obtenidos para las poblaciones y para las especies y subespecies del género *Ilex*, respectivamente.

**Tabla 8** Parámetros de diversidad genética para las poblaciones del género *Ilex*

Población	Nº	Especie	Isla	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	P
ESGO-L	5	<i>I. perado</i> ssp. <i>lopezlilloi</i>	La Gomera	2,13	0,50	0,48	100,00%
SUGO-P	4	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	La Gomera	2,25	0,34	0,42	100,00%
PARC-P	5	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	La Gomera	2,50	0,38	0,43	87,50%
APAT-P	8	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	La Gomera	1,63	0,47	0,28	62,50%
MOQU-P	28	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	Tenerife	3,25	0,42	0,50	100,00%
CAFO-P	17	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	Tenerife	4,13	0,43	0,61	100,00%
CRTA-P	31	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	Tenerife	3,00	0,44	0,48	100,00%
TROQ-A	10	<i>I. azorica</i>	San Miguel	3,75	0,25	0,33	62,50%
LAFO-A	10	<i>I. azorica</i>	San Miguel	4,13	0,28	0,36	75,00%
JACA-C	8	<i>I. canariensis</i>	GC y LG	2,38	0,48	0,42	75,00%

Número medio de alelos por locus (A), Heterocigosidad observada (H<sub>o</sub>), Heterocigosidad esperada (H<sub>e</sub>) y Proporción de loci polimórfico (P). "Nº" es el número de individuos analizados por localidad.

**Tabla 9** Índices de diversidad genética por especie o subespecie del género *Ilex*

Especie	Nº	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	P
<i>I. perado</i> ssp. <i>lopezlilloi</i>	5	2,12	0,50	0,48	100,00%
<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	93	5,37	0,42	0,60	100,00%
<i>I. azorica</i>	20	5,62	0,26	0,35	75,00%
<i>I. canariensis</i>	8	2,38	0,48	0,42	75,00%

Número medio de alelos por locus (A), Heterocigosidad observada (H<sub>o</sub>), Heterocigosidad esperada (H<sub>e</sub>) y Proporción de loci polimórfico (P). "N" es el número de individuos analizados por localidad.

## RIQUEZA ALÉLICA

El número medio de alelos por locus varía considerablemente entre las poblaciones estudiadas. Los valores oscilan entre 1,63 para la población de Apartacamínos (APAT-P) y 4,13 para la población de Casa Forestal (CAFO-P) y Lagoa de Fogo (LAFO-A); las dos primeras, poblaciones de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* y la última de *Ilex azorica*. La media para todas las poblaciones es 2,91.

En general las poblaciones de *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* e *Ilex perado* ssp. *platyphylla* procedentes de la isla de La Gomera (ENGO-L, SUGO-P, PARC-P y APAT-P) presentan valores de diversidad inferiores a las poblaciones de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* de Tenerife (MOQU-P, CAFO-P y CRTA-P), *Ilex azorica* (TROQ-A, LAFO-A) e *Ilex canariensis*

(JACA-A). Esto es debido, probablemente, al bajo número de ejemplares estudiados hasta el momento en las poblaciones gomeras, las cuales no llegan a la decena de ejemplares.

Los resultados del análisis al nivel de especie y subespecie se presentan en la Tabla 9 y revelan que *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* e *Ilex azorica* presentan la menor y mayor riqueza alélica, respectivamente.

---

### **POLIMORFISMO**

La variabilidad genética detectada por polimorfismo difiere un poco de los resultados obtenidos con el número medio de alelos por locus.

En la determinación del porcentaje de loci polimórficos de las poblaciones analizadas se ha escogido el criterio del 99%. Según este parámetro, el mayor porcentaje de loci polimórficos (100%) fue encontrado en cinco de las poblaciones analizadas (Tabla 8): La población de *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* (ENGO-L), una de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* en la isla de la Gomera (SUGO-P) y las tres poblaciones de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* de Tenerife (El Moquinal, MOQU-P; Casa Forestal, CAFO-P y Cruz de Taganana, CRTA-P). El menor valor de polimorfismo lo presentan la población de *Ilex azorica* nativa de Troqueira (TRO-A = 62,5%) y la población de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* proveniente de Apartacaminos (APAT-P = 62,5%). Este último dato y el alto valor obtenido para la población de Casa Forestal, coinciden con los resultados para la riqueza alélica expuestos con anterioridad.

Observando los resultados del análisis por especie en la Tabla 9, es notorio que las subespecies *I. perado* ssp. *lopezilloi* e *Ilex perado* ssp. *platyphylla* muestran mayor polimorfismo (100%) que *I. azorica* e *Ilex canariensis* (75%).

---

### **HETEROCIGOCIDAD ESPERADA**

Los valores obtenidos para la heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) varían desde 0,28 para la población de APAT-P hasta 0,61 para CAFO-P. En general y dentro de estos valores la heterocigocidad esperada es bastante alta ya que todas las poblaciones alcanzan valores superiores a 0,33 con excepción de APAT-P. Las razones de estos niveles de diversidad genética están aún por determinar ya que no presentan relación alguna con el tamaño muestral de las poblaciones.

En cuanto al taxón pueden apreciarse valores de 0,35; 0,42, 0,48 y 0,60 para *I. azorica*, *I. canariensis*, *I. perado* ssp. *lopezlilloi*, e *I. perado* ssp. *platyphylla*; en orden ascendente. Sorprende que *Ilex azorica* disponga de los niveles más bajos de heterocigosidad, este será un aspecto a estudiar en un futuro próximo.

## IDENTIDAD Y DISTANCIA GENÉTICA

En la tabla 10 se muestran los valores de identidad y distancia genética (Nei, 1972) obtenidos para las diferentes poblaciones del género *Ilex* analizadas. El rango de la identidad varía ampliamente entre las poblaciones desde 0,97 entre las poblaciones de *I. azorica* (TROQ-A y LAFO-A) hasta 0,01 para las relaciones TOQU-A – JACA-C (*Ilex azorica* – *Ilex canariensis*).

Tabla 10 Identidad (arriba) y distancia (abajo) de Nei (1972) entre las poblaciones naturales del género *Ilex* analizadas.

Población	ESGO-L	SUGO-P	PARC-P	APAT-P	MOQU-P	CAFO-P	CRTA-P	TROQ-A	LAFO-A	JACA-C
ESGO-L		0,80	0,86	0,78	0,66	0,56	0,72	0,30	0,28	0,08
SUGO-P	0,22		0,90	0,73	0,49	0,37	0,58	0,20	0,19	0,08
PARC-P	0,15	0,11		0,67	0,51	0,43	0,64	0,18	0,17	0,07
APAT-P	0,24	0,32	0,40		0,52	0,38	0,54	0,23	0,23	0,05
MOQU-P	0,41	0,71	0,68	0,66		0,77	0,90	0,49	0,48	0,15
CAFO-P	0,57	1,00	0,85	0,98	0,26		0,80	0,26	0,27	0,44
CRTA-P	0,32	0,54	0,44	0,62	0,11	0,22		0,46	0,46	0,14
TROQ-A	1,21	1,63	1,73	1,46	0,72	1,35	0,77		0,97	0,01
LAFO-A	1,26	1,68	1,79	1,47	0,74	1,31	0,78	0,03		0,02
JACA-C	2,54	2,51	2,61	3,08	1,89	0,83	1,98	4,89	4,05	

Si sólo se consideran las poblaciones de *I. perado* ssp. *platyphylla*, los valores de identidad genética varían desde  $I = 0,37$  para CAFO-P – SUGO-P (Casa Forestal – Suma de La Gomera) hasta  $I = 0,90$  para PARC-P – SUGO-P (Zona de Parcelas – Suma de La Gomera) y CRTA-P – MOQU-P (Cruz de Taganana – Moquinal; en Tenerife). El 86,67% de los valores de la identidad genética para esta subespecie es inferior a 0,9 y la media ( $\bar{I}$ ) es igual a 0,62. En el caso de *I. azorica* la identidad genética entre las dos poblaciones estudiadas es de  $I = 0,97$ . Tanto *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* como *Ilex canariensis* constan de una sola población por lo que las comparaciones entre sub poblaciones no son factibles.

