



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

JARDÍN BOTÁNICO CANARIO "VIERA Y CLAVIJO"-UA CSIC
Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Biología

Aplicación de marcadores genéticos
en la conservación de taxones vegetales
insulares amenazados:
géneros *Crambe* L. (sect. *Dendrocrambe* DC.)
y *Ruta* L.

Tesis Doctoral

Autor: Moisés E. Soto Medina

Noviembre de 2015
Las Palmas de Gran Canaria

Versión de junio de 2016, que añade:

- Corrección de las erratas incluidas en la adenda del tomo original.
- Mejoras en el diseño de las portadas interiores.
- Numeración de las páginas.
- Bibliografías completas.
- Agradecimientos.
- Figura II.3.3.
- Anexos I y II.

D. José Manuel Vergara Martín, SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en sesión permanente tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada “APLICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS EN LA CONSERVACIÓN DE TAXONES VEGETALES INSULARES AMENAZADOS: GÉNEROS *CRAMBE* L. (SECT. *DENDROCRAMBE* DC.) Y *RUTA* L.” por el doctorando D. MOISÉS E. SOTO MEDINA y dirigida por los Doctores JULI CAUJAPÉ CASTELLS y RUTH JAÉN MOLINA.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 19 de NOVIEMBRE de 2015.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento/Instituto/Facultad_Biología/Ciencias del Mar_____

Programa de doctorado _Ecología y Gestión de los Recursos Vivos Marinos_

Título de la Tesis

Aplicación de marcadores genéticos en la conservación de taxones vegetales
insulares amenazados: géneros *Crambe* L. (sect. *Dendrocrambe* DC.) y *Ruta* L.

Tesis Doctoral presentada por D/D^a __Moisés E. Soto Medina_____

Dirigida por el Dr/a. D/D^a. ____Juli Caujapé Castells_____

Codirigida por el Dr/a. D/D^a. __Ruth Jaén Molina_____

El/la Director/a,

El/la Codirector/a

El/la Doctorando/a,

(firma)

(firma)

(firma)

Las Palmas de Gran Canaria, a _24_ de __noviembre_____ de 2015



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA**

Agradecimientos

Esta tesis doctoral pudo realizarse gracias a la financiación recibida por parte del Cabildo Insular de Gran Canaria, que me concedió una beca predoctoral “Tomás de Zárata”, y por parte de varios proyectos liderados por personal investigador del Jardín Canario, especialmente los proyectos BIOMABANC (03/MAC/4.1/C7), CAVEGEN (04/MAC/3.5/C34), BIOCLIMAC (MAC/1/C067) y DEMIURGO (MAC/1/C20), concedidos por el programa Interreg IIIB de cooperación transnacional Madeira-Azores-Canarias. También contribuyó a que pudiera realizarse esta tesis el Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” - Unidad Asociada CSIC (JBCVCSIC), al proveer los medios técnicos necesarios para llevarla a cabo. Quiero agradecer a todos los miembros de esta institución, o personas que alguna vez pasaron (como yo) por allí y ejercieron sobre mí una influencia positiva, ya fuese por su ayuda o por su acogida y apoyo moral. Al intentar nombrarlos es fácil que me deje a alguno en el tintero:

A David Bramwell, porque cuando era director del Jardín Canario me abrió las puertas de dicho centro, permitiéndome investigar y desarrollar mi primer proyecto de investigación. También tuve el placer de tener con él tantas charlas, que fueron muy orientativas sobre taxonomía, corología y otros aspectos de las especies estudiadas y de otras más.

A Alicia Roca, directora del Banco de Germoplasma del JBCVCSIC, donde desarrollé los inicios de mi investigación, por su apoyo y confianza constantes, además de poner todos los medios y facilidades. Y por su paciencia, orientación y enseñanza en los momentos en que comenzaba a formarme como investigador.

Agradezco especialmente el trabajo de mi director, Juli Caujapé, por su implicación en esta tesis que sin su apoyo nunca hubiese logrado retomar, y menos aún, acabar. Por darme la oportunidad de participar en tan importantes proyectos. Además de tomar parte activa no sólo en mi formación de laboratorio, también (más importante si cabe) en la interpretación de los resultados (tantas discusiones, nunca excesivas para mí, sobre cómo interpretar y analizar los datos).

A Ruth Jaén, por su implicación en esta tesis como codirectora, sin cuyo apoyo no hubiese logrado acabar. Por su ayuda en mi formación de laboratorio, por su profesionalidad, pero sobre todo por su calidad humana y optimismo.

A Blas Vilches, por enseñarme con gusto metodologías y “trucos” en experimentación con semillas.

Al personal del Herbario del JBCVC-CSIC, Yolanda Faraldo y Águedo Marrero. A Águedo también le agradezco su constante ayuda y colaboración en cuestiones de taxonomía, corología y en el muestreo. Con él he tenido el placer de tener tantas charlas tan amenas sobre estos temas tan interesantes y a veces intrigantes, como en el momento de observar pliegos (“en el género *Ruta* en Canarias hay muchas cosas que aún no están claras”).

A Pepe Naranjo, por su constante asistencia con la corología y los mapas. Además de darme la oportunidad de participar en proyectos interesantes llevados a cabo por el Jardín Canario, durante los cuales (por ejemplo) se aclararon dudas sobre la distribución de las poblaciones de *Ruta oreojasme*, lo que ha servido para el muestreo en este y otros trabajos. Y por tantos buenos ratos pasados en el campo y en el Jardín.

A Tano Navarro, por su ayuda e interés con temas de corología y taxonomía. No olvidaré las excursiones y exploraciones organizadas por él y por Pepa Navarro principalmente, a las que fui, conociendo tantos rincones botánicos, tantas plantas raras (y garitos) de la isla.

A Isa Santana, por contar conmigo para la publicación de los datos poblacionales de *Crambe pritzelii* en el Proyecto AFA.

A Julia Pérez de Paz, Rosi Febles y Olga Fernández-Palacios por enseñarme desinteresadamente tantos aspectos de biología reproductiva de la flora canaria, de los cuales nunca se sabrá suficiente, y darme ánimos siempre en momentos cruciales. Especialmente a Olga por su compañerismo, compartir conmigo su experiencia y enseñarme tanta bibliografía “escondida”.

Al personal de los viveros del JBCVCSIC, especialmente a Pepe Cruz, del cual aprendí muchas cosas sobre el cultivo de *Crambe*, y esos cruces venturosos de *C. tamadabensis* con otras *Crambe* de otras islas, pero al parecer no con *C. pritzelii*.

A Lourdes Vega por su continua asistencia en la biblioteca, y por hacerme pasar mejor con su alegría tantas jornadas e incluso tardes eternas.

A Eugenio Reyes y Armando Reyes, que aún sin coincidir con mi trabajo me animaron mucho con su interés por mis cosas y sus interesantes puntos de vista (¡y sus chistes!).

Quiero agradecer a todos los compañeros con los que he compartido los laboratorios del Jardín Canario, por la paciencia y compañerismo que han tenido conmigo. A Feli Oliva (que hizo a veces de instructora personal) y a Magui Olangua durante los trabajos con isoenzimas. A Ruth Jaén (como instructora) y Bea Rumeu en las técnicas de ADN. Y especialmente a Leti Curbelo, por su alegría y generosidad en el trabajo y fuera de él, y por qué no decirlo, por adelantarme algunas horas de trabajo en momentos de apuro. También me llevo un buen recuerdo de los alumnos en prácticas en dichos laboratorios, especialmente de Cristina León, que con entusiasmo ayudó con varios geles y tinciones de isoenzimas.

Durante las exploraciones de campo y muestreos me acompañó mayormente Óscar Saturno, gran compañero y mejor amigo, con el que compartí desde muchos años atrás la afición por las montañas y las plantas (ya no sé si quizás me la inculcó él). Fueron muchos los días pasados encontrando plantas (donde pongo el ojo, pongo la *Crambe*), y llegando a una carretera siempre de noche. Pero también a algunas excursiones me acompañó más gente del Jardín Canario. Juli (¿todavía estará la prensa de Alicia haciendo equilibrio en un risco de Guayadeque del que hubo que salir como buenamente pudimos?), Tano, Pepe, Olga, Magui, Rosi... Cristina Vazacova, en estancia por la Universidad de Praga, me ayudó en muchas excursiones para recolectar semillas. También nos asistieron en varios de los muestreos Marilena Meloni, Elena Conti y Andrea Reid, de la Universidad de Zurich, al igual que José María Fernández-Palacios, de la Universidad de La Laguna, y personal del Cabildo de La Palma y P.N. de la Caldera de Taburiente (especialmente Aurelio Acevedo y Félix Medina).

A Pablo Manent, amigo y compañero de estudios, al que embauqué en una exploración vespertina a Riscos Jiménez, en donde se nos hizo de noche y acabamos reptando entre granadillos hasta llegar a una carretera a las tres de la mañana. Gracias también a Pablo por animarme tantas tardes de trabajo, tras almuerzo y disertación sobre softwares para analizar la estructuración de datos genéticos en el bar Maizep (aún me preguntaban allí por el menorquín,

años después).

A Mario Mairal por obsequiarme su compañía y consejos durante los meses en que coincidimos en los laboratorios del JBCVCSIC (también terminó yendo conmigo al campo como aquella vez en que nos perdimos y acabamos destrepando un caidero de noche cerrada en Guayadeque).

A Marta Martínez por brindarme igualmente su compañía y ánimos en los ratos libres del trabajo.

A Pedro Sosa por ser tan buen tutor en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por su apoyo y ofrecimiento. También me prestó varios libros fundamentales, los cuales retuve durante (al menos) dos meses.

Finalmente, a mi familia por todo el apoyo recibido. Especialmente a mi madre, que ha sufrido la escritura de esta tesis al menos tanto como yo. A mis padres por su interés y por pagarme los estudios, aunque nunca estuviesen convencidos de que fuese a tener algún futuro en esto, y a mi hermana por estar siempre cuando la necesitaba.

INDICE

	<u>Pág.</u>
RESUMEN	13
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	17
I.1. Introducción	19
I.1.1. Las especies endémicas insulares y la necesidad de su conservación	22
I.1.2. Bibliografía	25
I.1.2. Objetivos generales	31
II. LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN <i>CRAMBE PRITZELII</i> Y <i>C. TAMADABENSIS</i> CON ISOENZIMAS	33
II.1. Introducción a la variabilidad genética en <i>Crambe pritzelii</i> y <i>C. tamadabensis</i> con isoenzimas	35
II.2. Objetivos	41
II.3. Material y Métodos	43
II.3.1. Las especies de <i>Crambe</i> sección <i>Dendrocrambe</i>	45
II.3.2. <i>Crambe pritzelii</i> Bolle in A. Braun	49
II.3.2.1. Descripción	49
II.3.2.2. Hábitat y estado de conservación	49
II.3.2.3. Antecedentes corológicos	50
II.3.2.4. Corología actualizada	54
II.3.3. <i>Crambe tamadabensis</i> A Prina & Á. Marrero	58
II.3.3.1. Descripción	58
II.3.3.2. Hábitat y estado de conservación	58
II.3.3.3. Antecedentes corológicos	59
II.3.3.4. Corología actualizada	60
II.3.4. Muestreo	63
II.3.5. San Pedro-Agaete (CPAG2)	66
II.3.6. Los Berrazales-Agaete (CPAG1)	69
II.3.7. Barranco de Azuaje (CPAZ)	72
II.3.8. Riscos Jiménez (CPJI)	76
II.3.9. Baranco de Antona (CPAN)	78
II.3.10. Tenteniguada (CPTE)	81
II.3.11. Guayadeque (CPGY)	85
II.3.12. El Gallego-Amurga (CPGA)	89
II.3.13. Tamadaba (CTTA)	93
II.3.14. Montaña de Amagro (CTAM)	97
II.3.15. Montaña de Guía (CTGU)	99
II.3.16. Cuesta de Silva (CTSI)	102
II.3.17. Análisis isoenzimáticos	104
II.3.18. Interpretación de los fenotipos	108
II.3.19. Enzimas interpretadas	111
II.3.20. Análisis de datos: parámetros básicos de variabilidad	120
II.3.21. Desviaciones de los parámetros genéticos en las poblaciones naturales	121
II.3.22 Estructuración de la variabilidad genética entre poblaciones	126

II.4. Resultados	135
II.5. Discusión	161
II.5.1 Variabilidad genética intrapoblacional e historia evolutiva	163
II.5.2 Desviaciones del equilibrio poblacional y estructuración genética subpoblacional	167
II.5.3 Cohesión intraespecífica y variabilidad genética interpoblacional: la importancia del flujo génico frente a los efectos de la deriva génica.	172
II.5.4 Relaciones interespecíficas en el género <i>Crambe</i> : un caso de especiación incipiente.	175
II.5.5 Implicaciones para la conservación <i>in situ</i> y <i>ex situ</i>	177
II.6 Bibliografía	181
III. FILOGENIA Y FILOGEOGRAFÍA DE LOS TAXONES ENDÉMICOS DEL GÉNERO <i>RUTA</i> EN CANARIAS	193
III.1 Introducción al género <i>Ruta</i>	195
III.2 Objetivos	203
III.3 Material y Métodos	205
III.3.1 <i>Ruta oreojasme</i>	207
III.3.2 <i>Ruta pinnata</i>	210
III.3.3 <i>Ruta microcarpa</i>	212
III.3.4 Muestreo	215
III.3.5 Procesamiento de muestras	217
III.3.6 Amplificación del ADN	220
III.3.7 Edición y alineamiento de secuencias	223
III.3.8 Análisis de datos	224
III.4. Resultados	227
III.4.1 Análisis filogenéticos (<i>psbA-trnH</i> , <i>rps16-trnK</i> , <i>trnT-trnL</i> , <i>atpB-rbcL</i>).	230
III.4.2 Red de haplotipos	234
III.5. Discusión	237
III.5.1 Consideraciones taxonómicas y de conservación	243
III.6. Bibliografía	247
IV. CONCLUSIONES	255
IV.1 Variabilidad genética de endemismos del género <i>Crambe</i> en Gran Canaria	256
IV.2 Análisis filogenéticos y filogeográficos del género <i>Ruta</i> en Canarias	258
Anexo I: pliegos testigo	260
Anexo II: matrices de datos	262

Resumen.

En esta tesis doctoral se ha estudiado la variabilidad genética de 12 loci isoenzimáticos en las especies vegetales endémicas de Gran Canaria del género *Crambe* (*C. pritzelii* y *C. tamadabensis*), y las relaciones resultantes del análisis filogenético y filogeográfico de las secuencias de 4 regiones del ADN plastidial en una representación poblacional exhaustiva de las especies reconocidas hasta el momento en Canarias del género *Ruta* (*R. oreojasme*, *R. pinnata* y *R. microcarpa*). La aplicación de estos marcadores genéticos a estos dos géneros se orientó fundamentalmente a la obtención de resultados y conclusiones útiles para la conservación de las poblaciones de estos endemismos catalogados en su mayoría como “vulnerable” o “en peligro de extinción”, aunque también se han derivado implicaciones taxonómicas a partir de los resultados de *Ruta*.

En la primera parte de la tesis se interpretaron los resultados de los análisis de los fenotipos isoenzimáticos de *Crambe pritzelii* y *C. tamadabensis*, su variabilidad genética intrapoblacional, estructuración genética interpoblacional, y el flujo génico entre poblaciones para esclarecer si sus patrones de diversidad genética reflejan su cercanía filogenética y áreas de distribución solapadas o bien si existe una diferenciación genética consistente; y para dar orientaciones para la conservación basadas en las estimaciones de diversidad genética.

Los valores de diversidad genética hallados para ambas especies son considerablemente altos y, notablemente, superiores en *Crambe tamadabensis*, a pesar de su distribución más restringida en el cuadrante noroccidental de Gran Canaria y de su mayor grado de amenaza. Los valores de diferenciación interpoblacional tanto en *C. tamadabensis* como en *C. pritzelii* son bastante bajos (y menores en *C. tamadabensis*), lo cual está en desacuerdo con los altos niveles de diversidad genética interpoblacional dados a conocer para los endemismos canarios. La mayor estructuración genética detectada en *C. pritzelii* se interpretó como debida principalmente a desviaciones de las frecuencias alélicas relativas a tamaños poblacionales pequeños en los extremos de su área de distribución. Se hallaron asimismo evidencias claras de cuellos de botella históricos recurrentes en todas las poblaciones muestreadas de *C. tamadabensis* y en muchas de las de *C. pritzelii*, que pueden explicar los

contrastados tamaños y áreas de ocupación fragmentadas que se observaron en la mayoría de las poblacionales, y posibles extinciones locales. La alta variabilidad aloenzimática detectada en ambos taxones es compatible con una incipiente, pero a la vez consistente, diferenciación genética entre ambas especies, modulada por cuellos de botella recurrentes debido a las actividades humanas y el pastoreo residual, y por la deriva genética.

Los datos obtenidos sugieren que la mejor estrategia para la conservación de la diversidad genética de estas especies deben enfocarse en el mantenimiento de la conectividad genética existente entre sus poblaciones, junto con un muestreo intensivo de sus semillas para la conservación *ex situ*.

En la segunda parte de la tesis se interpretaron los resultados de las secuencias de ADN plastidial de *Ruta oreojasme*, *R. pinnata* y *R. microcarpa*, sus relaciones filogenéticas y filogeográficas, relaciones genealógicas entre haplotipos, estructuración y flujo génico entre poblaciones para esclarecer las implicaciones de estos resultados en la taxonomía de estas especies con poblaciones de difícil adscripción taxonómica; y para sugerir consideraciones en cuanto a la conservación de sus poblaciones.

Los datos reforzaron la consideración de las especies canarias de este género como producto de un único evento de colonización, con *Ruta oreojasme* como especie más basal y poseedora de una alta diversidad de haplotipos que no se encuentran estructurados geográficamente entre sus poblaciones, evidenciándose la existencia de flujo génico entre las mismas. En cambio, predominaron los haplotipos únicos para cada uno de los linajes evolutivos hallados en *R. pinnata* y *R. microcarpa*.

Tanto los análisis filogenéticos como las inferencias de genealogías entre haplotipos evidenciaron un esquema de colonización entre islas complejo, con un primer paso desde Gran Canaria (la isla más antigua del área de estudio) al sur de Tenerife, seguido de una colonización múltiple entre islas. La posición cercana de poblaciones de Tenerife y de La Palma a los haplotipos más ancestrales comunes de estas dos especies, y la diferenciación temprana de una única población de *R. microcarpa* hace pensar que hubo un ancestro común a *Ruta pinnata* y *Ruta microcarpa* que estuvo presente al mismo tiempo en esas tres islas. Este linaje ancestral de ambas especies generó tres o más linajes descendientes al mismo tiempo. No existe una unidad evolutiva común a

R. pinnata y las poblaciones tradicionalmente adscritas a *R. microcarpa* del norte de La Gomera comparten una historia evolutiva común a *R. pinnata* del norte de Tenerife. Las diferencias genéticas encontradas en *R. pinnata* de La Palma y del sur de Tenerife sugieren que pueden tratarse de endemismos exclusivos, mientras que se considera que las poblaciones adscritas a *R. microcarpa* del norte de La Gomera deberían considerarse provisionalmente como *R. pinnata*.

Los resultados apoyan que la población debe ser la unidad evolutiva y funcional a la hora de establecer estrategias y programas de conservación, a la vez que se desprende que la única población del estudio asignable a *R. microcarpa* debería ser objeto de acciones de conservación urgentes, entre las que se encuentran una revisión de su categoría de amenaza y una búsqueda exhaustiva de posibles nuevas poblaciones. Asimismo, para el género *Ruta* en Canarias se estima necesario realizar una revisión taxonómica exhaustiva que incluya a todo el ámbito geográfico asumido para *Ruta pinnata* y *Ruta microcarpa*.

En suma, los datos moleculares generados en esta investigación aportan una base sólida para establecer estrategias de conservación más eficientes de las especies de los géneros *Crambe* y *Ruta*, cumpliendo así con una de las misiones del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada al CSIC (Consejería de Medio Ambiente y Emergencias del Cabildo de Gran Canaria), centro en el que se ha desarrollado esta tesis doctoral.

Capítulo I. Introducción general



Crambe pritzelii y *Ruta oreojasme*. La Umbría de El Gallego, macizo de Amurga.

I.1. Introducción.

Los estudios que han usado marcadores moleculares polimórficos para ayudar a resolver diferentes problemáticas sobre la diversidad genética de especies insulares canarias amenazadas han ido aumentando en las últimas décadas. A lo largo de este tiempo, los diversos marcadores moleculares utilizados en la flora canaria han demostrado ser especialmente útiles en el esclarecimiento de cuestiones evolutivas y conservacionistas en diferentes unidades taxonómicas de características biológicas heterogéneas, y han ayudado a diseñar planes de conservación de especies amenazadas. Aunque todavía no existen demasiados estudios sobre diversidad de genes con valor selectivo, el mantenimiento de la suficiente diversidad genética neutral dentro de las poblaciones se considera crucial para la supervivencia de las especies a largo plazo. Asumiendo esta hipótesis (que todavía no ha sido testada para ningún linaje endémico canario) los marcadores moleculares se han usado como métodos indirectos del conocimiento del estado de conservación de un taxón, complementando los conocimientos sobre dinámica poblacional y biología reproductiva de las especies que son de nuestro interés porque son raras o están amenazadas.

La base de datos sobre genética de poblaciones en taxones canarios disponible en la actualidad consiste en unas 70 publicaciones científicas (Caujapé-Castells, 2011). Éstas han considerado a 49 géneros, comprendiendo un total de 162 especies y categorías infra específicas, usando aloenzimas y cinco marcadores diferentes de ADN (RAPDs, ISSRs, microsatélites, AFLPs y PCR-RFLPs). A pesar del creciente número de trabajos con microsatélites nucleares (que son sin duda los marcadores más empleados en la actualidad por sus múltiples ventajas), los aloenzimas son todavía la mayor base de datos de genética de poblaciones para la flora insular canaria. En la Tabla I.1.1 se muestra una lista de los estudios realizados con aloenzimas (y de mayor trascendencia) hasta la fecha. Los estudios de análisis filogenéticos, en cambio, comprenden un mayor número de publicaciones (más de 130), y por lo tanto incluyen a un número bastante mayor de géneros con taxones canarios (107), comprendiendo unos 350 taxones (Caujapé-Castells, 2011), que representan alrededor del 50% de las especies endémicas canarias

reconocidas actualmente.

En su mayor parte, los estudios con la flora endémica canaria se han centrado hacia grupos que han radiado en el archipiélago, como *Echium* (Boraginaceae, Böhle *et al.*, 1996), *Argyranthemum* (Asteraceae, Francisco-Ortega *et al.*, 1997), *Pericallis* (Asteraceae, Panero *et al.*, 1999), *Crambe* (Brassicaceae, Francisco-Ortega *et al.*, 2002), *Aeonium* (Crassulaceae, Mort *et al.*, 2002), *Convolvulus* (Convolvulaceae, Carine *et al.*, 2004), *Sideritis* (Lamiaceae, Barber *et al.*, 2007) o *Sonchus* (Asteraceae, Kim *et al.*, 2007). Los grupos que no han radiado han sido considerado con mucha menor frecuencia, como por ejemplo en los casos de *Asplenium* (Aspleniaceae, Van den Heede *et al.*, 2004), *Reseda* (Resedaceae, Martín-Bravo *et al.*, 2007), *Matthiola* (Brassicaceae, Jaén-Molina *et al.*, 2009) o *Festuca* y *Lolium* (Poaceae, Inda *et al.*, 2008).

En muchos casos de radiación en islas, la especiación reciente es un obstáculo para la detección de diferencias intra-específicas con las secuencias de ADN más frecuentemente usadas, que a veces no logran hallar diferencias entre algunos casos que resultan claros para la taxonomía. En cambio, los marcadores aloenzimáticos, generalmente considerados de tasa de mutación moderado-baja, suelen variar a nivel intrapoblacional, y las frecuencias de sus correspondientes alelos y/o genotipos han constituido (hasta la relativamente reciente irrupción de los microsatélites nucleares) las variables usadas para discriminar entre poblaciones. Además, la mayor tasa de variación genética en la flora canaria con respecto a la mayoría de archipiélagos oceánicos (Francisco-Ortega, 2000; Pérez de Paz & Caujapé-Castells, 2013) apoya el uso de los aloenzimas para ayudar a resolver problemas de diversidad y conservación genética en endemismos canarios. Debido a la existencia de nuevas investigaciones que muestran que las poblaciones insulares no están necesariamente depauperadas genéticamente respecto de sus sus congéneres continentales más cercanos (Chiang *et al.*, 2006; Désamoré *et al.*, 2012; García-Verdugo *et al.*, 2014, 2015) es de esperar que el uso de estos marcadores en la flora insular pueda generar datos moleculares suficientemente variables para su aplicación en los cometidos anteriormente mencionados.

Tabla I.1.1. Estudios de variabilidad con isoenzimas, con taxones de géneros presentes en canarias (en orden alfabético). **Islas:** L = Lanzarote; F = Fuerteventura; C = Gran Canaria; T = Tenerife; G = La Gomera; P = La Palma; H = El Hierro.

Género (Familia)	Islas	Referencia	Fecha
<i>Androcymbium</i> (Colchicaceae)	LFGPH	Pedrola-Monfort & Caujapé-Castells	1994, 1996
<i>Argyranthemum</i> (Asteraceae)	LFCTGPH	Francisco-Ortega <i>et al.</i>	1996
<i>Avena</i> (Poaceae)	LF	Morikawa & Leggett	1990
<i>Brassica</i> (Brassicaceae)	P	Lázaro & Aguinagalde	1998
<i>Chamaecytisus</i> (Fabaceae)	CTPH	Francisco-Ortega <i>et al.</i>	1992
<i>Cheirolophus</i> (Asteraceae)	CTGP	Garnatje <i>et al.</i>	1998
<i>Cistus</i> (Cistaceae)	CTG	Batista <i>et al.</i>	2001
<i>Echium</i> (Boraginaceae)	CG	Mora-Vicente <i>et al.</i>	2009
<i>Erysimum</i> (Brassicaceae)	C	Vilches <i>et al.</i>	2004
<i>Dactylis</i> (Poaceae)	CT	Sahuquillo & Luraret	1996
<i>Ilex</i> (Aquifoliaceae)	TG	Batista & Sosa	1998
<i>Limonium</i> (Plumbaginaceae)	G	Suárez-García <i>et al.</i>	2009
<i>Lobularia</i> (Brassicaceae)	LFCTGP	Borgen	1997
<i>Lolium</i> (Poaceae)	TG	Charmet & Balfourier	1994
<i>Lotus</i> (Fabaceae)	C	Oliva-Tejera <i>et al.</i>	2005
<i>Lotus</i> (Fabaceae)	LFC	Oliva-Tejera <i>et al.</i>	2006
<i>Lotus</i> (Fabaceae)	P	Medina	2009
<i>Matthiola</i> (Brassicaceae)	LF	Sánchez <i>et al.</i>	2006
<i>Myrica</i> (Myricaceae)	G	Batista & Sosa	1998
<i>Neochamaelea</i> (Cneoraceae)	CT	Lorenzo <i>et al.</i>	2003
<i>Olea</i> (Oleaceae)	C	Lumaret <i>et al.</i>	2004
<i>Parolinia</i> (Brassicaceae)	CTGP	Fernández-Palacios	2009
<i>Phoenix</i> (Arecaceae)	LFCTGP	González-Pérez <i>et al.</i>	2004
<i>Pinus</i> (Pinaceae)	CTGPH	Korol <i>et al.</i> , Schiller <i>et al.</i>	1999
<i>Sonchus</i> (Asteraceae)	LCTGPH	Kim <i>et al.</i>	1999
<i>Tolpis</i> (Asteraceae)	CTPH	Crawford <i>et al.</i>	2006
<i>Viola</i> (Violaceae)	P	Batista & Sosa	2002

Crambe pritzelii Bolle y *Crambe tamadabensis* A.Prina & Marrero Rodr. son ejemplos claros de dos especies endémicas canarias presumiblemente muy próximas entre sí (Francisco-Ortega *et al.*, 2002, Prina & Martínez-Laborde, 2008). Una prueba indirecta de tal proximidad es el hecho de que la segunda ha sido descrita solo recientemente (Prina & Marrero, 2001), ya que anteriormente era considerada como *C. pritzelii*. Esta extrema proximidad filogenética, junto con la generalizada falta de resolución de las secuencias de ADN a nivel intra-específico, apoyan el uso de los aloenzimas para aclarar algunas hipótesis de genética de poblaciones todavía no resueltas con estas dos especies (ver capítulo II.1).

En contraposición, las especies endémicas canarias actualmente reconocidas dentro del género *Ruta* L. están aparentemente más diferenciadas taxonómica y evolutivamente. Este hecho permite pensar que las secuencias de ADN, combinadas con un muestreo exhaustivo, pueden ofrecer una resolución adecuada para afinar las hipótesis actuales sobre sus relaciones filogenéticas y filogeográficas (ver capítulo III.1)

I.1.1. Las especies endémicas insulares y la necesidad de su conservación.

Los ecosistemas insulares (especialmente los oceánicos) se caracterizan por poseer una biota única, con un elevado grado de endemidad (Cronk, 1997; Stuessy *et al.*, 1998; Fernández-Palacios, 2004; Morici, 2004). En las Islas Canarias, la tasa de endemidad se estima en torno al 44%, una proporción que puede parecer pequeña en comparación con la de archipiélagos como Hawai (92%), pero que en realidad se encuentra a un nivel similar al de archipiélagos oceánicos tan conocidos como el de las Islas Galápagos (41%) (Fernández-Palacios, 2004).

En el caso de los endemismos canarios, en ocasiones se trata de especies o comunidades relicticas que sobrevivieron en las islas tras su

desaparición en el continente (paleoendemismos), debido fundamentalmente a cambios climáticos, como por ejemplo, la laurisilva canaria (Kondraskov *et al.*, 2015). En muchos otros casos, los endemismos no tienen carácter relictual, sino que son el resultado de la evolución insular de diferentes taxones continentales (neoendemismos).

Una de las principales características de las biota insulares oceánicas es que precisamente su evolución independiente del continente, junto con la fragmentación geográfica asociada a estos enclaves (que propicia bajos niveles de flujo génico entre poblaciones), las hace especialmente proclives a la extinción.

Por un lado, resultan especialmente graves los procesos de fragmentación y pérdida de hábitat, relativamente recientes en comparación con los ecosistemas continentales. La inmensa mayoría de archipiélagos o bien estaban mayormente despoblados hasta épocas recientes, o bien estaban habitados por sociedades humanas que se desarrollaban en cierta armonía con el entorno. Con los procesos posteriores de colonización (que adquirieron en los últimos siglos una dimensión planetaria), se llevaron usualmente a la práctica actividades de explotación agropecuaria intensiva, muy agresivas con el entorno, encaminadas fundamentalmente a la obtención de una alta producción destinada a la exportación, a la vez que se introdujeron numerosas especies vegetales exóticas (Carlquist, 1998; Stuessy *et al.*, 1998; Bernardello *et al.*, 2001; Fernández-Palacios, 2004; Merrett *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2002, 2004; Hume, 2004; Morici, 2004; Traveset & Santamaría, 2004; Marrero-Gómez *et al.*, 2005).

Por otro lado, la predominancia de formas leñosas entre la flora endémica, evolucionadas al margen de los ecosistemas continentales en los que están presentes grandes vertebrados herbívoros, hace a las biotas insulares especialmente vulnerables frente a la herbivoría por parte de mamíferos introducidos (especialmente cabras, ovejas y conejos).

Las islas constituyen una buena parte de los denominados “puntos calientes” de la biodiversidad (Médail & Quézel, 1999; Myers *et al.*, 2000; Pimm & Ravens, 2000). Según Myers *et al.* (2000), el 44% de todas las especies de plantas vasculares se encuentran distribuidas en un conjunto de 25 puntos calientes, que en total ocupan el 1,4% de la superficie de la tierra. De estos 25

puntos, nueve están constituidos principal o totalmente por islas. Uno de ellos es el formado por la Cuenca del Mediterráneo-Macaronesia. Dentro de él, Médail & Quézel (1997) definieron a su vez diez puntos calientes de menor entidad, que en conjunto suponen en torno al 22% de su superficie total, pero que contienen el 44% de todos sus endemismos. Uno de estos puntos son las Islas Canarias. Además, de acuerdo con Machado (2002), por la densidad de endemismos que poseen, estas islas deberían tener la categoría de *minihotspot* acuñada por *Conservation International*.

Según Bramwell (2002), actualmente existen entre 50.000 y 52.000 endemismos insulares en el mundo, lo que supone el 12% de la flora del planeta. De ellos, aproximadamente 20.000 (38-40%) se encuentran amenazados. Esta cifra supondría el 21% del total de las especies amenazadas en el mundo. Además, se calcula que en los últimos 400 años el 80% de las extinciones conocidas han sido especies insulares (Primac & Ros, 2002). A pesar del enorme valor que tienen los biotas insulares y del grave estado de amenaza en que se encuentran, existe un desconocimiento casi total de la diversidad y estructura genética de sus poblaciones, así como de los sistemas reproductivos de la inmensa mayoría de las especies. Se trata de una información que es vital a la hora de establecer medidas adecuadas para su conservación, por lo que se considera que este tipo de estudios son prioritarios y urgentes (Hamrick *et al*, 1991; Karron, 1987; Barrett & Kohn, 1991; Holsinger & Gottlieb, 1991; Cronk, 1997; Carlquist, 1998; Stuessy *et al.*, 1998; Bernardello *et al.*, 2001; Traveset, 2001; Pérez de Paz, 2002).

I.1.2. Bibliografía.

- Barber JC, Finch CC, Francisco-Ortega J, *et al.* 2007. Hybridization in Macaronesian *Sideritis* (Lamiaceae): evidence from incongruence of multiple independent nuclear and chloroplast sequence datasets. *Taxon* 56: 74-88.
- Barrett SCH, Kohn JR. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size. *In*: Falk D, Holsinger K, eds. *Genetics and conservation of rare plants*. New York, USA: Oxford University Press, 3-30.
- Batista F, Sosa P. 1998. Estudio de la variabilidad genética de los géneros *Echium*, *Ilex* y *Myrica* por electroforesis isoenzimática. Memoria final. Departamento de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Batista F, Bañares A, Caujapé-Castells J, Carqué E, Marrero Gómez M, Sosa PA. 2001. Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* (Cistaceae) from the Canary Islands: intraspecific and interspecific comparisons and implications for genetic conservation. *Amer. J. Bot.* 88: 1582-1592.
- Batista F, Sosa PA. 2002. Allozyme diversity in natural populations of *Viola palmensis* Webb & Berth. (Violaceae) from La Palma (Canary Islands): implications for conservation genetics. *Ann. Bot.* 90: 725-733.
- Bernardello G, Aanderson GJ, Stuessy TF, Crawford DJ. 2001. A survey of floral traits, breeding systems, floral visitors, and pollination systems of the angiosperms of the Juan Fernández Islands (Chile). *The Botanical Review* 67 (3): 225-308.
- Böhle UR, Hilger HH, Martin WF. 1996. Island Colonization and Evolution of the Insular Woody Habit in *Echium* L. (Boraginaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21): 11740-11745.
- Borgen L. 1997. Genetic differentiation in endemic *Lobularia* (Brassicaceae) in the Canary Islands. *Nordic Journal of Botany* 16: 487-503.
- Bramwell D. 2002. How many plants?. *Plant Talk* 28: 32-34.
- Carine MA, Russell SJ, Santos-Guerra A, *et al.* 2004. Relationships of the Macaronesian and Mediterranean floras: molecular evidence for multiple colonizations into Macaronesia and back-colonization of the continent in *Convolvulus* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 91: 1070-1085.
- Carlquist S. 1998. Shifting paradigms in island biology. *Aliso* 16(2): 85-88.
- Caujapé-Castells J. 2011. Jesters, red queens, boomerangs and surfers: a molecular outlook on the Canarian endemic flora. *In*: Bramwell D, Caujapé-Castells J, eds. *The biology of island floras*. Cambridge, Cambridge University Press, 284-324.
- Charmet G, Balfourier F. 1994. Isozyme variation and species relationships in the genus *Lolium* L. (ryegrasses, Graminaceae). *Theor. Appl. Genet.* 87: 641-649.
- Chiang YC, Hung KH, Schaal BA, Ge XJ, Hsu TW, Chiang TY. 2006. Contrasting phylogeographical patterns between mainland and island taxa of the *Pinus luchuensis* complex. *Molecular Ecology*, 15: 765-779.
- Crawford DJ, Archibald JK, Santos-Guerra A, Mort ME. 2006. Allozyme diversity within and divergence among species of *Tolpis* (Asteraceae-Lactuceae) in the Canary Islands: systematic, evolutionary, and biogeographical implications. *American Journal of Botany* 93(4): 656-664.
- Cronk QCB. 1997. Islands: stability, diversity, conservation. *Biodiversity and Conservation* 6: 477-493.
- Delgado JD, Arévalo JR, Fernández- Palacios JM. 2002. Fragmentación de los ecosistemas forestales. *In*: Fernández- Palacios JM, Martín Esquivel JL, eds. *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y Conservación*. Ediciones Turquesa. Madrid, 173-179.
- Delgado JD, Arévalo JR, Fernández- Palacios JM. 2004. Consecuencias de la fragmentación viaria: efectos de borde en la laurisilva y pinar de Tenerife. *In*: Fernández- Palacios JM, Morici C, eds. *Ecología Insular. Island Ecology*.