Al analizar los resultados de la identidad genética para las poblaciones de las distintas especies y subespecies se puede observar que el 100% de los valores son inferiores a 0,9. Entre las poblaciones de *I. perado* ssp. *lopezilloi* y las de su símil *I. perado* ssp. *platyphylla*  $\bar{I} = 0,73$ ; en la relación entre *I. perado* ssp. *lopezilloi* y su congénere *I. azorica* existe una mayor separación ( $\bar{I} = 0,29$ ) y entre *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* e *Ilex canariensis* los resultados muestran una media ( $\bar{I}$ ) de 0,08. Al comparar las poblaciones de

*I. perado* ssp. *platyphylla* e *I. azorica* encontramos una media de la identidad genética de 0,30 y entre *Ilex perado* ssp. *platyphylla* e *Ilex canariensis*, la media es de 0,16. Finalmente, entre *Ilex azorica* e *Ilex canariensis*  $\bar{I} = 0,02$ .

Por otro lado, si se analizan las identidades genéticas de acuerdo a la procedencia de las distintas muestras se obtienen valores de  $\bar{I} = 0,79$ ; 0,59 y 0,34 para La Gomera, Tenerife y San Miguel; respectivamente. Al comparar estos valores entre las islas tenemos medias de 0,50 entre La Gomera y Tenerife; 0,40 entre Tenerife y San Miguel y 0,29 entre La Gomera y San Miguel.

Los valores de la distancia genética de Nei (1972) sirvieron de base para la construcción del dendrograma UPGMA (Fig.12) en el cual se observa claramente la separación de las poblaciones de *I. canariensis* (con una fortaleza del 92%) e *I. azorica* (con 76% de fortaleza) del resto de las poblaciones estudiadas; mientras que la disgregación entre *I. perado* ssp. *platyphylla* e *I. perado* ssp. *lopezilloi* no está lo suficientemente marcada.

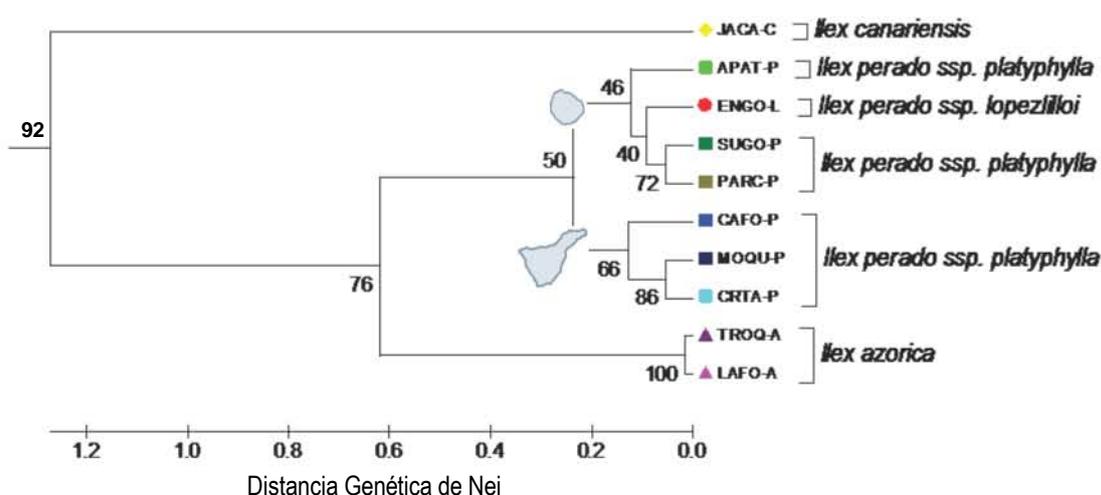
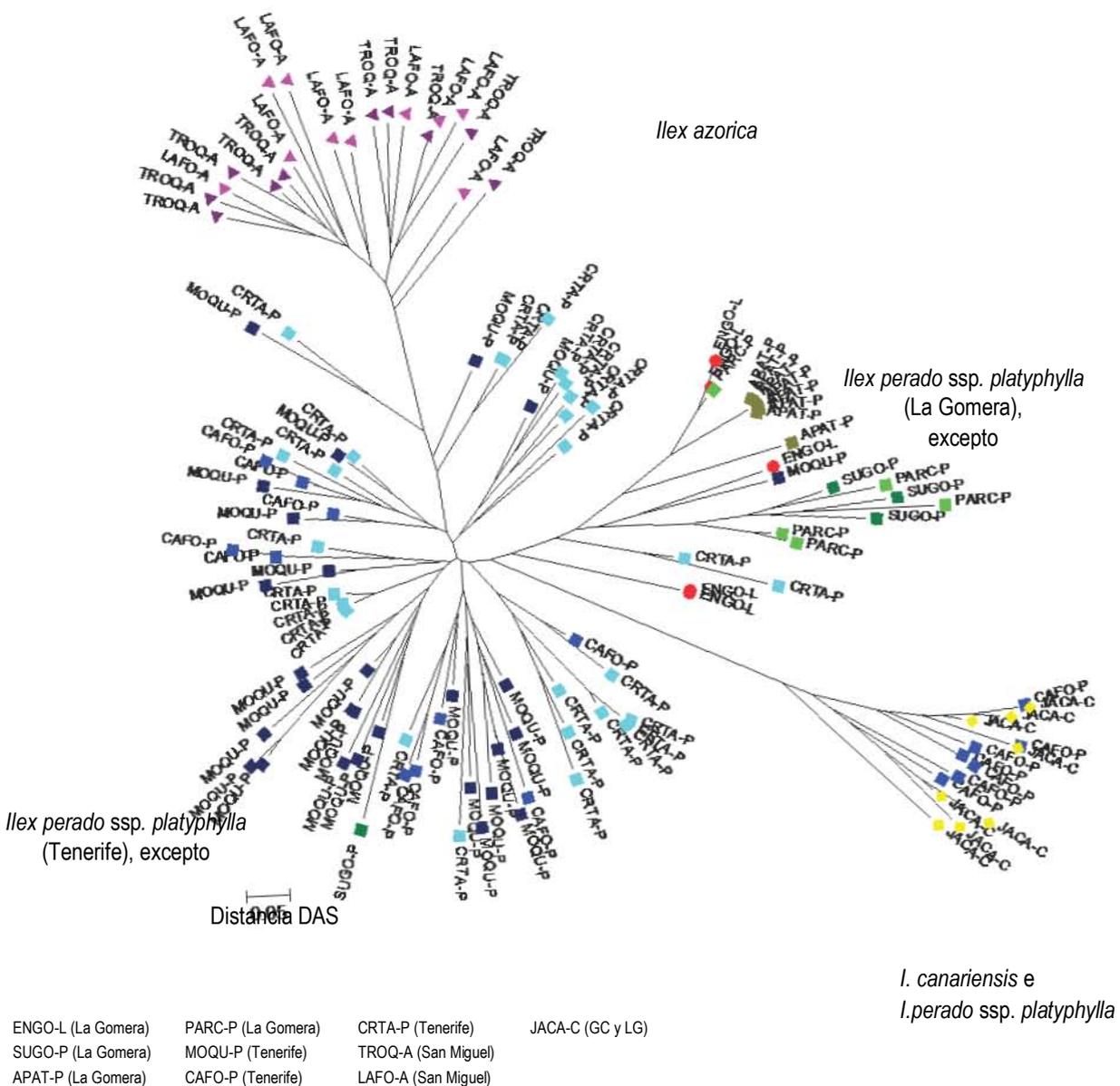


Fig. 12 Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) para las poblaciones del género *Ilex* analizadas.

De acuerdo con este dendrograma, las poblaciones de *I. perado* ssp. *lopezilloi* están más relacionadas con las poblaciones de *I. perado* ssp. *platyphylla* de La Gomera, de donde la primera subespecie es endémica. Por lo tanto, parece que la condición geográfica e insular condiciona las diferencias genéticas entre las poblaciones analizadas y no el rango taxonómico que a nivel de subespecie ha separado a *I. perado* ssp. *lopezilloi* e *I. perado* ssp. *platyphylla*.