- Asociación Española de Ecología Terrestre (AEET) - Cabildo Insular de La Palma, 181-225.
- Désamor é A, Laenen B, González-Mancebo JM *et al.* 2012. Inverted patterns of genetic diversity in continental and island populations of the heather *Erica scoparia* s.l. *Journal of Biogeography*, 39: 574–584.
- Fernández- Palacios JM. 2004. Introducción a las islas. *In:* Fernández- Palacios JM, Morici C, eds. *Ecología Insular. Island Ecology*. Asociación Española de Ecología Terrestre (AEET) - Excmo. Cabildo Insular de La Palma, 21-56.
- Fernández-Palacios O. 2009. Biodiversidad morfológico-reproductiva y genética del género endémico canario *Parolinia* Webb (Brassicaceae). Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Francisco-Ortega J, Jackson MT, Catty JP, Ford-Lloyd BV. 1992. Genetic diversity in the *Chamaecytisus proliferus* complex (Fabaceae: Genisteae) in the Canary Islands in relation to *in situ* conservation. *Gen. Res. Crop. Evol.* 39: 149-158.
- Francisco-Ortega J, DJ Crawford A, Santos-Guerra, Carvalho JA. 1996. Isozyme differentiation in the endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae: Anthemideae) in the Macaronesian Islands. *Pl. Syst. Evol.* 202: 137-152.
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Hines A, *et al.* 1997. Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 84: 1595-1613.
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Kim SC, Crawford DJ. 2000. Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *American Journal of Botany* 87(7): 909-919.
- Francisco-Ortega J, Fuertes-Aguilar J, Kim SC, Santos-Guerra A, Crawford DJ, Jansen RK. 2002. Phylogeny of the Macaronesian endemic *Crambe* section *Dendrocrambe* (Brassicaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 89(12): 1984-1990.
- García-Verdugo C, Baldwin BG, Fay MF, Caujapé-Castells J. 2014. Life history traits and patterns of diversification in oceanic archipelagos: a meta-analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 174: 334–348.
- García-Verdugo C, Sajeva M, La Mantia T, Harrouni C, Msanda F, Caujapé-Castells J. 2015. Do island plant populations really have lower genetic variation than mainland populations? Effects of selection and distribution range on genetic diversity estimates. *Molecular Ecology* 24: 726-741.
- Garnatje T, Susana A, Messeguer R. 1998. Isozyme studies in the genus *Cheirolophus* (Asteraceae: Cardueae - Centaureinae) in the Iberian Peninsula, North Africa and the Canary Islands. *Pl. Syst. Evol.* 213: 57-70.
- González-Pérez MA, Caujapé-Castells J, Sosa PA, 2004. Allozyme variation and structure of the Canarian endemic palm tree *Phoenix canariensis* (Arecaceae): implications for conservation. *Heredity* 93: 307-315.
- Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. *In:* Falk DA, Holsinger K, eds. *Genetics and conservation of rare plants*. New York, USA: Oxford University Press, 75-86.
- Holsinger KE, Gottlieb LD. 1991. Conservation of rare and endangered plants populations. *In:* Falk DA, Holsinger KE, eds. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York.
- Hume PE. 2004. Islands, invasions and impacts: a mediterranean perspective. *In:* Fernández- Palacios JM, Morici C, eds. *Ecología Insular. Island Ecology*. Asociación Española de Ecología Terrestre (AEET) - Excmo. Cabildo Insular de La Palma, 359-383.
- Inda LA, Segarra-Moragues, JG, Müller J, Peterson, PM, Catalán P. 2008. Dated historical biogeography of the temperate Lollinae (Poaceae, Pooideae) grasses in the northern and southern hemispheres. *Mol. Phyl. Evol.* 46: 932-957.
- Jaén-Molina R, Caujapé-Castells J, Reyes-Betancort JA, *et al.* 2009. Molecular

- phylogeny of *Matthiola* R. Br. (Brassicaceae) inferred from ITS sequences, with special emphasis on the Macaronesian endemics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 972-981.
- Karron JD. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* 1: 47-58.
- Kim S-C, Crawford DJ, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A. 1999. Adaptive radiation and genetic differentiation in the woody *Sonchus* alliance (Asteraceae: Sonchinae) in the Canary Islands. *Pl. Syst. Evol.* 215: 101-118.
- Kim, SC, Lee C, Mejías JA. 2007. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA matK gene and ITS of nrDNA sequences reveals polyphyly of the genus *Sonchus* and new relationships among the subtribe Sonchinae (Asteraceae: Cichorieae). *Mol. Phyl. Evol.* 44: 578-597.
- Kondrakov P, Schütz N, Schüssler C, de Sequeira MM, Guerra AS, Caujapé-Castells J, et al. 2015. Biogeography of Mediterranean Hotspot Biodiversity: Re-Evaluating the 'Tertiary Relict' Hypothesis of Macaronesian Laurel Forest. *PLOS ONE* 10(7): e0132091. doi:10.1371/journal.pone.0132091.
- Korol L, Gil SL, Climent MJ, Zehavia A, Schiller G. 1999. Canary Islands pine (*Pinus canariensis* Chr. Sm. ex DC.) 2. Gene flow among native populations. *Forest Genetics* 6: 277-282.
- Lázaro A, Aguinalalde I. 1998. Genetic diversity in *Brassica oleracea* L. (Cruciferae) and wild relatives ($2n = 18$) using isozymes. *Annals of Botany* 82: 821-828.
- Lorenzo H, Caujapé-Castells J, Febles R, Pérez de Paz J. 2003. Isozyme variation in the Canarian endemic *Neochamaelea pulverulenta* (Cneoraceae): implications for population differentiation in the Canaries and first molecular insights on the floristic link with the Mediterranean. *Bocconea* 16: 953-959.
- Lumaret R, Ouazzani N, Michaud H, Vivier G, Deguilloux M-F, di Guisto F. 2004. Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. *Heredity* 92: 343-351.
- Machado A. 2002. La biodiversidad de las islas Canarias. In: Pineda FD, de Miguel JM, Casado MA, Montalvo J, eds. *La diversidad biológica de España*. Pearson Educación, Madrid, 89-99.
- Marrero-Gómez MV, Bañares-Baudet Á, Carqué-Álamo E. 2005. Especies introducidas en Canarias. La gran amenaza para la biodiversidad. *Conservación Vegetal* 9: 4-6.
- Martín-Bravo S, Meimberg H, Luceño M, et al. 2007. Molecular systematics and biogeography of Resedaceae based on ITS and *trnL-F* sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 44: 1105-1120.
- Médail F, Quézel P. 1997. Hotspots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 112-127.
- Médail F, Quézel P. 1999. Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: Setting Global Conservation Priorities. *Conservation Biology* 13(6): 1510-1513.
- Medina FM. 2009. *Plan de recuperación del Pico de fuego (Lotus pyranthus) y el Picocernícalo (Lotus eremiticus)*. Resumen de Actuaciones, año 2009. Consejería de Medio Ambiente. Cabildo Insular de La Palma, 38 pp.
- Merrett MF, Clarkson BD, Bathgate JL. 2002. Ecology and conservation of *Alseuosmia quercifolia* (Alseuosmiaceae) in the Waikato region, New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 40: 49-63.
- Mora-Vicente S, Caujapé-Castells J, Pérez de Paz J, Febles-Hernández R, Malo JE. 2009. Isozyme diversity in some Canarian woody endemisms of the genus *Echium* L. (Boraginaceae). *Pl. Syst. Evol.* 279: 139-149.
- Morici C. 2004. Palmeras e islas: La insularidad en una de las familias más diversas del reino vegetal. In: Fernández- Palacios JM, Morici C, eds. *Ecología Insular. Island Ecology*. Asociación Española de Ecología Terrestre (AEET) - Cabildo Insular de La Palma, 81-122.

- Morikawa T, Leggett JM. 1990. Isozyme polymorphism in natural populations of *Avena canariensis* from the Canary Islands. *Heredity* 64: 403-411.
- Mort ME, Soltis DE, Soltis PS, *et al.* 2002. Phylogenetics and Evolution of the Macaronesian Clade of Crassulaceae Inferred from Nuclear and Chloroplast Sequence Data. *Systematic Botany* 27: 271-288.
- Myers N, Mittermeyer RA, Mittermeyer CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Oliva-Tejera F, Caujapé-Castells J, Naranjo-Suárez J, Navarro-Déniz J, Acebes-Ginovés JR, Bramwell D. 2005. Population genetic differentiation in taxa of *Lotus* (Fabaceae: Loteae) endemic to the Gran Canaria pine forest. *Heredity* 94: 199-206.
- Oliva-Tejera F, Caujapé-Castells J, Navarro-Déniz J, Reyes-Betancort A, Scholz S, Baccarani-Rosas M, Cabrera-García N. 2006. Patterns of genetic divergence of three Canarian endemic *Lotus* (Fabaceae): implications for the conservation of the endangered *L. kunkelii*. *American Journal of Botany* 93(8): 1116-1124.
- Panero JL, Francisco-Ortega J, Jansen RK. 1999. Molecular evidence for multiple origins of woodiness and a New World biogeographic connection of the Macaronesian Island endemic *Pericallis* (Asteraceae: Senecioneae). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 13886-13891.
- Pedrola-Monfort J, Caujapé-Castells J. 1994. Allozymic and morphological relationships among *Androcymbium gramineum*, *A. europaeum* and *A. psammophilum* (Colchicaceae). *Plant Syst. Evol.* 191: 111-126.
- Pedrola-Monfort J, Caujapé-Castells J. 1996. Genetic and morphological divergence in the *Androcymbium gramineum* complex (Colchicaceae). *Plant Syst. Evol.* 201: 149-162.
- Pérez de Paz J. 2002. La Biología Reproductiva. Importancia y tipos de estudios. *In: Bañares Baudet Á, coord. Biología de la conservación de plantas amenazadas.* Organismo Autónomo de P. Nacionales. Santa Cruz de Tenerife, 71-130.
- Pérez de Paz J, Caujapé-Castells J. 2013. A review of the allozyme data set for the Canarian endemic flora: causes of the high genetic diversity levels and implications for conservation. *Annals of Botany* 111(6): 1059-1073.
- Primac RB, Ros JD. 2002. Introducción a la Biología de la Conservación. Ariel, Barcelona.
- Pimm SL, Ravens P. 2000. Extinction by numbers. *Nature* 403: 843-845.
- Prina AO, Marrero Á. 2001. *Crambe tamadababensis* (Brassicaceae, Brassiceae), una nueva especie para Gran Canaria. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 58(2): 245-249.
- Prina AO, Martínez-Laborde JB. 2008. A taxonomic revision of *Crambe* section *Dendrocrambe* (Brassicaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 156:291-304.
- Sahuquillo E, Lumaret R. 1995. Variation in the subtropical group *Dactylis glomerata* L. -1. Evidence from allozyme polymorphism. *Bioch. Syst. Ecol.* 23: 407-418.
- Sánchez JL, Caujapé-Castells J, Reyes-Betancort JA, Scholz S. 2006. Population genetics of *Matthiola bolleana* (Brassicaceae) in the Canary Islands. *Plant Systematics and Evolution* 262: 139-151.
- Schiller G, Korol L, Ungar ED, Zehavia A, Gil SL, Climent MJ. 1999. Canary Islands pine (*Pinus canariensis* Chr.Sm. ex DC.). 1. Differentiation among native populations in their isoenzymes. *Forest Genetics* 6: 257-276.
- Stuessy TF, Swenson U, Crawford DJ, Anderson G, Silva OM. 1998. Plant Conservation in the Juan Fernandez Archipelago, Chile. *Aliso* 16(2): 89-101.
- Suárez C, Pérez de Paz J, Caujapé-Castells J, Febles R. 2009. Genetic diversity and floral dimorphism in *Limonium dendroides* (Plumbaginaceae), a woody Canarian species on the way of extinction. *Pl. Syst. Evol.* 280: 105-117.
- Traveset A. 2001. Ecología reproductiva de plantas en condiciones de insularidad: consecuencias ecológicas y evolutivas del aislamiento geográfico. *In: Zamora R,*

- Pugnaire FJ, eds. *Ecosistemas Mediterráneos. Análisis Funcional*. CSIC-AEET, España, 269-289.
- Traveset A, Santamaría L. 2004. Alteración de mutualismos planta-animal debido a la introducción de especies exóticas en ecosistemas insulares. *In: Fernández-Palacios JM, Morici C, eds. Ecología Insular. Island Ecology*. Asociación Española de Ecología Terrestre (AEET) - Cabildo Insular de La Palma, 251-276.
- Van den Heede J, Pajarón S, Pangua E, Viane RII. 2004. *Asplenium ceterach* and *A. octoploideum* on the Canary Islands (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Amer. Fern J.* 94: 81-111.
- Vilches B, Roca-Salinas A, Naranjo J, Navarro B, Bramwell D, Caujapé-Castells J. 2004. Estructura espacial de la variación genética de *Erysimum albescens* (Cruciferae) en Gran Canaria: implicaciones para la conservación *ex situ* en bancos de germoplasma. *Bot. Macaronésica* 25: 15-30.

I.2. Objetivos generales.

En este contexto global, los objetivos generales de la tesis en los que se enmarcarán los objetivos específicos para las especies de *Crambe* L. y *Ruta* L. (ver capítulos II.2 y III.2) son los siguientes:

1. Utilizar diferentes marcadores moleculares para ayudar a esclarecer cuestiones taxonómicas y evolutivas en grupos endémicos canarios de diferentes linajes y características biológicas.
2. Ampliar el conocimiento sobre los patrones y estructuración espacial del flujo génico entre especies y entre poblaciones de la misma especie.
3. Derivar directrices de conservación aplicables a cada unidad taxonómica evidenciada por la información obtenida a través de las diferentes técnicas moleculares .

Capítulo II. La variabilidad genética en *Crambe pritzelii* y *C. tamadabensis* con isoenzimas.



Crambe pritzelii. La Umbría de El Gallego.

Capítulo II.1 Introducción a la variabilidad genética en *Crambe pritzelii* y *C. tamadabensis* con isoenzimas.



Crambe tamadabensis. Cuesta de Silva.

Introducción

Las especies de archipiélagos oceánicos en general eran consideradas habitualmente como poseedoras de menores niveles de diversidad genética y por tanto más propensas a la extinción que sus congéneres continentales. En buena lógica, este razonamiento se apoyaba principalmente en los procesos promovidos por efectos fundadores (y consecuentemente comunes a este tipo de especies), como son la deriva genética y la depresión por consanguinidad, además de, presumiblemente, un flujo génico limitado por la fragmentación insular y las frecuentes barreras orográficas de este tipo de islas (Ellstrand & Elam, 1993; Barrett, 1996; Frankham, 1997, 1998). La asunción general de una diversidad genética depauperada en taxones y poblaciones insulares ha sido promovida al menos desde los trabajos de Wright (1931) y Stebbins (1942), a partir de los cuales los niveles bajos de variación genética frecuentemente publicados en endemismos insulares se consideran como un efecto colateral de rareza (Barrett & Kohn, 1991; Frankham, 1997). En consecuencia, desde los más influyentes estudios tempranos de diversidad aloenzimática en endemismos de archipiélagos oceánicos (Helenuum & Ganders, 1985; Crawford *et al.*, 1987a; Elisens, 1992; deJooode & Wendel, 1992), se venía asumiendo que las especies raras y las insulares poseían generalmente niveles de variación genética menores que las especies continentales, más ampliamente distribuidas (Hamrick & Godt, 1989; Karron, 1987), y que presentaban una alta identidad genética con sus congéneres insulares a pesar de las claras diferencias morfológicas y ecológicas (Crawford *et al.*, 2006). Otro principio general proveniente de los estudios aloenzimáticos en especies de islas oceánicas era que la mayor parte de la diversidad genética se explicaba mayoritariamente por las diferencias entre poblaciones (deJooode & Wendel, 1992; Francisco-Ortega *et al.*, 2000; Crawford *et al.*, 2001).

Sin embargo, a tenor de lo subrayado por primera vez por Stebbins (1980), algunos estudios aloenzimáticos en especies raras de sistemas insulares oceánicos empezaron a revelar niveles de variabilidad similares a los de congéneres ampliamente distribuidos (por ejemplo Lewis & Crawford, 1995; Smith & Pham, 1996; Young & Brown, 1996). Poco después, Gitzendanner & Soltis (2000) sugieren que la idea de que las especies raras tienen menos

variabilidad genética que las más comunes puede deberse a una conclusión demasiado generalizada, y que la historia filogenética debe tenerse en cuenta en las comparaciones, frente al uso de taxones filogenéticamente independientes o distantes.

Investigaciones recientes y en desarrollo por el grupo del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada CSIC (en adelante, JBCVCSIC) parecen confirmar que los endemismos insulares no necesariamente han de tener menor variación genética que sus congéneres continentales (ver García-Verdugo *et al.*, 2014). Además, la hipótesis general de que la variación genética interpoblacional es mucho mayor en endemismos insulares no se corresponde con el hallazgo de diversidad genética interpoblacional muy baja en especies insulares que presentan niveles altos de diversidad genética. En este sentido, un análisis realizado con datos provenientes de especies endémicas canarias de distribución tanto amplia como restringida (Caujapé-Castells, 2010) sugiere que la detección de altos niveles de fragmentación genética como la que se mide con los parámetros G_{ST} (Nei, 1973) o F_{ST} (Wright, 1951), puede hallarse fuertemente influenciada por un muestreo espacialmente no representativo dentro de las poblaciones. Estas evidencias relativamente recientes cuestionan la generalidad de la hipótesis de que las especies insulares son genéticamente depauperadas y sugieren que, al menos en algunos casos, las estimaciones de diversidad y estructura genética para la flora canaria pueden haber sido sesgadas por efecto de un muestreo no intensivo. Además, algunos de estos trabajos recientes apuntan a que la cercanía del archipiélago canario al continente africano puede haber sido un factor determinante a la hora de propiciar mayores niveles de diversidad genética (y menores niveles de fragmentación genética) en algunos endemismos (García-Verdugo *et al.*, 2009; Pérez de Paz & Caujapé-Castells, 2013).

Crambe L. sección *Dendrocrambe* DC. contiene 14 especies (Prina & Martínez-Laborde, 2008) de putativo origen monofilético (Francisco-Ortega *et al.*, 2002), que son endémicas de los archipiélagos de Canarias y Madeira. Casi todas las especies son endemismos exclusivos de una sola isla. Representan un caso notable de radiación presumiblemente reciente, con especies morfológicamente muy parecidas y que ocupan ecosistemas similares. Sin

embargo, Francisco-Ortega *et al.* (2002) encontraron un patrón de colonización dentro de la sección desde el matorral termoesclerófilo de cotas bajas hacia áreas elevadas de la laurisilva y el pinar. *Crambe tamadabensis* A.Prina & Marrero Rodr. y *Crambe pritzelii* Bolle son dos endemismos estrechamente relacionados de la isla de Gran Canaria que, junto a *C. santosii* Bramwell, *C. strigosa* L'Hér. y *C. wilpretii* Prina & Bramwell (de otras islas canarias) forman un "grupo corona" monofilético (aunque pobremente resuelto) en los análisis filogenéticos realizados con ITS en el género (Francisco-Ortega *et al.*, 2002). *Crambe tamadabensis* ha sido descrita recientemente (Prina & Marrero, 2001) a partir de pliegos que habían sido adscritos previamente a *C. pritzelii*. Mientras *C. tamadabensis* presenta unas pocas poblaciones confinadas en el noroeste de Gran Canaria, *C. pritzelii* consiste en poblaciones fragmentadas geográficamente y repartidas por toda la mitad noreste de esta isla.

El norte de Gran Canaria ha estado mucho más poblado históricamente, y, como consecuencia, ha sufrido muchos cambios en los usos del suelo que han tenido un impacto severo en su vegetación (Hansen & Domínguez, 1993; Santana, 1993; Aguilera *et al.*, 1994). En el presente, los bosques termoesclerófilos originales donde crecen *C. tamadabensis* y *C. pritzelii* sólo existen, en el mejor de los casos, como parches de formaciones secundarias, y algunas de las poblaciones de *C. pritzelii* que se conocían desde el S. XIX están probablemente extintas hoy en día. Las razones principales del declive histórico de estas especies de *Crambe* en Gran Canaria son cambios en usos de suelo asociados a la expansión de la superficie cultivada y el sobrepastoreo: estas plantas son particularmente apetecidas por las cabras, y prácticamente las primeras en desaparecer de las partes accesibles de una comunidad que sirve como pasto a estos animales. Así, mientras algunas poblaciones han alcanzado un considerable tamaño censal en paralelo a la reducción del ganado doméstico acaecida en las últimas décadas, otras continúan con pequeños tamaños, debido fundamentalmente a la persistencia de cabras silvestres en sus áreas de distribución.

Existen algunos precedentes sobre estudios de variabilidad genética en el género, con el uso de RAPDs, ITS y ADN_{cp} en el complejo *Crambe abyssinica* (Warwick & Gugel, 2003) y la aplicación de la técnica de ISSRs a *Crambe maritima* (Bond *et al.*, 2005). En el JBCVCSIC anteceden las

investigaciones con isoenzimas realizadas con otras especies de Brassicaceae endémicas canarias como las especies del género endémico *Parolinia* (Fernández-Palacios, 2010), *Erysimum albescens* (Vilches *et al.*, 2004) o *Matthiola bolleana* (Sánchez *et al.*, 2004, 2006). Otros trabajos de interés dentro del mismo campo con especies de la familia de las Crucíferas (Brassicaceae) dentro y fuera de Canarias son los realizados con *Lobularia canariensis* (Borgen, 1997), *Brassica oleraceae* y otras especies del género como la endémica canaria *B. bourgeauii* (Lázaro & Aguinalde, 1998) o *Raphanus raphanistrum* (Kercher & Conner, 1996).

Las investigaciones con isoenzimas se han aplicado mayoritariamente en las unidades evolutivas más básicas, a nivel de población, y se han dirigido especialmente a estudios de especiación divergente y origen de especies por eventos como la poliploidía. Entre las características de las isoenzimas que las hacen más apropiadas para la estimación de la diversidad genética se encuentran las siguientes: a) la relación entre productos observados y alelos es más simple que en otras técnicas electroforéticas, b) la herencia codominante en la mayoría de casos, c) la baja incidencia de homoplasias y d) su razonablemente alto nivel de resolución. Aunque la tecnología de los estudios poblacionales de ADN está en expansión desde hace tiempo, numerosos trabajos muestran la eficacia de las isoenzimas para estimar e interpretar la variabilidad genética de las poblaciones naturales y los niveles de flujo génico entre ellas, estudiar eventos de hibridación y evolución de ploidías, o apoyar a los estudios taxonómicos entre especies cercanas (Gotlieb, 1984; Sytsma & Schaal, 1985; Dolan, 1995; Murphy *et al.*, 1996; Francisco-Ortega *et al.*, 1996; Sosa & Lindstrom, 1996; Anderson & Warwick, 1999; Crawford, 1989, 2000; Membrives-Fernández *et al.*, 2001; Duminil & di Michele, 2009). Además, su aplicación en endemismos canarios ha demostrado su utilidad para el diseño de estrategias eficaces de conservación y gestión de endemismos amenazados como *Cistus osbaeckiaefolius* y *C. chinamadensis* (Batista *et al.*, 2001), *Viola palmensis* (Batista & Sosa, 2002), *Lotus kunkelii* (Oliva-Tejera *et al.*, 2006) o *Limonium dendroides* (Suárez-García *et al.*, 2009).

II.2 Objetivos.

En esta tesis doctoral, se provee la primera evaluación exhaustiva de los niveles y distribución de la diversidad genética para *Crambe* sección *Dendrocrambe*, en una amplia muestra de *C. tamadabensis* y *C. pritzelii*, con los siguientes objetivos:

Comprobar si los niveles y estructuración de la variación genética aloenzimática detectada en las diferentes poblaciones naturales de estos taxones se corresponden a lo esperado para endemismos insulares en peligro y si están en concordancia con los de otras especies de la misma familia Brassicaceae.

Analizar si estos marcadores moleculares detectan diferencias genéticas entre estas dos especies estrechamente relacionadas de *Crambe*, o si por el contrario su incipiente divergencia evolutiva tan solo se manifiesta por diferencias morfológicas y barreras reproductivas putativas.

Aportar directrices para diseñar mejores estrategias de conservación y gestión de estos endemismos amenazados que sean congruentes con las estimaciones obtenidas de diversidad genética poblacional.

Capítulo II.3 Material y Métodos *Crambe pritzelii* y *C. tamadabensis*.



Muestreo en el sector subpoblacional Guaniles, Guayadeque.

II.3.1 Las especies de *Crambe* sección *Dendrocrambe*

La sección *Dendrocrambe* DC., *Syst. Nat.* 2: 656 (1821) se distingue por poseer tallos leñosos, el segmento superior del fruto generalmente apiculado y los filamentos de los estambres medios gibosos (Prina & Martínez-Laborde, 2008). Las características de las diferentes especies que la conforman las define como nanofanerófitos, microfanerófitos o caméfitos hasta 3(4) m, profusamente ramificados. Pétalos blancos. Filamentos de los estambres medios generalmente recurvados y gibosos hacia el ápice. Pedicelos de los frutos frecuentemente tetragonos. Segmento inferior del fruto subdesarrollado y sin semilla, segmento superior mayoritariamente tetracostado, rugoso-reticulado, apiculado, con la única semilla a veces adherida al pericarpio (Prina & Martínez-Laborde, 2008).

Comprende 14 especies endémicas de los archipiélagos macaronésicos: 13 se encuentran distribuidas por todas las Islas Canarias menos Lanzarote (de las cuales 11 son endemismos de una única isla), y una en las islas de Madeira. Inicialmente, la sección comprendía solamente dos especies, las por entonces ya descritas *Crambe fruticosa* L.f. (1781) de zonas bajas del norte de Madeira y Porto Santo (especie tipo), y *C. strigosa* L'Hér. (1785), ampliamente distribuida por zonas de monteverde de Tenerife, La Palma y La Gomera. Desde entonces, otras especies atribuibles a esta sección han ido describiéndose sucesivamente hasta la actualidad: *C. pritzellii* Bolle (1862) de medianías de la mitad nororiental de Gran Canaria; *C. arborea* Webb ex Christ (1887) de laderas del Valle de Güímar en el este de Tenerife; *C. gomerae* Webb ex Christ (1887) de zonas medias y altas del sur y este de La Gomera; *C. laevigata* DC. ex Christ (1887) del Valle de Masca y otros barrancos aledaños en la vertiente suroeste del macizo de Teno, extremo oeste de Tenerife; *C. scoparia* Svent. (1953) de zonas medias del oeste de Gran Canaria; *C. sventenii* Pett. ex Bramwell & Sunding (1973) de cimas aisladas del sureste de Fuerteventura; *C. scaberrima* Webb ex Bramwell (1973) de acantilados al norte del macizo de Teno y barrancos del suroeste de Tenerife; *C. microcarpa* A.Santos (1983) de la zona centro-occidental de La Palma; *C. santosii* Bramwell (1995) de zonas sombreadas de laurisilva del norte y este de La Palma, norte de La Gomera y norte de Tenerife; *C. wildpretii* Prina & Bramwell

(2000) de una única localidad del oeste de La Gomera; *C. tamadabensis* A.Prina & Marrero Rodr. (2001) de escarpes del noroeste de Gran Canaria; y *C. feuillei* A. Santos (2008) de laderas del norte de El Hierro. Además de estos taxones cabe añadir *C. gomerae* Webb ex Christ subsp. *hirsuta* Prina (2008) de una única localidad en áreas de margen de laurisilva del noreste de La Gomera; y *C. fruticosa* L.f. subsp. *pinnatifida* (Lowe) Prina & Mart.-Laborde (2008) de zonas bajas del sur de Madeira.

Muchas de las especies que componen esta sección no han estado exentas de controversia taxonómica. *C. scaberrima* había sido determinada por primera vez a mediados del S. XIX por P. B. Webb (aunque no publicada) para el Valle de Güímar al este de Tenerife, aunque fue posteriormente determinada como *C. strigosa* L'Hér. var. *sessiloifolia* por Bornmüller (1903) y consecutivamente descrita con este mismo nombre por Schulz (1919) para la misma localidad que Webb (donde nunca más ha sido encontrada). Schulz (1919) además amplió la circunscripción de la variedad de Bornmüller a las poblaciones de *C. gomerae*, dio el nombre de *C. strigosa* L'Hér var. *arborea* para *C. arborea*, y asignó *C. strigosa* L'Hér como sinónimo de *C. pritzelii*.

Más recientemente, *C. microcarpa* ha sido citada para algunas localidades de laurisilva donde crece *C. santosii* (García & Wildpret, 1996). Las poblaciones de Tenerife y La Gomera adscritas a *C. santosii* en la revisión taxonómica de la sección *Dendrocrambe* llevada a cabo por Prina & Martínez-Laborde (2008) podrían pertenecer en realidad a *C. strigosa* (Francisco-Ortega *et al.*, 2002; Santos Guerra, 2013), mientras que las de La Palma adscritas a *C. strigosa* en esta misma revisión podrían deberse a confusiones con *C. santosii* (Francisco-Ortega *et al.*, 2002), pues comparten localidades idénticas.

En la sinopsis taxonómica sobre las especies de *Crambe* en Canarias de Bramwell (1969) y en la revisión taxonómica de la sección *Dendrocrambe* (Prina & Martínez-Laborde, 2008) se distinguen ciertos caracteres taxonómicos que caracterizarían a diferentes grupos de especies, que guardan correspondencia con los tres clados principales revelados en el análisis filogenético de Francisco-Ortega *et al.* (2002). El clado 1 comprende a *C. fruticosa* y *C. sventenii*, que comparten características morfológicas únicas como los frutos lateralmente comprimidos y las hojas pequeñas y glaucas con márgenes sinuosos. El clado 2 comprende a *C. gomerae*, *C. scaberrima*, *C.*

laevigata, *C. microcarpa* y *C. feuillei*, las cuales parecen relacionadas por sus inflorescencias poco ramificadas y hojas romboidales e hispídas (a excepción de *C. laevigata*). El clado 3 comprende a *C. arborea*, *C. scoparia*, *C. strigosa*, *C. santosii*, *C. wildpretii*, *C. pritzelii* y *C. tamadabensis*, que se asemejan por sus inflorescencias paniculadas, densamente ramificadas.

En cuanto a las categorías de amenaza (IUCN, 2015), ordenando las diferentes especies de menor a mayor grado de amenaza encontramos *Crambe strigosa*: LC; *Crambe santosii*: LC; *Crambe fruticosa*: NT; *Crambe gomerae*: VU D2; *Crambe arborea*: VU D2; *Crambe scaberrima*: VU B1ab(iii)+2ab(iii); *Crambe microcarpa*: EN B1ab(iii,v)+2ab(iii,v); *Crambe laevigata*: EN B1ab(iii,v)+2ab(iii,v); *Crambe pritzelii*: EN B1ab(iii,v)+2ab(iii,v); *Crambe tamadabensis*: CR B1ab(iii)+2ab(iii); *Crambe scoparia*: EN B2ab(ii,iii); *Crambe sventenii*: CR B2ab(iii,v); *Crambe feuillei*: CR B1ab(iii,v)+2ab(iii,v); *Crambe wildpretii*: CR C2a(i);D.

En la Figura II.3.1 se muestran las áreas de distribución de las especies canarias, actualizadas según interpretación del autor de esta tesis, en base al material estudiado en la revisión taxonómica de la sección *Dendrocrambe* (Prina & Martínez-Laborde, 2008) y a la información existente sobre algunas de estas especies en el Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España (Bañares *et al.*, 2003, 2009).



Figura 3.1. Áreas de distribución de las especies canarias de *Crambe* sección *Dendrocrambe*. Los símbolos en aspas, asteriscos y círculos corresponden a poblaciones de especies de los clados 1, 2 y 3 en Francisco-Ortega *et al.* (2002). x: *C. sventenii*, * : *C. scaberrima*, * : *C. laevigata*, * : *C. gomerae*, * : *C. gomerae* subsp. *hirsuta*, * : *C. microcarpa*, * : *C. feuillei*, ○ : *C. scoparia*, ○ : *C. pritzelii*, ○ : *C. tamadabensis*, ○ : *C. arborea*, ○ : *C. strigosa*, ○ : *C. wildpretii*, ○ : *C. santosii*.

II.3.2 *Crambe pritzelii* Bolle in A. Braun, *Append. Pl. Nov. Hort. Bot. Berol.* 1861: 10 (1862).

II.3.2.1 Descripción.

Nanofanerófito entre 1-1,5 m. Tallos multicostales, muy leñosos en la base, ásperos y espinosos en partes superiores, inermes hacia la inflorescencia. Hojas basales y caulinares con peciolo de (1,5-) 3,5-4 cm, hirsutas, y lámina de (6-)9-12(-15) x 3-5 cm, de ovadas a ovado-lanceoladas, acuminadas hacia el ápice, irregularmente dentadas, con pelos erectos y punzantes principalmente en los nervios y el margen. Inflorescencia paniculada, intrincadamente ramificada, con ramas de patentes a erectas; pedicelos de 3-4 mm, erectos, glabros, tetracostados; flores densamente agrupadas en el ápice; sépalos glabros, blanquecinos en el extremo apical; pétalos con el limbo de 3 x 2 mm, oblongos, abruptamente estrechados en una uña de c. 1,5 mm; filamentos de los estambres medios recurvados, ligeramente gibosos hacia el ápice. Fruto con el segmento inferior de 0,25-0,30 mm, y el segmento superior de 3-3,2 mm, ampuliforme, distintivamente tetracostado, con la superficie rugoso-reticulada, con apículo de c. 0,5 mm. Semilla de 2,5-3 mm, ovoide, ligeramente comprimida, rodeado por un funículo de 3,5-4 mm (adaptado de Prina & Martínez-Laborde, 2008).

El holotipo (Braun, 1862) corresponde a un pliego sin un número de referencia (o sin un número de colección) (B).

II.3.2.2 Hábitat y estado de conservación.

Endemismo de la isla de Gran Canaria, que generalmente habita en riscos del área potencial de los bosques termoesclerófilos y del margen de la laurisilva, en un amplio rango altitudinal comprendido entre los 120 y los 1500 msnm, con poblaciones dispersas por toda la mitad nororiental insular y afectadas, al menos parcialmente, por los vientos alisios, desde el Valle de Agaete en el noroeste hasta el Macizo de Amurga al sureste, en orientaciones siempre sombreadas independientemente de la altitud. La especie prefiere suelos profundos de laderas inclinadas, donde los individuos alcanzan por lo

general grandes tamaños. Habita en todo tipo de sustrato rocoso, desde los basaltos más antiguos del primer ciclo de formación de la isla, traquitas y fonolitas, hasta basaltos sub-recientes.

Categoría de amenaza UICN (2015): EN B1ab(iii, v)+2ab(iii,v). Entre los riesgos que afectan a la especie cabe destacar el ramoneo por parte de herbívoros, ya que es una especie muy palatable para el ganado (Santana *et al.*, 2008). Actualmente el ganado doméstico puede causar una merma circunstancial importante en algunas poblaciones, pues esta especie está entre las primeras en desaparecer de los lugares accesibles cuando el ganado los visita después de un largo periodo de tiempo sin acudir.

Gran parte de sus poblaciones se encuentran en áreas protegidas por la Red de Espacios Naturales de Canarias: Parque Natural de Tamadaba, Reserva Natural Especial de Azuaje, Parque Rural Doramas, Paisaje Protegido de Pino Santo, Reserva Natural Especial Los Marteles, Monumento Natural del Barranco del Draguillo, Monumento Natural de Guayadeque; y por los Lugares de Importancia Comunitaria (LICs) de Tamadaba, Azuaje, Pino Santo, Los Marteles, Barranco de Guayadeque y Amurga. Existen semillas de la mayoría de las poblaciones almacenadas en el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Canario 'Viera y Clavijo'-Unidad Asociada al CSIC (JBCVCSIC en adelante).

II.3.2.3 Antecedentes corológicos.

Su *locus classicus* (Braun, 1862), corresponde a la Cumbre del Saucillo y los Roques sobre Tenteniguada. En Christ (1887a), se dan las mismas localidades de mont. Saucillo (Déspréaux) y Tenteniguada (Bourgeau) para *Cr.* [ambe] *vieraiana* syn. ined. Estas citas se mantuvieron inalteradas hasta que en el año 1929 Burchard añade las nuevas de Barranco de La Virgen (800 m), Barranco de los Tiles (800 m) y de la Culeta (Culata) 1200 m, además de Roque Saucillo (1500 m), sobre Tenteniguada 700-1200 m, Barranco de La Coruña 1000 m y Barranco del Drago 800 m (estas tres últimas, en la caldera de Tenteniguada).

En Menéndez *et al.* (1947) y en García Cabezón *et al.* (1955) aparece como herborizada en "Goyedra" (se refiere a Guayedra) 700 m, localidad que,

al igual que todas las del macizo de Tamadaba y algunas otras más, permanecerá relacionada a la especie en la bibliografía posterior hasta la descripción de *C. tamadabensis* por Prina & Marrero (2001). Nuevamente García Cabezón *et al.* (1956, 1957) la publican como recolectada en Bco. Angostura 350 m. Sventenius la herborizó en varios emplazamientos más, aunque el material fue publicado póstumamente por otros autores. Lid (1968) la halla en el interior de la Caldera de Bandama 330 m, aunque la determina como *C. strigosa* (presumiblemente siguiendo el criterio propuesto por Schulz [1919]). Kunkel (1969c) la nombra en un inventario en las paredes de un barranquillo de la Montaña de Horgazales, aunque debió tratarse de una confusión con *C. scoparia* (Montelongo & Moraleda, 1979). Bramwell (1969a) enumera entre otras conocidas, las siguientes nuevas localizaciones: Tafira (Bramwell), Agaete (Bramwell) y San Nicolás (Hurst), aunque esta última cita, como se irá viendo más adelante, parece incierta. Kunkel (1977a) la cita por primera vez entre Moya y Firgas (probablemente se refería al Barranco de Azuaje) y en Barranco del Cernícalo, además de citar el Barranco de La Virgen y Los Tilos de Moya, entre otras localidades previamente conocidas.

En el año 1978, Santos & Fernández publican pliegos inéditos de Sventenius contenidos en el Herbario del Jardín de Aclimatación de Plantas de La Orotava, entre los que figuran los siguientes para esta especie (herborizados entre 1947 y 1960): Caidero, Tenteniguada, 1100 m, ORT 7527, ORT 7528 a 1300m; Caldera de Bandama, 500 m, ORT 7513; balneario de Agaete, 400 m, ORT 7515; Bco. Lechuza, 900 m, ORT 7530; Guayadeque, 500 m, ORT 7516, ORT 7514 a 900 m; además de otros pliegos del macizo de Tamadaba determinados como *C. pritzelii*: Bco. Oscuro, Bco. Palo Blanco y Guayedra. Pérez de Paz (1980) usa material atribuible a esta especie y proveniente de la Cuesta de Silva para su estudio cariológico. Suárez (1982) la cita para los altos de la Hoya del Gamonal, San Mateo, y para un tabuco del Barranco de Aison, Guía, 500 m. Marrero (1984) la cita para el Barranco de Azuaje, 400 m.

Suárez (1994), en su trabajo sobre los relictos del monteverde en Gran Canaria, nos da por vez primera una conversión de localizaciones a cuadrículas U. T. M. de 1x1 km, y cita nuevos emplazamientos con sus correspondientes pliegos (*exsiccata*): altos de San Mateo, Lomo de Chiginique,

1.200-1.300 m, TFC 31.300; frente a Montañeta Los Dragos, Moya, TFC 31.293, 31.294; Barranco Azuaje, 300 m, TFC 31.299. De las 32 cuadrículas relacionadas en un mapa para la especie (Figura II.3.2), 8 corresponderían realmente a *C. tamadabensis* (Prina & Marrero, 2001; Marrero & Navarro, 2003), con pliegos de Faneque, Barranco del Palo y Barranco de La Palma en Tamadaba, y de Montaña de Guía. Del resto de cuadrículas, algunas se interpretan como erróneas actualmente (ver más adelante), debido al desplazamiento de la red de cuadrículas U. T. M. (aproximadamente 200 m hacia el este y 150 m hacia el sur) ocurrido en 1995, a la vez que se deduce que varias de ellas representarían nuevos emplazamientos (sin cita relacionada) para la especie, que corresponderían al menos a las siguientes poblaciones: sobre San Pedro de Agaete (presumiblemente observada desde el borde de los lomos superiores al sur de Pico Viento); Barranco de Azuaje, parte baja, por debajo de la carretera general entre Firgas y Moya; Riscos Jiménez; Barranco de La Mina, por debajo del caserío de Las Lagunetas; Barranco del Draguillo; Guayadeque, a la altura de Montaña Las Tierras y por encima de los 1200 m.