Un segundo árbol (Neighbour-joining) basado en las distancias individuales DAS (Chakravorty y Jin, 1995), se presenta en la figura 13. Otra vez es evidente la separación de los individuos de *I. azorica* (triángulos violáceos) e *Ilex canariensis* (rombos amarillos). También es visible la mayor afinidad de los organismos de *I. perado* ssp. *platyphylla* de acuerdo a su isla de procedencia (cuadrados en tonos verdes, La Gomera y cuadrados en tonos azules, Tenerife); de éstos últimos, 7 individuos de la población de Casa Forestal de Tenerife (CAFO-P1, CAFO-P2, CAFO-P3, CAFO-P4, CAFO-P8, CAFO-P9 y CAFO-P10) se mezclan con la población de *I. canariensis*.



**Fig. 13** Neighbour-joining individual para las poblaciones del género *Ilex* analizadas. Los códigos de las poblaciones se indican en la tabla 8.

Esta aproximación genética de los individuos de *I. perado* ssp. *platyphylla* con *I. canariensis* constituye un resultado inesperado sobretodo porque, en primer lugar, son especies completamente distintas a priori bien diferenciadas, tanto morfológicamente como genéticamente según el dendrograma UPGMA anteriormente descrito; en segundo lugar, porque los individuos analizados de ambas especies pertenecen a diferentes islas (*I. canariensis*, Gran Canaria y La Gomera, e *I. perado* ssp. *platyphylla* de Tenerife). Es necesario incrementar el número de individuos de *I. canariensis* para poder determinar las causas de esta similitud genética.

En cuanto a *I. perado* ssp. *lopezlilloi* (circunferencias rojas), este diagrama coincide con el anterior y los individuos de esta subespecie se hallan más próximos a algunos de *I. perado* ssp. *platyphylla* de su propia isla.

## ESTRUCTURACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

La base de datos para el análisis bayesiano incluyó 126 individuos, 8 loci y 10 poblaciones del género *Ilex*. Las pruebas se hicieron para valores de  $K=1-10$ , obteniéndose la máxima probabilidad de los datos en  $K=5$ , esto sugiere niveles en estructuración adicionales al número de taxa (4) en la muestra total.

Según Rosenberg *et al.* (2002), escoger un valor de  $K$  que maximice la probabilidad posterior de datos (PPD) puede ser difícil para un conjunto de datos complejos, incluyendo muchos grupos.

Dado que  $K$  toma valores que incrementan de acuerdo a la diferencia de los grupos y separa primero los grupos más divergentes en distintos racimos, en el caso de datos muy estructurados una segunda opción para escoger  $K$  es considerar el incremento sucesivo de la probabilidad de datos posterior (PPD) en el aumento de los valores de  $K$ . Esto es, considerar el acrecentamiento de la información para cada adición de un conjunto de frecuencias de alelos (Rosenberg *et al.*, 2002).

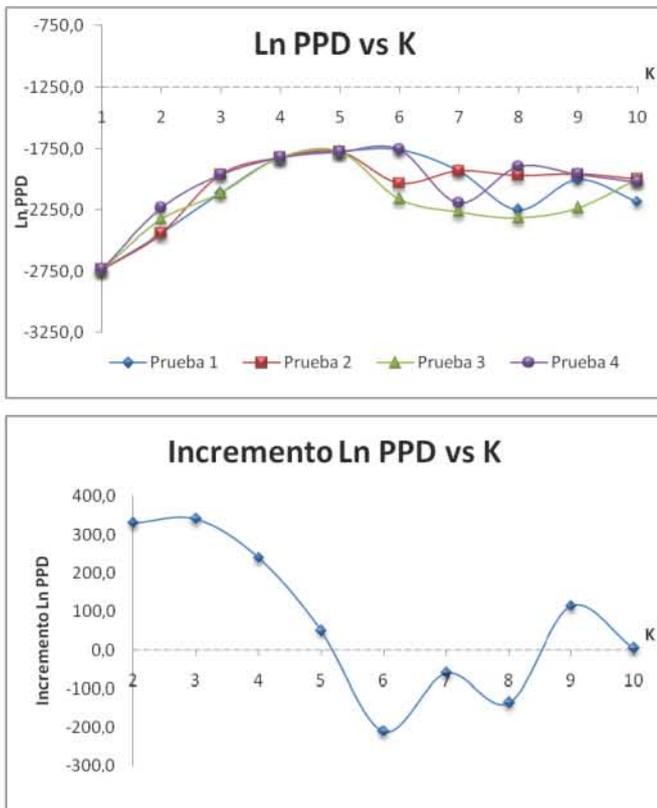


Fig. 14 Gráficos para la detección de  $K$ . LnPPD vs  $K$  (arriba) e Incremento de LnPPD vs  $K$  (abajo).

En este análisis (Fig.14) el PPD incrementó de  $K=1$  a  $K=5$  siendo este último su máximo valor promedio y posteriormente se notó un decrecimiento.

Al evaluar el incremento de PPD se observa un alto valor para  $K=3$ , mientras que para  $K>3$  el incremento en información se hace menor y va decreciendo progresivamente. Esto significa que la información obtenida a partir del cuarto grupo no es tan importante como la de los tres primeros.

De esta manera se ha determinado que  $K=3$  y cada individuo de las distintas poblaciones será asignado de manera asimétrica a uno de estos grupos.

La asignación de los miembros de cada población a uno de los grupos definidos anteriormente se ilustra en un histograma para las proporciones inferidas a partir del análisis bayesiano (Fig. 15) en el que cada delgada línea vertical representa a un individuo, el cual tiene tantos segmentos coloreados como fracciones de pertenencia tenga en los grupos K. Las líneas negras separan a los individuos de distintas poblaciones.

Puesto que en este estudio se analizaron cuatro taxa, se preveía que las poblaciones se estructurarían en cuatro racimos o clústeres correspondientes. Empero, tal como se observa en el diagrama de barras, existe una gran diferenciación entre las poblaciones de *I. azorica* e *I. canariensis* (aunque persiste la tendencia de los siete individuos de CAFO-P en acercarse a esta última población); mientras que entre las poblaciones de *I. perado* ssp. *platyphylla* e *I. perado* ssp. *lopezlilloi* no se visualizan diferencias significativas. De hecho, análisis posteriores (no mostrados aquí) demuestran que cuando se escoge K=4 la separación de estos individuos obedece más al lugar de procedencia de las muestras analizadas que al orden taxonómico.

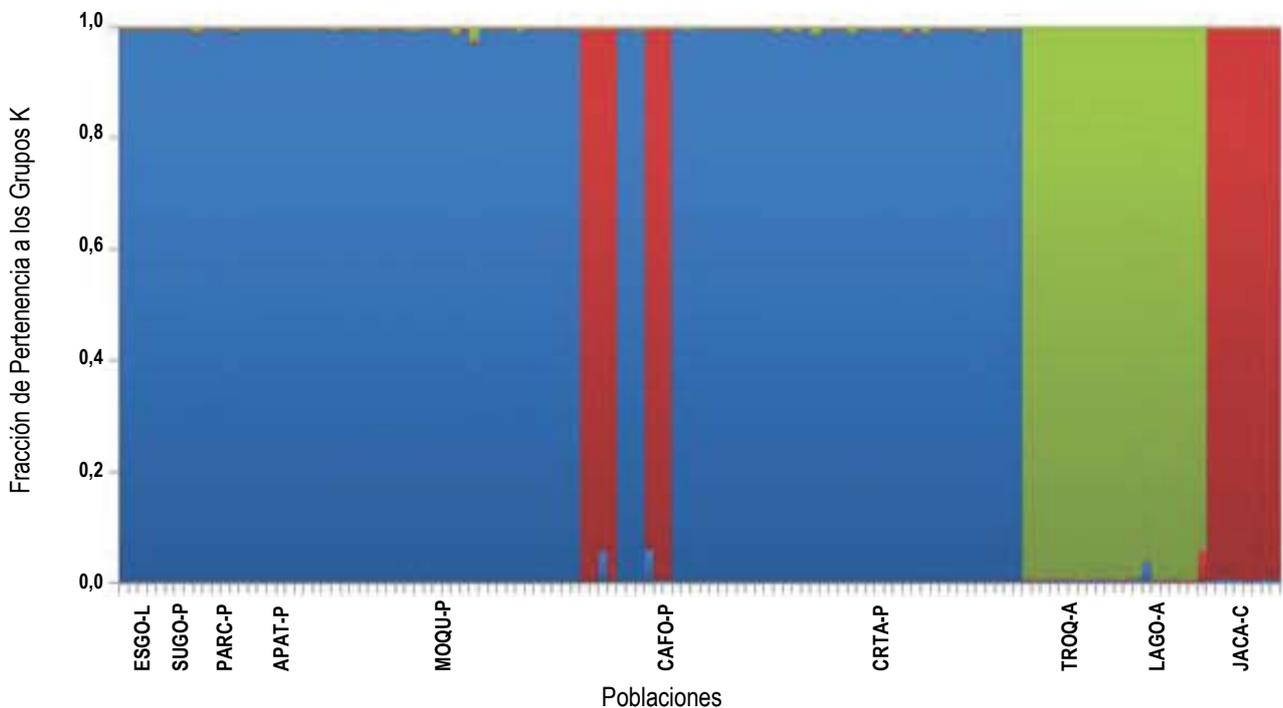


Fig. 15 Diagrama de barras para las proporciones inferidas con el análisis bayesiano en las poblaciones de *Ilex*.

### ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis de componentes principales, que explica el 21,51% de la varianza, (Fig. 16) separa claramente las poblaciones de *I. azorica* (TROQ-A y LAFO-A) e *Ilex canariensis* (JACA-C) de las demás poblaciones analizadas. Una vez más, no se aprecian diferencias entre los individuos de *I. perado ssp. platyphylla* e *I. perado ssp. lopezlilloi*; a excepción de los siete individuos de la población de Casa Forestal de Tenerife que aparecen disgregados del resto y muy próximos a la población de *I. canariensis*, tal como se observó en el NJ (fig. 13) y el análisis bayesiano (fig. 15).

De esta manera, dos aspectos son sobresalientes en este análisis: la separación de las poblaciones de *I. azorica* e *I. canariensis* del resto de las poblaciones (aunque con intrusión de los individuos *I. perado ssp. platyphylla* de Casa Forestal en la población de *Ilex canariensis*) y la integración de ambas subespecies de *I. perado* (con la misma excepción). Estos resultados coinciden con el análisis de la estructura de la población presentado previamente.

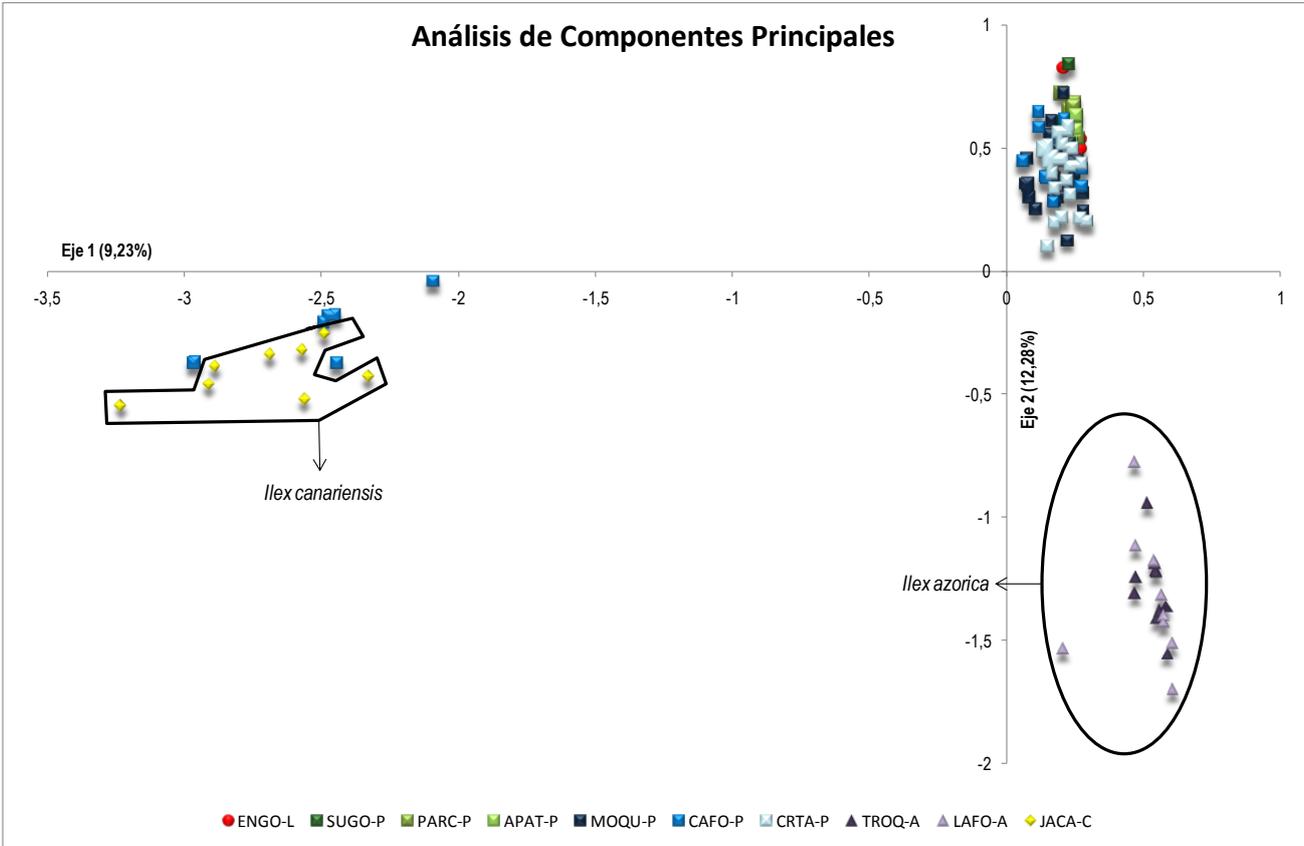


Fig. 16 Análisis de Componentes Principales para los individuos de las poblaciones del género *Ilex* analizadas

## CONCLUSIONES

1. Algunos de los cebadores publicados para *Ilex leucoclada* (Torimaru *et al.* 2004) pueden ser utilizados en la detección de genotipos para sus congéneres presentes en Canarias y Azores: *Ilex perado*, *Ilex azorica* e *Ilex canariensis*.
2. Los cebadores desarrollados para *Silene latifolia* (Teixeira y Bernasconi, 2007) y *Silene vulgaris* (Juillet *et al.*, 2003) han resultado incompatibles con la endémica *Silene nocteolens*.
3. Sólo dos de los cebadores desarrollados para *Sorbus torminalis* (Oddou-Muratorio *et al.*, 2001) reflejaron un carácter polimórfico en *Sorbus aria*, y ninguno de los cebadores elaborados para los géneros comerciales *Malus* (Gianfranceschi *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002) y *Pyrus* (Yamamoto *et al.*, 2002) han dado resultados positivos en la especie que nos atañe.
4. La matriz de genotipos obtenidos con los 8 microsatélites para el género *Ilex* (Anexo II) revela la naturaleza clónica de la mayoría de los miembros catalogados como *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* restituidos por los agentes del Parque Nacional Garajonay en La Gomera y la existencia de sólo 5 genotipos diferentes entre los 39 individuos analizados.
5. El dendrograma UPGMA basado en la distancia genética entre poblaciones (Nei, 1972), el NJ basado en la distancia entre individuos DAS (Chakravorty y Jin, 1995) y el análisis de componentes principales (PCA) separan de manera evidente las poblaciones e individuos de *Ilex azorica* e *Ilex canariensis* del resto de las poblaciones y no hacen diferenciación entre los individuos de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* e *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* a excepción de 7 ejemplares de *I. perado* ssp. *platyphylla* de Casa Forestal de Tenerife.
6. Por último, la estructura de las poblaciones de *Ilex perado* parece estar más relacionada con la isla de origen de las muestras analizadas que con su categoría taxonómica.