Prina & Marrero (2001), en la descripción original de *C. tamadabensis*, relacionan como material estudiado de *C. pritzelii* un pliego de Sventenius de 1973 en el que se lee "San Nicolás Tolentino, Artajeve" (LPA 10817), localidad que resulta muy alejada del área de distribución de esta especie y en el entorno del *locus classicus* de *C. scoparia*; así como un pliego de P. Sunding de 1966 con la etiqueta "Slopes above San Felipe, facing towards Barranco Calabozo, 150-200 m" (O), localidad que se corresponde con el entorno de la Cuesta de Silva. Cabe mencionar las citas de la especie en los inventarios (Navarro *et al.*, 2003) que figuran en la Base de Datos del JBCVCSIC, donde se ubica en localizaciones concretas (provistas de su correspondiente cuadrícula U. T. M. de 1x1 km), y de las que se enumeran las siguientes por referirse a poblaciones nuevas, ampliar la extensión conocida de algunas poblaciones o confirmar algunas de las cuadrículas sin cita concreta de Suárez (1993): Bco. Antona, 900 m, inv. 31, e inv. 32 a 950 m; pared ladera derecha Bco. de Los Mocanes, 850 m (inv. 68); Agaete, tabuco al final del Barranco de Los Berrazales, 350 m, inv. 79; Riscos de Jiménez, 450-500 m, inv. 98; Bco. de Guayadeque, tramo medio, pared derecha, 1190 m, inv. 149; Bco. del Corte

(Tenteniguada), 1000-1100 m, inv. 237. Salas *et al.* (2003), en uno de los inventarios para *Echio decasnei-Retametum rhodorhizoidis* *ass. nov.*, la citan para Breña Alta (Telde), alt. 830 m. Saturno (2007) sitúa la especie en los andenes del Barranco de Las Palmas, en el Macizo de Amurga.

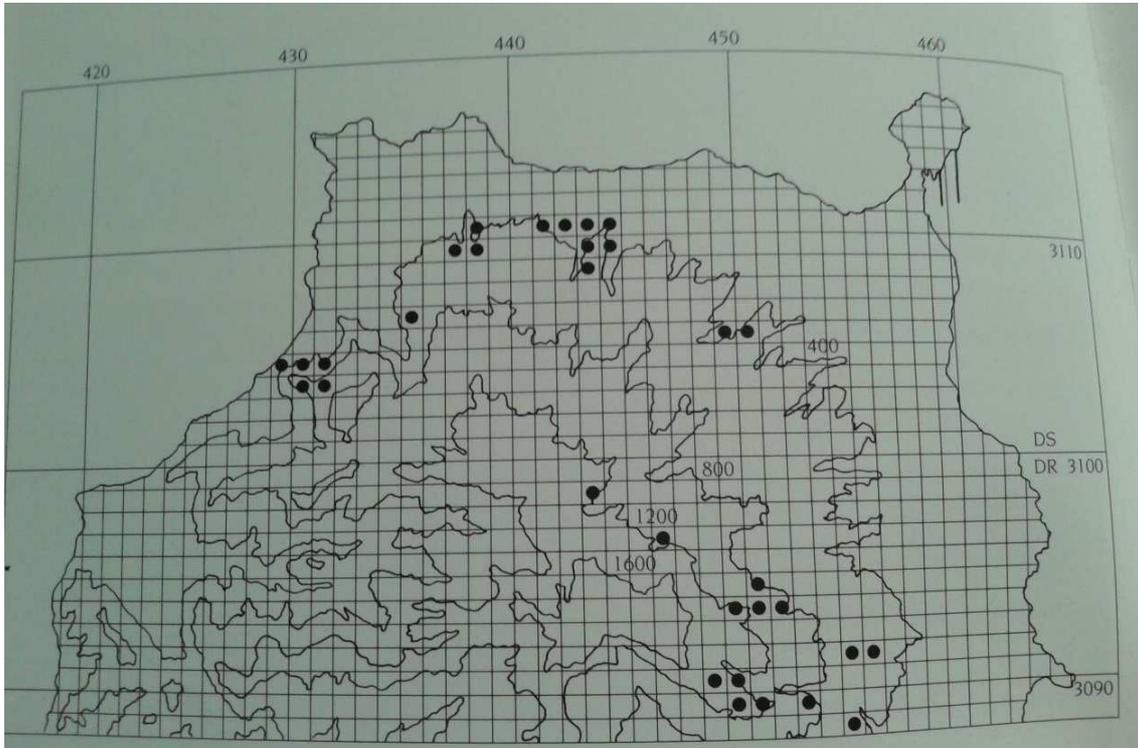


Figura II.3.2. Mapa con las localidades atribuidas a *Crambe pritzelii* (extraído de Suárez, 1994). Los números en los márgenes corresponden a cuadrículas U.T.M. De 1x1 km.

Por último, Prina & Martínez-Laborde (2008), en su revisión taxonómica de la sección *Dendrocrambe*, continúan clasificando como material estudiado de *C. pritzelii* el pliego de Sventenius LPA 10817 de San Nicolás Tolentino, Artajeve. Otros pliegos de la especie examinados por Prina & Martínez-Laborde (2008) y relevantes en cuanto al tema que nos ocupa son los siguientes: *slopes above* San Felipe, *facing towards* Barranco Calabozo, 150-200 m, 24.iii.1966, P. Sunding (O); *slope above* San Felipe, c. 180 m, 11.iii.1967, L. Borgen 109 (O); Cuesta de Silva, 23.v.1933, E. Asplund (B); Aldea Blanca, cordillera de Las Fuentecillas, 8.v.1974, J. Alonso (LPA 10168); Valle de Agaete, San Pedro, 19.vi.1999, Á. Marrero & A. Prina 234 (LPA 18656, MA 626721); Arucas, 300 m, 31.iii.1964, F. Markgraf (B); Barranco de Azuaje (Barranco de La Virgen), 300-400 m, 22.iii.1971, L. Borgen 450 (O); Barranco de La Virgen near Cambalud,

300 m, 23.iv.1973, A. Aldridge 1582 (RNG); Los Tilos de Moya, 500 m, 22.iv.1971, G. Kunkel 3591 (MA); Los Tilos de Moya, 600 m, 27.iii.1971, Humphries 3137 (RNG); Los Tilos de Moya, Barranco del Pagador, 18.vi.1999, A. Prina & A. Marrero (LPA 18655, MA 626707); *slope* Cabo Verde *ad* 150 m, *in dumosis*, 4.iv.1980, Fdez. Casas 3010 (MA); Tafira Alta, Monte Lentiscal, 500 m, 28.iii.1969, D. Bramwell 1097 (RNG); Barranco de Guayadeque, 1200 m, A. Marrero *et al.*, ¿4.iv.1985? (LPA 10191).

II.3.2.4 Corología actualizada.

Tras la comprobación en el campo de cada una de las localidades citadas en la bibliografía se ha actualizado la corología de la especie. La mayoría de estos datos corológicos se encuentran incluidos en la ficha de *C. pritzelii* del Atlas y Libro Rojo de la flora vascular amenazada de España (AFA), elaborada en coautoría por el autor de esta tesis (Santana *et al.*, 2009).

En la actualización corológica realizada en esta tesis, no se han considerado las citas de San Nicolás, Artajeve (Bramwell, 1969; LPA 10817 de Sventenius en Prina & Marrero [2001] y Prina & Martínez-Laborde [2008]), ya que en el entorno existen poblaciones de *C. scoparia* que han sido prospectadas y censadas en varias ocasiones (Marrero *et al.*, 1988; Santana & Naranjo, 2003; Santana, 2009b). El que exista un pliego de Sventenius (gran conocedor de *C. scoparia* puesto que la describió en 1959) con el nombre de esa localidad y asignable a *C. pritzelii* resulta, cuanto menos, complicado de interpretar, y podría deberse a una traslocación de etiquetas. Tampoco pertenecen a *C. pritzelii* los núcleos poblacionales del Barranco de Aison (Suárez, 1982) y del entorno de la Cuesta de Silva (Pérez de Paz, 1980; pliegos de diferentes recolectores en Prina & Martínez-Laborde [2008]), los cuales se han considerado taxonómicamente como *C. tamadabensis* en el presente trabajo, en base a observaciones de campo y a pliegos aportados por el autor de esta tesis (ver *exsiccata* en página 61).

Tampoco se incluyen las siguientes citas por no haber sido confirmadas con posterioridad, ni encontrada la especie en los lugares a los que hacen referencia, por el autor de esta tesis, considerándose como poblaciones probablemente extintas (todas ellas localizadas entre el Barranco de Moya y los

alrededores de la Caldera de Bandama): Barranco de Los Tiles, 800 m (Burchard, 1929); Los Tilos de Moya (Kunkel, 1977a); Los Tilos de Moya, 500 m (pliego de Kunkel 3591 [MA] de 1971 en Prina & Martínez-Laborde [2008]); Los Tilos de Moya, 600 m (pliego de Humphries 3137 [RNG] de 1971 en Prina & Martínez-Laborde [2008]); *slope* Cabo Verde *ad* 150 m, *in dumosis* (pliego de Fdez. Casas 3010 [MA] de 1980 en Prina & Martínez-Laborde [2008]); Barranco de La Virgen, 800 m (Burchard, 1929; Kunkel, 1977a); Arucas, 300 m (pliego de F. Markgraf [B] de 1964 en Prina & Martínez-Laborde [2008]); Bco. Angostura 350 m (García Cabezón, Sventenius *et al.* [1956, 1957]); Tafira Alta, Monte Lentiscal, 500 m (pliego de D. Bramwell 1097 [RNG] de 1969 en Prina & Martínez-Laborde [2008]); interior de la Caldera de Bandama, 330 m (Lid, 1968), y Caldera de Bandama, 500 m (pliego de Sventenius [ORT 7513] de 1947 en Santos & Fernández [1978]).

La cita de Los Tilos de Moya, Barranco del Pagador (pliegos de A. Prina y Á. Marrero [LPA 18655, MA 626707] de 1999 en Prina & Martínez-Laborde [2008]), se considera equivalente a Barranco del Pagador (donde sí ha sido encontrada la especie), ignorándose el topónimo de Los Tilos de Moya, por debajo del cual (a varios kilómetros) nace el Barranco del Pagador.

Tampoco ha podido ser confirmada la cita de Burchard (1929) de Barranco del Drago 800 m, que corresponde a un pequeño enclave del extremo noreste de la Caldera de Tenteniguada, muy próximo a otros núcleos de la especie, siendo el más cercano el del Barranco del Corte (Navarro *et al.*, 2003).

No han sido consideradas las cuadrículas U. T. M de 1x1 km, 28RDS4110 y 28RDS4210, indicadas en el trabajo de Suárez (1994) sin cita relacionada, que corresponderían al tramo bajo del Barranco de Moya, al no haber sido encontrada la especie por el autor de esta tesis en dicho lugar, pudiendo tratarse igualmente de una población extinta. En el año 1995, la red de cuadrículas U. T. M. fue desplazada aproximadamente 200 m hacia el este y 150 m al sur. Por consiguiente, algunas de las cuadrículas indicadas en Suárez (1994) no se corresponden actualmente con una localización de *C. pritzellii* (aunque sí alguna cuadrícula vecina no indicada en aquel trabajo): 28RDS4905 y 28RDS5005, sin cita relacionada, se refieren a Riscos Jiménez; 28RDR4993, sin cita relacionada, podría referirse a los andenes de Los Espigones al sur de Tenteniguada. Por último, no se han considerado las cuadrículas 28RDR4890 y

28RDR5488 indicadas en Suárez (1994), sin cita, que corresponderían a situaciones muy marginales de la población conocida de Guayadeque, y en donde la especie no pudo ser encontrada por el autor de esta tesis, pudiendo considerarse como esporádica en dichas localizaciones.

A continuación se relatan las 44 cuadrículas U. T. M. (1x1 km) confirmadas para la especie (Figura II.3.3) [se indican los emplazamientos correspondientes y los casos en que sean primera cita]: **28RDS3406**: San Pedro, Valle de Agaete; **28RDS3506**: parte más alta de esta misma población; **28RDS3405**: Barranco de La Culata, Valle de Agaete (M. Olangua, com. pers., comprobada con posterioridad por el autor de esta tesis); **28RDS3505**: Barranco de La Culata, parte oriental de la población (M. Olangua, com. pers., comprobada con posterioridad por el el autor de esta tesis); **28RDS3404**: tabuco al final del Barranco de Los Berrazales, Valle de Agaete, 350 m; **28RDS3504**: Balneario de Agaete y por encima de éste, entre los 400-650 m; El Sao, a 500-550 m; **28RDS4310**: cabecera del Barranco del Pagador, por donde lo cruza la carretera general bajo Moya, 300-350 m (frente Montañeta Los Dragos, Moya); **28RDS4308**: Barranco de Azuaje, extremo sur de la población siguiendo el barranco aguas arriba; **28RDS4309**: Barranco de Azuaje, zona del balneario y también zona del cauce inmediatamente por debajo de la carretera general; **28RDS4409**: Barranco de Azuaje, ladera bajo la carretera general dirección Buenlugar, también por encima de la carretera; **28RDS4410**: Barranco de Azuaje, aguas abajo hasta una altitud del cauce de 140 m, y laderas anexas; **28RDS4411**: Barranco de Azuaje, extremo norte de la población siguiendo el cauce aguas abajo, zona de Hoya Cabreja a unos 120 m de altitud, y laderas anexas (primera cita); **28RDS4511**: Barranco de Azuaje, ladera derecha del barranco, zona de La Morena, alrededor de un canal – cueva en su parte más alta (primera cita); **28RDS4906**: Riscos Jiménez, 450-500 m; **28RDR4398**: Barranco de La Mina, por debajo de Las Lagunetas; **28RDR4598**: Barranco de Antona, 900-1050 m; **28RDR4697**: Caidero del Barranco de La Lechuza, por debajo del núcleo poblacional homónimo, 900 m; **28RDR4696**: altos de San Mateo, Lomo de Chiginique, 1200-1300 m; **28RDR4594**: Roque Sardina, Roque Cayo, altos de la Hoya del Gamonal, sobre San Mateo, 1500 m; **28RDR4694**: cabecera del Barranco de La Coruña,

altos de Tenteniguada, hasta unos 1475 m de límite superior; **28RDR4795:** Barranco del Corte (Tenteniguada), 1000-1100 m (aunque no ha podido ser encontrada por el autor de esta tesis, se ha tenido en consideración por tratarse de una cita relativamente reciente [Navarro *et al.*, 2003]); **28RDR4794:** Barranco de La Coruña, Barranco de La Pasadera y camino clásico a Los Roques al noreste del Roque Chico de Tenteniguada; **28RDR4793:** cabecera del Barranco de La Pasadera, hasta unos 1375 m, y en la parte más alta que alcanza la especie en el camino clásico a Los Roques de Tenteniguada, a unos 1275 m; **28RDR4894:** paredes al norte de Roque Redondo (sobre Tenteniguada), 1100-1175 m; Barranco de La Capellania (sobre Tenteniguada), 950-1050 m; **28RDR4893:** parte alta del Barranco de La Capellanía, a unos 1100 m; **28RDR4994:** andenes sobre Era de Mota, Los Espigones, 975-1050 m; **28RDR5094:** Barranco de Los Mocanes, 850 m, y Barranco de La Culata; **28RDR5093:** Barranco de Los Cernícalos, tramo alto; **28RDR5193:** Barranco de Los Cernícalos, tramo medio, y en Breña Alta (Telde), situada en un lomo que se asoma al Barranco de Los Cernícalos; **28RDR5294:** Barranco de Los Cernícalos, laderas bajo el Lomo de Cuba (primera cita, incluida en Santana *et al.*, 2009); **28RDR5491:** Barranco del Draguillo, por encima del Pozo del Draguillo; **28RDR5591:** Barranco del Draguillo, por debajo del Pozo del Draguillo; **28RDR4990:** Barranco de Guayadeque, frente a Montaña Las Tierras, extremo oeste de la población; **28RDR4989:** Barranco de Guayadeque, frente a Montaña las Tierras; **28RDR5090:** Barranco de Guayadeque, entre El Canalizo y Roque Negro; **28RDR5089:** Barranco de Guayadeque, al este del Canalizo, parte alta; **28RDR5190:** Barranco de Guayadeque, al este de Roque Negro, frente al Puntón de Las Melianas; **28RDR5189:** Barranco de Guayadeque, parte alta de la ladera por encima del Roque Negro, 900 m; **28RDR5290:** Barranco de Guayadeque, laderas al noroeste de Cuevas Bermejas; **28RDR5289:** Barranco de Guayadeque, sobre Cuevas Bermejas; **28RDR5389:** Barranco de Guayadeque, laderas de la Cañada de Los Burros, 500 m; **28RDR4880:** La Umbría en Barranco de Gallegos, hasta el Lomo de Las Fuentecillas, y bajo el caidero del Barranco de Las Palmas; **28RDR4980:** andenes de la ladera derecha del Barranco de Las Palmas; **28RDR4979:** andenes de la ladera derecha del Barranco de Las Palmas.

II.3.3 *Crambe tamadabensis* A Prina & Á. Marrero, *Anales Jard. Bot. Madrid* 58(2): 246 (2001).

II.3.3.1 Descripción.

Caméfito o nanofanerófito poco ramificado, de 40-100 cm, con tallos estriados, provistos de acúleos patentes a levemente erectos, esparcidos a lo largo de las costillas. Hojas caulinares indivisas, obovado-lanceoladas, con pecíolo de 3-3,5 cm, aculeado, acanalado; lámina de 12-14 x 7,5-8 cm con el margen irregularmente dentado y esparcidamente espinosa en las nervaduras y en el margen. Inflorescencia glabra, grácil o levemente condensada, con las ramas en posición ascendente a suberectas, levemente aladas cerca del ápice, pedicelos glabros, de 4-6 mm, subadpresos, estrechamente alados. Sépalos oblongos, glabros, de 2,2 x 0,9-1 mm, con el margen blanco y estrecho; pétalos blancos, oblongo-obovados, con el limbo de 4,5 x 2-2,3 mm, suavemente estrechados en una uña de c. 1 mm; filamentos estaminales medianos de 2,1-2,2 mm, recurvados, gibosos hacia el ápice. Fruto con el segmento inferior tetrágono de 0,5 x 0,3 mm y el superior de 2,2-2,4 x 0,8-1 mm, elíptico, tetrágono, apiculado, con un ala breve en cada una de las aristas y con la superficie rugoso-reticulada. Semilla de ovoide a globosa y con el tegumento liso (adaptado de Prina & Martínez-Laborde, 2008).

Holotipo: Tamadaba, Faneque, 14-V-1985, Á. Marrero, LPA 10202.

II.3.3.2 Hábitat y estado de conservación.

Endemismo de la isla de Gran Canaria, restringido al noroeste insular, desde el Macizo de Tamadaba hasta cerca de la costa norte, en riscos del área potencial de los bosques termoesclerófilos, margen de la laurisilva y del pinar asociado a sustratos sálicos dentro del área potencial climática de las dos formaciones anteriores, con rango altitudinal entre los 225 y los 1000 m. Habita localidades afectadas por los vientos alisios, en situaciones tanto sombrías como parcialmente soleadas, con orientaciones N, O, SW y E. Especie con mayores afinidades rupícolas que *C. pritzelii*, aunque los escasos ejemplares

que crecen sobre suelos más o menos desarrollados de andenes y pie de pared no muestran un aumento de tamaño significativo. Habita exclusivamente sobre sustratos rocosos sálicos (traquitas y fonolitas) antiguos, del primer ciclo de formación de la isla.

Categoría de amenaza UICN (2015): CR B1ab(iii)+2ab(iii). La principal amenaza en las distintas poblaciones es el ramoneo (Marrero & Navarro, 2003), por ganado cabrío cimarrón en el Macizo de Tamadaba y por pastoreo ocasional en el resto de localidades. Actualmente esta presión es muy fuerte en la vertiente norte de Tamadaba, mientras que el ganado doméstico puede causar una merma circunstancial importante en algunas poblaciones, ya que los individuos ramoneados de esta especie sucumben fácilmente. También hay que considerar el pequeño tamaño de todas las poblaciones fuera del Macizo de Tamadaba.

De sus cinco poblaciones (Tamadaba-Guayedra, Tamadaba-Las Helecheras, Montaña de Amagro, Montaña de Guía y Cuesta de Silva), tres se encuentran dentro de los límites de alguna de las figuras de protección de la Red de Espacios Naturales de Canarias: Parque Natural de Tamadaba y Monumento Natural de Amagro; y de los Lugares de Importancia Comunitaria (LICs) de Tamadaba y Amagro. Existen semillas de casi todas sus poblaciones almacenadas en el Banco de Germoplasma del JBCVCSIC.

II.3.3.3 Antecedentes corológicos.

En la descripción original de la especie (Prina & Marrero, 2001) se la cita para Tamadaba, Faneque (Marrero, varios pliegos LPA entre 1984 y 1985); Guayedra, Barranco del Palo, 550-600 m (R. Febles, 20-IV-1998, LPA 15864); y montaña de Almagro [Amagro] (B. Navarro, 9-II-1999, LPA 18654). Para Tamadaba-Faneque indican cinco cuadrículas U. T. M de 1x1 km, en el área que va desde Faneque al Barranco del Palo, y para Amagro una cuadrícula. En Marrero & Navarro (2003) se añade una población en Montaña de Guía, a la que corresponde una única cuadrícula U. T. M. de 1x1 km (28RDS3710). En los inventarios que figuran en la Base de Datos del JBCVCSIC (Navarro *et al.*, 2003) se la relaciona para Las Helecheras, Pinar de Sansó, Tamadaba, 900 msm (inv. 267), y para el Andén del Trébol, Pinar de Sansó, Tamadaba, 1050

msm (inv. 266). En el Herbario del JBCVCSIC existe un pliego de la especie (LPA 25262) de “Andén de los Juncos (en un ramal del Bco. de Agaete), 375 m, N-NE, Olangúa-Corral, Ojeda-Cáceres, 20-03-2010.

Hay que considerar las citas anteriores de *C. pritzellii* en el Macizo de Tamadaba: “Goyedra” 700 m (Menéndez *et al.*, 1947; García Cabezón *et al.*, 1955), Bco. Oscuro, Bco. Palo Blanco y Guayedra (pliegos de Sventenius en Santos & Fernández [1978]), como correspondientes a *C. tamadabensis*, una vez que han sido comprobadas por el autor de esta tesis.

II.3.3.4 Corología actualizada.

En general, se ha ampliado la corología para la especie tras la comprobación en el campo de cada una de las localidades citadas para *Crambe* en la bibliografía. Como consecuencia del desplazamiento de la red de cuadrículas U. T. M. en el año 1995, aproximadamente 200 m hacia el este y 150 m al sur, las cuadrículas 28RDS3809 y 28RDS3810 indicadas en Suárez (1994) para Montaña de Guía (de un total de cuatro) no se corresponden en la actualidad con una localización de *Crambe*.

A continuación se relatan las 14 cuadrículas U. T. M. (1x1 km) confirmadas para la especie (Figura II.3.3) [se indican los emplazamientos correspondientes y los casos en que sean primera cita]: **28RDS2904**: Montaña de Faneque y andén de Taguante (la segunda es nueva cita); **28RDS3003**: cabecera del Barranco de La Palma (o del Aderno); **28RDS3004**: bajo el Morro de Las Lechugas y andenes del Barranco de La Palma; **289RDS3103**: Barranco del Palo Blanco, parte alta, 1000 m; **28RDS3104**: Barranco del Palo Blanco, 550-600m, y en el Andén de la Tortolita y Barranco Oscuro (las dos últimas son cita nueva para la especie); **28RDS3204**: Andenes de la Breña, 700-775 m (nueva cita); **28RDS3205**: Andenes de la Breña, 750 m (nueva cita); **28RDS3305**: Las Helecheras, Pinar de Sansó, Tamadaba, 900 m; **28RDS3304**: Andén del Trébol, Pinar de Sansó, Tamadaba, 1050 m; **28RDS3404**: Andén de los Juncos, 375 m; Andén de los Juncos, Tamadaba, sobre los 700 m (comprobada por el autor de esta tesis); **28RDS3311**: Montaña de Amagro, 450 m; **28RDS3709**: tabuco del Barranco de Aison, o Ansó (cita nueva para la especie); **28RDS3710**: Montaña de Guía; **28RDS4012**: Risco Alto del Cabro en

el Barranco del Calabozo, Cuesta de Silva, 250-300m (cita nueva para la especie).

EXSICCATA. LPA33083: *Crambe tamadabensis*. Barranco Oscuro, Guayedra (Tamadaba), 580 m. En cauce del barranco. Moisés Soto, Óscar Saturno. 3-II-2005. LPA33085: *Crambe tamadabensis*. Barranquillo sobre los Andenes de la Tortolita, Guayedra. 775 m. Moisés Soto. 13-V-2006. LPA33086: *Crambe tamadabensis*. Andenes de La Breña, Guayedra. Moisés Soto. 13-V-2006. LPA33087: *Crambe tamadabensis*. Caidero Negro, Guayedra. Moisés Soto. 13-V-2006. LPA33088: *Crambe tamadabensis*. Montaña de Guía. Cara oeste. Moisés Soto. 11-V-2006. LPA33089: *Crambe tamadabensis*. Montaña de Guía. Cara oeste. Moisés Soto. 11-V-2006. LPA33090: *Crambe tamadabensis*. Montaña de Guía. Cara este. Moisés Soto. 12-V-2006. LPA33082: *Crambe tamadabensis*. Risco Alto del Cabro, sobre el Barranco del Calabozo (Cuesta de Silva). Moisés Soto, Óscar Saturno. 20-I-2006. LPA33084: *Crambe tamadabensis*. Risco Alto del Cabro. Moisés Soto. III-2005. LPA33091: *Crambe tamadabensis*. Risco Alto del Cabro, Barranco del Calabozo. Moisés Soto. 12-V-2006. LPA33092: *Crambe tamadabensis*. Risco Alto del Cabro, Barranco del Calabozo. Moisés Soto. 12-V-2006. LPA33093: *Crambe tamadabensis*. Risco Alto del Cabro, Barranco del Calabozo. Moisés Soto. 12-V-2006. LPA33094: *Crambe pritzelii*. Las Escaleras, al norte de San Pedro, Agaete, 300 m. Moisés Soto. 12-V-2006. LPA33095: *Crambe pritzelii*. Las Escaleras, al norte de San Pedro, Agaete, 300 m. Moisés Soto. 12-V-2006. LPA33096: *Crambe pritzelii*. Roque de La Culata, Valle de Agaete. 1-V-2015.

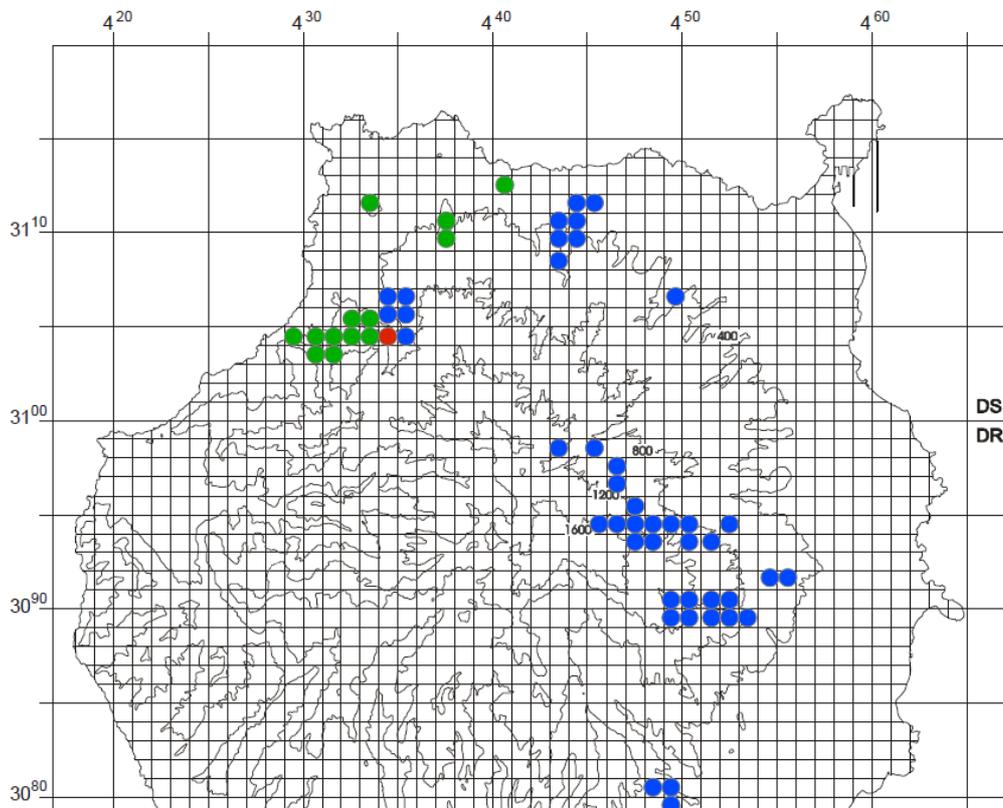


Figura II.3.3. Mapa de la isla de Gran Canaria con la red de cuadrículas U.T.M. de 1x1 km, mostrando la distribución de *C. tamadabensis* (en verde) y de *C. pritzelii* (en azul). En rojo se indica una cuadrícula compartida por ambos taxones.

II.3.4 Muestreo

Se muestrearon hojas destinadas a los análisis isoenzimáticos de un total de 721 individuos pertenecientes a doce poblaciones (ocho de *C. pritzelii* y cuatro de *C. tamadabensis*) que representan toda el área de distribución de estos dos taxones (Figura II.3.4). Previamente al muestreo de cada población, se procedió a una inspección del área de distribución de la planta, y se hizo una estimación rigurosa del número de individuos que conforman las diferentes poblaciones, por medio del cartografiado del área de ocurrencia y de cálculos de la densidad de individuos en diferentes zonas. Los muestreos se realizaron a través de transectos que abarcaron el área de extensión en cada población, siguiendo la metodología explicada en Caujapé-Castells (2006). En poblaciones pequeñas y homogéneas, se realizó un único transecto recorriendo toda el área de ocupación de la planta; en poblaciones grandes o complejas, se consideraron diferentes sectores, en cada uno de los cuales se muestreó siguiendo el mismo procedimiento.

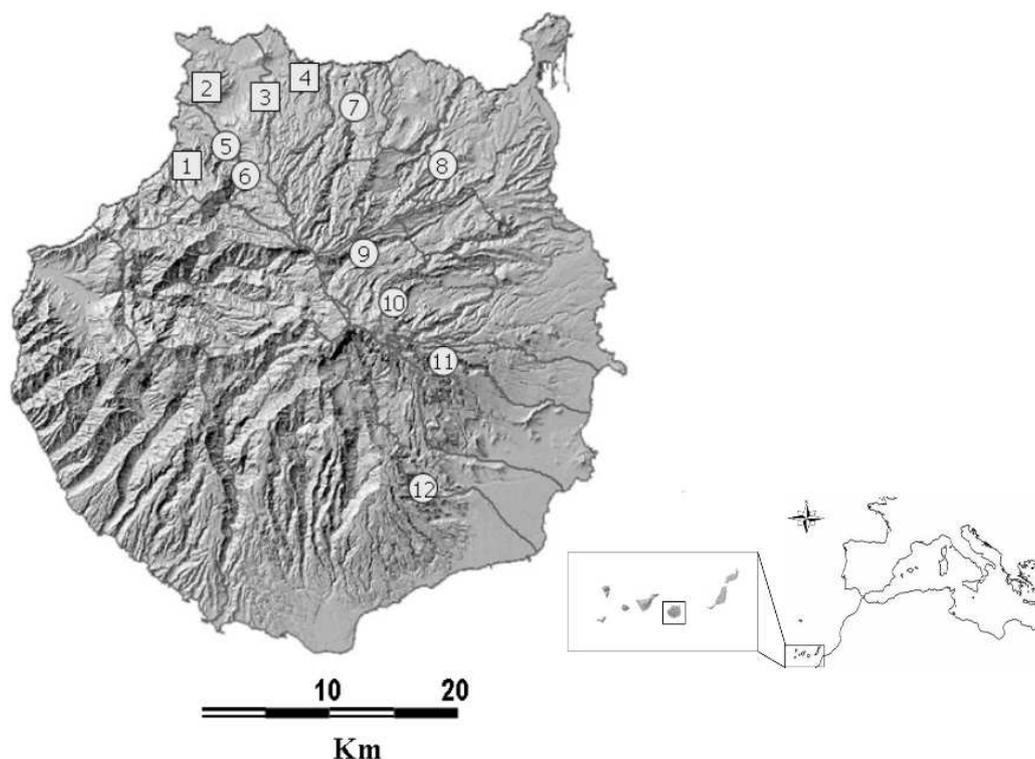


Figura II.3.4. Poblaciones muestreadas de *C. tamadabensis* (cuadrados) y *C. pritzelii* (círculos) en la isla de Gran Canaria. Los números corresponden a los de la Tabla II.3.1.

La relación de poblaciones muestreadas se indican en la Tabla II.3.1. El número de muestras por población osciló entre los 29 y los 95 individuos, dependiendo del tamaño poblacional estimado (ver Tabla II.3.1). También se hizo una recolección exhaustiva de semillas en todos los sectores subpoblacionales, siguiendo los procedimientos básicos en Bacchetta *et al.* (2008). Dichas semillas se encuentran depositadas en el Banco de Germoplasma del JBCVCSIC, para su conservación a largo plazo.

Tabla II.3.1. Poblaciones muestreadas (los números corresponden a los de la Figura II.3.4), sectores subpoblacionales incluidos en el muestreo, códigos, coordenadas (**U.T.M.**), altitudes (en metros), estado de conservación (**Con**) de cada sector subpoblacional (**▼** fluctuante, **—** estable, **▲** expansivo) número de individuos reproductores muestreados (**N**) y número de individuos muestreados por población (**n**).

<i>Especie</i> /POBLACIÓN/Sector	CÓDIGO	U.T.M	Altitud (m)	Con	N	n
<i>Crambe tamadabensis</i>						
1. TAMADABA	CTTA	28RDS3003	700-1000		12.000	84
Andenes de Guayedra	CTTA1		700-800	—		31
Barranco de La Palma	CTTA2		800-875	—		21
Faneque	CTTA3		900-1000	—		32
2. AMAGRO	CTAM	28RDS3311	400-465	—	300	32
3. MONTAÑA DE GUIA	CTGU	28RDS3710	375-550		700	41
Cara Oeste	CTGU1		400-500	▼		24
Cara Este	CTGU2		425-450	▼		8
Barranco de Gáldar	CTGU3		375-400	▼		9
4. CUESTA DE SILVA	CTSI	28RDS4012	225-300	▼	400	29
<i>Crambe pritzelii</i>						
5. AGAETE SAN PEDRO	CPAG2	28RDS3406	200-550		625	39
Risco de La Escalera	CPAG2a		200-400	▼		30
La Cardonera	CPAG2b		375-550	▼		9
6. AGAETE BERRAZALES	CPAG1	28RDS3504	350-650		1.225	54
Los Berrazales	CPAG1a		400-650	—		46
Barranco de Agaete	CPAG1b		350-375	▼		8
7. AZUAJE	CPAZ	28RDS4309	120-425		3.000	95
Barranco del Pagador	CPAZ1		300-350	—		27
Barranco de Azuaje alto	CPAZ2		275-350	—		28
Barranco de Azuaje bajo	CPAZ3		120-250	—		40
8. RISCOS JIMÉNEZ	CPJI	28RDS4906	475-500	▼	300	33
9. BARRANCO DE ANTONA	CPAN	28RDS4598	900-1050	—	600	37
10. TENTENIGUADA	CPTE	28RDS4794	950-1475		8.425	92
Barranco de La Coruña	CPTE1		1050-1475	▲		22
Barranquillo de La	CPTE2		1075-1350	▲		27
Pasadera						
Camino al Roque Grande	CPTE3		1100-1275	▲		17
Barranco de La Capellanía	CPTE4		950-1125	▲		14
Era de Mota	CPTE5		975-1050	▼		12
11. GUAYADEQUE	CPGY	28RDS5189	475-1350		49.525	94
Los Guaniles	CPGY1		1025-1200	▲		37
Roque Negro	CPGY2		750-1100	▲		23
Cuevas Bermejas	CPGY3		600-820	▲		13
Cañada de Los Burros	CPGY4		475-650	▲		21
12. AMURGA	CPGA	28RDS4880	450-725		1.800	91
Barranco de Las Palmas	CPGA1		450-650	▼		29
Gallegos	CPGA2		600-725	▼		62

Con la información obtenida principalmente de las exploraciones de campo se ha elaborado una ficha de cada población muestreada, con la descripción de características tales como su localización y extensión detallada, fitosociología y vegetación actual del entorno donde se encuentra, un inventario de las especies acompañantes más comunes y la geología y sustrato rocoso del lugar. Como normalmente ambas especies se han encontrado en lugares que sirven de refugio a muchas otras especies amenazadas, se ha considerado necesario citarlas en un apartado independiente, junto a su categoría de amenaza IUCN (post 1997). Algunas de las poblaciones muestreadas corresponden a localidades poco exploradas, donde ocasionalmente se han localizado núcleos poblacionales nuevos de otros taxones amenazados (se mencionan cuando se trata de nueva cita) o incluso taxonómicamente conflictivos. Se explican los detalles del muestreo de cada población y se adjunta un mapa donde figuran los transectos realizados (con líneas que representan los muestreos continuos de individuos, y aspas que representan los muestreos de individuos aislados). Finalmente, se ha hecho una mención del estado de conservación de la población en el momento del muestreo, procediéndose a su clasificación según tres tipos de dinámica poblacional, que según se ha observado en la actualidad (ver el capítulo de Introducción), ocurren normalmente siguiendo un orden cronológico:

- 1) fluctuante, cuando se ha encontrado a la población sometida a presiones negativas que hacen oscilar su tamaño censal alrededor de un mínimo marcado por la existencia de paredones inaccesibles;
- 2) estable, cuando no se han encontrado evidencias de presiones negativas que repercutan sensiblemente en la dinámica poblacional, pero la población se restringe aún a paredones más o menos inaccesibles y a los alrededores más cercanos, pudiendo, en algunos casos, haber experimentado un ligero incremento del área de ocurrencia;
- 3) expansiva, cuando se ha hallado una parte importante de la población en áreas fácilmente accesibles y relativamente alejadas de los paredones que presumiblemente le han servido de refugio, en los cuales aún se reconocen núcleos poblacionales con alta densidad de individuos.

II.3.5 San Pedro – Agaete (CPAG2)

Localización y extensión. La población se sitúa en la ladera izquierda del Barranquillo de Bracamonte, tributario del Barranco de Agaete por su lado derecho. Sobre esta ladera dominan paredes que llegan a superar los 100 m de altura orientadas al norte y noreste, y que culminan en una crestería que separa este barranquillo del de La Culata. Bajo estas paredes encontramos laderas con fuerte pendiente.

La población se encuentra fragmentada en dos núcleos separados unos 200 m entre sí, ceñidos a las áreas donde presentan mayor verticalidad las paredes. El núcleo inferior se localiza desde las orillas de la carretera GC-231 que comunica Agaete con la parte alta del valle, pocos metros antes de llegar a las casas de San Pedro y muy cerca del fondo del Barranco de Agaete (cota 200 m), y continúa, siempre siguiendo las paredes del Risco de La Escalera, a lo largo de aproximadamente 300 m más, hasta la cota de 400 m. El segundo núcleo se encuentra en las paredes bajo el cresterío de La Cardonera, en altitudes comprendidas entre los 375 y los 550 m.

En el censo realizado, se estimó una superficie total ocupada por la especie de 1,2 Ha, equivalente a unos 625 individuos reproductores.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Inframediterráneo xérico semiárido-inferior; inframediterráneo xérico semiárido-superior. Serie de vegetación: *Aeonio–Euphorbio canariensis* sigmetum (Rivas-Goday & Steve, 1965; Sunding, 1972); *Pistacio–Oleo cerasiformis* sigmetum (Del Arco *et al.*, 2002). Ambiente umbroso favorecido por su exposición al norte y el encajamiento del barranquillo. Sin embargo, la vegetación actual se encuentra sumamente degradada por las actividades antrópicas históricas, y fuera de las paredes predominan los prados nitrófilos y especies relacionadas a matorrales nitrófilos de la asociación *Artemisio–Rumicetum lunariae*. Aún así cabe destacar la población de almácigos (*Pistacia atlantica*) que de manera dispersa ocupa los alrededores.

Otros taxones amenazados. Los paredones donde se encuentra *C. pritzellii* son refugio de otros endemismos raros como *Kickxia pendula* (VU),

Camptoloma canariensis (VU), *Argyranthemum lidii* (EN) y *Parolinia* sp. (según Fernández-Palacios, 2009). Además se encontraron ejemplares de una probable especie no descrita de *Scilla* grex. *latifolia* (sin cita previa existente).

Especies acompañantes. *Euphorbia regis-jubae*, *Lavatera acerifolia*, *Rubia fruticosa*, *Kleinia neriifolia*, *Carduus clavulatus*, *Aeonium manriqueorum*, *Sonchus leptcephalus*, *Pancratium canariensis*, *Agave* sp., *Opuntia* sp., *Micromeria tenuis* subsp. *linkii*, *Echium decaisneii*, *Lavandula canariensis*, *Psoralea bituminosa*, *Artemisia canariensis*, *Arisarum vulgare*, *Ononis angustissima*, *Whitania aristata*, *Convolvulus floridus*, *Oxalis pes-caprae*, *Euphorbia canariensis*, *Pistacia atlantica*, *Argyranthemum lidii*, *Parolinia* sp., *Kickxia pendula*, *Camptoloma canariensis*, *Scilla* grex. *latifolia*.

Geología. El Barranco de Agaete se encuentra en la zona de contacto entre los materiales más antiguos del primer ciclo eruptivo (Ciclo I) de conformación de la isla, y los del ciclo más reciente (Ciclo III). En el tramo bajo del barranco aflora la formación basáltica del Ciclo I: lavas y conos de tefra basálticos alcalinos, olivínicos-piroxénicos y hawaííticos indeferenciados (ITGME, 1992), con edades superiores a los 13,5 Ma. Estos materiales abarcan gran parte del Barranquillo de Bracamonte. En las partes más altas (en general sobre los 400 msnm), aparecen los materiales basálticos del Ciclo III (post Roque Nublo): lavas y conos de tefra, con edades comprendidas entre los 2,9 y los 0,6 Ma (ITGME, 1992).

Muestreo. Se muestreó un total de 39 individuos. En el núcleo del Risco de La Escalera se muestrearon algunos de los individuos a ambos lados de la carretera, y a continuación se accedió a un andén, que va junto a la base de las paredes. Existe otro andén superior, muy cerca de la cresta que separa este barranquillo del de Las Culatillas, al cual no se pudo acceder. En el núcleo de La Cardonera sólo se pudieron muestrear 9 individuos en su parte más occidental, debido a su inaccesibilidad general. No obstante, estas muestras se recolectaron lo más separadamente posible, haciendo un recorrido hasta el cresterío superior.

Estado de conservación. La población se encuentra sometida a constantes fluctuaciones, debido al pastoreo reciente. A la entrada del barranquillo existe una pequeña explotación ganadera de cabras, por lo que el ganado pasta frecuentemente por toda el área donde se encuentra la especie, con evidentes efectos en la vegetación. Es probable que la fragmentación en dos núcleos separados por unos cientos de metros sea debida a la falta de paredes verticales en la parte central de la población, por donde accede más fácilmente el ganado. El lugar no se encuentra dentro de ningún espacio protegido.

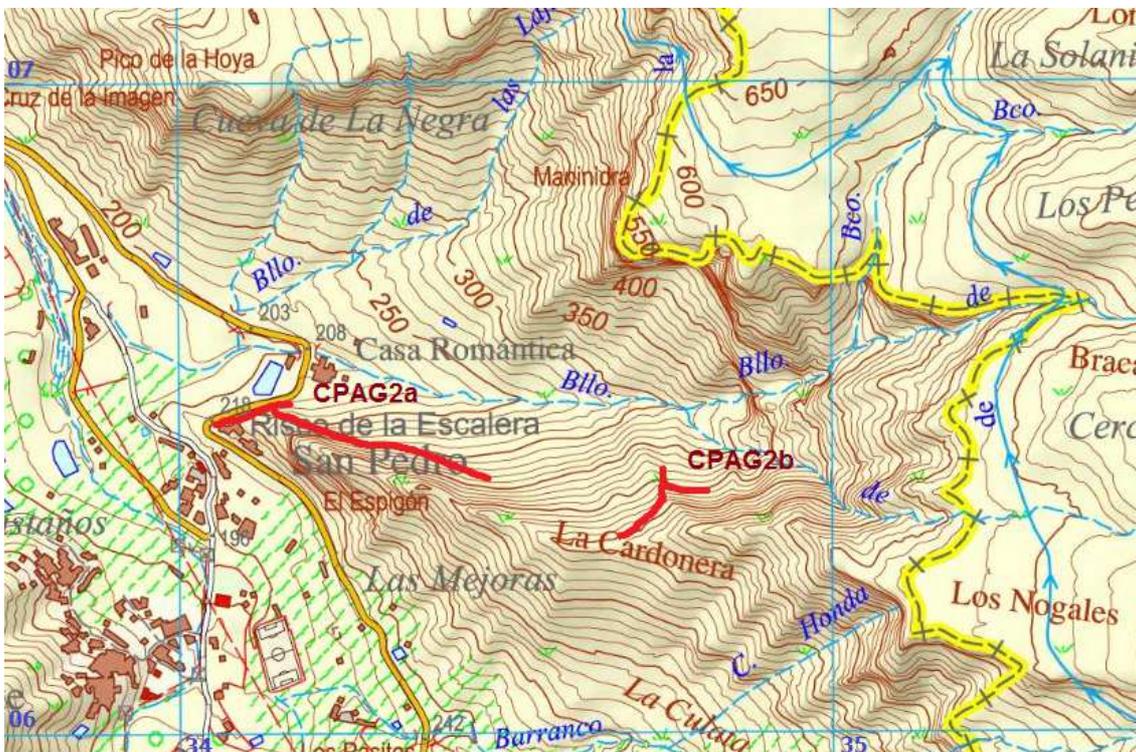


Figura II.3.5. Localización de las áreas muestreadas de la población de San Pedro-Agaete (CPAG2). Los número en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.

II.3.6 Los Berrazales – Agaete (CPAG1).

Localización y extensión. El entorno del principal núcleo de esta población del Valle de Agaete lo conforman las laderas al sur del antiguo balneario de Los Berrazales, en la Montaña de Las Vueltas (por donde pasa la carretera que sube al barrio de El Sao) entre los 400 y los 650 msnm. y a unos 1,4 km de la población de San Pedro (CPAG2). Otro núcleo, conformado por unos pocos individuos dispersos, se encuentra llegando a El Sao, sobre la carretera y a unos 400 m del principal. Existe un tercer núcleo de la especie en el fondo del Barranco de Agaete, en el tabuco que hay bajo la presa de las Tierras de Manuel, a unos 350-375 msnm y situado a unos 400 m de cada uno de los dos núcleos anteriores. Este último núcleo se encuentra ya al pie de los primeros contrafuertes del macizo de Tamadaba, donde se asienta, a menos de 500 m de distancia (oeste del Andén de Los Juncos), el núcleo más cercano de *Crambe tamadabensis*.

Se estimó una superficie total ocupada por la especie de 2,5 Ha, equivalente a unos 1.225 individuos reproductores. Casi todos pertenecen al núcleo principal; se han censado unos 100 individuos en el núcleo del tabuco del fondo del barranco y unos 10-15 en las proximidades de El Sao.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Inframediterráneo xérico semiárido-superior; termomediterráneo pluviestacional seco inferior. Serie de vegetación: *Pistacio–Oleo cerasiformis* sigmetum (Del Arco *et al.*, 2002); *Visneo–Arbuto canariensis* sigmetum (Rivas-Martínez *et al.*, 1993). La vegetación actual corresponde a un pinar de repoblación bastante aclarado, entre el que crece un matorral alto con abundancia de escobones (*Chamaecytisus proliferus*). En cambio el núcleo del fondo del barranco se encuentra en un ambiente más xérico y también degradado, donde dominan matorrales nitrófilos de la asociación *Artemisio–Rumicetum lunariae*, aunque en los cantiles del tabuco se entremezclan especies propias de las comunidades de la clase fitosociológica *Greenovio–Aeonietea* (Santos, 1976).

Otros taxones amenazados. En las zonas más escarpadas abundan endemismos como *Cheirolophus arbutifolius* (VU), *Dendriopoterium*

menendezii (VU), *Echium callithyrsum* (VU), *Descurainia artemisoides* (EN), y *Limonium sventenii* (EN).

Especies acompañantes. Núcleo principal: *Echium strictum*, *Aeonium manriqueorum*, *Micromeria tenuis* subsp. *linkii*, *Lobularia canariensis*, *Olea europaea* subsp. *guanchica*, *Lavatera acerifolia*, *Chamaecytisus proliferus*, *Davallia canariensis*, *Dendriopoterium menendezii*, *Bupleurum salicifolium* subsp. *acifiurum*, *Carlina canariensis*, *Cheirolophus arbutifolius*, *Hypericum reflexum*, *Pistacia atlantica*, *Pancratium canariensis*, *Asphodelus aestivus*, *Sonchus leptocephalus*, *Pinus canariensis* (de repoblación), *Echium callithyrsum* (parte más alta de la población), *Limonium sventenii* (parte más alta de la población).

Núcleo del fondo del barranco: *Euphorbia regis-jubae*, *Whitania aristata*, *Lavatera acerifolia*, *Echium decaisneii*, *Artemisia canariensis*, *Rumex lunaria*, *Dendriopoterium menendezii*, *Convolvulus floridus*, *Cistus monspeliensis*, *Micromeria tenuis* spp., *Chrysoprenanthes pendula*, *Ononis angustissima*, *Descurainia artemisoides*, *Pennisetum setaceum*, *Maytenus canariensis*, *Limonium sventenii* (un ejemplar visto).

Geología. En su tramo medio, el Barranco de Agaete se excava en los materiales de la última formación constructiva del dominio intracaldera (Ciclo I): fonolitas nefelínicas y traquitas, predominantemente lavas, con edades comprendidas entre los 9,7 y los 8,7 Ma (ITGME, 1992). El entorno de la población se encuentra dentro del límite que alcanzan las rocas de la paleocaldera: aguas abajo aflora la formación basáltica del Ciclo I: lavas y conos de tefra basálticos alcalinos, olivínicos-piroxénicos y hawaiíticos indeferenciados, con edades superiores a los 13,5 Ma (ITGME, 1992), sobre cuyo sustrato crecen algunos de los individuos de cotas más bajas del núcleo principal.

Muestreo. Se muestrearon 54 individuos a lo largo y ancho de un transecto desde la cota más baja hasta la más alta que alcanza la especie en el núcleo principal, hasta encontrar el canal de la Presa de Los Pérez (donde la especie comienza a escasear). Este muestreo se reforzó siguiendo la carretera que

sube de Los Berrazales. Se muestreó un único individuo en las cercanías de El Sao, y ocho en el fondo del Barranco de Agaete, en las cercanías del tabuco y base de las paredes.

Estado de conservación. La población se encuentra actualmente en un estado estable en el núcleo principal, donde no se ha observado evidencia alguna de pastoreo. Si bien pudo haber sido lugar de paso de ganado hacia las dehesas superiores (por fuera del valle) en el pasado, actualmente existen ejemplares de la especie junto a los caminos y a orillas de la carretera. En cambio el núcleo del fondo del barranco se encuentra sometido a fluctuaciones periódicas, ya que existe ganado que deambula ocasionalmente por la zona, con el consiguiente ramoneo de la vegetación. No obstante, en el momento del muestreo se encontraron varios individuos de *Crambe pritzelii* a unas decenas de metros por debajo del tabuco. Solamente el núcleo del fondo del barranco se encuentra incluido dentro de un espacio protegido (Parque Natural de Tamadaba).

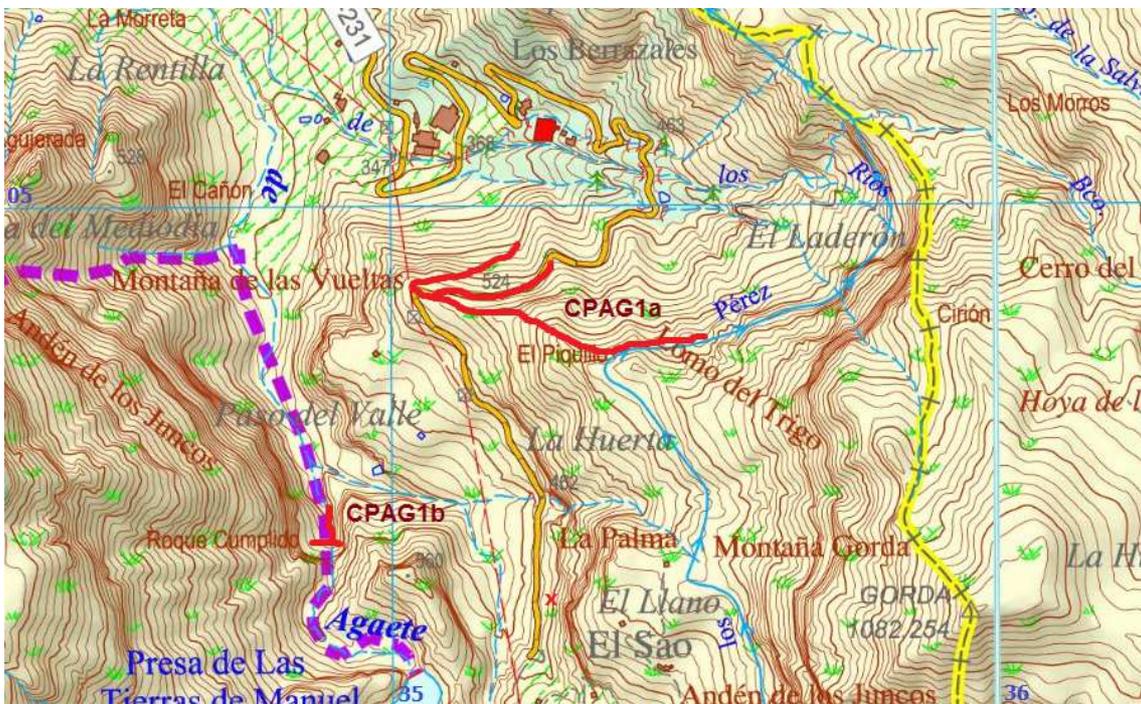


Figura II.3.6. Localización de las áreas muestreadas de la población de Los Berrazales-Agaete (CPAG1). Los número en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.

II.3.7 Barranco de Azuaje (CPAZ).

Localización y extensión. La especie se encuentra en un largo tramo del Barranco de Azuaje, además de en una localización puntual del pequeño Barranco del Pagador, cuyo núcleo dista unos 400 - 500 m de los de su vecino. La carretera que une los municipios de Firgas y Moya por su parte baja cruza la población a la mitad de su área de extensión. Sin embargo, en la mitad inferior la especie escasea bastante más debido a la menor proporción de hábitats apropiados, restringiéndose ésta a la ladera derecha del barranco (con orientación noroeste), y en núcleos cada vez más dispersos conforme se descende (en altitudes comprendidas entre los 120 y los 300 msnm). En la mitad superior la especie aparece de forma continua en las paredes y laderas a ambos lados, aunque la mayoría de sus efectivos se encuentran en las proximidades del mismo cauce. La especie deja de aparecer a una altitud del cauce de 325 m, alcanzando algunos núcleos los 425 msnm.

Aunque la especie se encuentra a lo largo de aproximadamente 3,5 km, su escasez en la mitad inferior de la población en Barranco de Azuaje y en las laderas alejadas del cauce en la mitad superior, hace que el número de efectivos no sea muy elevado. El área de ocupación en Azuaje se ha estimado en unas 8,5 Ha, con número estimado de 2.605 individuos reproductores. Para el núcleo del Barranco del Pagador se estimaron 405 individuos, que ocupan alrededor de 1 Ha.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Inframediterráneo xérico semiárido-inferior; inframediterráneo xérico semiárido-superior. Serie de vegetación: *Aeonio–Euphorbio canariensis* sigmetum (Rivas-Goday & Steve, 1965; Sunding, 1972); *Pistacio–Oleo cerasiformis* sigmetum (Del Arco *et al.*, 2002); *Visneo–Arbuto canariensis* sigmetum (Rivas-Martínez *et al.*, 1993). El rápido aumento de las precipitaciones con la altitud, unido al encajamiento del Barranco de Azuaje, que aporta mayor humedad, hace que en la zona pasemos en un corto espacio de la vegetación típica de los ambientes más xéricos hasta un ecotono con elementos más mesófitos (que cerca del fondo del barranco descienden por debajo de su rango altitudinal normal) y ligados al monteverde. Sin embargo, los matorrales de sustitución asociados a zonas

degradadas ocupan amplias zonas, como el tabaibal amargo (*Euphorbia regis-jubae*), o los matorrales nitrófilos de la asociación *Artemisia–Rumicetum lunariae*. En las laderas más alejadas del fondo del barranco abundan especies introducidas muy agresivas, como *Opuntia sp.*, *Agave americana*, *Pelargonium sp.* y *Rubus sp.* Aún así, en el lugar se encuentran varios endemismos restringidos, además de una importante saucedá.

Otros taxones amenazados. *Semele gayae* (VU), *Heberdenia excelsa* (VU), *Salix canariensis* (EN), *Solanum vespertilio* spp. *doramae* (CR), al parecer extinguida en estado silvestre.

Especies acompañantes. Por debajo de la carretera general: *Euphorbia regis-jubae*, *Echium decaisnei*, *Salvia canariensis*, *Rumex lunaria*, *Convolvulus floridus*, *Euphorbia balsamifera*, *Campylanthus salsoloides*, *Echium strictum*, *Pericallis webbii*, *Hypericum canariense*, *Aeonium percanium*, *Arundo donax*, *Dracunculus canariensis*, *Aeonium virgineum*, *Pelargonium sp.*

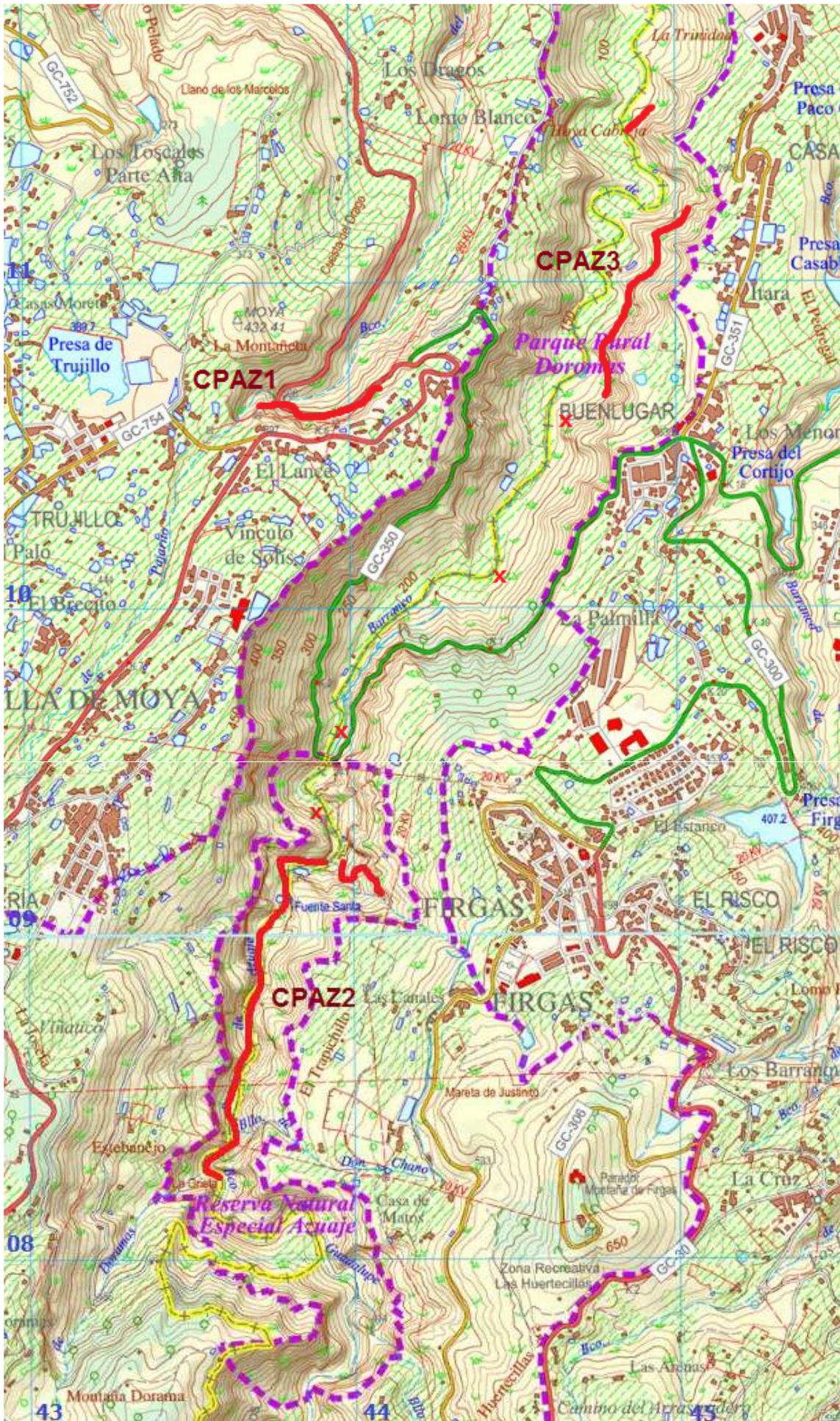
Por encima de la carretera general: *Hypericum canariense*, *Convolvulus floridus*, *Euphorbia regis-jubae*, *Artemisia canariensis*, *Salix canariensis*, *Rubus sp.*, *Arundo donax*, *Apollonias barbujana*, *Maytenus canariensis*, *Sonchus acaulis*, *Echium strictum*, *Dracunculus canariensis*, *Pericallis webbii*, *Canarina canariensis*, *Aeonium virgineum*, *Semele gayae*, *Picconea excelsa*, *Olea europaea* subsp. *guanchyca*, *Heberdenia excelsa*.

Geología. Los barrancos de Azuaje y del Pagador se excavan en amplias lomadas conformadas por el magmatismo basáltico del último ciclo eruptivo de la isla (Ciclo III): lavas y conos de tefra, con edades comprendidas entre los 2,9 y los 0,6 Ma (ITGME, 1992). Sin embargo, en las laderas cercanas al cauce de Azuaje predominan los afloramientos del Ciclo Roque Nublo (Ciclo II) entre los que se encaja el barranco: brechas ricas en líticas, y localmente ignimbritas, con edades comprendidas entre los 4,2 y los 4 Ma (ITGME, 1992). El núcleo del Barranco del Pagador se asienta a partes iguales entre los sustratos anteriormente mencionados del Ciclo III y afloramientos basálticos de Ciclo II: lavas y conos de tefra basanítico, basálticos alcalinos y tefríticos, con edades entre los 4,3 y los 3,5 Ma (ITGME, 1992).

Muestreo. En el núcleo del Barranco del Pagador, el transecto se realizó básicamente siguiendo la carretera general, dejándola puntualmente para el muestreo de algunos individuos elevados en la ladera. En el Barranco de Azuaje se recorrió el área que abarca la especie de un extremo a otro, siguiendo el fondo del barranco. Al ser más discontinua la planta en la parte baja de la población, se hicieron varios transectos en zonas de ladera del margen derecho del barranco, con varios muestreos puntuales (1-3 individuos) por el fondo. Se muestrearon 95 individuos, de los cuales 27 pertenecen al núcleo del Barranco de Pagador.

Estado de conservación. La población se encuentra en un estado estable en la actualidad, aunque en el Barranco de Azuaje los núcleos poblacionales inferiores se hallan rodeados por cultivos y otros usos como asentamientos humanos. En el núcleo del Barranco del Pagador las plantas se encuentran acantonadas en una ladera poco transitable sobre la carretera y bajo un acantilado sobre el que se asoman viviendas, y desde el que se arrojan grandes cantidades de escombros. La especie desaparece repentinamente en el extremo sur de la población, justo cuando acaba el encajamiento del barranco entre paredes verticales y vuelven a aparecer las evidencias los usos humanos, como viviendas (abandonadas), caminos por los que cruzaba el ganado, y cultivos. Aguas arriba se sitúa el emplazamiento de la cita de una población probablemente extinguida, Barranco de La Virgen (ver antecedentes corológicos de la especie). La mitad inferior de la población en Barranco de Azuaje se encuentra contenida en el Parque Rural de Doramas, y la mitad superior en la Reserva Natural Especial de Azuaje. El núcleo del Barranco del Pagador no se encuentra dentro de ningún espacio natural protegido.

Figura II.3.7 (página siguiente). Localización de las áreas muestreadas de la población de Azuaje (CPAZ). Los números en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.



II.3.8 Riscos Jiménez (CPJI).

Localización y extensión. La población se restringe a uno de los escarpes sobre el Barranco de Teror, en su margen derecho, justo bajo las casas del barrio de San José del Álamo, y abarcando poco más de 200 m longitudinales de dicho escarpe, entre los 475 y los 500 msnm. Como factor que limita su área de extensión, la preferencia de la especie por las áreas más sombreadas se añade a las reducidas dimensiones de este risco ,.

Se estimó una superficie total ocupada por la especie de 0,6 Ha, que equivale a unos 300 individuos reproductores.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Termomediterráneo pluviestacional seco inferior. Serie de vegetación: *Visneo–Arbuto canariensis* sigmetum (Rivas-Martínez *et al.*, 1993). La vegetación actual consiste en un matorral denso de sustitución en el que domina *Hypericum canariense* (asociación de sustitución de la climatófila, *Rhamno–Hypericetum canariensis*), enriquecido en algunos riscos con plantas más exigentes en suelo y humedad, o que se encuentran en situación de refugio. En los alrededores más inmediatos a la población existen parches de helechal de *Pteridium aquilinum*.

Otros taxones amenazados. En el lugar se encuentra la principal población de *Teline nervosa* (CR).

Especies acompañantes. *Hypericum canariense*, *Sonchus acaulis*, *Euphorbia regis-jubae*, *Eucaliptus sp.*, *Phillyrea angustifolia*, *Canarina canariensis*, *Pteridium aquilinum*, *Teline nervosa*, *Sonchus leptocephalus*, *Olea europaea* subsp. *guanchyca*, *Asphodelus aestivus*, *Pancratium canariensis*, *Bryonia verrucosa*, *Echium strictum*, *Davallia canariensis*, *Aeonium manriqueorum*, *Teline microphylla*, *Opuntia sp.*

Geología. En su tramo medio-bajo, el Barranco de Teror se excava en los materiales del segundo ciclo eruptivo (Ciclo Roque Nublo), que abundan en el cuadrante noreste de la isla. En el área donde se asienta la población, predominan materiales lávicos y de carácter básico: lavas y conos de tefra

basáníticos, basálticos alcalinos y tefríticos, con edades entre los 4,3 y los 3,5 Ma (ITGME, 1992).

Muestreo. En este caso y dado lo compacto del núcleo se realizó un único transecto rectilíneo de lado a lado de la población, recogiendo muestras de las plantas accesibles de la parte baja de las paredes. Se muestrearon 33 individuos.

Estado de conservación. La población se encuentra en estado fluctuante. Al lugar accede con cierta frecuencia un pequeño rebaño de cabras, cuyo redil se sitúa en el lomo superior. El estado de conservación de la especie en esta localidad parece además bastante precario: en el momento de la realización del censo (con posterioridad al muestreo) para el Proyecto AFA (Santana *et al*, 2009), se constató un área de ocupación similar al momento del muestreo (0,6 Ha) pero con un número de adultos reproductores bastante bajo (175 individuos). El lugar se encuentra dentro de los límites del Paisaje Protegido de Pino Santo.



Figura II.3.8. Localización de las áreas muestreadas de la población de Riscos Jiménez (CPJI). Los número en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.

II.3.9 Barranco de Antona (CPAN).

Localización y extensión. El principal núcleo de esta población se localiza en un área bastante puntual del Barranco de Antona (que se une aguas abajo al de Las Lagunetas), coincidiendo con una zona de afloramiento de paredes de la ladera derecha del barranco, a alturas comprendidas entre los 940 y los 1000 msnm, en orientación noroeste, y justo bajo una pronunciada curva de la carretera general de San Mateo a Cruz de Tejeda, conocida como “Vuelta de Antona”. Pese a haberse observado ejemplares de la especie algo más abajo, a 900 msnm (inventario 31 del Jardín Botánico Canario en Navarro *et al.*, 2002), deben considerarse como individuos dispersos, al igual que los que se observan en partes superiores de la ladera hasta las 1050 m de altitud.

En el censo realizado se estimó un área de ocupación de 1,5 Ha, equivalente a unos 600 individuos reproductores.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Termomediterráneo pluviestacional subhúmedo. Serie de vegetación climatófila: *Lauro–Perseo indicae* sigmetum (Oberdorfer ex Rivas-Martinez *et al.*, 1977). En el entorno de la población existe un pequeño relicto del bosque de laurisilva, conformado por pequeños grupos de árboles en situación rupícola, entre los que se intercalan algunos *Salix canariensis*, lo que denota una situación de humedad freática más o menos permanente. Otras áreas inmediatamente próximas están ocupadas por vegetación arbustiva de sustitución asociada a los escobonales (*Chamaecytisus proliferus*) y codesares (*Adenocarpus foliolosus*), aunque con abundancia de plantas de la orla más heliófila del monteverde.

Otros taxones amenazados. *Echium callithyrsum* (VU), *Bencomia caudata* (VU), *Aeonium undulatum* (VU), *Salix canariensis* (EN), *Scrophularia calliantha* (CR).

Especies acompañantes. *Laurus novocanariensis*, *Apollonias barbujana*, *Salix canariensis*, *Echium callithyrsum*, *Bencomia caudata*, *Chamaecytisus proliferus*, *Adenocarpus foliolosus*, *Dracunculus canariensis*, *Drusa glandulosa*, *Ranunculus cortusifolius*, *Aeonium manriqueorum*, *Aeonium undulatum*,

Canarina canariensis, *Carlina salicifolia*, *Pericallis webbi*, *Ferula linkii*, *Hedera helix* subsp. *canariensis*, *Scrophularia calliantha*, *Pteridium aquilinum*, *Artemisia canariensis*, *Rubus* sp., *Teline microphylla*.

Geología. El Barranco de Antona conforma un encajamiento relativamente modesto (con profundidades que alcanzan puntualmente los 200 m) entre materiales basálticos del Ciclo III (post Roque Nublo): lavas y conos de tefra, con edades comprendidas entre los 2,9 y los 0,6 Ma (ITGME, 1992). Estos materiales provienen de la misma cumbre central de la isla, y se expandieron en dirección noreste, provocando un rejuvenecimiento del modelado en las áreas actualmente ocupadas por los tramos, alto y medio, del Barranco de Guinguada, del que Antona es afluente. Al contrario que en su vecino y más profundo Barranco de Las Lagunetas, aquí no afloran materiales más antiguos del Ciclo II.

Muestreo. Se recorrió el camino que de la Vuelta de Antona baja al barranco y sigue su ladera derecha en dirección a Utiaca, aguas abajo. En su primera parte, ladera arriba, se recogieron muestras correspondientes a individuos dispersos (1-4) en varios puntos. Cerca del cauce, se pasa muy por debajo de una primera zona de paredes (primera mitad del núcleo, con *Salix canariensis* en situación rupícola), donde se muestrearon 12 individuos encontrados en pequeños grupos discontinuos. Más adelante se abandonó el camino a la altura de un espolón rocoso, para subirlo y entrar de lleno en el núcleo, y recorrerlo hacia el noreste (segunda mitad), siguiendo una tubería de agua que sale al lomo. En total se muestrearon 37 individuos.

Estado de conservación. La población se encuentra en un estado estable, con pequeñas recolonizaciones de los alrededores del núcleo principal, que forman pequeños grupos dispersos. Si bien el barranco formaba parte hasta hace al menos dos décadas de una importante área de pastoreo, en la actualidad estas actividades se encuentran en un progresivo abandono en la zona. Este pastoreo se centró más en la parte de la ladera inmediatamente al oeste de la población (donde predomina aún un pastizal nitrófilo que va siendo poco a poco colonizado por *Bencomia caudata*), y quizás barranco abajo

siguiendo el camino a Utiaca, dejando algo de lado este núcleo superviviente. El lugar no se encuentra contenido en ningún espacio protegido.

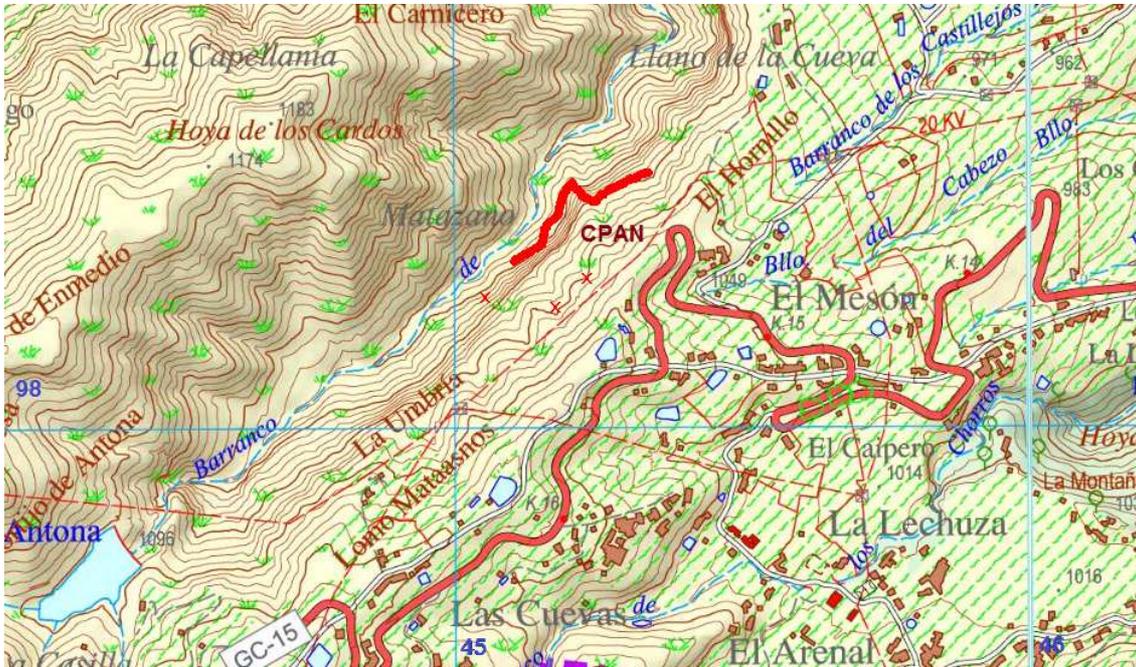


Figura II.3.9. Localización de las áreas muestreadas de la población de Barranco de Antona (CPAN). Los número en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.

II.3.10 Tenteniguada (CPTe).

Localización y extensión. El *locus classicus* de la especie abarca gran parte de la caldera de Tenteniguada, que se excava en el flanco este de la cumbre de la isla. A pesar de la extensión de la población, la especie se encuentra de forma discontinua, con la inmensa mayoría de los individuos conformando núcleos localizados en laderas sombreadas de los barranquillos, existiendo pequeños grupos e individuos dispersos en otras laderas. El extremo occidental donde se ha observado la planta es en el Barranco de La Coruña, con los ejemplares altamente concentrados en su cabecera. Otro núcleo poblacional importante es el del Barranquillo de La Pasadera. Prácticamente en contacto con el anterior se halla el de la ladera al norte del Roque Chico, que se prolonga al noreste hasta alcanzar el camino clásico a Los Roques. Más al este ya sólo se encuentra el pequeño núcleo de la pared norte de Roque Redondo, y los pequeños grupos dispersos encontrados en el Barranco de La Umbría. A unos 700 m al este, al otro lado del camino ganadero del Lomo de los Alfaques, la especie aparece localizada en los andenes que cierran el valle del Barranco de San Miguel por su lado sur (Los Espigones).

Se estimó una superficie real de ocupación por la especie de 19,75 Ha, equivalente a unos 8.425 individuos reproductores, de los cuales 7.865 (18,2 Ha) corresponden al circo de Tenteniguada y 560 (1,55 Ha) al núcleo de los andenes de Los Espigones.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Mesomediterráneo pluviestacional seco superior. Serie de vegetación climatófila: *Visneo–Arbuto canariensis* sigmetum (Rivas-Martínez *et al.*, 1993). En la actualidad la vegetación dominante corresponde a un matorral denso de recolonización en el que predominan *Teline microphylla*, *Chamaecytisus proliferus* y *Adenocarpus foliolosus*. En los paredones de diferentes roques encontramos comunidades rupícolas de la clase fitosociológica *Greenovio – Aeonietea* (Santos, 1976).

Otros taxones amenazados. Este lugar es refugio de interesantes endemismos, gracias en parte a la existencia de paredones en las cotas superiores. Aquí encontramos las mayores poblaciones de *Echium callithyrsum*

(VU) y *Scrophularia calliantha* (CR), con sus principales núcleos localizados en las cabeceras de los barrancos de La Coruña y del Corte (250 y 100 individuos respectivamente). Además se encuentran *Aeonium undulatum* (VU), *Silene tamaranae* (VU), *Orchis canariensis* (VU), *Heberdenia excelsa* (VU) y *Bencomia grex. caudata* (VU), con un importante núcleo en la cabecera del Barranco del Corte (1200 msnm) hallado por el autor de esta tesis.

Especies acompañantes. Barranquillo de La Pasadera: *Adenocarpus foliolosus*, *Chamaecytisus proliferus*, *Echium callithyrsus*, *Aeonium manriqueorum*, *Aeonium simsii*, *Aeonium spathulatum*, *Aeonium undulatum*, *Greenovia aurea*, *Pericallis webbi*, *Ranunculus cortusifolius*, *Argyranthemum audactum* subsp. *canariense*, *Teline microphylla*, *Carlina salicifolia*, *Paronychia canariensis*, *Hypericum reflexum*, *Hypericum grandifolium*, *Sonchus acaulis*, *Sonchus platylepis*, *Ferula linkii*, *Todaroa montana*, *Rubus* sp., *Silene tamaranae*, *Scrophularia calliantha*.