Los resultados y conclusiones aquí presentados constituyen en primera instancia una aproximación al análisis genético de *Ilex perado*, *Silene nocteolens* y *Sorbus aria* que debe complementarse en los siguientes meses de trabajo. Para ello se está procediendo, por un lado, a incrementar los tamaños muestrales de las especies y, por otro, a la obtención de los microsatélites específicos para *Silene nocteolens* y *Sorbus aria*.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar la oportunidad para extender mi agradecimiento al Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación y a la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo que han depositado su confianza en mí al sufragar mis estudios a través de una beca MAEC-AECID.

Agradezco también a mis tutores, Pedro Antonio Sosa Henríquez y Miguel Ángel González Pérez, que con toda dedicación y paciencia me han enseñado las técnicas de laboratorio, los principios esenciales de la Genética de la Conservación y, además, han pulido reiteradamente mis manuscritos. También al Dr. Takeshi Torimaru por su cooperación tan desinteresada al compartir información no publicada sobre los microsatélites desarrollados para *Ilex leucoclada*.

Un reconocimiento especial a Ángel Fernández y Cito China (Parque Nacional Garajonay), a Manuel Marrero, Eduardo Carqué y Manuel Izquierdo (Parque Nacional del Teide) y a Álvaro Rodríguez Felipe (Parque Nacional Caldera del Taburiente) por su asistencia en la recolección de muestras. A Agustín Naranjo, Gerald Oostermeijer, Nancy Cabanillas y Alicia Escandell por su colaboración en el muestreo y la recolección de datos de campo.

A mi familia por su amor y apoyo emocional; pero sobre todas las cosas al “*Único y Sabio Dios*” (Judas 1:25) que es “*mi amparo, fortaleza y pronto auxilio en las tribulaciones*” (Salmos 46:1); a quien debo todos mis logros sean grandes o pequeños.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, S. 1983 A Reappraisal of *Ilex aquifolium* and *I. perado* (Aquifoliaceae). Kew Bulletin 39: 141-155.
- Avise, J.C. 1994 Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall. First Publication. New York, USA. 511p.
- Ayala, F.J. 1982 Population and Evolutionary Genetics. The Benjamin/Cummings Publishing. 268p.
- Bañares, A.; Blanca, G.; Güemes, J.; Moreno, J.C. y S. Ortiz (Eds.) 2004 Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. DGCN. Madrid. 1072p.
- Bañares, A.; Marrero, E.; Carqué, E. y Á. Fernández 2003 Plan de Recuperación de la Flora Amenazada del Parque Nacional Garajonay, La Gomera (Islas Canarias): Germinación y Restitución de *Pericallis hamsenii*, *Gonospermum gomerae* e *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*. Botánica Macaronésica 24: 3-16.
- Belkhir, K.; Borsa, P.; Chikhi, L.; Raufaste, N. y F. Bonhomme 1996-2004 Genetix 4.05. Université de Montpellier II, France.
- Bramwell, D. 1995 A New *Silene* Species from Gran Canaria. Botánica Macaronésica 22: 121-122.
- Cabezudo, B.; Hernández-Bermejo, J.E.; Herrera, C. M.; Muñoz, J y B. Valdés 2000 Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía, II: Especies Vulnerables. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla, España.
- Campbell, C.S.; Donoghue, M.J.; Baldwin, B.G. y M.F. Wojciechowski 1995 Phylogenetic Relationship in *Maloideae* (Rosaceae): Evidence from Sequences of Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA and its Congruence with Morphology. American Journal of Botany 82: 903-918.

- Caujapé-Castells, J. y M. Baccarani-Rosas 2005 Transformer-3: a Program for Analysis of Molecular Population Genetic Data. EXEGEN software, Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo".
- CEAC 2000 Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias. BOC. 1 de agosto de 2000.
- Chakravorty R. y L. Jin 1995 Estimation of Genetic Distance and Coefficient of Gene Diversity from Single-Probe Multilocus DNA Fingerprinting Data. Molecular Biology and Evolution 11: 120-127.
- Corniquel, B. y L. Mercier 1994 Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivar Identification by RFLP and RAPD. Plant Science 101: 163-172.
- Dellaporta S.; Wood, I. y J.B. Hicks 1983 A Plant DNA Minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 14: 19-21.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle 1987 A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America. 19: 11-15.
- Duran, A. y Y. Menemen 2003 A New Species of *Silene* (Caryophyllaceae) from South Anatolia, Turkey. Botanical Journal of the Linnean Society 143: 109-113.
- Engel, S.R.; Linn R.A.; Taylor, J.F. y S.K. Davis 1996 Conservation of Microsatellite Loci across Species of Artiodactyls: Implications for Population Studies. Journal of Mammalogy 77: 584-518.
- Falush, D.; Stephens, M. y J.K. Pritchard 2007 Inference of Population Structure using Multilocus Genotype Data: Dominant Markers and Null Allele. Molecular Ecology Note 7: 574-578. Disponible en: [http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure2\\_2.html](http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure2_2.html).
- Fernández-Palacios, J.M. y J.L. Martín Esquivel 2001 Las Islas como Experimento de Laboratorio en: Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y Conservación. Fernández-Palacios, J.M y J.L. Martín Esquivel (Eds.). Ediciones Turqueza. pp. 39-44.

- Fontdevila, A. y A. Moya 1999 Introducción a la Genética de Poblaciones. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España. 349p.
- Francisco-Ortega, J. y A. Santos 2001 Genes y Conservación de Plantas Vasculares en: Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y Conservación. Fernández-Palacios, J.M. y J.L. Martín Esquivel (Eds.). Ediciones Turqueza.
- Frankel, O.H.; Brown, A.H.D. y J.J. Burdon 1995 The Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge University Press. United Kingdom. 299p.
- Frankham, R.; Ballou, J.D. y D.A. Briscoe 2002 Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. United Kingdom. 617p.
- Galle, F.C. 1997 Hollies: the genus *Ilex*. Timber Press. Oregon, USA. 573p.
- Gianfranceschi, L.; Seglias, N.; Tarchini, R.; Komjanc, M. y C. Gessler 1998 Simple Sequence Repeats for the Genetic Analysis of apple. Theoretical and Applied Genetics 96: 1069-1076.
- Goldstein, D.B. y C. Schötterer 1999 Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press. United Kingdom. 352p.
- González-Pérez, M.A.; Lledó, M.D.; Fay, M.F.; Lexer, C. y P.A. Sosa 2004 Isolation and Characterisation of Microsatellite loci in *Bencomia exstipulata* and *B. caudata* (Rosaceae). Molecular Ecology Notes 4: 130-132.
- González-Pérez, M.A.; Sosa, P.A.; Rivero, E.; González-González, E.A. y A. Naranjo 2008 Molecular markers reveal no genetic differentiation between *Myrica rivas-martinezii* and *M. faya* (Myricaceae). Annals of Botany Doi:10.1093/aob/mcn222.
- Hamrick, J.L. y M.J.W. Godt 1989 Allozyme Diversity in Plant Species en: Plant Populations Genetics, Breeding, and Genetic Resources. Brown, H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. y B.S. Weir (Eds.). Massachusetts, USA. pp. 43-63.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark 1997 Principles of Population Genetics. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA. 542p.