Los Espigones: *Chamaecytisus proliferus*, *Pinus canariensis* (de repoblación), *Echium callithyrsus*, *Hypericum grandifolium*, *Hypericum reflexum*, *Teline microphylla*, *Orchis canariensis*, *Aeonium manriqueorum*, *Lobularia canariensis*, *Carlina salicifolia*, *Tolpis* cf. *lagopoda*, *Davallia canariensis*, *Ferula linkii*, *Todaroa montana*, *Sonchus leptcephalus*, *Sonchus acaulis*, *Sonchus platylepis*, *Asphodelus aestivus*, *Pericallis webbi*, *Ranunculus cortusifolius*, *Carduus clavulatus*, *Prunus dulcis*, *Umbilicus* cf. *heylandianus*, *Laurus novocanariensis*, *Heberdenia excelsa*.

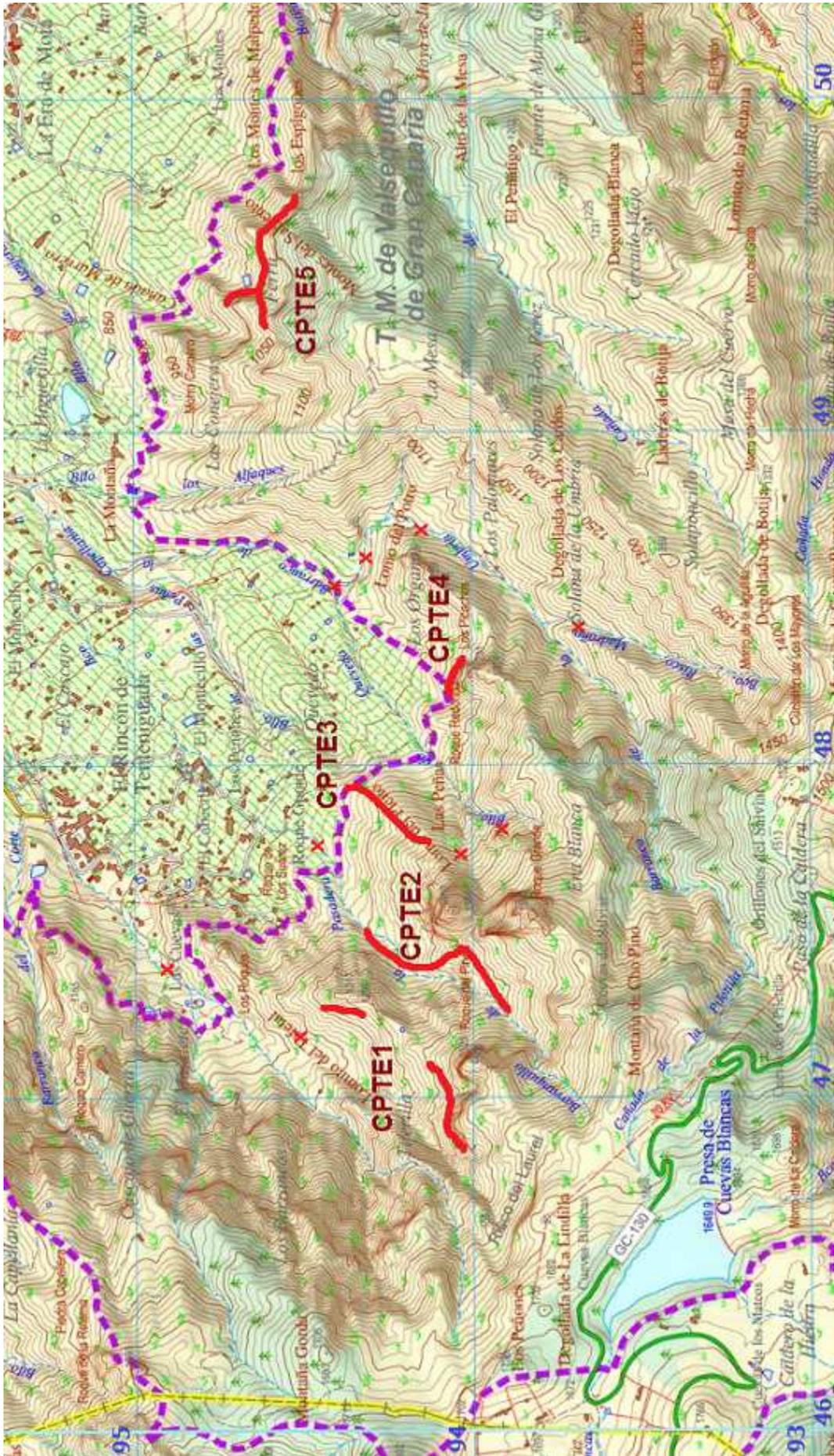
Geología. La caldera de Tenteniguada, de tipo erosivo, en donde afloran los materiales del Ciclo Roque Nublo (Ciclo II). Su geología es compleja. En las partes más bajas de la caldera encontramos materiales basálticos del Ciclo post Roque Nublo (Ciclo III), y en el Lomo de Los Alfaques: lavas y conos de tefra, con edades comprendidas entre los 2,9 y los 0,6 Ma (ITGME, 1992). En altitudes medias, entre 1100 y 1400 msnm, predominan los materiales básicos del Ciclo II: lavas y conos de tefra basanítico, basálticos alcalinos y tefríticos, con edades entre los 4,3 y los 3,5 Ma. En partes altas afloran pitones fonolíticos de fases finales del mismo ciclo eruptivo, como los del Roque Grande, Roque Chico y el Roque del Pino: intrusiones y localmente lavas

fonolíticas haüynicas, con edades entre los 3,7 y los 3,5 Ma. En los escarpes de Los Espigones los afloramientos del Ciclo II son de depósitos piroclásticos, por lo general de origen ácido: brechas ricas en líticos, y localmente ignimbritas, con edades comprendidas entre los 4,2 y los 4 Ma.

Muestreo. Dada la complejidad de la población, se optó por hacer varios transectos siguiendo diferentes caminos que atraviesan los principales núcleos. Así, se recorrieron los siguientes caminos: el que asciende por el Barranco de La Coruña y por el Lomo del Tafetal accede al núcleo de su cabecera; el que asciende por el Barranquillo de La Pasadera; el camino clásico a Los Roques, que asciende por el Lomo del Pleito; el que pasa bajo las paredes del Roque Redondoy el que recorre el fondo del Barranco de La Capellanía; recorrido por el andén de Los Espigones. Allí donde se encontraron solamente individuos dispersos (márgenes del área de distribución y en el Barranco de La Capellanía), se recogieron muestras puntualmente (de 1 ó 2 individuos). De esta forma, se recolectó una muestra representativa de toda la población, no hallándose ningún otro núcleo importante aparte de los atravesados por los transectos.

Estado de conservación. La población se halla en estado expansivo. Es, junto con Guayadeque, la única población de las dos especies de *Crambe* en estudio en donde un alto porcentaje de individuos se encuentra entre la vegetación de las laderas, y no a refugio de las paredes o a pie de éstas. No obstante, el núcleo de Los Espigones se encuentra restringido aún a algunas paredes y se halla muy cerca de donde pasta el ganado. En el límite occidental de este núcleo existe un vallado, al otro lado del cual todos los ejemplares que inicialmente proliferan, desaparecen después por el ramoneo. La población se encuentra íntegra dentro de los límites de la Reserva Natural Especial Los Marteles.

Figura II.3.10 (página siguiente). Localización de las áreas muestreadas de la población de Tenteniguada (CPTe). Los números en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.



II.3.11 Guayadeque (CPGY).

Localización y extensión. Es la mayor población de la especie, y se extiende de manera continua (entre los 475 y los 1350 m) a lo largo de cinco kilómetros en la ladera sur del Barranco de Guayadeque, que desde el extremo sureste de la cumbre central hace un recorrido casi rectilíneo hasta la costa. La planta comienza a aparecer a distancias variables según la zona del fondo del barranco desde donde se parta (a mayor distancia si es desde los núcleos habitados de Cuevas Bermejas o Montaña de Las Tierras). A media altura en la ladera abunda generalmente, hasta los relieves culminantes del lomo exterior. En cambio en la ladera de enfrente (con orientación sur) no se ha encontrado ni un solo ejemplar.

La superficie total ocupada por la especie se ha estimado en 124 Ha, equivalente a unos 49.530 individuos reproductores.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Inframediterráneo xérico semiárido-superior; termomediterráneo xérico semiárido-superior; termomediterráneo pluviestacional seco. Serie de vegetación climatófila: *Pistacio–Oleo cerasiformis* sigmetum (Del Arco *et al.*, 2002); *Pineo canariensis* sigmetum (Ceballos & Ortuño ex Sunding, 1972). La vegetación potencial, en unas tres cuartas partes del área de extensión de la población, correspondería a un bosque termófilo caracterizado por *Olea europaea* subsp. *guanchica* (encontramos ejemplares dispersos desde al este de Cuevas Bermejas hasta El Campanario). A partir de unos 1100 msnm se extendió en el pasado el pinar, atestiguado por los viejos ejemplares de *Pinus canariensis* del Risco de Los Pinos y algún ejemplar en el lomo exterior. Hoy en día las laderas están ocupadas por un denso matorral rico en especies, con especial abundancia de elementos termófilos como *Lavatera acerifolia* hasta unos 900 msnm, donde comienzan a dominar especies como *Teline microphylla*, *Chamaecytisus proliferus* y *Bupleurum salicifolium*. Sin embargo, la abundancia de *Euphorbia regis-jubae* en todas las cotas parece evidenciar un altísimo grado de antropización en el pasado y menor cobertura vegetal que en la actualidad.

Otros taxones amenazados. Entre otros factores, la considerable extensión

de áreas escarpadas en esta ladera posibilita la existencia de importantes poblaciones de *Kickxia pendula* (VU), *Silene tamaranae* (VU) y *Camptoloma canariensis* (VU) [nuevos núcleos poblacionales en los andenes de Higueras Canarias]. También se encuentra *Orchis canariensis* (VU) [nueva cita] y una pequeña población de *Helianthemum tholiforme* (EN). En áreas algo soleadas, como en Roque Negro, se halla *Parolinia platypetala* (CR). A pie de la población, bajo la cañada de Los Burros, existe una población de *Lotus sp.*

Especies acompañantes. Cañada de Los Burros, al este de las Higueras Sajarillas: *Euphorbia regis-jubae*, *Prunus dulcis*, *Lavatera acerifolia*, *Convolvulus floridus*, *Aeonium manriqueorum*, *Sonchus acaulis*, *Sonchus leptcephalus*, *Ononis angustissima*, *Artemisia canariensis*, *Rumex lunaria*, *Echium decaisnei*, *Kleinia neriifolia*, *Asphodelus aestivus*, *Ferula linkii*, *Carlina canariensis*, *Descurainia preauxiana*, *Pancratium canariensis*, *Pericallis webbi*, *Kickxia pendula*.

Bajo el Risco de Los Pinos: *Teline microphylla*, *Chamaecytisus proliferus*, *Bupleurum salicifolium*, *Descurainia preauxiana*, *Paronychia canariensis*, *Echium onosmifolium*, *Aeonium manriqueorum*, *Hypericum reflexum*, *Euphorbia regis-jubae*, *Sonchus acaulis*, *Prunus dulcis*, *Argyranthemum audactum* subsp. *canariense*, *Silene tamaranae*, *Kickxia pendula*, *Carlina cf. canariensis*, *Ranunculus cortusifolius*, *Pericallis webbi*, *Orchis canariensis*, *Helianthemum tholiforme*.

Geología. El Barranco de Guayadeque es un cauce muy encajado, con un perfil relativamente estrecho en forma de U, con paredes más o menos verticales y fondo plano. Su profundidad aumenta progresivamente en el ámbito de la población desde los 200 m en el extremo inferior hasta los 400 m en las partes superiores. Excluyendo su cabecera (cubierta por lavas y tefras de episodios recientes), se excava íntegramente en materiales de la serie Post Roque Nublo (Ciclo III): lavas, conos de tefra, “maares” y “fallout” basaníticos, nefeliníticos y localmente, melilíticos, con edades comprendidas entre los 2,9 y los 1,5 Ma (ITGME, 1992).

Muestreo. Tras comprobar que la especie se distribuye en la zona

conformando una única población continua, se desestimó la realización de un transecto de un extremo a otro por medio de la ladera, debido a la ausencia de andenes de largo recorrido, y a la existencia de riscos poco transitables, conformados por terreno muy inestable y cubierto de una densa vegetación. En su lugar se realizaron cuatro transectos (siguiendo antiguos caminos), que atraviesan la ladera desde el fondo del barranco hasta el lomo exterior, separados por distancias de entre 500 y 1400 m lineales. Estos transectos fueron, de este a oeste: por la ladera de las Higueras Sajarillas y la Cañada de Los Burros (475 – 650 msnm); desde Cuevas Bermejas en dirección sureste, por la ladera de La Umbría (600 – 820 msnm); por el conocido como Roque Negro, hasta la entrada de los andenes de las Higueras Canarias, y la degollada de la Cañada de La Gota (750 – 1100 msnm); frente a la Montaña de Las Tierras hasta el Risco de Los Pinos y bajando la Cañada del Canalizo (1025 – 1200 msnm). Estos caminos hacen recorridos amplios por las laderas y aprovechando diferentes andenes.

Estado de conservación. La población se encuentra en estado expansivo. En la actualidad, la especie aparece como un elemento más de la vegetación arbustiva de la ladera. Sin embargo, aún es difícil de observar en muchas de las partes bajas de las laderas, especialmente frente al caserío habitado de la Montaña de Las Tierras. En cambio sí es fácil de encontrar por todo el borde del lomo exterior, cerca de las paredes y laderas escarpadas. Esto parece deberse a que actualmente las acciones antrópicas adversas ocurren en el fondo del barranco, y a que esta especie aún no ha llegado a colonizar amplias zonas de las laderas bajas, ocupadas por bancales semiabandonados. La población se encuentra contenida en el Monumento Natural Guayadeque.

Figura II.3.11 (página siguiente). Localización de las áreas muestreadas de la población de Guayadeque (CPGY). Los números en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.

II.3.12 El Gallego – Amurga (CPGA).

Localización y extensión. En paredes y andenes con orientación norte y noreste de la parte oriental del Macizo de Amurga, en el sureste de la isla, a donde llega la influencia ocasional de los vientos alisios. La población se extiende a lo largo de un tramo considerable de 2 kilómetros, aunque con un área de ocupación muy limitada a estos espacios verticales. Se encuentra dividida en dos grandes núcleos, separados por solamente 300 m, aunque en diferentes barrancos: en la Umbría del Gallego, parte alta del barranco homónimo, continuando un poco más al este por el paredón sobre la pista que sube al Lomo de los Puercos (o de Las Fuentecillas), entre los 600 y los 725 msnm; y en la ladera derecha del Barranco de Las Palmas, bajo el caidero principal, prolongándose por los Andenes de La Palmita (donde es ya muy escasa y limitada a individuos inaccesibles), entre los 450 y 650 msnm. Se encontró además un pequeño núcleo en un lugar puntual del fondo de este mismo barranco, por encima del caidero.

Se estimó para la especie una superficie de ocupación real de 4,4 Ha, equivalente a aproximadamente 1.800 individuos reproductores, de los cuales 1.095 (2,2 Ha) pertenecen al Barranco del Gallego, 650 (2,1 Ha) al Barranco de Las Palmas por debajo del caidero, y 50 (0,1 Ha) al pequeño núcleo del Barranco de Las Palmas por encima del caidero.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Inframediterráneo xérico semiárido-inferior; inframediterráneo xérico semiárido-superior. Serie de vegetación climatófila: *Aeonio–Euphorbio canariensis* sigmetum (Rivas-Goday & Steve, 1965; Sunding, 1972); *Pistacio–Oleo cerasiformis* sigmetum (Del Arco *et al.*, 2002). El bosque termófilo en esta zona de la isla estaría caracterizado por la sabina (*Juniperus turbinata* subsp. *canariensis*), aunque mezclada con *Pinus canariensis* y *Olea europaea* subsp. *guanchica*. Sin embargo, actualmente sólo encontramos ejemplares aislados de estas tres especies en lugares inaccesibles. La vegetación dominante es el matorral de sustitución del sabinar, o *Euphorbio regis-jubae–Cistetum monspeliensis*, aunque rico en endemismos que se refugian en los riscos. En lugares con suelos profundos, como en la Umbría del Gallego, abunda el escobonal (*Chamaecytisus*

proliferus subsp. *meridionalis*). En los lugares más bajos de la subpoblación, en el Barranco de Las Palmas, encontramos un ecotono con especies más propias del cardonal - tabaibal, como *Rubia fruticosa*, *Kleinia neriifolia* y *Euphorbia canariensis*.

Otros taxones amenazados. Son localmente abundantes *Convolvulus glandulosus* (VU) y *Ruta oreojasme* (VU) [ambos taxones citados por primera vez en Saturno (2007), Soto (2010)]. Existe una población de *Limonium preauxii* (VU) en los alrededores del caidero de Las Palmas. En el núcleo por encima del caidero de Las Palmas encontramos *Sideritis grex dasygnaphala*, taxón de asignación controvertida y con poblaciones exiguas (Marrero, com. pers.).

Especies acompañantes. La Umbría del Gallego: *Chamaecytisus proliferus* subsp. *meridionalis*, *Ruta oreojasme*, *Cistus monspeliensis*, *Asphodelus aestivus*, *Pancratium canariensis*, *Euphorbia regis-jubae*, *Aeonium simsii*, *Sonchus acaulis*, *Arisarum vulgare*, *Todaroa montana*, *Echium onosmifolium*, *Descurainia preauxiana*, *Convolvulus glandulosus*, *Aeonium percanium*, *Aeonium manriqueorum*, *Atalanthus pinnatus*, *Chrysoprenanthes pendula*, *Pericallis webbii*, *Argyranthemum audactum* subsp. *gracile*, *Asparagus plocamoides*, *Bupleurum salicifolium*, *Rubia fruticosa*, *Micromeria helianthemifolia*, *Juniperus turbinata* subsp. *canariensis*, *Pinus canariensis*.

Barranco de Las Palmas, ladera derecha, por debajo del caidero: *Cistus monspeliensis*, *Psoralea bituminosa*, *Echium onosmifolium*, *Bupleurum salicifolium*, *Descurainia preauxiana*, *Rubia fruticosa*, *Euphorbia regis-jubae*, *Kleinia neriifolia*, *Ruta oreojasme*, *Argyranthemum audactum* subsp. *gracile*, *Lobularia canariensis*, *Pancratium canariensis*, *Euphorbia canariensis*, *Sonchus acaulis*, *Convolvulus glandulosus*, *Pericallis webbii*, *Micromeria helianthemifolia*, *Chrysoprenanthes pendula*, *Asparagus plocamoides*, *Juniperus turbinata* subsp. *canariensis*, *Olea europaea* subsp. *guanchica*.

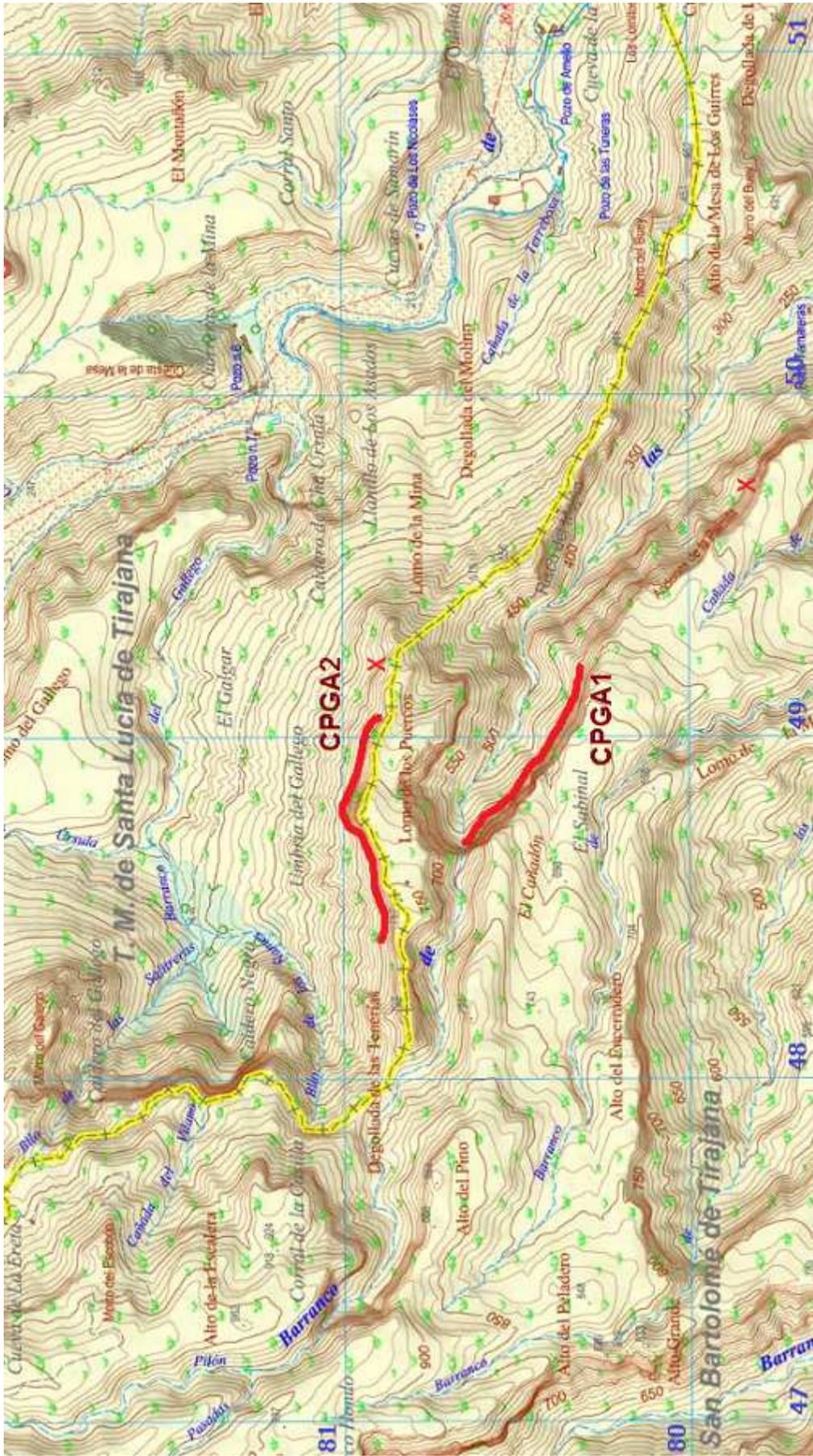
Geología. El Macizo de Amurga es un enorme apilamiento de coladas ácidas con forma de rampa triangular, con centros de emisión concentrados en su estrecho vértice superior. Es resultado del intenso episodio eruptivo de las últimas fases del primer ciclo constructivo de la isla (Ciclo I): fonolitas

nefeliníticas y traquitas (en el entorno de la población exclusivamente fonolitas), predominantemente lavas, con edades comprendidas entre 12 y 9,7 Ma (ITGME, 1992). Los barrancos, de Gallegos y de Las Palmas, se excavan en estos duros materiales, con un perfil en forma de U.

Muestreo. Una vez comprobado que la especie se distribuye en dos núcleos principales, se realizó un transecto en cada uno de ellos, aprovechando los grandes andenes transitables que se encuentran entre las diferentes coladas que conforman este tipo de relieves. Se muestreó un total de 91 individuos: 62 pertenecen a la Umbría del Gallego, con dos de ellos en un pequeño grupo, a 200 m al este del extremo de este núcleo, en la pista que sube al Lomo de los Puercos; y 29 al Barranco de Las Palmas, por debajo del gran caidero, donde casi todos se recolectaron en los primeros 500 m a partir del caidero, ya que más adelante todos los ejemplares observados se hallaban en lugares inaccesibles, pudiéndose recolectar dos individuos situados ya en el extremo de la población, a unos 800 m del resto.

Estado de conservación. La población se encuentra en estado fluctuante, debido a la visita ocasional de ganado caprino, proveniente de los tramos bajos de los barrancos de Tirajana y de Las Palmas. Cuando estas visitas se producen, el número de ejemplares adultos puede verse reducido a aproximadamente la mitad, como se observó en el núcleo de La Umbría del Gallego con posterioridad al muestreo y al censo realizado para el proyecto AFA (Santana *et al.*, 2008), con una eliminación casi total de efectivos en el andén y demás escarpes por debajo de las paredes verticales. En el núcleo del Barranco de Las Palmas, las fluctuaciones de tamaño poblacional parecen más frecuentes debido a la escasez de individuos accesibles y a los efectos observados en años consecutivos sobre la vegetación, principalmente en la mitad más cercana a las explotaciones ganaderas. La población se encuentra contenida íntegramente en el Lugar de Importancia Comunitaria (LIC) de Amurga.

Figura II.3.12 (página siguiente). Localización de las áreas muestreadas de la población de El Gallego (CPGA). Los números en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.



II.3.13 Tamadaba (CTTA).

Localización y extensión. La mayor población de este taxón se encuentra en los paredones y andenes altos del Macizo de Tamadaba, en toda su vertiente de Guayedra, desde el norte de Barranco Oscuro hasta el andén de Taguante al oeste de Montaña Faneque, entre los 700 y 1000 msnm, aunque puede descender hasta los 550 msnm en lugares puntuales como en el Barranco de los Palos Blancos. La especie se encuentra de manera continua por todo el área de distribución, a lo largo de 4 km siguiendo los andenes. Sin embargo su abundancia es muy variable, dependiendo de la accesibilidad al ganado de los riscos donde se encuentra.

En el censo realizado, se estimó un área de ocupación total de 54 Ha, equivalente a unos 12.000 individuos reproductores.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Termomediterráneo pluviestacional seco. Serie de vegetación climatófila: *Visneo–Arbuto canariensis* sigmetum (Rivas-Martínez *et al.*, 1993); *Pineo canariensis* sigmetum (Ceballos & Ortuño ex Sunding, 1972). La vegetación residual corresponde a un ecotono entre el bosque de laurisilva seco y el pinar, que desciende a estas cotas debido al sustrato sálico. En las orientaciones más edafoxéricas se entremezclan elementos del bosque termófilo. Existe una variada vegetación de sustitución: helechales de *Pteridium aquilinum*, matorral de sustitución del termófilo y del pinar (*Euphorbio regis-jubae–Cistetum monspeliensis*), matorral nitrófilo de *Ononis angustissima* y pastizales nitrófilos de *Echio–Galactition* en las zonas más transitadas por el ganado. Además, la potencia y extensión considerable de estos riscos hace que sean refugio de una ingente cantidad de endemismos amenazados.

Otros taxones amenazados. Tienen importantes poblaciones en el lugar: *Heberdenia excelsa* (VU), *Descurainia artemisioides* (EN), *Sventenia bupleroides* (VU), *Teline rosmarinifolia* subsp. *eurifolia* (VU) y *Dendriopoterium menendezii* (VU). También encontramos *Cheirolophus arbutifolius* (VU), *Asplenium hemionitis* (VU), *Pteris incompleta* (VU), *Micromeria pineolens* (EN), *Helianthemum tholiforme* (EN), *Sideritis guayedrae* (CR) y las extremadamente

raras *Gonospermum oshanahanii* (CR) y *Globularia ascanii* (CR). En el lugar existen ejemplares de taxones probablemente no descritos de *Sideritis grex. dasygnaphala* y *Teline grex. canariensis*. Cabe mencionar por último a *Pericallis tussilaginis*, taxón endémico de Tenerife y Gran Canaria que no está considerado como amenazado, pero es muy raro en esta isla.

Especies acompañantes. Andenes de la Tortolita, entre Barranco Oscuro y el Barranco de los Palos Blancos: *Heberdenia excelsa*, *Visnea mocanera*, *Laurus novocanariensis*, *Picconia excelsa*, *Pinus canariensis*, *Olea europaea* subsp. *guanchica*, *Cistus horrens*, *Cistus monspeliensis*, *Chrysoprenantes pendula*, *Sventenia bupleroides*, *Echium strictum*, *Teline rosmarinifolia* subsp. *eurifolia*, *Descurainia artemisioides*, *Sonchus acaulis*, *Pteridium aquilinum*, *Erica arborea*, *Myrica faya*, *Ilex canariensis*, *Asplenium hemionitis*, *Dendriopoterium menendezii*, *Lavatera acerifolia*, *Convolvulus canariensis*, *Carlina* cf. *salicifolia*, *Geranium canariensis*, *Hedera helix* subsp. *canariensis*, *Maytenus canariensis*, *Hypericum canariense*, *Asphodelus aestivus*, *Pteris incompleta*, *Cheirolophus arbutifolius*, *Persea indica*, *Pericallis tussilaginus*, *Sideritis guayedrae*, *Sideritis grex. dasygnaphala*, *Teline grex. canariensis*, *Ageratina adenophora*, *Ononis angustissima*, *Salvia canariensis*, *Euphorbia regis-jubae*.

Entre Montaña Faneque y el Morro de las Lechugas, andenes altos: *Cistus horrens*, *Cistus monspeliensis*, *Pinus canariensis*, *Micromeria pineolens*, *Sonchus acaulis*, *Tolpis lagopoda*, *Greenovia aurea*, *Erica arborea*, *Asphodelus aestivus*, *Dendriopoterium menendezii*, *Pericallis webbii*, *Ranunculus cortusifolius*, *Hypericum reflexum*, *Bystropogon origanifolius*, *Arisarum vulgare*, *Ferula linkii*, *Micromeria varia*, *Argyranthemum audactum* subsp. *canariense*, *Sideritis grex. dasygnaphala*, *Helianthemum tholiforme*.

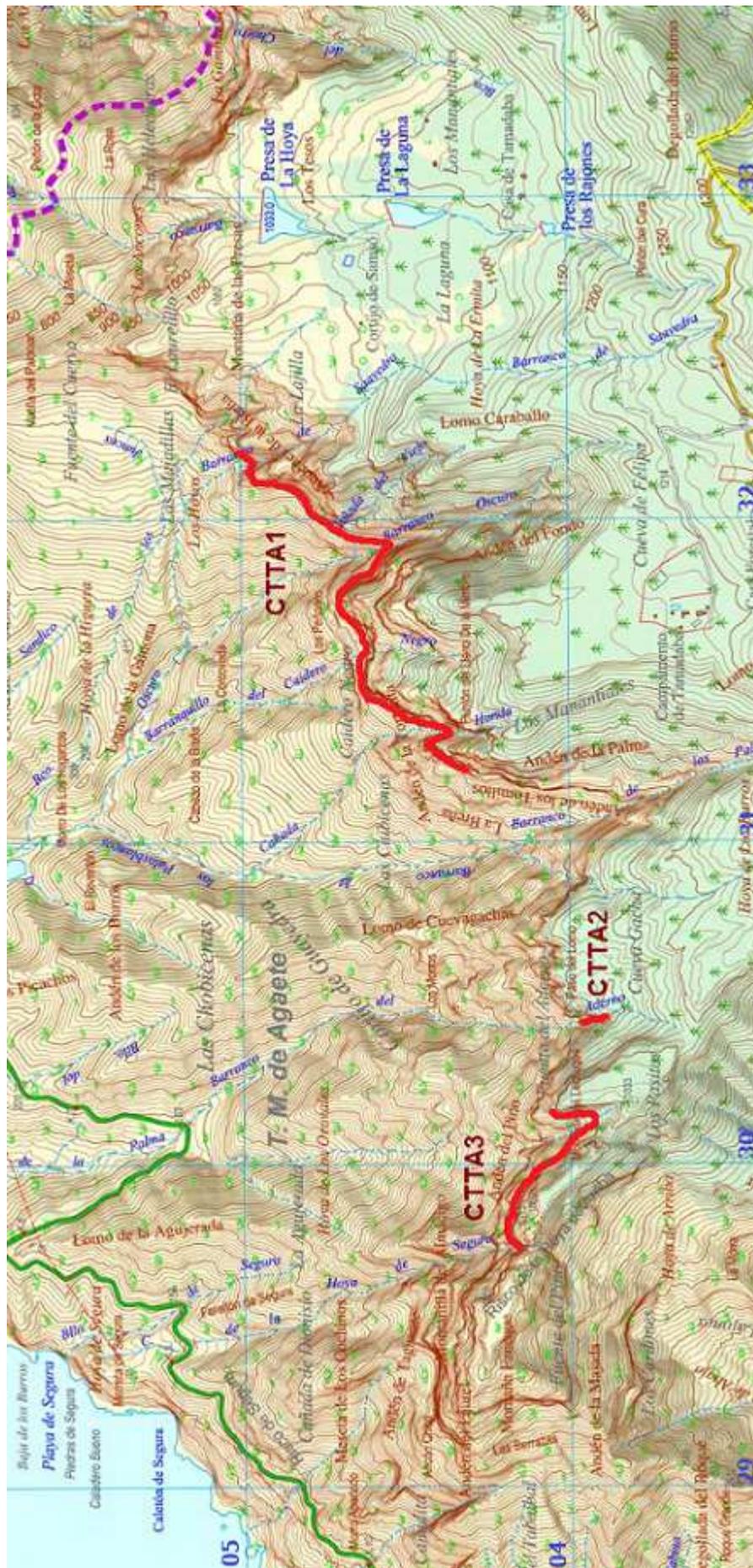
Geología. El Macizo de Tamadaba es un antiguo relieve culminante del borde de la antigua caldera que se formó en el centro de la isla (paleocaldera de Tejeda) durante su primera etapa constructiva. Los materiales posteriores (siempre sálicos) la rellenaron y llegaron a rebosar ampliamente, creando un enorme edificio cupuliforme con sus cotas más altas desplazadas hacia el oeste de la isla. En el área de Guayedra, por lo general a una altitud de unos 700 msnm, se aprecia claramente la discordancia entre las rocas a ambos

lados del borde de la antigua caldera. Por encima de esta discordancia los materiales son de la fase sálica intracaldera del Ciclo I: ignimbritas traquítico-riolíticas, lavas, brechas y sedimentos tobáceos, con edades comprendidas entre los 13,4 y los 11 Ma (ITGME, 1992). En pequeñas áreas del borde exterior, como en Montaña Faneque, afloran ignimbritas riolítico-mugearíticas, con edad aproximada de 13,4 Ma. Por debajo, la erosión ha dejado al descubierto los materiales basálticos previos: lavas y conos de tefra basálticos alcalinos, olivínicos-piroxénicos y hawaííticos indeferenciados, con edades que van desde los 14 a los 13,4 Ma (aunque no se encontraron individuos de *Crambe tamadabensis* creciendo sobre este sustrato).

Muestreo. Debido a la imposibilidad de realizar el muestreo de la población entera en una sola jornada, se realizaron dos grandes transectos: uno desde los Andenes de La Breña (muy cerca del extremo este) hasta la ladera derecha del Barranco de los Palos Blancos, siguiendo una cota aproximada de 750 msnm; y otro siguiendo los andenes altos desde el este de Montaña Faneque hasta por debajo del Morro de Las Lechugas, a unos 950 msnm y reforzando el muestreo con individuos de la cabecera del Barranco del Aderno a unos 850 msnm. En total se muestrearon 84 individuos, de los cuales 31 pertenecen al primer transecto, 32 al segundo y 21 a la cabecera del Barranco del Aderno.

Estado de conservación. La población se encuentra en un estado estable. Abunda localmente, pero ve limitada su propagación más allá de las paredes debido a la proliferación de ganado cabrío cimarrón. No obstante, existen algunas zonas amplias donde la especie prácticamente desaparece, como en los alrededores del Barranco de los Palos Blancos o entre el Morro de las Lechugas y el Barranco del Aderno, debido a la accesibilidad general de estos riscos al ganado cimarrón. La población se encuentra incluida en su totalidad en el Parque Natural de Tamadaba.

Figura II.3.13 (página siguiente). Localización de las áreas muestreadas de la población de Tamadaba (CTTA). Los números en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.



II.3.14 Montaña de Amagro (CTAM).

Localización y extensión. Se trata de un enclave puntual de la cumbre de la Montaña de Amagro, en el extremo noroeste de la isla. La especie ocupa los escarpes de la cima más occidental, en unos paredones con orientación oeste y noroeste, y a una altitud de 400-465 m.

Esta población ocupa un área de 0,6 Ha, equivalente a unos 300 individuos reproductores.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Inframediterráneo xérico semiárido-inferior; inframediterráneo xérico semiárido-superior. Serie de vegetación: *Aeonio–Euphorbio canariensis* sigmetum (Rivas-Goday & Steve, 1965; Sunding, 1972); *Pistacio–Oleo cerasiformis* sigmetum (Del Arco *et al.*, 2002). A pesar del emplazamiento algo elevado en el noroeste de la isla, predominan especies climácicas de las formaciones de cardonal-tabaibal, en situación ecotónica con especies relacionadas al bosque termófilo. El lugar se encuentra intensamente invadido por *Opuntia dillenii*.

Otros taxones amenazados. Existe una importante población de *Limonium sventenii* (EN). Además se encuentra *Argyranthemum lidii* (EN), y la única población existente del más raro endemismo de la isla, *Sideritis amagroii* (CR). A escasos metros existe una población de *Jasminium odoratissimum*, taxón endémico canario que, aunque no se encuentra catalogado como amenazado, es muy raro en esta isla.

Especies acompañantes. *Euphorbia balsamifera*, *Euphorbia canariensis*, *Lavandula canariensis*, *Opuntia dillenii*, *Argyranthemum frutescens*, *Echium strictum*, *Argyranthemum lidii*, *Helianthemum canariense*, *Campylanthus salsoloides*, *Euphorbia regis-jubae*, *Aeonium manriqueorum*, *Aeonium percanium*, *Phagnalon saxatile*, *Kleinia neriifolia*, *Lycium intricatum*, *Ceropegia fusca*, *Limonium sventenii*, *Olea europaea* subsp. *guanchica*, *Sideritis amagroii*.

Geología. La Montaña de Amagro es un testigo erosivo (y relativamente aislado) de los apilamientos de coladas ácidas en forma de rampa emitidos

durante el intenso episodio eruptivo de las últimas fases del primer ciclo constructivo de la isla (Ciclo I): fonolitas nefeliníticas y traquitas, predominantemente lavas, con edades comprendidas entre 12 y 9,7 Ma (ITGME, 1992).

Muestreo. Se caminó un andén situado en la base del paredón, que recorre toda la parte baja de la población. El transecto se completó recolectando material de ejemplares de la cima y del lomo que se prolonga al noroeste. En total se muestrearon 32 individuos.

Estado de conservación. La población se encuentra en la actualidad en un estado estable. En los últimos años ha ido colonizando la parte más alta del lomo al noroeste de la cima occidental de la montaña. No obstante, aún se encuentra limitada a un espacio muy reducido, y en clara competencia con una especie muy invasora como es *Opuntia dillenii*, que forma rodales masivos y se ve favorecida en ambientes rupícolas. Por el lugar hace ya varias décadas que no pasa ningún tipo de ganado doméstico. La población se encuentra contenida en el Monumento Natural de Amagro.