- Hedrick, P.W. 1983 Genetic of Populations. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Boston, USA. 629p.
- Hernández, J.M.V. 1992 Métodos de Regresión y Análisis Multivariante. Tomo II. Primera reimpresión, IMPRE S.A. Universidad Nacional de Educación a Distancia. 309p.
- Hoelzel, A.R. 1998 Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. Second Edition. IRL Press at Oxford University Press. New York, USA. 445p.
- Izquierdo, I.; Martín, J.L.; Zurita, N. y M. Arechavaleta (Eds.) 2004 Lista de Especies Silvestres de Canarias (Hongos, Plantas y Animales Terrestres) 2004. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias, España. 500p.
- Julliet, N.; Freymond, H.; Degen, L. y J. Goudet 2003 Isolation and Characterization of Highly Polymorphic Microsatellite Loci in the Bladder Campion, *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae). *Molecular Ecology Notes* 3: 358-359.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B. y M. Nei 2001 MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
- Kunkel, G. 1977a Endemismos Canarios: Inventario de las Plantas Vasculares Endémicas en la Provincia de Las Palmas. ICONA. Madrid, España. 436p.
- Kunkel, G. 1977b The *Ilex* Complex in the Canary Islands and Madeira. *Cuaderno de Botánica Canaria* 28: 17-19.
- Langella, O. 2005 Populations 1.2.30. Laboratoire Populations, Génétique et Evolution, Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS UPR9034, Gif Sur Yvette. Disponible en: <http://ftp.bioinformatics.org/pub/populations>.
- Liebard, R.; Gianfranceschi, L.; Koller, B.; Ryder, C.D.; Tarchini, R.; Van den Weg, E. y C. Gessler 2002 Development and Characterisation of 140 New Microsatellites in Apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* 10: 21-241.
- Melzheimer, V. 1988 *Silene* L. en: Rechinger, K.H. (Ed). *Flora Iranica* 163: 431-508.

- MMA 2003 Informe Anual. Parque Nacional de la Caldera de Taburiente. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Islas Canarias, España. [www.mma.es](http://www.mma.es)
- Nei, M. 1972 Genetic Distance between Populations. American Naturalist 106: 283-292.
- Nei, M. 1973 Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1987 Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York, USA. 512p.
- Nelson-Jones, E.B.; Briggs, D. y A.G. Smith 2002 The Origin of Intermediate Species of the Genus *Sorbus*. Theoretical and Applied Genetics 105: 953-963.
- Nuez, F y J.M. Carrillo (Eds.) 2000 Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Sociedad Española de Genética. Valencia, España. 579p.
- Oddou-Muratorio, L.; Aligon, C.; Decroocq, S.; Plomion, C.; Lamant, A.T. y B. Mush-Demesure 2001 Microsatellite Primers for *Sorbus torminalis* and Related Species. Molecular Ecology Notes 1: 297-299.
- Oxelman, B y M. Lidén 1995 Generic Boundaries in the Tribe *Sileneae* (Caryophyllaceae) as Inferred from Nuclear rDNA Sequences. Taxon 44: 525-542.
- Picca, A., Helguera, M., Solomón, N. y A. Carrera 2002 Marcadores Moleculares en: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Echenique, V.; Rubinstein, C. y L. Mroginski (Eds.). Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina. pp. 61-68.
- Ramel, C 1997 Mini and Microsatellite. Environmental Health Perspectives 105: 781-789.
- Robertson, K.R.; Phipps, J.B.; Rohrer, J.R. y P.G. Smith 1991 A Synopsis of Genera in *Maloideae* (Rosaceae). Systematic Botany 16: 376-394.

- Rosenberg, N.A.; Pitchard, J.K.; Weber, J.L.; Cann, H.M.; Kidd, K.K.; Zhivotovsky, L.A y M.W. Feldman 2002 Genetic Structure of Human Populations. Science 298: 2381-2385.
- Sanger, F.; Nikelen, S. y A.R. Coulson 1977 DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74: 5463-5467.
- Sosa, P.; Batista, F.; González, M.A. y N. Bouza 2002 La Conservación Genética de las Especies Amenazadas en: Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación. Bañares, A. (Ed.). Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España. pp. 133-160.
- Sosa, P.A. 2008 Genetic Diversity and Differentiation of Both Natural Populations of *Bencomia exstipulata* and *B. caudata* (Rosaceae): a Comparative Analysis of Species with Different Conservation Status. Conservation Genetics (sometido).
- Sosa, P.A.; González-Pérez, M.A. y J.B. Clarke 2008 Conservation of the Endangered Endemic *Sambucus palmensis* Link (Sambucaceae) from the Canary Islands. (en preparación).
- Swofford, D.L. y G.J. Olsen 1990 Phylogeny Reconstruction en: Molecular Systematics. Hills, D.M. and C. Moritz (Eds.). Massachusetts, USA. pp. 411-501.
- Sytsma, K.J. y B.A Schaal 1985 Genetic Variation, Differentiation, and Evolution in Species Complex of Tropical Shrubs based on Isozymic Data. Evolution 39: 582-593.
- Tautz, D. 1989 Hipervariability of a Simple Sequence as a General Source for Polymorphic DNA Markers. Nucleic Acids Researches 7: 6463-6470.
- Teixeira, S. y G. Bernasconi 2007 High Prevalence of Multiple Maternity within Fruits in Natural Populations of *Silene latifolia*, as Revealed by Microsatellite DNA Analysis. Molecular Ecology 16: 4370-4379.

- Torimaru, T.; Tani, N.; Tsumura, Y.; Hiraoka K. y N. Tomaru 2004 Development and Polymorphism of Simple Sequence Repeat DNA Markers for the Evergreen Shrub *Ilex leucoclada* M. *Molecular Ecology Notes* 4: 531-533.
- VVAA 2000 Lista Roja de Flora Vasculare Española (valoración según las categorías de la UICN). *Conservación Vegetal* 6: 11-38.
- Williams, G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. y S.V. Tingey 1990 DNA Polimorphism Amplified by Arbitrary Primers are useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Researches* 18: 6531-6535.
- Yamamoto, T.; Kumura, T.; Shoda, M.; Ban, Y.; Hayashi, T. y N. Matsuta 2002 Development of Microsatellite Markers in the Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Molecular Ecology Notes* 2: 14-16.
- Yeh, F.C.; Yang R.C.; Boyle T.; Ye Z.H. y J.X. Mao 1997 Popgene, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Alberta.*
- Zapata, C. 1987 La Variación Genética de las Poblaciones en: *Genética en Acuicultura*. Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta (Eds.). CAICYT. pp. 33-53.

## ANEXOS

ANEXO I: COMPENDIO DEL MUESTREO DE *SILENE NOCTOLENS*.

Colecta N°: 1  
Fecha: 5 de junio del 2007

Integrantes: Pedro Sosa  
Agustín Naranjo  
Edna González

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadios					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
1	Montaña Blanca (La parcela)	1	1→20	4	19						19
		2	21→40		20						20
		3	41→54	28	13						13
		Núcleo 1	55→59		5						5
		Trans.	60→72		13						13
		<b>Sub-Total</b>			70	0	0	0	0	0	70
2	Montaña Blanca (Carretera)	<b>Sub-Total</b>	73→112		40	0	0	0	0	0	40
3	Montaña Blanca (Est. Sism.)	<b>Sub-Total</b>	113→126		14	0	0	0	0	0	14
<b>Total</b>					124	0	0	0	0	0	124

Detalles en: "Control Silene" y "Diagrama de Campo (Silene)"

Colecta N°: 2  
Fecha: 13 de julio del 2007

Integrantes: Pedro Sosa  
Gerald Oostermeijer  
Edna González

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadios					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
4	Montaña Blanca (La parcela)		127→204		78	26	25	26	1	0	0

Detalles en: "Control Silene" y "Datos de Campo (Silene)"

Colecta N°: 3  
Fecha: 16 de julio del 2007

Integrantes: Gerald Oostermeijer  
Eduardo Carqué

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadios					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
5	Pico Viejo (interior del cráter)		205→334		130	27	30	23	25	25	0

Detalles en: "Control Silene"

Colecta N°: 4  
Fecha: 22 de agosto del 2007

Integrantes: Edna González  
Eduardo Carqué

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadios					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
5	Montaña Blanca (La Parcela)		335→384		50	0	0	0	25	25	0

Detalles en: "Control Silene" y "Datos de Campo (Silene 2007-08-22)"

Colecta N°: 5  
Fecha: 22 de agosto del 2007

Integrantes: Eduardo Carqué

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadios					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
5	Montaña Blanca (La Parcela)		385→419		35	0	0	0	0	35	0
6	Pico Viejo		420→422		3	0	0	0	0	3	0
<b>Total</b>					38	0	0	0	0	38	0

Detalles en: "Control Silene"

Gran Total a la fecha: (5 de marzo del 2008)

Total	Estadios					
	Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
420	53	55	49	51	88	124

\* muestras 8 y 48 extraviadas!