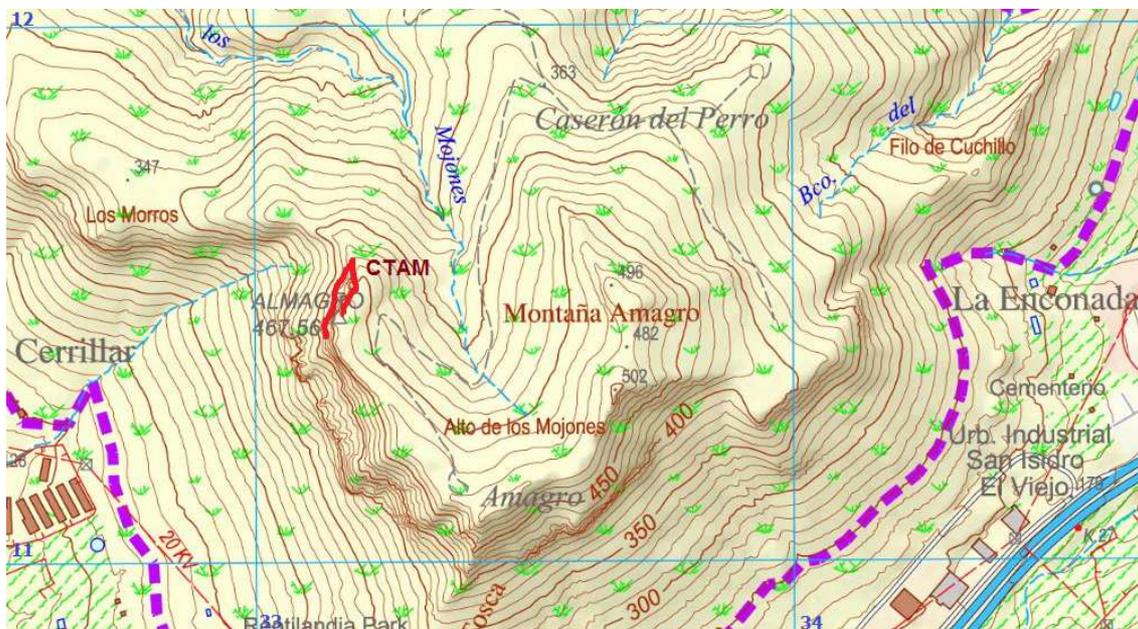


Figura II.3.14. Localización de las áreas muestreadas de la población de Montaña de Amagro (CTAM). Los número en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.

II.3.15 Montaña de Guía (CTGU).

Localización y extensión. La especie se encuentra en paredes y piedemontes que circundan la cima de la Montaña de Guía, en alturas comprendidas entre los 375 y los 550 msnm. La población se encuentra fragmentada en varios núcleos de muy pequeño tamaño salvo el principal, situado en la cara oeste de la montaña, que se extiende a lo largo de aproximadamente 400 m lineales de paredes y en el andén al pie de éstas. En la cara este de la montaña existen dos núcleos puntuales, a unos 400 m del principal y separados entre sí por unos 250 m. A escasos 150 m, pero en la ladera de enfrente del Barranco de Gáldar, existe otro núcleo limitado a los 50 m longitudinales de una pequeña pared. Por último, existe un último núcleo en el pequeño caidero del Barranco de Ansó, situado a unos 650 m al suroeste del principal.

Se estimó para la especie una superficie de ocupación de 2,2 Ha, equivalente a aproximadamente 700 individuos reproductores, de los cuales 400 (1 Ha) pertenecen a la cara oeste de la montaña, 150 (0,8 Ha) a los núcleos de la cara este, 50 (0,2 Ha) al núcleo del Barranco de Gáldar, y 100 (0,2 Ha) al caidero del Barranco de Ansó.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Inframediterráneo xérico semiárido-superior. Serie de vegetación climatófila: *Pistacio–Oleo cerasiformis* sigmetum (Del Arco *et al.*, 2002). La vegetación actual se encuentra sumamente degradada por las actividades antrópicas históricas, dominando los matorrales nitrófilos de la asociación *Artemisio–Rumicetum lunariae*, con elementos más agresivos de la alianza *Aeonio–Euphorbion canariensis* (Sunding, 1972). Algunas áreas se encuentran intensamente invadidas por *Opuntia ficus-barbarica*.

Otros taxones amenazados. *Sideroxylon canariensis* (EN), *Pericallis appendiculata* var. *preauxiana* (En peligro de extinción, Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias en el Decreto 151/2001 [BOC, 2001]) [núcleo del caidero del Barranco de Ansó]. Cabe mencionar a *Jasminum odoratissimum* (ver ficha de la población de Amagro), que tiene aquí su mayor población en la isla.

Especies acompañantes. Montaña de Guía, ambas caras: *Convolvulus floridus*, *Whitania aristata*, *Euphorbia regis-jubae*, *Periploca laevigata*, *Aeonium percarneum*, *Aeonium manriqueorum*, *Aeonium virgineum*, *Echium decaisnei*, *Echium strictum*, *Olea europaea* subsp. *guanchica*, *Phillyrea angustifolia*, *Lavandula canariensis*, *Lobularia canariensis*, *Bryonia verrucosa*, *Kleinia neriifolia*, *Rumex lunaria*, *Opuntia ficus-barbarica*, *Agave americana*, *Jasminum odoratissimum* (cara este), *Sideroxylon canariensis* (cara oeste).

Geología. La Montaña de Guía es un testigo erosivo de los apilamientos de coladas ácidas en forma de rampa emitidos durante el intenso episodio eruptivo de las últimas fases del primer ciclo constructivo de la isla (Ciclo I): fonolitas nefeliníticas y traquitas, predominantemente lavas, con edades comprendidas entre 12 y 9,7 Ma (ITGME, 1992).

Muestreo. El núcleo de la cara oeste se recorrió de un extremo a otro siguiendo el andén bajo la pared principal de la cara oeste de la montaña. Se muestreó también uno de los escasos individuos dispersos hallados en las laderas superiores, más accesibles, de la cara oeste. En los núcleos de la cara este se accedió puntualmente, a pie de las paredes, aunque separando las muestras en el espacio. Del núcleo de la ladera derecha del Barranco de Gáldar se recolectaron igualmente muestras a pie de pared. En total se recogieron 41 muestras, de las cuales 24 corresponden a la cara oeste de la montaña, 8 a la cara este y 9 a la ladera derecha del Barranco de Gáldar.

Estado de conservación. La población se encuentra en estado fluctuante. Con posterioridad al muestreo, se observó que por el entorno del núcleo de la cara oeste de la montaña había pastado ganado doméstico, con una disminución drástica del número de ejemplares adultos, superior al cincuenta por ciento (la mayoría de los ejemplares crecían en zonas accesibles, al tiempo que el paredón vertical de la cara oeste ofrece muy poco espacio aprovechable por la especie). La población no se encuentra contenida en ningún espacio natural protegido.

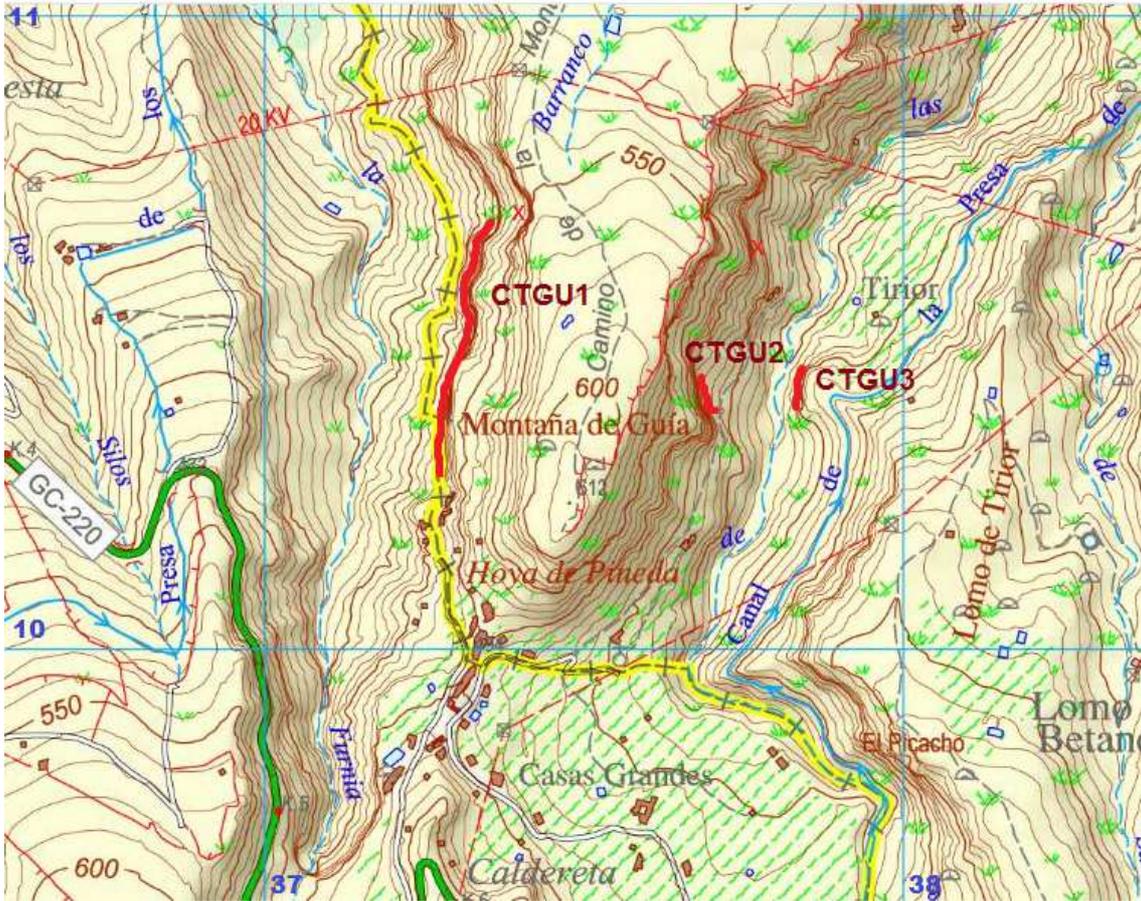


Figura II.3.15. Localización de las áreas muestreadas de la población de Montaña de Guía (CTGU). Los número en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.

II.3.16 Cuesta de Silva (CTSI).

Localización y extensión. La población se localiza en la actualidad de manera puntual en la parte baja del Barranco del Calabozo, en los escarpes del Risco Alto del Cabro, en orientaciones norte y oeste, entre los 225 y los 300 msnm. Esta localización se sitúa ligeramente por encima de la conocida como Cuesta de Silva, por donde pasa la antigua carretera general a Guía y Gáldar.

La superficie de ocupación estimada para la especie fue de 0,8 Ha, equivalente a unos 400 individuos reproductores.

Fitosociología y vegetación actual. Piso bioclimático: Inframediterráneo xérico semiárido-superior. Serie de vegetación: *Pistacio–Oleo cerasiformis* sigmetum (Del Arco *et al.*, 2002). La vegetación actual se encuentra muy degradada, con abundancia de pastizales nitrófilos de la asociación *Cenchrus ciliaris–Hyparrhenietum hirtae* y de especies del piso basal (alianza *Aeonio–Euphorbion canariensis* [Sunding, 1972]). Sin embargo, actualmente existen evidencias de expansión de ciertos elementos arbustivos como *Hypericum canariense*.

Otros taxones amenazados. No se encontraron.

Especies acompañantes. *Convolvulus floridus*, *Whitania aristata*, *Hypericum canariense*, *Phillyrea angustifolia*, *Aeonium virgineum*, *Echium strictum*, *Asparagus umbellatus*, *Euphorbia regis-jubae*, *Lavandula canariensis*, *Pancratium canariensis*, *Hyparrhenia sinaica*, *Sonchus acaulis*, *Davalia canariensis*, *Ferula linkii*, *Bryonia verrucosa*, *Arisarum vulgare*, *Sonchus leptocephalus*, *Periploca laevigatae*, *Kleinia neriifolia*, *Psoralea bituminosa*, *Hyparrhenia hirta*, *Oxalis pes-caprae*, *Eucalyptus sp.*

Geología. Risco Alto del Cabro es parte de uno de los afloramientos de coladas ácidas que caracterizan algunos de los relieves de las medianías bajas del norte de Gran Canaria. Estos materiales fueron emitidos durante el intenso episodio eruptivo de las últimas fases del primer ciclo constructivo de la isla (Ciclo I): fonolitas nefeliníticas y traquitas, predominantemente lavas, con

edades comprendidas entre 12 y 9,7 Ma (ITGME, 1992).

Muestreo. Se recogieron muestras espaciadas siguiendo la base de las paredes. También se hizo un recorrido por el espolón que forma el risco a la altura de la curva del barranco, hasta llegar a los llanos superiores. Se recolectaron muestras de 29 individuos.

Estado de conservación. Considerando el reducido tamaño del enclave y la distribución de los individuos en lugares poco accesibles o al pie de las paredes, la población puede encontrarse aún en estado fluctuante. Por el borde inferior de la población pasa un camino que cruza el Barranco del Calabozo, y es usado esporádicamente para el paso del ganado; en el momento del muestreo se encontraron individuos de la especie parcialmente ramoneados, junto a otros aparentemente intactos. Varios años después se constató que la especie había vuelto a colonizar áreas de ladera en el extremo sur del núcleo poblacional, con ejemplares floreciendo en medio de un pastizal de *Oxalis pes-caprae*. El lugar no se encuentra dentro de los límites de ningún espacio natural protegido.

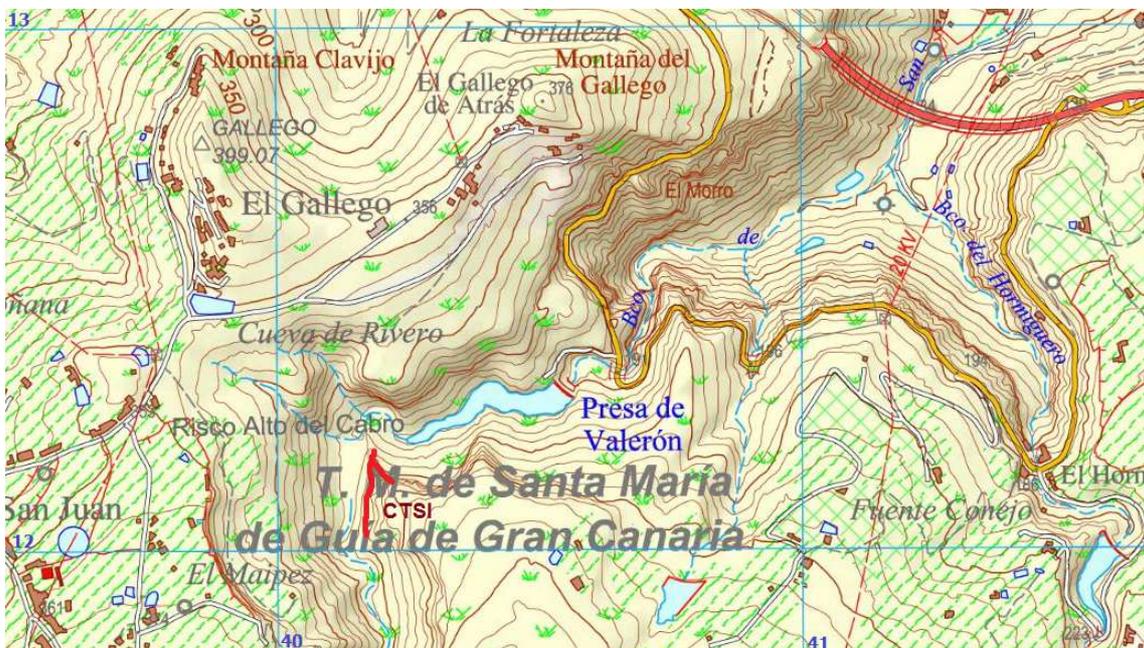


Figura II.3.16. Localización de las áreas muestreadas de la población de Cuesta de Silva (CTSI). Los número en los márgenes corresponden a cuadrículas U. T. M de 1x1 km.

II.3.17 Análisis isoenzimáticos.

Fundamentos de la técnica de electroforesis de isoenzimas.

La electroforesis de aloenzimas permite estimar la variabilidad genética en los *loci* analizados, ya que cada enzima está codificada por un *locus* determinado del ADN y tiene distintas formas o electromorfos (que corresponden a diferentes alelos) que se pueden detectar por su migración diferencial según su carga eléctrica (Kephart, 1990). La técnica de electroforesis horizontal de proteínas en gel de almidón implica tres procesos: la obtención de extractos proteicos, la separación electroforética de las enzimas y las tinciones enzimáticas.

La separación electroforética de las diferentes enzimas se realiza en un gel de almidón, que constituye un soporte no tóxico, y cuyo tamaño de poro es similar al tamaño de las proteínas, produciendo por tanto una especie de tamiz que permite la separación entre las proteínas cuando éstas se desplazan a través del campo eléctrico. El gel se cubre con un tampón de electroforesis cuyo pH junto a la composición del gel son claves para asegurar que las proteínas se mantienen fisiológicamente activas durante el proceso de migración. Por tanto, durante la electroforesis, las proteínas deben mantener intacta su estructura tridimensional cuaternaria (y por tanto su funcionalidad) para ser detectadas con posterioridad. El proceso de tinción enzimática se basa en la actuación de la enzima sobre su sustrato específico para generar un producto resultante de la catálisis enzimática. Es necesaria además la actuación de un coenzima (NAD o NADP) que recoja los electrones desde el sustrato reducido. Mediante estas reacciones acopladas, la zona del gel donde está actuando la enzima se vuelve visible en forma de banda coloreada. El patrón de bandas isoenzimáticas obtenido en un gel se denomina zimograma. En la mayoría de tinciones, la PMS (fenacina metosulfato) acepta electrones desde el coenzima NAD(P)H y reduce las sales de tetrazolium (MTT). El MTT reducido tiene color azul oscuro y se vuelve insoluble en agua, formando la banda coloreada que se observa en el zimograma.

Para la puesta a punto de la técnica en *Crambe sectio Dendrocrambe*, se realizaron pruebas con un número elevado de enzimas, que se ensayaron

en diferentes sistemas de gel/electrodo, a la vez que se fue ajustando la concentración óptima del almidón. La metodología de la técnica se realizó siguiendo los protocolos contenidos en Caujapé-Castells *et al.* (2001).

Obtención y almacenamiento de extractos proteicos.

Se machacó aproximadamente 1 cm² de hoja por cada muestra en un mortero de vidrio, utilizando 500 µl del tampón de extracción usado por Shields *et al.* (1983), que es adecuado para preservar la actividad enzimática y prevenir la oxidación de las enzimas. El extracto así obtenido se embebió en tiras de papel de filtro Whatman nº3 de aproximadamente 1 x 0,4 cm, retirando a continuación el exceso de extracto. Seguidamente, estas tiras se almacenaron en tubos Eppendorf en el ultra-congelador a -80° C hasta el momento de la electroforesis.

Ensayos y tinción de las enzimas.

Las electroforesis fueron realizadas en geles horizontales de almidón al 12.5% p/v (que equivale a 31 g de almidón para 250 ml de gel). Se ensayaron 3 sistemas tampón gel/electrodo (cuyas características se detallan en la Tabla II.3.2), denominados según su composición y pH.

Las enzimas ensayadas fueron las siguientes (se mencionan junto con sus abreviaciones y códigos, asignados por la Enzyme Commission): *alcohol deshidrogenasa* (ADH, E.C.1.4.1.2), *esterasa* (EST, E.C.3.1.1.1), *glutamato deshidrogenasa* (GDH, E.C.1.4.1.2), *glutamato oxalacetato transaminasa* (GOT, E.C. 2.6.1.1), *isocítrico deshidrogenasa* (IDH, E.C. 1.1.1.42), *malato deshidrogenasa* (MDH, E.C.1.1.1.37), *enzima málica* (ME, E.C.1.1.1.40), *menadiona reductasa* (MNR, E.C.1.6.99.2), *fosfoglucoisomerasa* (PGI, E.C.5.3.1.9), *fosfoglucomutasa* (PGM, E.C.5.4.2.2), *shikimato deshidrogenasa* (SKD, E.C.1.1.1.25) y *6-fosfogluconato deshidrogenasa* (6-PGD, E.C.1.1.1.44).

Los protocolos de tinción enzimática que seguimos están basados en Arús (1983), Murphy *et al.* (1996) y Wendel & Weeden (1989), con ligeras modificaciones que afectan principalmente a las cantidades de sustrato y a los pH finales, resultando en una mejor resolución de las bandas de actividad

enzimática para las dos especies vegetales ensayadas. La composición final de las tinciones usadas para cada enzima se muestra en la Tabla II.3.3.

Tabla II.3.2. Composición de los sistemas tampón gel/electrodo ensayados para la separación electroforética.

Sistema	Composición gel	Composición electrodo
Histidina pH 7.0	0.005M DL-Histidina (hidrocloruro monohidrato) ajustado con Na OH	0.135M Tris 0.043M ácido cítrico anhidro ajustado con HCl 1N
Morfolina Citrato pH 6.1	1 parte de tampón de electrodo 19 partes de H ₂ O	0.04M ácido cítrico hidratado ajustado con N-(3-amino propil)-morfolina
Borato de Litio pH 8.3	0.047M Tris 0.007 ácido cítrico anhidro 0.019M ácido bórico 0.004M hidróxido de litio	0.19M ácido bórico ajustado con LiOH 1N

Resolución de sistemas enzimáticos.

Ocho de las enzimas ensayadas produjeron bandas isoenzimáticas bien diferenciadas y consistentes para alguno de los sistemas tampón-gel empleados. Así, el sistema Histidina 7.0 (Sistema E en Shields *et al.*, 1983) resolvió las enzimas *fosfoglucomutasa* (PGM), *fosfoglucoisomerasa* (PGI) y *esterasa* (EST). El sistema Morfolina-citrato 6.1 (Clayton & Tretiak, 1972) resolvió las enzimas *isocítrico deshidrogenasa* (IDH), *menadiona reductasa* (MNR) y *malato deshidrogenasa* (MDH). Finalmente, las enzimas mejor resueltas en el sistema Borato de litio 8.3 (Sistema C en Shields *et al.*, 1983) fueron la *málica* (ME) y *glutamato oxalacetato transaminasa* (GOT).

Toda la investigación subsiguiente, con las muestras de las 12 poblaciones naturales de *Crambe* en estudio, se ciñó a los resultados obtenidos con estos ocho sistemas enzimáticos. Otras dos enzimas produjeron patrones de bandas bastante definidos, pero no fueron consistentes en todas

las electroforesis realizadas con las poblaciones naturales de *Crambe*, resultando por tanto demasiado dificultosa su interpretación. Estas fueron la enzima SKD para el sistema gel-tampón de Histidina 7.0, y la 6-PGD para el de Borato de Litio 8.3 principalmente (también en Morfolina-Citrato 6.1).

Tabla II.3.3. Composición final de las tinciones específicas ensayadas para cada enzima en *Crambe pritzelii* y *C. tamadabensis*. **MTT:** 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil-tetrazolio bromuro; **PMS:** Fenazil metasulfato. Todas las tinciones fueron ajustadas a pH 8.

Enzima	Tris 0.1M	MTT (1%)	NADP (10mg /ml)	NAD (20mg /ml)	PMS (5mg / ml)	MgCl ₂ (10%)	Otros productos
ADH	50ml	1ml		1ml	0,5ml		Etanol: 20ml
IDH	50ml	1ml	0,5ml		1ml	3ml	Ác. isocítrico: 100mg
GDH	50ml	1ml		1ml	0,5ml	2ml	Ác. L-glutámico: 200mg
MDH	35ml	1ml		1ml	0,5ml		Solución L-malato: 20ml
ME	50ml	0,5ml	0,5ml		0,5ml	4ml	Ác. DL-málico: 250mg
MNR	50ml	1ml					NADH: 10mg Menadiona: 25mg
PGI	50ml	1ml	0,5ml		0,5ml		Fructosa-6P: 15mg G6PDH: 60µl
PGM	50ml	1ml	0,5ml		0,5ml	3ml	Glucosa-1P: 100mg G6PDH: 120µl
SKH	50ml	1ml	0,5ml		1ml		Ác. Shikímico: 100mg
6PGD	50ml	1ml	0,5ml		0,5ml		Ác. 6P-glucónico: 50mg
EST	Tampón fosfato 0,1M: 50ml; β-Naftil acetato: 2ml; N-propanol: 5ml; Fast Garnet GBC: 50mg α-Naftil acetato: 3ml (verter después de 5')						
GOT	Tampón GOT: 50ml; Piridoxal-5P: 10mg; Fast Blue BB: 150mg						

II.3.18 Interpretaciones de los fenotipos.

Para cada enzima, las denominaciones de los *loci* y alelos siguieron las secuencias numérica y alfabética, respectivamente, empezando por la zona de actividad más cercana a la región anodal del gel. La verificación y homologación de las movilidades enzimáticas se determinó mediante comparaciones de los diferentes electromorfos en un mismo gel. El número e intensidad de las bandas en casi todos los casos correspondió a lo esperado según la estructura cuaternaria de cada enzima y la hipótesis de co-dominancia mendeliana (Wendel & Weeden, 1989), esto es, en individuos heterocigotos, dos bandas con intensidad 1:1 para enzimas monoméricas, tres bandas con intensidad 1:2:1 para enzimas diméricas y cinco bandas con intensidad 1:4:6:4:1 para enzimas tetraméricas. Por lo tanto, los patrones de bandas obtenidos pudieron ser interpretados de acuerdo a las pautas usuales de herencia mendeliana para plantas diploides.

Para la interpretación, representación de los diferentes alelos, y posterior análisis estadístico se empezó utilizando el programa Transformer-3 (Caujapé Castells & Baccarani-Rosas, 2005), creado en el propio JBCVCSIC con la colaboración de EXEGEN software a partir de una hoja de cálculo Excel reprogramada en Visual Basic y en donde dibujamos las bandas observadas en los zimogramas de los geles. Este programa ahorra muchísimo tiempo y evita errores humanos en la asignación de genotipos, pues ordena y genotipa los alelos automáticamente a partir del dibujo. La tabla de genotipos así obtenidos se pasó al programa Transformer-4 (T4, Caujapé-Castells et al. 2013), que permitió generar los archivos de entrada a los programas de análisis genético poblacional y estadística multivariante más ampliamente utilizados. Además, en este programa (y su predecesor) pueden implementarse las coordenadas (X, Y) de los individuos, en caso de querer realizar análisis de autocorrelación espacial.

Patrones de bandas múltiples.

Las enzimas producidas por los diferentes *loci* isoenzimáticos se encuentran típicamente en el citosol y también aisladas en los distintos

compartimentos subcelulares, y se localizan con frecuencia en distintas zonas del zimograma (Weeden, 1983). Aparte de estos distintos *loci* que codifican diferentes formas subcelulares de una misma enzima, pueden también ocurrir duplicaciones de un *locus* determinado que codifica una de las existentes formas isoenzimáticas. Estas duplicaciones han sido citadas para diploides aunque han sido más frecuentemente asociadas a poliploides (Gottlieb, 1982). Si un *locus* se encuentra duplicado en el genoma, la relación 1:2:1 de intensidad de bandas asociada al genotipo heterocigótico de una enzima dimérica, por ejemplo, puede estar distorsionada porque los alelos, y por tanto las subunidades polipeptídicas, pueden no estar presentes en una relación 1:1. También tres o cuatro alelos diferentes para un mismo *locus* pueden estar presentes en un único genoma (Raelson & Grant, 1989).

A la vista de los análisis realizados en *Crambe*, se constataron en algunas enzimas algunas evidencias indirectas que podrían hacernos pensar en indicios de la existencia de antiguas duplicaciones, como la detección de más *loci* de los esperados en la enzima PGM (tres en vez de dos: ver Soltis, Soltis & Gottlieb, 1987; Weeden & Wendel, 1989; Kephart, 1990); la aparición de algunos individuos heterocigotos con patrón de intensidades de bandas distorsionado, o heterocigotos asimétricos, en las enzimas PGM, EST, IDH, MNR, MDH y GOT; la presencia de más electromorfos de los esperados en unos pocos individuos en la región correspondiente a cada *locus* en la enzima GOT, y en cierta medida en la enzima MDH; y la aparición de bandas “fantasma”, o electromorfos de intensidad más débil que migran muy cerca de las principales bandas en los zimogramas de las enzimas EST, IDH y MDH, y cuyo origen es incierto, pudiendo corresponderse con antiguas duplicaciones “silenciadas” (Kephart, 1990; Anderson & Warwick, 1999; Williamson & Werth, 1999; Crawford *et al.*, 2001).

Cabe mencionar que estas evidencias visuales podrían también ser debidas a artefactos de la técnica, a la diferente eficiencia de los alelos en la catálisis del sustrato (que se delata en la diferente intensidad de las bandas en las tinciones), a la competencia de otras enzimas por los sustratos empleados en las tinciones, o a anomalías de expresión generadas por el campo eléctrico. Debemos también enfatizar que, tanto en *Crambe pritzelii* como en *C. tamadabensis*, las duplicaciones son un hecho anecdótico sin mucha

relevancia para la interpretación de los diferentes zimogramas. Así, los patrones de este tipo fueron encontrados tan solo en unos pocos individuos y podrían indicar evidencias de antiguas duplicaciones, que estarían ya totalmente silenciadas en la abrumadora mayoría de los individuos examinados. Todos los taxones de la sección *Dendrocrambe*, se comportan como diploides (Ortega & Navarro, 1977) a pesar de presentar una dotación cromosómica relativamente alta ($n = 15$), en contraste con algunos de sus congéneres mediterráneos, que llegan al nivel octoploide. Dentro de la familia Brassicaceae existen otros ejemplos de taxones canarios con comportamiento diploide que manifiestan duplicaciones génicas mucho más patentes, como las existentes en el género *Parolinia* (Fernández-Palacios *et al.*, 2006, 2009); o en *Lobularia* (Borgen, 1987, 1997).

Dado que no se realizó ningún cruzamiento controlado para ayudar a verificar la interpretación genética de las posibles duplicaciones, carecemos de conocimientos más profundos sobre la herencia de cada uno de estos *loci*.

II.3.19 Enzimas interpretadas.

La enzima **PGM** mostró tres zonas de actividad enzimática (figura II.3.17), designadas como *loci* putativos, de las cuales las dos más cercanas a la zona inferior de la región anodal del gel pudieron ser interpretadas (*Pgm-1* y *Pgm-2*), con 3 y 4 alelos detectados respectivamente (entre las dos especies estudiadas). Estos dos *loci* aparecen parcialmente solapados en el gel, de modo que varios alelos del sistema isoenzimático inferior presentan movilidad idéntica o similar a alguno de los alelos del sistema superior. Cuando alelos de sistemas diferentes y con la misma movilidad aparecen en un mismo individuo se aprecian como una única banda, más intensa de lo normal.

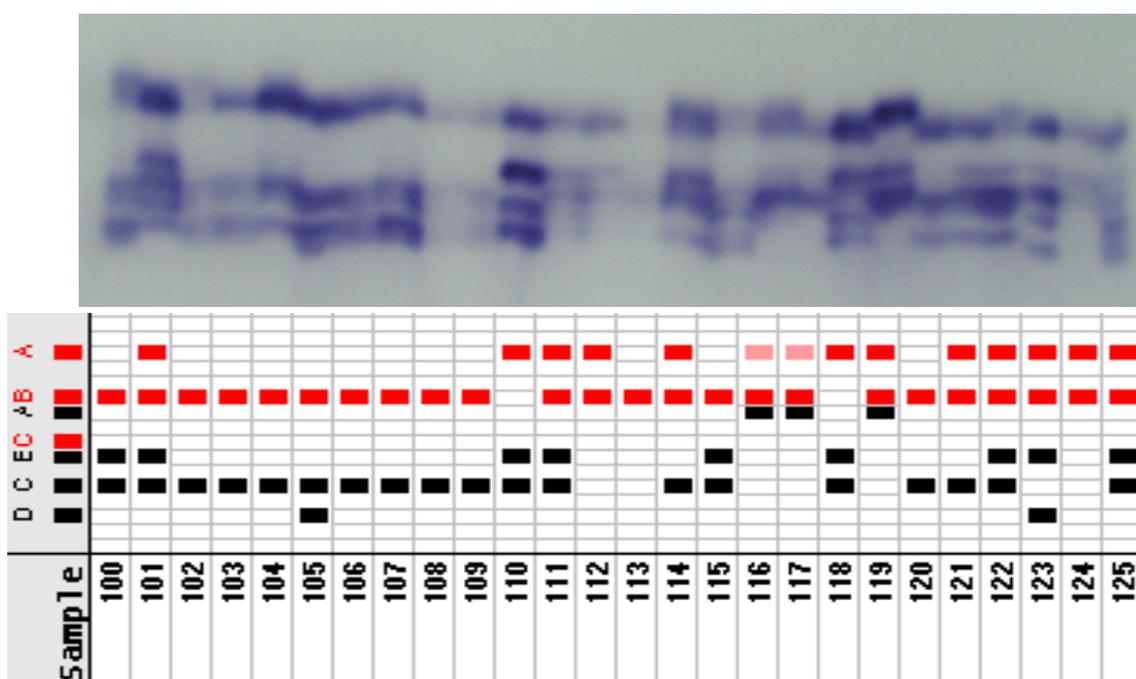


Figura II.3.17. Una muestra de zimograma de la enzima PGM y su correspondiente interpretación en Transformer-3, con tres zonas de actividad enzimática, de las cuales fueron interpretadas las dos más inferiores (*Pgm-1* y *Pgm-2*, colores rojo y negro, respectivamente). Se pueden observar heterocigotos asimétricos en las muestras 121, 122 y 123. Las bandas dibujadas como tenues aparecen solamente a título indicativo, pero no son interpretadas en el proceso de genotipado de este programa informático.

Los patrones de bandeado en estos *loci* se ajustan a lo esperado en una enzima monomérica (esto es, con una única subunidad) con herencia mendeliana codominante, pero se observa a veces en los geles la presencia de heterocigotos asimétricos, con mayor frecuencia en el sistema superior interpretado o *Pgm-1*, que fueron interpretados como heterocigotos, a menos

que alguna de la bandas fuese demasiado débil como para asignarla a un alelo con seguridad, en cuyo caso se consideró como artificio generado por la técnica. Esta asimetría, como se ha indicado más arriba, puede deberse al hecho de que el alelo que aparece con menor intensidad es menos eficiente en la catálisis de la reacción o a la presencia de evidencias de antiguas duplicaciones.

La enzima **PGI** (Fig II.3.18) mostró dos zonas de actividad enzimática en la zona inferior de la región anodal del gel, aunque sólo la de menor movilidad pudo interpretarse como un *locus* genético (*Pgi-1*). En este *locus* se han detectado 6 alelos diferentes. El patrón de intensidades en los individuos corresponde a lo esperado en una enzima dimerica con herencia mendeliana codominante, mostrando los individuos heterocigóticos tres bandas, de las cuales la intermedia, que corresponde al heterodímero, fue más intensa que la de cada uno de los extremos (correspondientes a los homodímeros) y equidistante respecto a ellas.

La enzima **EST** (Fig. II.3.19) mostró una zona de actividad interpretable como *locus* genético (*Est-1*) en la zona central de la región anodal del gel, en donde se localizaron hasta un total de cinco alelos distintos. El patrón de bandas observado en este *locus* está de acuerdo con lo esperado para una enzima monomérica con herencia mendeliana codominante, por lo que los individuos heterocigotos típicamente mostraron dos bandas de similar intensidad aunque en algunos casos una de ellas aparecía algo más débil, hecho que puede deberse a que el alelo que aparece con menor intensidad sea menos eficiente en la catálisis de la reacción.

Normalmente encontramos bandas débiles cerca del área de expresión de los alelos del *locus* Est-1, cuyo origen es incierto, pero como más arriba se ha apuntado podrían corresponder a evidencias de duplicaciones (bandas "fantasma") para esta enzima o a la actividad de otras enzimas que compiten por alguno de los sustratos que se utilizan en la tinción.

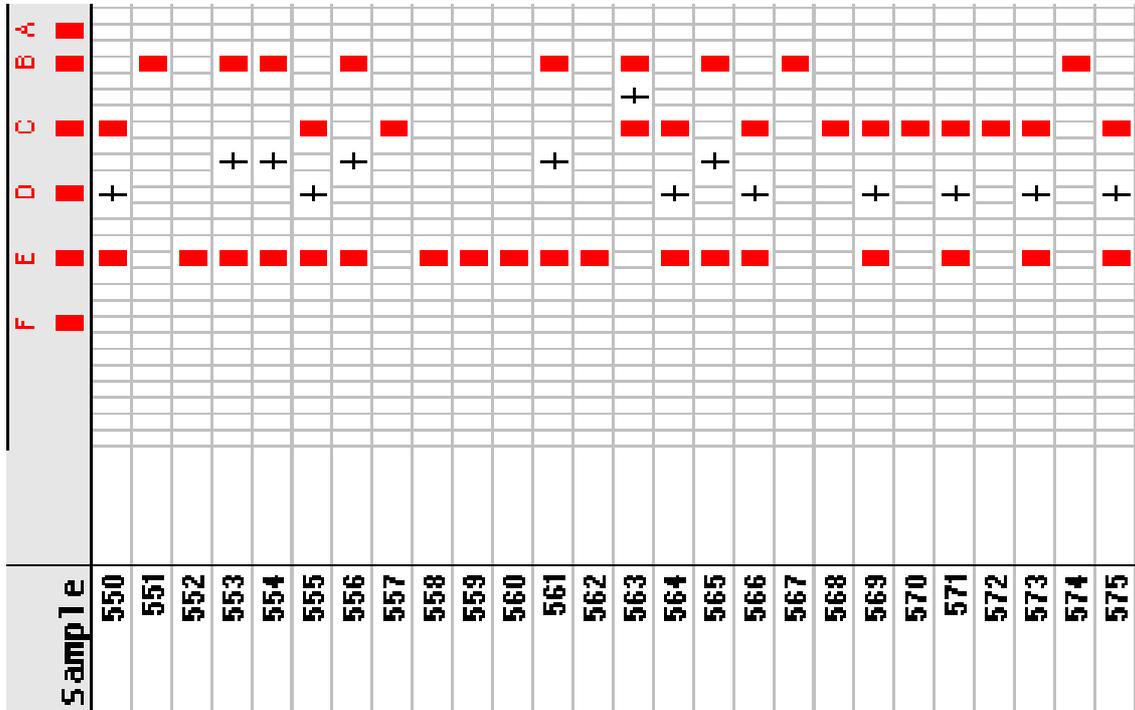
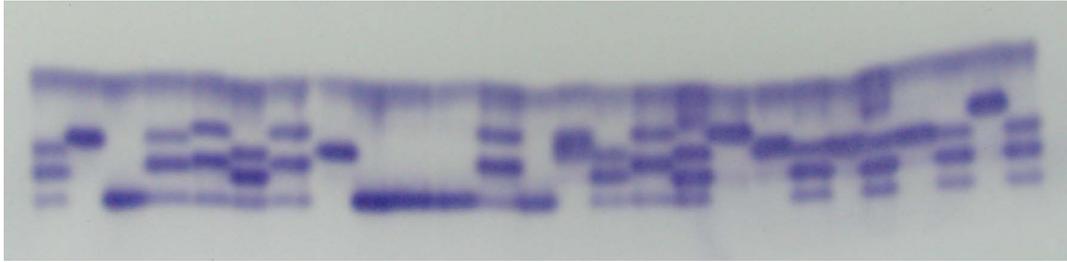


Figura II.3.18. Una muestra de zimograma de la enzima PGI. En la fotografía pueden apreciarse dos zonas de actividad, aunque la calidad de las bandas obtenidas sólo permitió interpretar el sistema inferior (*Pgj-1*). Las cruces en Transformer-3 representan a los heterodímeros.

La enzima **IDH** (Fig. II.3.20), mostró actividad en la parte inferior de la región anodal del gel, donde se aprecian dos zonas muy cercanas que pueden ser designadas como *loci* putativos, aunque solamente la inferior fue interpretable como *locus* (*Idh-1*), donde se han reconocido hasta siete alelos diferentes. El patrón de bandas de este locus se corresponde con el patrón de intensidades de bandas esperado en una enzima dimérica con herencia mendeliana codominante, aunque algunos individuos se mostraron como heterocigotos asimétricos. Esta asimetría puede deberse a la presencia de antiguas duplicaciones pero también al hecho de que el alelo que aparece con menor intensidad sea menos eficiente en la catálisis de la reacción enzima-sustrato. Se detectaron además con frecuencia bandas “fantasma” en la parte inferior del área de *Idh-1*, que migran de manera similar a algunas de las bandas del sistema interpretado. El origen de estas bandas es incierto.

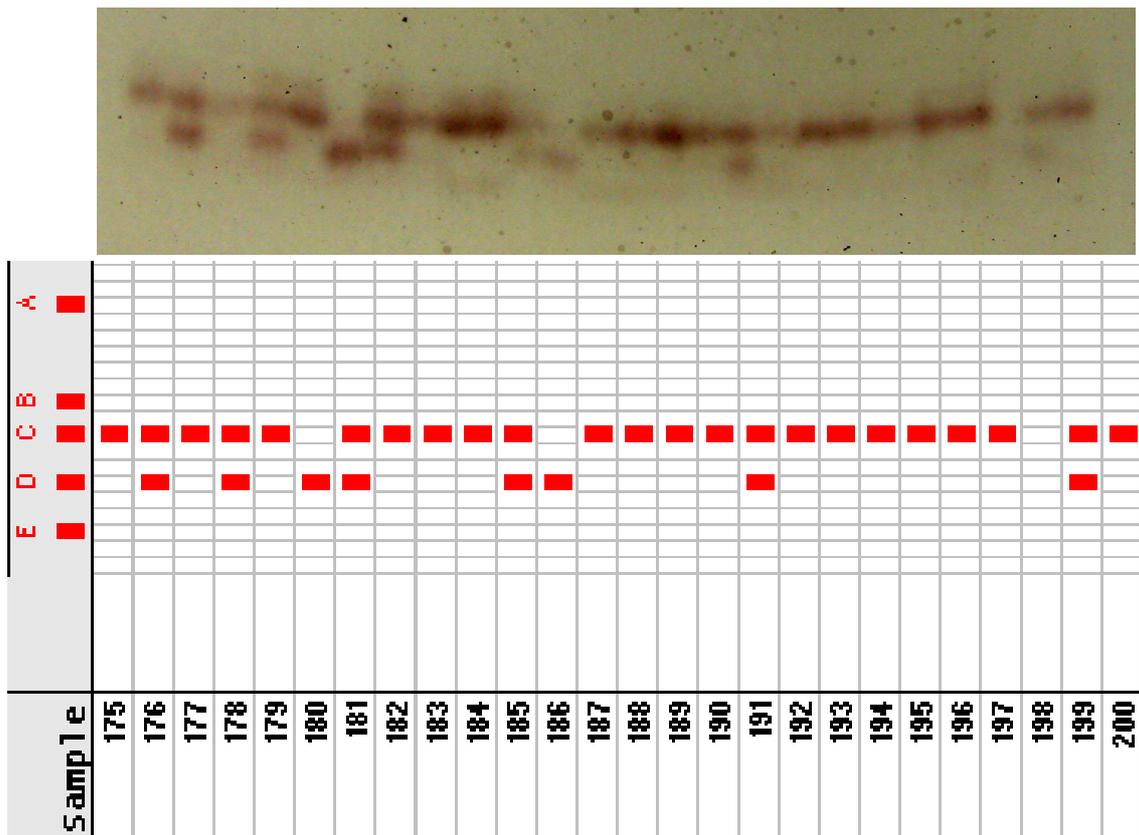


Figura II.3.19. Zimograma de la enzima EST. Se aprecia una única zona de actividad interpretable como *locus* genético (*Est-1*). Justamente por debajo de ella aparece un área con presencia de bandas débiles.

La enzima **MNR** (Fig. II.3.21), mostró una zona de actividad en la parte inferior de la región anodal del gel, interpretada como *locus* (*Mnr-1*) y en donde se han podido diferenciar hasta cuatro alelos diferentes. La mayoría de las bandas tuvieron una migración similar en el gel, y se asignaron como productos de un mismo alelo “b” (aunque se evidenciase claramente cierta variación), pues no eran claramente distinguibles según la resolución del gel.

Su patrón de bandas se corresponde con lo esperado para una enzima tetramérica (resultado del ensamblaje de cuatro subunidades) con herencia mendeliana codominante, con la aparición de cinco bandas en los individuos heterizigóticos, aunque en ellos la relación de intensidades no se ajusta al modelo clásico de 1:4:6:4:1, siendo por lo general la segunda banda más alta, la más intensa. Por debajo de cada banda, y siempre a la misma distancia de cada una de ellas, se apreciaron en algunos geles halos tenues de tinción que podrían corresponder con la disociación de las subunidades de la enzima por efecto de la corriente eléctrica.

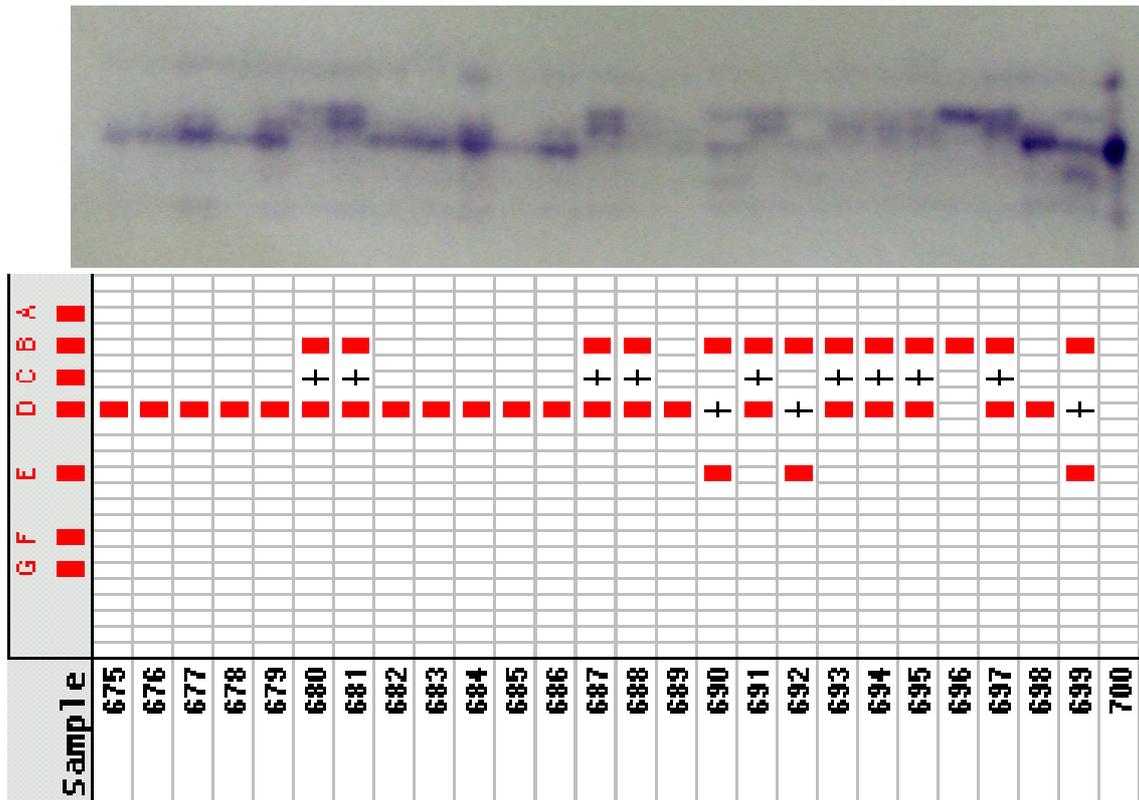


Figura II.3.20. Zimograma de la enzima IDH. Se distinguen dos zonas de actividad: una superior muy difusa y otra inferior interpretable (*Idh-1*). Se aprecian individuos heterocigotos asimétricos que corresponden a las muestras 681, 687, 697 y 699. Se puede también apreciar la profusión de bandas “fantasma” en la parte inferior del área de actividad enzimática, que en este caso pueden confundirse con el alelo “e”.

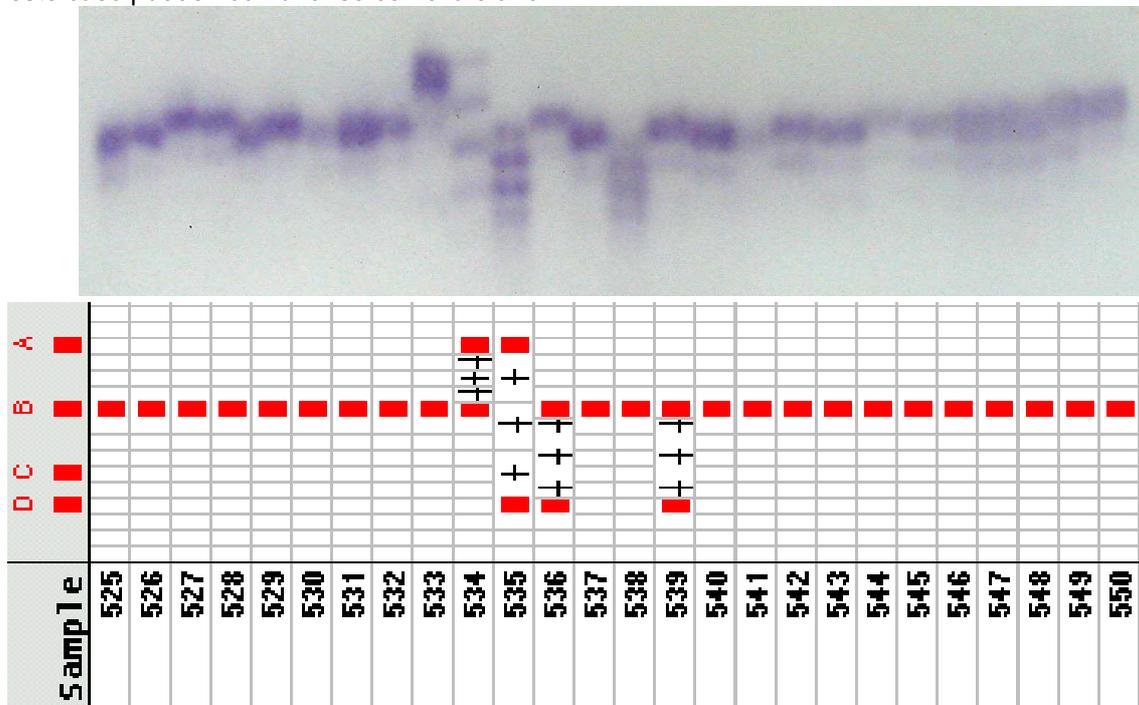


Figura II.3.21. Zimograma de la enzima MNR, donde se aprecia una única zona de actividad (*Mnr-1*), y las cinco bandas en los individuos heterocigotos, si bien éstos se muestran normalmente como heterocigotos asimétricos. Cierta variabilidad, difícilmente interpretable, en la región central del área de actividad, fue asimilada a un único alelo putativo “b”. Se aprecian los halos de tinción por debajo de las bandas principales.

La enzima **MDH** mostró tres zonas de actividad enzimática en la parte baja de la región anodal del gel, que fueron designadas como tres *loci* putativos (*Mdh-1*, *Mdh-2* y *Mdh-3*), las cuales se encuentran muy cercanas entre sí, con cuatro, uno y siete alelos respectivamente (Figuras II.3.22 y II.3.23). Los patrones de bandas observados permitieron una interpretación acorde con su consideración como enzima dimérica (Vallejos, 1983; Weeden & Wendel, 1989; Kephart, 1990; Murphy *et al.*, 1996). La mayoría de los individuos hererozigóticos para alguno de los *locus* de MDH se comportaron como heterocigotos asimétricos.

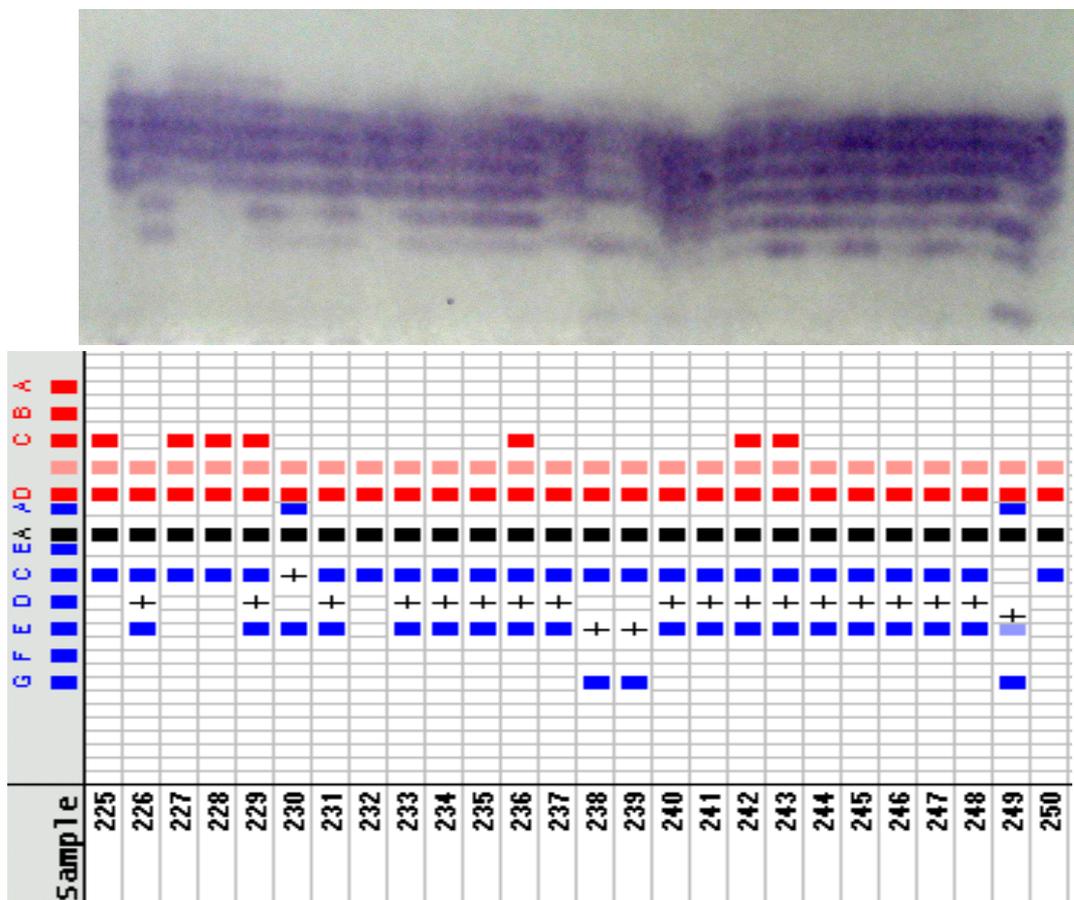


Figura II.3.22. Zimograma de la enzima MDH. La tres zonas de actividad enzimática aparecen muy juntas entre sí (*Mdh-1*, *Mdh-2* y *Mdh-3*). En la zona correspondiente al sistema superior aparecen dos bandas en los individuos interpretados como homocigotos, y tres en los heterocigotos (coincidiendo el heterodímero en movilidad con la banda superior más frecuente).

En la zona ocupada por *Mdh-1*, en los individuos homocigóticos nos encontramos normalmente con dos bandas de similar intensidad. Esto puede deberse bien a la existencia de una duplicación para *Mdh-1* (con un único alelo fijado para todas las muestras analizadas), o bien a una disociación de la

proteína durante la ejecución de las electroforesis, teniendo en cuenta que en algunos casos la estabilidad de la estructura cuaternaria de MDH se ha visto alterada por el pH (Chen & Smith, 2001). En *Mdh-2* nos encontramos con un alelo aparentemente fijado, aunque en algunos geles se observaron dos bandas con escasa diferencia de movilidad, lo que apunta más claramente a un posible caso de disociación de la proteína. En *Mdh-3* los patrones obtenidos se interpretaron como polimorfismos segregantes correspondientes a varias combinaciones de siete alelos. Algunos de estos alelos migraron de manera similar a otros alelos de los restantes dos sistemas. Es en la zona ocupada por este sistema donde se observaron en algunas ocasiones más electromorfos de los esperados, o bien bandas débiles o bandas “fantasma” que migraron de manera similar a algunos de los alelos más bajos en el gel.

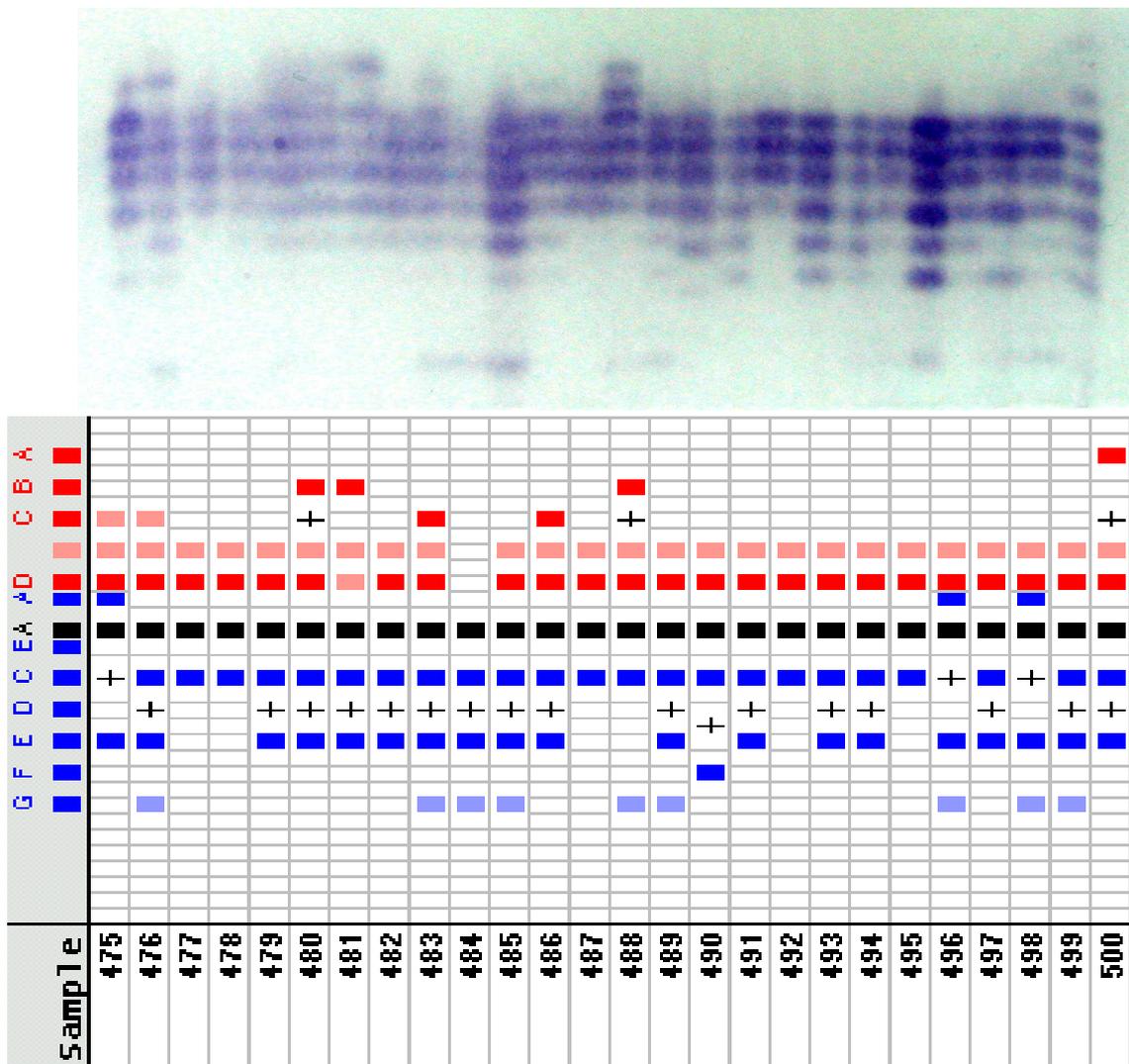


Figura II.3.23. Otra fotografía de la enzima MDH y su correspondiente interpretación, en donde podemos ver dibujadas las bandas “fantasma” que migran a la altura del sistema inferior.

La enzima **ME** mostró una única zona de actividad interpretable como *locus* (*Me-1*) en la parte inferior de la región anodal del gel, y otras zonas más catodales con cierta actividad, pero con bandeo difuso y por lo tanto no interpretable (Figura II.3.24). Esta enzima está descrita como tetrámera (Soltis *et al.*, 1983; Wendel & Weeden, 1989; Murphy *et al.*, 1996). En todos los geles analizados se constató la presencia de un único alelo fijado para las dos especies de *Crambe* estudiadas, apareciendo como una única banda en todas las muestras analizadas.

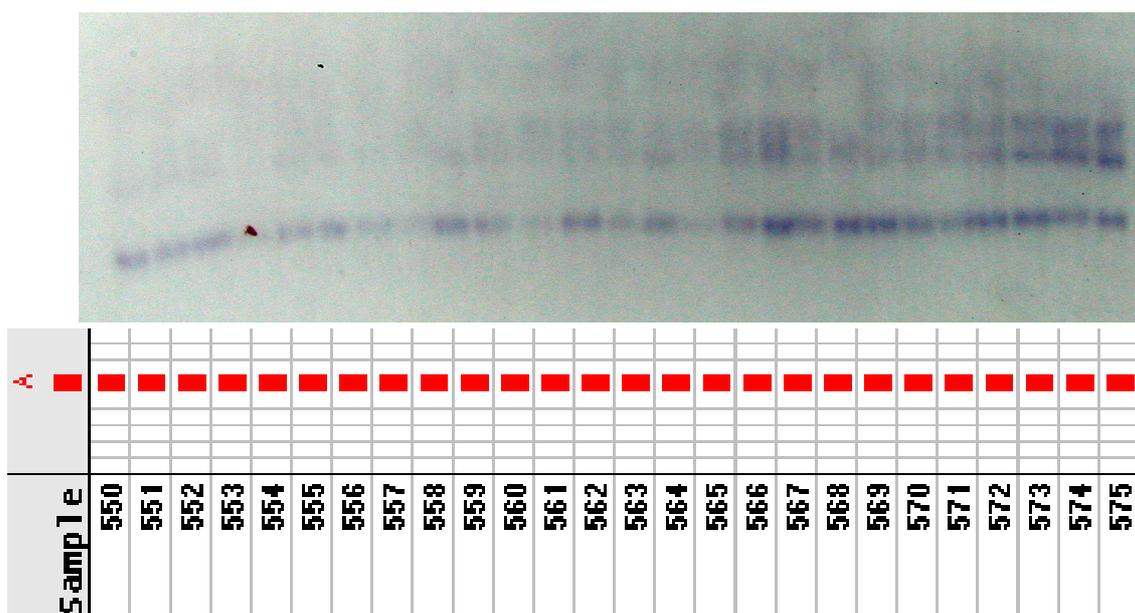


Figura II.3.24. Zimograma de la enzima ME. En la parte inferior de la imagen aparece una zona de actividad interpretable como *locus* (*Me-1*). Se aprecian zonas de bandeo difuso en la parte superior de la imagen.

La enzima **GOT** manifestó dos zonas de actividad parcialmente solapadas en la parte central de la región anodal del gel, que son interpretables como dos *loci* segregantes (*Got-1* y *Got-2*) donde detectamos siete y seis alelos, respectivamente. En ambos sistemas enzimáticos existen alelos con movilidades eléctricas similares, por lo que suelen aparecer como una única banda alelos de uno y otro *locus* cuando coinciden en un mismo individuo. Los patrones de intensidad de bandas, al ajustarse a lo esperado para una enzima dimerica con herencia mendeliana codominante (Figura II.3.25), resultan aquí muy útiles para distinguir bandas pertenecientes a uno u otro sistema, teniendo en cuenta la doble intensidad de las bandas correspondientes a los heterodímeros, y la intensidad fuerte de las bandas en los individuos homocigotos.

En las tinciones aparecen muy de vez en cuando individuos con más electromorfos de los esperados para una enzima dimérica, que migran de manera similar a los alelos conocidos para ambos *loci*, y complican en cierta manera las interpretaciones. También hay que tener en cuenta en las interpretaciones la aparición de algunos heterocigotos asimétricos.

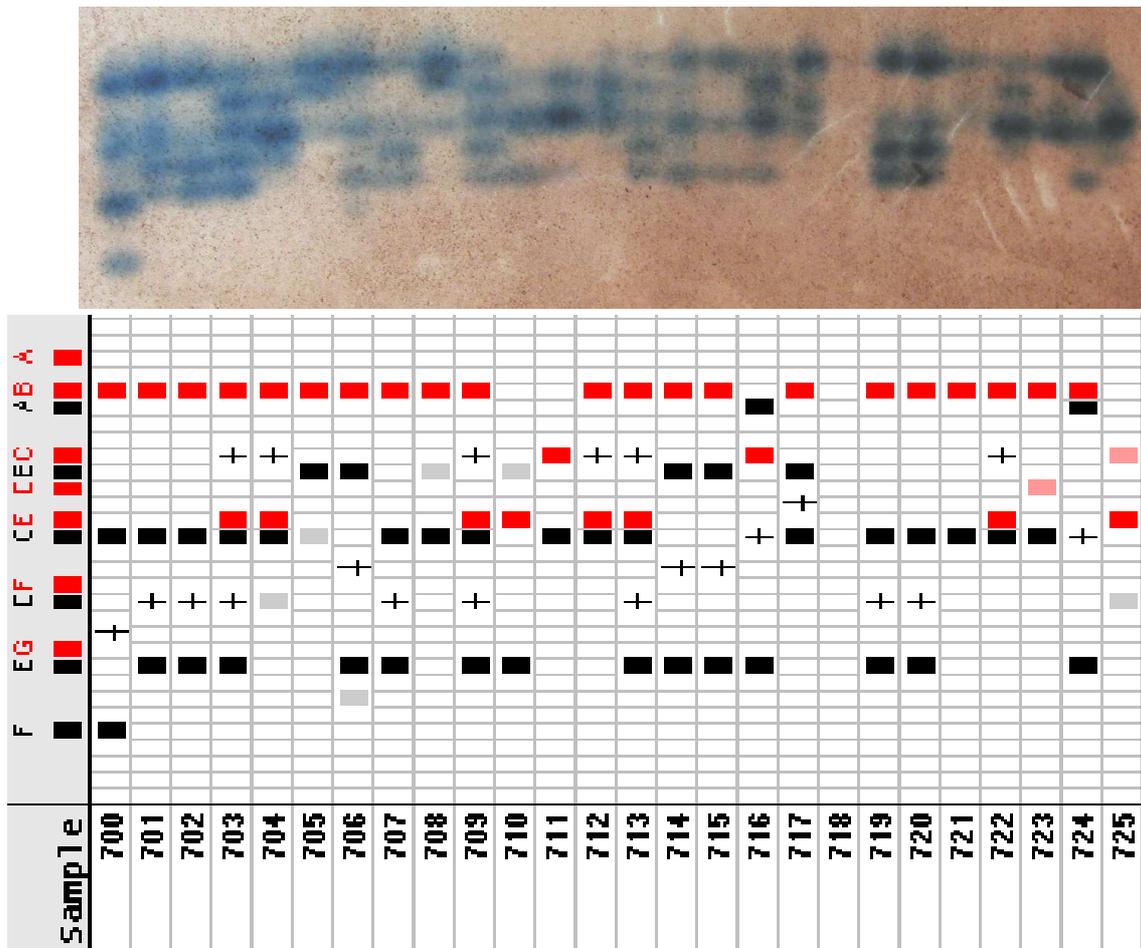


Figura II.3.25. Zimograma de la enzima GOT. Algunos de los alelos de los dos sistemas evidenciados (*Got-1* y *Got-2*) se solapan entre sí por su similar movilidad en el campo eléctrico. Los electromorfos que exceden a lo esperado y que no son atribuidos a estos *loci* se dibujan como bandas tenues en Transformer-3.

II.3.20 Análisis de datos: parámetros básicos de variabilidad.

Los cálculos de los parámetros básicos de variabilidad se calcularon usando el programa informático Popgene 1.32 (Yeh *et al.*, 1997).

Número medio de alelos por *locus* (A_i).

Es el promedio de los alelos detectados en cada *locus*, incluyendo tanto los *loci* monomórficos como los polimórficos. Es la medida más dependiente del tamaño de la muestra.

Número medio efectivo de alelos por *locus* (A_e).

Es el promedio de alelos esperados en cada *locus* que a similar frecuencia equivalen a un mismo valor de heterozigosidad esperada. Se formula como $A_e = 1/(1-h)$, donde h es la heterozigosidad observada de cada *locus*. También puede expresarse como $A_e = 1 - \sum p_i^2$, siendo p_i la frecuencia de cada uno de los i alelos.

Porcentaje de *loci* polimórficos (P).

Es la proporción (expresada en tanto por ciento) de *loci* en los que se ha detectado más de un alelo. Calculado por el criterio del 95% (cuando la frecuencia del alelo más común es $\leq 0,95$). Este parámetro depende también del número de individuos muestreados, porque es probable que un muestreo pequeño sólo incluya unos pocos genotipos diferentes, mientras que un estudio más extenso revelaría más fielmente la variabilidad de la población.

Heterozigosidad observada (H_o).

Es la proporción de individuos heterozigotos en una muestra poblacional. Se calcula como el promedio de la frecuencia de los individuos heterozigóticos detectados en cada *locus*.

Heterozigosidad esperada (H_e).

Es la proporción esperada de individuos heterocigotos en una población con apareamiento al azar. Este parámetro es una función de las frecuencias alélicas detectadas, y se calcula como un promedio entre todos los *loci* analizados, siendo en cada *locus*: $H_e = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia de cada uno de los i alelos. Se denomina también “diversidad genética”, y ofrece una medida indirecta de heterocigosidad genética que se ve menos afectada por el tamaño de la muestra y el error del muestreo que el número de alelos por *locus*, ya que su valor está mucho menos influenciado por las frecuencias de los alelos raros.

Índice de fijación (F_{IS}).

Se conoce también como coeficiente de *inbreeding* o de consanguinidad, aunque la interpretación de consanguinidad a partir solamente del valor de F_{IS} requiere precaución. Su valor refleja las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, pudiendo indicar incremento de la homocigosidad debido a la incidencia de apareamientos entre parientes cercanos de una población. Se calcula como el promedio para los *loci* polimórficos según la fórmula: $F_{IS} = 1 - (H_o/H_e)$. Valores cercanos a 0 indican que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg, se produce panmixia o apareamiento al azar entre todo el conjunto de individuos de una población, y no existe exceso ni defecto de homocigotos.

Variabilidad genética intrapoblacional y conservación.

Para examinar una posible relación entre el estado de conservación actual de cada población y nuestros datos obtenidos de los diferentes parámetros de variabilidad genética intrapoblacional, se llevaron a cabo diferentes análisis de regresión lineal, con XLSTAT v.7.5.2 (XLSTAT, 2007). En ellos, se relacionó cada parámetro básico de variabilidad (P , A_i , A_e , H_o , H_e) con el número de plantas adultas y el grado de aislamiento de cada población, expresado como la distancia (en kilómetros) con la población conespecífica

conocida más cercana (Tabla II.3.4). De entre todas las poblaciones conespecíficas más cercanas existentes, no se consideró la del Barranco del Draguillo, situada a unos 2,5 km de la población de Guayadeque de *C. pritzelii*, al estar compuesta por un número muy bajo de individuos (muy inferior a 100).

Tabla II.3.4. Poblaciones muestreadas (los números corresponden a los de la Figura II.3.3), códigos, y variables explicativas utilizadas en los análisis de regresión lineal: **N** = número de plantas reproductivas en la población; **Dist** = distancia, en kilómetros, con la población conespecífica más cercana con talla poblacional superior a 100 individuos reproductivos. **Población cercana** = nombre de la población más cercana considerada.

<i>Especie/Población</i>	Código	N	Dist	Población cercana
<i>Crambe tamadabensis</i>				
1. Tamadaba	CTTA	12.000	1,00	Tamadaba-Las Helecheras
2. Amagro	CTAM	300	4,30	Montaña de Guía
3. Montaña de Guía	CTGU	700	2,75	Cuesta de Silva
4. Cuesta de Silva	CTSI	400	2,75	Montaña de Guía
<i>Crambe pritzelii</i>				
5. Agaete San Pedro	CPAG2	625	0,60	Barranco de La Culata
6. Agaete Berrazales	CPAG1	1.225	0,75	Barranco de La Culata
7. Azuaje	CPAZ	3.000	6,70	Riscos Jiménez
8. Riscos Jiménez	CPJI	300	6,70	Azuaje
9. Barranco de Antona	CPAN	600	1,00	Barranco de La Lechuza
10. Tenteniguada	CPTA	8.425	1,50	Barranco Cernícalos
11. Guayadeque	CPGY	49.525	3,40	Barranco Cernícalos
12. Amurga	CPGA	1.800	8,70	Guayadeque

II.3.21 Desviación de los parámetros genéticos en las poblaciones naturales.

Desviación del equilibrio Hardy-Weinberg.

Este test se basa en el contraste de las desviaciones de las frecuencias génicas observadas respecto de las esperadas bajo el equilibrio que define el teorema de Hardy-Weinberg. En una población natural que cumple las condiciones de equilibrio, para un *locus* dialélico (en el que existen dos alelos, *a* y *b*) las frecuencias de los genotipos *aa*, *ab*, *bb* deben ajustarse a p^2 , $2pq$, q^2 donde *p* y *q* son las frecuencias alélicas detectadas de *a* y *b*, respectivamente (Hardy, 1908; Weinberg, 1908).

La significación de las posibles desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg se obtiene por medio de un test de Chi-cuadrado (χ^2) no paramétrico independiente para cada *locus*, siendo la hipótesis nula que la población se encuentra en equilibrio. Cuando la probabilidad del test es $\geq 0,05$ se considera que el *locus* está en equilibrio, y si por el contrario es $< 0,05$ existe una desviación significativa de las frecuencias génicas observadas. Para los cálculos del test se usó el programa informático Popgene 1.32 (Yeh *et al.*, 1997).

Test de neutralidad de Ewens-Watterson.

El test de neutralidad (Watterson, 1978) permite detectar si un *locus* está bajo presión selectiva o no, y se basa en la teoría muestral de los alelos selectivamente neutrales desarrollada por Ewens (1972). Se fundamenta en la comparación entre la homocigosidad esperada (*F*) asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg y el valor de la homocigosidad esperada bajo la hipótesis de neutralidad para el mismo tamaño muestral ($2n$) y el mismo número de alelos (*k*) [este valor se obtiene por simulación].

Los valores del test de neutralidad se obtuvieron mediante el programa informático Popgene 1.32 (Yeh *et al.*, 1997), el cual calcula un intervalo de confianza al 95% del valor medio de la homocigosidad esperada bajo la hipótesis de neutralidad. Si el valor promedio de la homocigosidad esperada según las proporciones de Hardy-Weinberg entra dentro del intervalo, el test no

es significativo y el *locus* en cuestión puede considerarse neutral. Si el promedio queda fuera del intervalo de confianza, entonces hay motivos para pensar que la selección podría estar actuando en el *locus* implicado (Caujapé-Castells, 2006).

Test de cuello de botella.

Se trata de un test no paramétrico propuesto por Cornuet y Luikart (1996), para detectar si las poblaciones muestreadas han experimentado una disminución brusca de tamaño reciente. Se basa en que los cuellos de botella generan un exceso de heterocigotos temporal, ya que los alelos raros (que apenas contribuyen a la heterocigosidad total calculada) se pierden mucho más rápidamente que la heterocigosidad. Consecuentemente, en una población que haya experimentado un cuello de botella, la heterocigosidad esperada (H_e) calculada bajo las expectativas de Hardy-Weinberg será mayor que la esperada en el equilibrio (H_{eq}), que depende del número de alelos observado en la muestra (k) asumiendo un mismo tamaño muestral. Los cálculos se realizan por *locus*. En poblaciones que no han sufrido cuellos de botella, lo esperable sería que los *loci* tuvieran un ligero exceso o defecto de heterocigotos, como consecuencia de factores estocásticos y los inevitables errores del muestreo. En cambio, en las poblaciones que sí han experimentado un cuello de botella reciente, la mayoría de los *loci* polimórficos manifestarán un exceso sustancial de heterocigosidad ($H_e > H_{eq}$) (Luikart & Cornuet, 1998).

Los cálculos del test se llevaron a cabo por medio del programa Bottleneck (Piry *et al.*, 1999), que halla los valores de H_{eq} bajo la asunción de equilibrio mutación-deriva, en función de tres modelos de mutación: alelos independientes (IAM), en dos fases (TPM) y en pasadera o “stepping stone” (SMM). La H_{eq} según cada uno de estos modelos se obtiene por medio de simulación, y se compara con la H_e a nivel de cada *locus*. La desviación estándar (SD) de la heterocigosidad esperada bajo equilibrio mutación-deriva se usa para calcular la diferencia estandarizada para cada *locus* ($(H_e - H_{eq})/SD$). La distribución obtenida por simulación permite así la computación de un *p*-valor para cada heterocigosidad esperada obtenida con los datos empíricos. A continuación se testó si la población presenta un número significativo de *loci* con exceso de heterocigotos (que no cumplan la hipótesis

nula de encontrarse en equilibrio de mutación-deriva, en cada uno de los tres modelos), usando el test no paramétrico de Wilcoxon, ya que este test puede usarse con pocos *loci* polimórficos y bajo número de individuos. En este caso usamos la probabilidad de una cola para el exceso de H_e para un nivel de significación de 0,05.

El modelo escogido para nuestros *loci* fue el de alelos independientes (IAM), ya que la situación de exceso de heterocigotos ha sido demostrada sólo para *loci* que evolucionan bajo este mecanismo de mutación según Maruyama & Fuerst (1985), y dado que puede haber situaciones en las que este exceso de heterocigotos no es observable bajo el modelo de estructura poblacional en pasadera (SMM) (Cornuet & Luikart, 1996).

La probabilidad de pérdida alélica.

La probabilidad de pérdida L (es decir, la probabilidad de que una muestra de N poblaciones no contenga un alelo con frecuencia poblacional p) se estima usando la expresión: $L = (1 - p)^{2N}$ (Bengtsson *et al.*, 1995) para los alelos considerados raros: en nuestro caso se selecciona todo aquel que tiene una frecuencia media en las poblaciones en las que es observado menor de 0.1 y está presente en el 50% o menos de las poblaciones muestreadas. Este criterio de selección está implementado en el programa informático Transformer-3 (Caujapé-Castells & Baccarani-Rosas, 2005), así como los cálculos pertinentes. Se calcularon las probabilidades de pérdida observadas, L_o , y esperada, L_e (calculadas asumiendo que los alelos seleccionados tienen la misma frecuencia media para el total de las poblaciones muestreadas). Estos valores fueron utilizados en una regresión lineal, donde la frecuencia de cada alelo se representó en el eje X, y el $-\log(L_o)$ y $-\log(L_e)$ se representaron en el eje Y.