## ANEXO II: GENOTIPOS OBTENIDOS CON LOS 8 MICROSATÉLITES EN EL GÉNERO *ILEX* ANALIZADOS HASTA JUNIO DEL 2008.

Microsatélite → ↓Población	ILE 04-02 (72-142pb)	ILE 04-10 (222-275pb)	ILE 03-38 (268-328pb)	ILE 03-53 (150-182pb)	ILE 03-01 (197-223pb)	ILE 04-06 (175-224pb)	ILE 05-81 (242-262pb)	ILE 03-86b (205-219pb)								
<i>Ilex perado ssp. lopezilloi</i>																
Ancule	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	201	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	94	94	231	243	271	271	156	167	216	218	201	201	244	246	209	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
Ancón de Pajarito	94	94	231	243	271	271	?	?	216	218	?	?	244	246	209	219
	94	94	231	243	271	271	156	167	216	218	201	201	244	246	209	219
	94	94	231	243	271	271	156	167	216	218	201	201	244	246	209	219
	94	94	231	243	271	271	156	167	216	218	201	201	244	246	209	219
	94	94	231	243	271	271	156	167	216	218	201	201	244	244	209	219
	94	94	231	243	271	271	156	167	216	218	201	201	244	246	209	219
	94	94	231	243	271	271	156	167	216	218	201	201	244	246	209	219
	94	94	231	243	?	?	156	167	216	218	201	201	244	246	209	219
Las Cancelas	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	?	?	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	156	159	216	218	199	201	244	246	219	219
Lorito Plantado	94	94	243	243	271	271	167	167	216	218	199	199	246	246	219	219
	94	94	243	243	271	271	167	167	216	218	199	199	246	246	219	219
	94	94	243	243	271	271	167	167	216	218	199	199	246	246	219	219
	94	94	243	243	271	271	167	167	216	218	199	199	246	246	219	219
	94	94	243	243	271	271	?	?	216	218	199	199	246	246	219	219
	94	94	243	243	271	271	167	167	216	218	199	199	246	246	219	219
	94	94	243	243	271	271	167	167	216	218	199	199	246	246	219	219
	94	94	243	243	271	271	167	167	216	218	199	199	246	246	219	219
<i>Ilex perado ssp. platyphylla</i>																
Ancule	96	96	243	243	261	261	167	167	216	247	199	201	246	246	209	219
Bailadero	74	74	231	243	271	271	156	159	216	216	199	201	244	246	219	219
	74	74	243	243	271	271	159	159	216	216	199	201	246	246	219	219
Zona de Parcelas	94	94	231	255	271	271	156	159	216	216	199	201	246	246	219	219
	94	94	243	255	271	271	156	159	216	216	199	201	246	246	219	219
	74	74	231	243	271	271	156	167	216	216	201	201	246	246	219	219

Microsatélite →	ILE 04-02		ILE 04-10		ILE 03-38		ILE 03-53		ILE 03-01		ILE 04-06		ILE 05-81		ILE 03-86b	
	74	74	255	255	271	271	159	159	<b>216</b>	247	201	217	246	246	219	219
	96	96	243	243	261	271	<b>156</b>	159	216	218	<b>199</b>	<b>201</b>	244	246	219	219
Reventón Oscuro	74	74	243	243	261	271	156	159	216	216	199	217	246	246	219	219
Apartacamínos	96	96	243	243	<b>271</b>	<b>271</b>	156	159	<b>216</b>	<b>218</b>	<b>199</b>	<b>199</b>	244	246	209	219
	96	96	243	243	<b>271</b>	<b>271</b>	?	?	216	218	?	?	244	246	209	219
	96	96	243	243	271	271	156	159	216	218	199	199	244	246	209	219
	96	96	243	243	271	271	156	159	216	218	199	199	244	246	209	219
	96	96	243	243	271	271	156	159	216	218	199	199	244	246	209	219
	94	96	243	243	271	271	159	159	216	218	199	199	244	244	209	209
	96	96	243	243	271	271	156	159	216	218	199	199	244	246	209	219
El Moquinal (Anaga)	94	96	218	218	261	261	167	167	216	218	199	199	244	244	209	219
	94	94	229	237	261	261	156	167	216	218	191	199	244	244	209	219
	96	96	218	218	261	261	<b>167</b>	<b>172</b>	218	218	201	201	244	246	209	209
	94	94	231	255	261	261	156	167	218	218	199	201	244	246	209	219
	94	96	218	229	261	261	164	167	218	220	199	201	246	246	219	219
	96	96	255	255	<b>261</b>	<b>271</b>	156	167	218	218	201	201	244	244	209	209
	94	94	<b>218</b>	<b>218</b>	<b>261</b>	<b>261</b>	167	172	<b>216</b>	<b>220</b>	<b>199</b>	<b>201</b>	244	244	209	209
	96	96	?	?	261	261	164	164	216	218	199	201	244	246	209	219
	94	94	231	255	261	261	159	167	218	218	199	199	244	246	209	209
	94	94	231	231	261	261	<b>159</b>	<b>159</b>	216	218	201	201	244	244	209	219
	?	?	<b>218</b>	<b>237</b>	261	261	?	?	218	220	201	201	<b>244</b>	<b>246</b>	209	219
	94	96	218	218	261	261	167	167	216	218	199	199	244	244	209	219
	94	94	229	231	261	261	156	167	216	216	<b>191</b>	<b>199</b>	244	246	209	219
	<b>94</b>	<b>94</b>	218	255	261	261	167	167	218	218	199	201	244	246	209	209
	94	94	218	255	261	261	156	156	218	218	201	201	244	244	209	219
	96	96	218	255	261	261	167	167	216	216	<b>199</b>	201	244	244	209	209
	?	?	255	255	?	?	?	?	<b>218</b>	<b>218</b>	199	219	244	246	209	219
	96	96	218	255	261	261	<b>156</b>	<b>172</b>	216	218	199	199	244	246	209	219
	74	74	218	218	261	261	167	167	216	218	199	201	244	246	209	219
	<b>94</b>	<b>94</b>	218	218	261	261	<b>167</b>	<b>172</b>	216	218	199	201	244	246	209	209
	94	94	218	255	261	261	<b>164</b>	<b>164</b>	218	220	199	201	246	246	209	209
	94	94	255	255	261	261	156	167	216	218	199	201	244	244	209	209
	96	96	255	255	<b>261</b>	<b>271</b>	167	167	216	218	199	199	<b>246</b>	<b>246</b>	219	219
	94	94	218	255	<b>261</b>	<b>261</b>	164	164	218	218	199	199	244	246	219	219
	96	96	218	218	261	271	<b>167</b>	<b>172</b>	218	218	201	201	244	246	209	209
	74	74	<b>218</b>	255	261	261	167	167	218	218	<b>201</b>	<b>201</b>	244	246	209	209
	94	94	255	255	261	261	164	167	218	218	199	199	244	246	209	219
	94	96	218	255	261	261	167	167	216	218	199	199	244	246	209	219
Casa Forestal (Anaga)	?	?	218	218	259	<b>267</b>	161	161	<b>214</b>	<b>216</b>	194	194	250	252	213	213
	?	?	218	218	259	267	161	161	<b>214</b>	<b>218</b>	<b>194</b>	<b>194</b>	252	252	213	213
	?	?	218	218	259	259	159	161	214	<b>218</b>	199	199	252	256	213	213
	?	?	218	218	259	259	<b>159</b>	<b>167</b>	<b>214</b>	218	<b>194</b>	<b>194</b>	252	258	213	213
	94	94	218	231	261	271	167	167	218	218	191	199	244	246	219	219
	94	94	218	218	261	261	167	167	218	218	191	199	244	246	209	219
	94	94	218	231	261	261	156	167	216	218	191	199	244	244	209	219
	94	<b>96</b>	218	231	259	259	161	161	<b>218</b>	<b>227</b>	<b>194</b>	<b>194</b>	250	252	213	213

Microsatélite →	ILE 04-02	ILE 04-10	ILE 03-38	ILE 03-53	ILE 03-01	ILE 04-06	ILE 05-81	ILE 03-86b								
	?	?	218	223	259	267	161	167	216	218	194	194	250	252	213	213
	?	?	218	218	259	259	159	161	214	218	?	?	252	256	213	213
	94	94	229	231	261	261	159	164	218	218	199	199	246	246	209	219
	94	94	237	237	261	261	?	?	216	218	?	?	244	246	209	209
	94	94	218	231	261	271	167	167	218	218	199	201	246	246	219	219
	94	94	231	231	261	261	167	167	216	218	199	201	246	246	209	219
	94	94	218	231	261	261	159	159	216	218	191	199	244	244	209	219
	94	94	237	237	261	261	164	164	216	218	191	201	244	246	209	209
	94	94	218	231	261	261	159	159	216	218	191	191	244	244	209	219
Cruz de Taganana	94	94	218	231	261	271	159	164	216	218	201	201	246	246	209	209
	94	94	231	237	261	261	167	167	216	216	199	201	244	244	219	219
	94	94	229	231	261	271	167	171	216	216	199	199	244	246	209	219
	94	94	218	231	261	271	159	164	216	218	201	201	246	246	209	209
	94	94	218	231	261	271	156	156	216	216	199	201	244	244	209	219
	94	94	218	255	261	261	156	167	216	218	199	199	244	246	209	219
	94	94	218	231	261	271	156	156	216	216	199	201	244	244	209	219
	94	94	218	255	261	261	156	167	216	218	199	199	244	246	209	219
	94	94	218	218	261	271	156	156	216	216	201	201	244	244	209	209
	94	94	218	237	261	261	159	167	216	218	191	201	244	246	209	219
	94	94	218	255	261	261	156	167	216	218	199	199	244	246	209	219
	94	94	218	231	261	271	159	167	216	218	201	201	246	246	209	209
	94	94	231	231	261	261	156	156	216	216	199	201	244	246	209	209
	94	94	231	231	261	261	159	159	216	218	199	199	244	246	219	219
	94	94	218	255	261	271	167	167	216	216	199	201	244	246	209	219
	94	94	218	231	261	261	156	164	216	216	199	199	244	246	209	209
	94	94	231	231	261	271	167	167	218	218	199	201	244	246	209	209
	94	94	218	255	261	261	156	167	216	218	199	199	244	246	209	219
	86	96	231	231	261	271	159	159	216	218	199	199	244	246	219	219
	94	94	218	255	261	261	159	167	216	218	199	199	244	246	209	219
	96	96	231	255	261	271	156	156	216	218	201	201	244	244	209	219
	94	94	218	231	261	261	159	167	216	216	199	201	246	246	209	209
	94	94	229	255	261	261	159	167	216	216	199	199	246	246	209	209
	94	94	229	255	261	261	159	159	216	216	201	201	246	246	209	209
	94	94	231	255	261	261	167	167	216	218	199	201	244	244	209	209
	94	94	218	231	261	271	159	164	216	218	201	201	246	246	209	209
	94	94	218	231	261	261	156	159	216	218	199	201	244	244	209	209
	94	94	218	229	261	271	156	159	216	216	199	199	244	246	209	219
	94	94	231	231	261	261	167	167	216	218	201	201	246	246	209	209
	94	94	229	231	261	261	159	159	216	218	199	199	244	244	209	209
	94	94	237	237	261	261	156	156	218	218	199	201	246	246	219	219
<i>Ilex azorica</i>																
Açores (Troqueira)	103	145	228	231	261	261	156	156	212	212	201	203	244	244	215	215
	90	90	228	228	261	261	156	156	212	212	201	203	244	244	215	215
	119	158	228	228	261	261	156	156	212	212	217	221	244	244	209	209
	?	?	228	228	261	261	156	156	212	212	213	213	244	244	209	209
	90	90	228	228	261	261	156	156	208	212	193	217	244	244	209	209
	90	129	228	228	261	261	156	156	199	210	201	201	244	244	209	209

Microsatélite →	ILE 04-02	ILE 04-10	ILE 03-38	ILE 03-53	ILE 03-01	ILE 04-06	ILE 05-81	ILE 03-86b								
	95	117	228	228	261	261	156	156	212	212	201	201	244	244	205	215
	117	145	228	228	261	261	156	156	212	212	201	201	244	244	209	215
	117	137	228	228	261	261	156	156	210	212	<b>203</b>	<b>205</b>	244	244	209	209
	98	140	228	228	<b>261</b>	<b>261</b>	156	156	212	212	201	201	244	244	209	215
Açores (Lagoa do Fogo)	98	98	228	228	261	261	156	156	212	212	213	213	244	244	209	209
	98	98	226	228	261	261	156	156	212	212	217	219	244	244	209	209
	<b>121</b>	<b>123</b>	228	231	261	261	156	156	212	212	201	201	244	244	209	209
	94	145	226	<b>228</b>	261	261	<b>156</b>	<b>156</b>	212	212	<b>203</b>	<b>213</b>	244	244	209	215
	100	123	228	228	261	261	156	156	212	212	201	201	244	244	215	215
	76	76	228	228	261	261	156	156	212	212	203	213	242	244	209	209
	<b>90</b>	<b>127</b>	<b>226</b>	<b>228</b>	261	261	156	156	212	212	201	201	244	244	209	215
	<b>86</b>	<b>117</b>	228	228	261	261	156	156	<b>208</b>	<b>212</b>	211	211	244	244	215	215
	143	145	228	228	261	261	156	156	212	212	<b>201</b>	<b>211</b>	244	244	209	215
	95	113	228	228	261	261	156	156	212	212	<b>189</b>	<b>217</b>	244	244	213	215
Açores (Estrada do Mato)	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	244	244	209	215
	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	244	244	209	219
	90	90	<b>223</b>	<b>228</b>	?	?	?	?	208	212	?	?	244	244	209	209
	?	?	<b>223</b>	<b>228</b>	?	?	?	?	208	212	?	?	244	244	<b>213</b>	<b>215</b>
	?	?	<b>228</b>	<b>228</b>	?	?	?	?	212	212	?	?	244	244	<b>209</b>	<b>215</b>
	71	71	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	244	248	209	209
	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
	?	?	228	228	?	?	?	?	208	210	?	?	244	244	209	215
	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	244	244	209	209
	103	103	223	228	?	?	?	?	208	212	?	?	244	244	209	215
Açores (Ponta Delgada)	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	244	244	209	209
	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	209	209
	?	?	228	228	?	?	?	?	212	212	?	?	244	244	215	215
	100	100	?	?	?	?	?	?	212	212	?	?	244	244	215	215
	100	100	?	?	?	?	?	?	208	212	?	?	244	244	<b>209</b>	<b>215</b>
	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	244	244	209	209
	?	?	<b>223</b>	<b>228</b>	?	?	?	?	<b>212</b>	<b>212</b>	?	?	244	244	209	209
	?	?	?	?	?	?	?	?	212	212	?	?	244	244	<b>215</b>	<b>215</b>
	96	96	<b>228</b>	<b>228</b>	?	?	156	156	<b>212</b>	<b>212</b>	?	?	244	244	<b>215</b>	<b>215</b>
<i>Ilex canariensis</i>																
Jardín Botánico V&C	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	250	258	213	213
	71	71	218	218	?	?	?	?	<b>214</b>	?	?	?	250	252	213	213
	?	?	218	218	?	?	?	?	214	218	?	?	250	252	213	213
	?	?	218	218	?	?	?	?	214	?	?	?	252	252	213	213
	?	?	218	218	259	267	?	?	214	216	217	217	250	252	213	213
	71	71	218	221	<b>259</b>	<b>267</b>	?	?	214	216	215	215	250	252	213	213
	?	?	218	223	?	?	161	167	214	216	215	215	252	262	213	213
	71	71	218	231	?	?	?	?	214	216	?	?	250	252	213	213
	71	71	218	231	<b>259</b>	<b>267</b>	161	161	218	227	?	?	250	252	213	213

**Nota:** El signo de interrogación (?) señala que el alelo no pudo ser obtenido con claridad o no amplificó.