Siguiendo a Bengtsson *et al.* (1995), se obtuvo un valor de representatividad (R) dividiendo la pendiente de la línea de regresión observada (basada en los valores de L_o) por la pendiente de la línea de regresión esperada (basada en los valores de L_e). Los valores de R altos (cerca de 1) indican que el muestreo aleatorio de una sola población representaría la mayor parte de la variabilidad genética del conjunto analizado (en relación a los alelos raros).

II.3.22 Estructuración de la variabilidad genética entre poblaciones.

Estadísticos de estructura poblacional de Wright.

Los F estadísticos de Wright (1931) se basan en las comparaciones de los valores de heterozigosidad observada y esperada bajo apareamiento al azar a diferentes niveles espaciales considerados: a nivel de los organismos individuales (F_{IS}), de las diferentes poblaciones o subpoblaciones (F_{ST}), y a nivel de la población total (F_{IT}). Se calculan para cada *locus* analizado y se fundamentan en base a *locus* dialélicos.

Para el cálculo de estos tres indicadores básicos del grado de subdivisión poblacional se parte de tres nociones de jerarquización de la heterozigosidad: H_I que es el promedio de la heterozigosidad observada para las diferentes subpoblaciones, H_S o promedio de la heterozigosidad esperada por subpoblación y H_T o heterozigosidad esperada considerando las poblaciones analizadas como un todo virtual.

El índice de fijación (F_{IS}) cuantifica la consanguinidad (teórica) de los individuos en relación a las subpoblaciones a las que pertenecen. Según Wright (1931), $F_{IS} = 1 - H_I/H_S$. Si las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg, $H_I = H_S$ y por tanto $F_{IS} = 0$.

La subdivisión poblacional (F_{ST}) cuantifica la consanguinidad de las subpoblaciones en relación a la población total de la que forman parte, y se formula (Wright, 1951) como $F_{ST} = 1 - H_S/H_T$. Equivale a la proporción de la variación (de la heterozigosidad total) atribuible a la diferenciación entre poblaciones. Teóricamente se interpreta como el efecto combinado de un flujo génico reducido y de la deriva genética. Como la diferencia entre H_S y H_T aumenta a medida que las frecuencias génicas en las diferentes subpoblaciones se desvían con respecto a la media en la población total, F_{ST} se suele usar también como una medida de diferenciación genética entre pares de poblaciones.

La desviación de heterozigosidad total (F_{IT}) cuantifica la consanguinidad de los individuos en relación a la población total. Su formula es $F_{IT} = 1 - H_I/H_T$, y constituye la medida más global de consanguinidad, puesto que tiene en cuenta los efectos del apareamiento no aleatorio dentro de las subpoblaciones

(implícito en la heterozigosidad observada) y el efecto de la subdivisión poblacional (al comparar con la heterozigosidad esperada total).

Los F estadísticos de Wright pueden calcularse para *loci* multialélicos por medio del desarrollo posterior de Nei (1987). Para su cálculo se usó el programa Popgene 1.32 (Yeh *et al.*, 1997).

Estadísticos de estructura poblacional de Nei.

Los estadísticos de Nei (1973, 1987) se basan en una aproximación para varios *loci* y múltiples alelos a partir de las formulaciones de Wright. Los parámetros de la heterozigosidad media en cada población (H_S) y la heterozigosidad promedio en la población global (H_T) se calculan de forma similar que para los estadísticos de Wright. El estimador de Nei análogo a F_{ST} se conoce como $G_{ST} = 1 - H_S/H_T$. Alternativamente se calcula $G_{ST} = (H_T - H_S)/H_T = D_{ST}/H_T$, considerando el parámetro D_{ST} como la heterozigosidad total distribuida entre las poblaciones, $D_{ST} = d_s^2 \sum (p_{ij} - p_{ij'})^2$, donde d_s es el número de poblaciones consideradas y p_{ij} la frecuencia del alelo i en la población j .

Cuando hay solamente dos alelos en un *locus*, G_{ST} equivale a la F_{ST} de Wright. En caso de múltiples alelos, G_{ST} es el promedio ponderado de F_{ST} para todos los alelos (Nei, 1973). El parámetro θ de Weir y Cockerham (1984) es análogo a G_{ST} , pero incorpora correcciones para tamaños muestrales y número de poblaciones limitados.

Para el cálculo de los estadísticos G_{ST} y θ se usó el programa Fstat v. 2.9.3 (Goudet, 2000).

Estructura poblacional estimada por análisis de la varianza (AMOVA).

La jerarquización de la estructura genética se puede estudiar por medio de un análisis de la varianza para datos provenientes de marcadores moleculares (Cockerham, 1969, 1973; Weir & Cockerham, 1984), análogo a un test paramétrico de análisis de la varianza (ANOVA), donde las observaciones son las frecuencias genotípicas. Así, el análisis molecular jerarquizado de la varianza permite la partición de la varianza total (σ^2) en componentes de covarianza (Rousset, 2000; Excoffier, 2003) debida a diferencias entre

individuos, diferencias entre poblaciones de un mismo grupo (o especie, en nuestro caso) y diferencias entre grupos. Estos componentes de covarianza se usan para calcular los diferentes estadísticos de estructura poblacional (índices de fijación) en términos de coeficientes de consanguinidad definidos originalmente por Wright (1951, 1965), donde F_{ST} es la suma que sobre la varianza total representan los componentes de covarianza entre grupos (σ^2_a) y entre poblaciones de un mismo grupo (σ^2_b), mientras que el parámetro F_{CT} equivale a (σ^2_a) respecto a la varianza total.

De modo análogo a un análisis de la varianza estándar, las sumas de los cuadrados de las desviaciones se obtienen de la suma de las varianzas individuales dentro de las poblaciones, suma de las varianzas entre poblaciones dentro de los grupos, entre grupos de poblaciones, y de la suma de las varianzas individuales total (respecto a la población global). La significación de los índices de fijación se testa por medio de una aproximación permutacional no paramétrica (Excoffier *et al.*, 1992), donde F_{ST} se testa permutando genotipos individuales entre poblaciones de ambos grupos, y F_{CT} se testa permutando poblaciones entre los grupos.

Los cálculos del análisis molecular de la varianza se realizaron con el programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Por medio de este programa se realizó un AMOVA *locus a locus*, ya que este proceso debe favorecerse cuando existe cierta cantidad de datos faltantes (Excoffier & Lischer, 2011), algo común en los datos isoenzimáticos y que tiende a subestimar la estimación de estructura génica interpoblacional por medio de un AMOVA estándar.

Los diferentes componentes de la varianza y F -estadísticos se estiman para cada *locus* por separado, y se muestran en una tabla global. Los diferentes componentes de la varianza a diferentes niveles de jerarquización se combinan para producir estimadores sintéticos de los F -estadísticos, y por tanto sus valores globales no se obtienen como media aritmética entre los diferentes *locus* (Weir & Cockerham, 1984; Weir, 1996). El número de permutaciones para testar la significación de los componentes de covarianza e índices de fijación fue de 16000, ya que esta cantidad garantiza tener menos de un 1% de diferencias respecto a la probabilidad exacta en el 99% de los casos (según se sugiere en Schneider *et al.*, [2000]).

Análisis multivariante. La ordenación por Análisis de Componentes Principales (ACP).

Los métodos conocidos como “técnicas de ordenación” permiten representar las relaciones entre los datos originales de un espacio de n dimensiones (en nuestro caso, las t poblaciones $\times n$ variables o alelos de la matriz de frecuencias alélicas) en un espacio estadístico de pocas dimensiones que implique una mínima pérdida de información. Entre las modalidades de ordenación más empleadas se encuentra el Análisis de Componentes Principales o ACP, que es un tipo de análisis factorial (reducción de variables) para variables continuas.

En el ACP partimos de una matriz de similitud entre variables (calculada a partir de la matriz de frecuencias alélicas), para llegar a una representación gráfica final de las distancias relativas entre observaciones (poblaciones) en un plano cuyos ejes (los “componentes principales”) son combinaciones lineales de las variables de partida y abarcan el máximo posible de la varianza de los datos originales. Su finalidad es la de facilitar la interpretación y comprensión de las relaciones entre observaciones.

Para la implementación de este análisis se usó el programa XLSTAT v. 7.5.2 (XLSTAT, 2007), que realiza las siguientes operaciones:

- Cálculo de la matriz de similitud o correlación entre las variables, a partir de la matriz de datos (en nuestro caso, de frecuencias alélicas). En el ACP se trata de una matriz cuadrada y simétrica de covarianzas donde se enfrentan todos los alelos detectados. Previamente es necesaria la estandarización de los datos (se les resta la media en cada variable y se divide el resultado por la desviación típica).

- Obtención de los coeficientes necesarios para explicar el modelo de correlación entre variables, por medio de cálculos de álgebra matricial. Los nuevos ejes (también llamados vectores propios) aparecen ordenados según sus valores propios (que corresponden a la proporción de la varianza total del conjunto de datos que es explicada por cada uno de ellos). También se muestran los porcentajes de varianza acumulada al ir añadiendo los vectores propios sucesivos al primer componente principal. Los vectores propios se representan en una tabla con los coeficientes que los relacionan con cada una

de las diferentes variables.

Cálculo de otras tablas como el peso o contribuciones porcentuales de cada variable en cada componente principal, o las coordenadas de las poblaciones según los nuevos ejes de la ordenación.

Identidad y distancia genética de Nei.

La identidad genética de Nei (1972) mide el grado de similitud genética entre pares de poblaciones mediante la fórmula $I_{NEI} = \sum x_i y_i / (\sum x_i^2 \sum y_i^2)^{0.5}$, donde x_i e y_i son las frecuencias de cada uno de los i alelos detectados para un *locus* enzimático en las poblaciones “x” e “y”. Para poblaciones que no comparten ningún alelo $I_{NEI} = 0$, mientras que para poblaciones que tienen frecuencias alélicas idénticas $I_{NEI} = 1$. Se calcula como el promedio para cada uno de los *loci* en estudio. La distancia genética de Nei se define a partir de la fórmula de identidad: $D_{NEI} = -\ln I_{NEI}$, y cuantifica el grado de diferenciación genética entre pares de poblaciones.

Posteriormente, Nei (1978) propone una estimación no sesgada de su identidad genética de 1972: $I_{NEI} = \sum x_i y_i / [2n_x \sum (x_i^2 - 1) 2n_y \sum (y_i^2 - 1)]^{0.5}$, donde n_x y n_y son los tamaños muestrales de la población X e Y, respectivamente. El uso de la distancia de Nei de 1978 se prefiere comúnmente al de otras distancias, ya que en las simulaciones de Nei y Chesser (1983) se demostró que este estimador da mejores resultados que otros métodos de cálculo de distancia genética.

Para el cálculo de las identidades y distancias de Nei (1978) entre todos los pares posibles de poblaciones se usó el programa Popgene 1.32 (Yeh *et al.*, 1997).

Correlación entre distancias genéticas y geográficas. Test de Mantel.

Con el fin de evaluar una posible influencia del aislamiento por distancia en la diferenciación interpoblacional, necesitamos testar la correlación entre las matrices de distancias genéticas y distancias geográficas entre pares de poblaciones. El primer paso consiste en representar en un gráfico de dispersión el valor de cada par de poblaciones para ambas variables o distancias (el eje

de las X corresponde a las distancias genéticas y el de las Y a las distancias geográficas). Conociendo los valores medios para cada distancia y las desviaciones típicas hallaríamos el coeficiente de correlación de Pearson (ρ), para conocer la bondad de ajuste de la línea que mejor se adapta a la nube de puntos.

La correlación entre dos matrices de distancia no puede testarse de manera paramétrica, ya que estas distancias no cumplen los requisitos de independencia exigidos (son en cierto modo interdependientes, puesto que al cambiar el valor para un solo par de poblaciones cambiarán las distancias entre una de estas poblaciones y todas las demás), y por tanto no se puede evaluar la significación de la correlación simplemente testando el coeficiente de correlación de Pearson. Por ello, Mantel (1967) desarrolló un test no paramétrico basado en permutaciones. La hipótesis nula es que la relación observada entre las dos matrices de distancia se debe al azar. En tal caso, permutando al azar las filas y las columnas de ambas matrices muchas veces, la distribución de los valores del estadístico, calculado otras tantas veces, no debe ser diferente del observado por experimentación.

Como estadístico, Mantel (1967) usa el valor del determinante resultante del producto de las dos matrices de distancia: $Z = \sum A_{ij} B_{ij}$, donde A_{ij} y B_{ij} son cada uno de los elementos de las matrices de distancia A y B. El valor observado de Z se compara con su distribución permutacional. Con los datos matriciales normalizados, el estadístico resultante se denomina r y equivale al coeficiente de correlación de ambas matrices de distancia. Para los cálculos de correlación y desarrollo del Test de Mantel se usó el programa NTSYS-pc v. 2.02j (Rohlf, 1998), con 9999 permutaciones al azar sobre la matriz de distancias geográficas lineales y la matriz de distancia de Nei entre cada par de poblaciones. Según la documentación del programa, el grado de ajuste puede interpretarse subjetivamente como muy bueno ($0,9 < r$), bueno ($0,8 < r < 0,9$), bajo ($0,7 < r < 0,8$) o muy bajo ($r < 0,7$).

Análisis Bayesiano de asignación poblacional.

Para determinar el número de clusters genéticos en el que puede subdividirse nuestra muestra de individuos se aplicó la aproximación bayesiana

implementada en STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000). El método aplicado en STRUCTURE usa los datos de genotipos multilocus, y se basa en un modelo en el que hay K poblaciones (donde k en principio es desconocida). Los individuos de la muestra global se asignan probabilísticamente a un número determinado de grupos (K), y se provee la proporción de pertenencia (q) de cada individuo en un grupo genético dado, o en dos o más grupos a la vez, si los genotipos indican que están mezclados. El programa se ejecutó diez veces desde $K = 1$ a 12; cada simulación consistió en un “burning” de 30000 iteraciones seguido de 70000 iteraciones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Para cada simulación de K el programa estima una “probabilidad de los datos”, que se expresa como $\Pr(X/K)$. El criterio de elección de K que ofrecen los creadores del programa se basa en los valores que toma el $\ln \Pr(X/K)$ frente a diferentes K . El valor de K para nuestros datos se estimó según el criterio de ΔK , que es una variante basada en el estancamiento de los valores que toma $\ln \Pr(X/K)$ cuando aumenta K (Evanno *et al.*, 2005).

El modelo elegido para el análisis fue el de genealogía de “admixture” con frecuencias alélicas correlacionadas (Falush *et al.*, 2003), ya que es considerablemente flexible y mejora con frecuencia el agrupamiento en poblaciones estrechamente cercanas (Pritchard *et al.* 2010), como las de *C. tamadabensis* y *C. pritzelii*. También fue activada la opción de LOCPRIOR (Hubisz *et al.*, 2009), que usa la ubicación de las muestras como información previa para mejorar el agrupamiento (principalmente de individuos dudosos) a partir del conjunto de datos cuando la señal de estructuración pueda ser relativamente débil, como puede suceder con marcadores moleculares de bajo nivel de mutación.

Hay sin embargo dos consideraciones que nos deben llevar a tomar los resultados de STRUCTURE con cautela: 1) es difícil obtener estimaciones computacionales precisas de $\Pr(X/K)$ y cualquier método de elección de K será siempre una aproximación *a posteriori*; y 2) la interpretación biológica de a qué equivale K puede no ser clara, sobre todo en datos de poblaciones complejas que no se amolden al modelo de STRUCTURE (por ejemplo, el programa asume que los grupos obtenidos cumplen las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg), donde no es infrecuente que el valor del criterio de elección del programa continúe aumentando según aumenta K . En este caso, los

creadores del programa sugieren centrarse en valores de K que contengan la mayor estructuración de los datos y que sean razonables biológicamente.

Representación geográfica de barreras genéticas.

Para la prospección de posibles barreras genéticas entre poblaciones y comparar estos resultados con los de STRUCTURE, usamos el programa BARRIER versión 2.2 (Manni *et al.*, 2004), que construye un mapa de barreras en función a nuestros datos genéticos, usando la triangulación de Delaunai (Brassel & Reif, 1979) y el algoritmo de máxima diferencia de Monmonier (1973). Para la asignación de una barrera, este algoritmo aplica el criterio de búsqueda de la diferencia máxima de una medida de distancia empleada entre todos los bordes de poblaciones vecinas, y repite el proceso a través de los bordes adyacentes hasta formar una línea (Manni & Guérard, 2004). Como datos de distancia se usó una matriz de distancias genéticas de Nei (1978) entre todos los pares de poblaciones, y se activó la opción de puntos virtuales en el programa, para evitar la detección de falsas barreras en las partes cóncavas del mapa debido a las distancias genéticas entre poblaciones remotas, que quedarían como poblaciones vecinas por la triangulación de Delaunai (ver Manni & Guérard, 2004).

La robustez de las barreras computadas se evaluó con 100 matrices de réplica “bootstrap” obtenidas por remuestreo de individuos en todas las poblaciones, siguiendo a Manni & Guérard (2004). Para la validación de una barrera, solo se consideraron aquellas apoyadas por más de 50 barreras provenientes de remuestreo.

Alelos detectados.

Las ocho enzimas finalmente resueltas permitieron la interpretación conjunta de 12 *loci* putativos (*Est-1*, *Got-1*, *Got-2*, *Idh-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Me-1*, *Mnr-1*, *Pgi-1*, *Pgm-1* y *Pgm-2*), para los que se contabilizó un total de 55 alelos (Tabla II.4.1). Dos de los *loci* interpretados (*Me-1* y *Mdh-2*) fueron monomórficos (esto es, constaban de un único alelo) para el conjunto de las 12 poblaciones estudiadas. Del resto de *loci*, *Mdh-1* se halló fijado en dos de las poblaciones (CPJI y CPAN), y *Mnr-1* en cuatro poblaciones (CTAM, CPAG2, CPJI y CPGA).

Ocho de los alelos encontrados en los *loci* polimórficos fueron exclusivos de *Crambe tamadabensis* (*Got-1a*, *Got-1d*, *Idh-1c*, *Mdh-1b*, *Mdh-3d*, *Mdh-3f*, *Mnr-1c*, *Mnr-1d*), y ocho de *C. pritzelii* (*Est-1a*, *Est-1b*, *Got-1f*, *Got-2b*, *Mdh-3b*, *Pgi-1a*, *Pgi-1f*, *Pgm-1c*). Sin embargo, ninguno de ellos se encontró presente en todas las poblaciones de los taxones correspondientes, y por lo tanto no pueden ser considerados como alelos con valor diagnóstico. De los ocho alelos exclusivos de *C. tamadabensis* y *C. pritzelii*, cinco y seis, respectivamente, resultaron ser alelos raros según las condiciones establecidas en Material y Métodos

Niveles de variabilidad genética intrapoblacional.

Los indicadores básicos de variabilidad isoenzimática mostraron, en general, valores considerablemente altos (Tabla II.4.2). Las poblaciones con los mayores niveles de diversidad genética en conjunto fueron Tamadaba (CTTA) [$A_I = 3,4$; $P = 83,3$; $H_o = 0,320$; $H_e = 0,411$] y Tenteniguada (CPTE) [$A_I = 3,4$; $P = 75,0$; $H_o = 0,329$; $H_e = 0,397$] en *C. tamadabensis* y *C. pritzelii*, respectivamente. Destaca también la población de Cuesta de Silva (CTSI) por poseer el mayor valor de heterocigosidad observada para *C. tamadabensis* ($H_o = 0,350$), al igual que Barranco de Antona (CPAN) para *C. pritzelii* ($H_o = 0,330$), aunque ambas poblaciones son de reducido tamaño. Los niveles de variación genética más bajos se detectaron en dos poblaciones de *C. pritzelii*: Riscos Jiménez (CPJI) [$A_I = 1,9$; $P = 41,7$; $H_o = 0,178$; $H_e = 0,168$] y El Gallego-Amurga (CPGA) [$A_I = 2,3$; $P = 66,7$; $H_o = 0,206$; $H_e = 0,255$].

Tabla II.4.1. Frecuencias alélicas halladas en los 12 *loci* interpretados para las 12 poblaciones de *Crambe tamadabensis* y *C. pritzelii* muestreadas en la isla de Gran Canaria. Las frecuencias en sombreado son los alelos exclusivos detectados en cada taxón.

Alleles	<i>C. tamadabensis</i>				<i>C. pritzelii</i>							
	CTTA	CTAM	CTGU	CTSI	CPAG2	CPAG1	CPAZ	CPJI	CPAN	CPTE	CPGY	CPGA
Est-1a	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Est-1b	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,030	0,000	0,000	0,018	0,000
Est-1c	0,289	0,611	0,160	0,600	0,909	0,872	0,978	0,970	0,792	0,885	0,881	0,919
Est-1d	0,689	0,389	0,800	0,367	0,061	0,128	0,011	0,000	0,208	0,103	0,095	0,081
Est-1e	0,022	0,000	0,040	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,006	0,000
Got-1a	0,034	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Got-1b	0,514	0,304	0,550	0,404	0,237	0,449	0,729	0,982	0,500	0,428	0,709	0,848
Got-1c	0,075	0,018	0,000	0,000	0,026	0,061	0,000	0,000	0,000	0,072	0,025	0,000
Got-1d	0,034	0,000	0,000	0,288	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Got-1e	0,301	0,375	0,313	0,115	0,605	0,388	0,217	0,018	0,500	0,394	0,266	0,152
Got-1f	0,000	0,000	0,000	0,000	0,105	0,020	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000
Got-1g	0,041	0,304	0,013	0,192	0,026	0,082	0,054	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000
Got-2a	0,000	0,017	0,000	0,000	0,053	0,000	0,012	0,000	0,000	0,060	0,012	0,000
Got-2b	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,262	0,000	0,114	0,055	0,042	0,000
Got-2c	0,544	0,414	0,622	0,431	0,316	0,224	0,065	0,000	0,271	0,412	0,458	0,231
Got-2d	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,081	0,000	0,000	0,012	0,000
Got-2e	0,344	0,569	0,378	0,569	0,632	0,776	0,655	0,919	0,614	0,396	0,476	0,769
Got-2f	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,077	0,000	0,000
Idh-1a	0,013	0,323	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,079	0,000	0,000
Idh-1b	0,279	0,274	0,500	0,220	0,444	0,598	0,813	0,900	0,778	0,483	0,714	0,160
Idh-1c	0,000	0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Idh-1d	0,675	0,371	0,365	0,780	0,542	0,272	0,148	0,083	0,208	0,202	0,115	0,583
Idh-1e	0,019	0,000	0,000	0,000	0,014	0,065	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Idh-1f	0,000	0,000	0,068	0,000	0,000	0,000	0,023	0,017	0,014	0,124	0,170	0,215
Idh-1g	0,013	0,000	0,041	0,000	0,000	0,065	0,006	0,000	0,000	0,112	0,000	0,042
Mdh-1a	0,127	0,047	0,037	0,000	0,000	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Mdh-1b	0,000	0,000	0,085	0,179	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Mdh-1c	0,012	0,047	0,000	0,036	0,013	0,000	0,091	0,000	0,000	0,124	0,006	0,005
Mdh-1d	0,861	0,906	0,878	0,786	0,987	0,971	0,909	1,000	1,000	0,876	0,994	0,995
Mdh-2a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Mdh-3a	0,036	0,177	0,207	0,017	0,077	0,173	0,102	0,000	0,143	0,080	0,128	0,075
Mdh-3b	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000
Mdh-3c	0,602	0,452	0,524	0,603	0,615	0,531	0,457	0,955	0,429	0,529	0,445	0,586
Mdh-3d	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Mdh-3e	0,331	0,355	0,183	0,328	0,308	0,265	0,419	0,045	0,429	0,368	0,396	0,339
Mdh-3f	0,018	0,000	0,061	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Mdh-3g	0,012	0,000	0,024	0,034	0,000	0,031	0,016	0,000	0,000	0,017	0,030	0,000
Me-1a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Mnr-1a	0,072	0,000	0,098	0,052	0,000	0,130	0,011	0,000	0,311	0,038	0,022	0,000
Mnr-1b	0,910	1,000	0,878	0,948	1,000	0,870	0,989	1,000	0,689	0,962	0,978	1,000
Mnr-1c	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Mnr-1d	0,018	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Pgi-1a	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,161	0,000	0,015	0,017	0,034	0,000
Pgi-1b	0,169	0,500	0,293	0,214	0,770	0,606	0,283	0,212	0,456	0,590	0,443	0,250
Pgi-1c	0,519	0,194	0,524	0,589	0,149	0,144	0,489	0,303	0,265	0,275	0,295	0,085
Pgi-1d	0,281	0,306	0,183	0,196	0,081	0,250	0,056	0,000	0,059	0,096	0,085	0,523
Pgi-1e	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,485	0,191	0,022	0,142	0,142
Pgi-1f	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,000
Pgm-1a	0,480	0,703	0,539	0,500	0,486	0,337	0,461	0,766	0,543	0,550	0,208	0,060
Pgm-1b	0,520	0,297	0,461	0,500	0,446	0,616	0,539	0,234	0,357	0,438	0,612	0,773
Pgm-1c	0,000	0,000	0,000	0,000	0,068	0,047	0,000	0,000	0,100	0,013	0,180	0,167
Pgm-2a	0,361	0,688	0,098	0,083	0,090	0,149	0,324	0,000	0,000	0,089	0,211	0,000
Pgm-2b	0,291	0,234	0,354	0,708	0,321	0,436	0,582	0,667	0,432	0,487	0,222	0,038
Pgm-2c	0,152	0,078	0,427	0,208	0,410	0,362	0,060	0,076	0,527	0,405	0,467	0,925
Pgm-2d	0,196	0,000	0,122	0,000	0,179	0,053	0,033	0,258	0,041	0,019	0,100	0,038

Tabla II.4.2. Indicadores básicos de variación isoenzimática en *Crambe tamadabensis* y *C. pritzelii*: A_i = número medio de alelos por *locus*; N_e = número medio efectivo de alelos por *locus*; $P_{0,95}$ = porcentaje de *loci* polimórficos (criterio de 0,95); H_o y H_e = heterocigosidad observada y esperada; F_{IS} = índice de fijación. Valores en paréntesis corresponden a las desviaciones típicas. L = número de *loci* polimórficos usados en el test de cuello de botella; H_d/H_e = número de *loci* con deficiencia y exceso de heterocigosidad, respectivamente, de acuerdo con el Modelo de Alelos Independientes (IAM); P = probabilidad del test (los valores estadísticamente significativos al nivel de $p < 0,05$ se indican en negrita.).

ESPECIE/POBLACIÓN	A_i	N_e	$P_{0,95}$	H_o	H_e	F_{IS}	Test de cuello de botella		
							L	H_d/H_e	P
<i>Crambe tamadabensis</i>									
1. CTTA	3,4 (1,6)	2,0 (0,8)	83,3	0,320 (0,215)	0,411 (0,249)	0,183	10	3/7	0,016
2. CTAM	2,6 (1,2)	1,9 (0,8)	75,0	0,242 (0,256)	0,396 (0,277)	0,371	9	1/8	0,005
3. CTGU	3,1 (1,4)	1,9 (0,7)	83,3	0,278 (0,210)	0,410 (0,247)	0,310	10	3/7	0,042
4. CTSI	2,6 (1,2)	1,8 (0,7)	83,3	0,350 (0,253)	0,386 (0,234)	0,082	10	3/7	0,009
Valores promedio	2,9	1,9	81,2	0,298	0,401	0,237			
<i>Crambe pritzelii</i>									
5. CPAG2	2,7 (1,2)	1,7 (0,7)	66,7	0,227 (0,217)	0,331 (0,270)	0,302	9	2/7	0,102
6. CPAG1	2,8 (1,3)	1,8 (0,7)	75,0	0,246 (0,209)	0,369 (0,257)	0,319	10	1/9	0,003
7. CPAZ	3,2 (1,6)	1,6 (0,7)	66,7	0,284 (0,291)	0,316 (0,256)	0,077	10	4/6	0,312
8. CPJI	1,9 (0,8)	1,3 (0,5)	41,7	0,178 (0,237)	0,168 (0,216)	-0,034	8	5/3	0,473
9. CPAN	2,5 (1,4)	1,8 (0,7)	75,0	0,330 (0,292)	0,384 (0,253)	0,126	9	0/9	0,001
10. CPTE	3,4 (1,6)	2,0 (0,8)	75,0	0,329 (0,266)	0,397 (0,275)	0,219	10	2/8	0,007
11. CPGY	3,1 (1,4)	1,9 (0,8)	66,7	0,271 (0,273)	0,356 (0,283)	0,283	10	3/7	0,097
12. CPGA	2,3 (1,1)	1,5 (0,6)	66,7	0,206 (0,237)	0,255 (0,242)	0,241	9	3/6	0,082
Valores promedio	2,7	1,7	66,7	0,259	0,322	0,192			

En cuanto a los valores poblacionales medios por especie, *C. tamadabensis* mostró niveles mayores de variabilidad en todos los parámetros ($A_i = 2,9$; $P = 81,2$; $H_o = 0,298$; $H_e = 0,401$) que *C. pritzelii* ($A_i = 2,7$; $P = 66,7$; $H_o = 0,259$; $H_e = 0,322$), a pesar de su distribución geográfica mucho más reducida. El índice de fijación (F_{IS} , Tabla 4.2) mostró valores poblacionales medios moderados para ambas especies (0,237 y 0,192 para *C. tamadabensis* y *C. pritzelii*, respectivamente), que se corresponde con un descenso de los niveles de heterocigosidad observada con respecto a la esperada y, por tanto, con un defecto de heterocigosidad por población. Sin embargo, algunas poblaciones mostraron valores mucho más bajos y cercanos a cero, o incluso negativos: CTSI ($F_{IS} = 0,082$), CPAZ ($F_{IS} = 0,077$) o CPJI ($F_{IS} = -0,034$).

Los modelos de regresión lineal tomando como variable explicativa a la talla poblacional (logaritmo del número de individuos) que se ajustaron significativamente a los datos fueron solamente los realizados para P y A_i en *C. pritzelii*, aunque el nivel de bondad de ajuste obtenido fue muy bajo ($r^2 = 0,474$; $P < 0,05$ y $r^2 = 0,461$; $P < 0,05$ respectivamente) [Figura II.4.1].

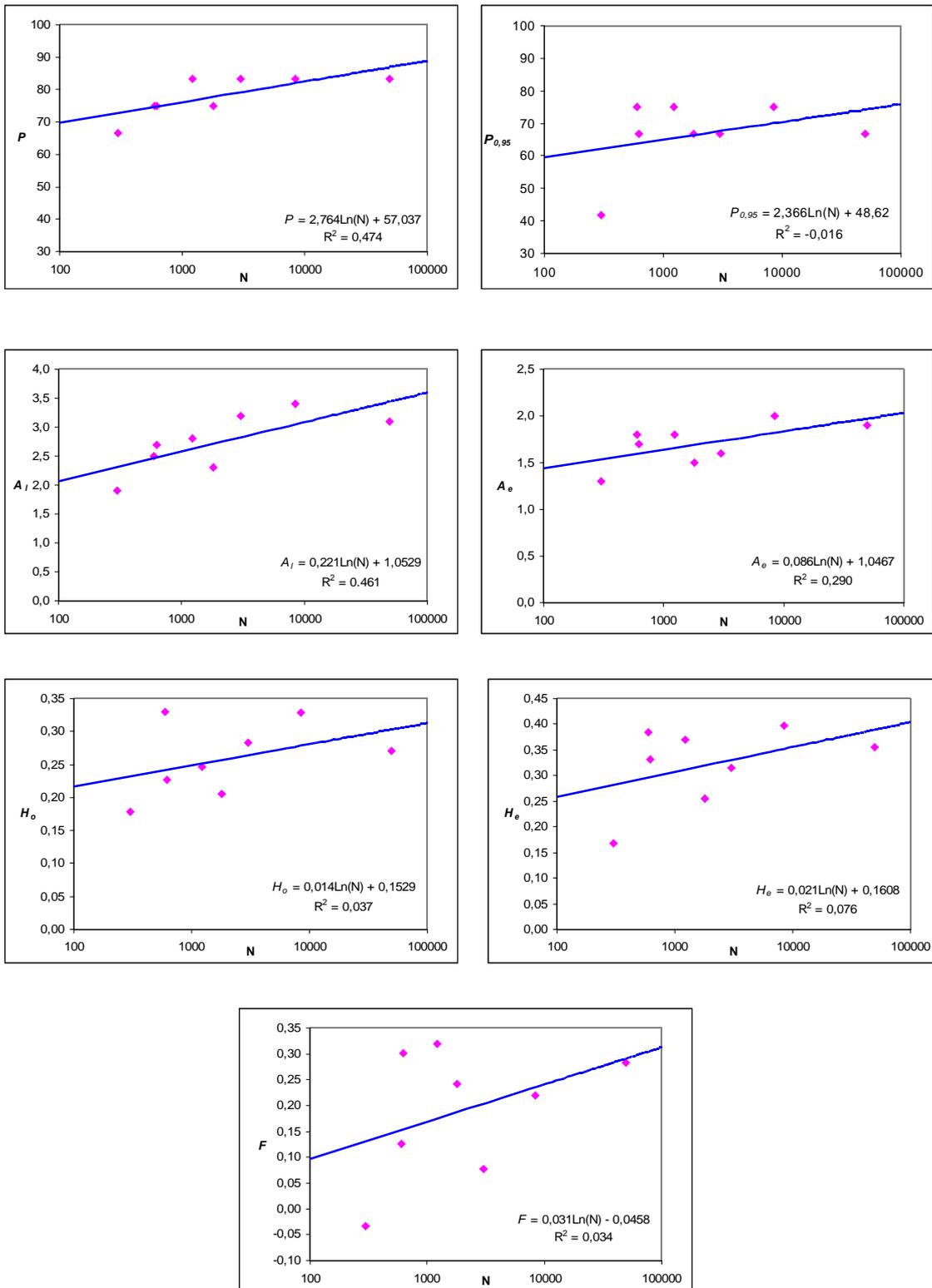


Figura II.4.1. Diagramas de dispersión (los puntos representan a las poblaciones), rectas de regresión y coeficientes de determinación ajustados (R^2) en la relación entre diferentes parámetros de variabilidad intrapoblacional (P , $P_{0,95}$, A_i , A_e , H_o , H_e , F) [eje Y], y el tamaño poblacional (logaritmo del número de individuos) [eje X] dentro de *C. pritzelii*. Las relaciones resultaron significativas solamente para P y A_i ($P < 0,05$).

Para todos los parámetros de variabilidad (P , A_i , A_e , H_o , H_e) las regresiones lineales mostraron siempre mayores coeficientes de ajuste (R^2) cuando se consideró tanto la talla poblacional como la distancia a la población conoespecífica conocida más cercana (ver Tabla II.3.4), en comparación con los modelos en los que se consideró sólo la talla poblacional. En *C. pritzelii* cada parámetro básico de variabilidad genética se incrementó con el tamaño poblacional y decreció con la distancia, mientras que el modelo se ajustó significativamente a los datos para A_e ($r^2 = 0,858$; $P < 0,01$) y H_e ($r^2 = 0,634$; $P < 0,05$) [Tabla II.4.3]. Entre los diferentes modelos para *C. tamadabensis*, solamente A_i se incrementó con el tamaño poblacional y decreció con la distancia, y ninguno de los modelos se ajustó significativamente a los datos, probablemente debido al escaso número de poblaciones de este taxón.

Tabla II.4.3. Modelos de Regresión Lineal Múltiple y valores del coeficiente de determinación ajustado (R^2) para diferentes parámetros de variabilidad intrapoblacional en las dos especies de *Crambe* analizadas. N = número total de individuos adultos estimado para una población; Dist = distancia con la población más cercana (ver Tabla 3.x); **P** = nivel de significación (los valores estadísticamente significativos al nivel de $p < 0,05$ se indican en negrita.).

Especie / Modelo	R^2 (ajustado)	F de Fisher	P
<i>C. tamadabensis</i>			
$P = 121,61 - 7,797\log N - 6,292\text{Dist}$	0,884	12,397	0,197
$A_i = 1,695 + 0,435\log N - 0,029\text{Dist}$	0,444	2,199	0,430
$A_e = 1,057 + 0,214\log N + 0,074\text{Dist}$	0,808	7,316	0,253
$H_o = 0,764 - 0,093\log N - 0,069\text{Dist}$	0,395	1,978	0,449
$H_e = 0,330 + 0,019\log N + 0,005\text{Dist}$	-0,453	0,532	0,696
<i>C. pritzelii</i>			
$P = 59,330 + 6,308\log N - 0,574\text{Dist}$	0,496	4,438	0,078
$P_{(0,95)} = 56,133 + 5,263\log N - 1,881\text{Dist}$	0,218	1,978	0,233
$A_i = 1,277 + 0,503\log N - 0,056\text{Dist}$	0,540	5,112	0,062
$A_e = 1,249 + 0,192\log N - 0,051\text{Dist}$	0,878	26,122	0,002
$H_o = 0,187 + 0,031\log N - 0,009\text{Dist}$	0,203	1,893	0,244
$H_e = 0,232 + 0,047\log N - 0,018\text{Dist}$	0,682	8,515	0,025

Desviación de los parámetros de variabilidad intrapoblacional.

De los 10 *loci* polimórficos, solamente uno (*Mdh-1*) se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) para todas las poblaciones analizadas (Tabla II.4.4). Las frecuencias alélicas del *locus Mdh-3* mostraron desviaciones significativas respecto del equilibrio H-W en 11 poblaciones, con un mayor peso de las desviaciones por exceso de heterocigotos en 10 de ellas (según el test de Chi-cuadrado). En general, el resto de *loci* polimórficos no se encontraron en equilibrio para la mayoría de las poblaciones debido a un defecto de heterocigotos. *Pgi-1* fue el *locus* no hallado en equilibrio para el menor número de poblaciones (5 de 12). Los *loci Est-1* y *Mnr-1* (este último polimórfico en sólo ocho poblaciones) no se encontraron en equilibrio en 6 poblaciones. *Idh-1* no se encontró en equilibrio en 7 poblaciones, y *Got-2* en 8 poblaciones, mientras que *Got-1*, *Pgm-1* y *Pgm-2* no se encontraron en equilibrio en 10 poblaciones. En consonancia con los resultados del índice de fijación, solamente la población CPJI cumplió las proporciones de Hardy-Weinberg para todos los *loci*. Las demás poblaciones generalmente mostraron desviaciones significativas para la mayoría de los *loci* y un defecto de heterocigotos en casi todos los casos, en un rango comprendido entre cinco (CTGU, CTSI y CPAN) y ocho (CPTe y CPGY) o nueve (CPAG1) de los *loci* analizados.

En el test de neutralidad, los valores de la homocigosidad esperada (F) para todos los *loci* en todas las poblaciones analizadas entraron dentro del intervalo de confianza del 95% según el valor medio de la homocigosidad esperada bajo la hipótesis de neutralidad (Tabla II.4.5), salvo para el *locus Pgm-2* en CTTA. Podemos concluir por lo tanto que los *loci* empleados en nuestra investigación se pueden considerar neutrales, es decir, no sometidos a procesos de selección.

Tabla II.4.4. Test de Chi-cuadrado. χ^2 : valor del estadístico Chi-cuadrado para cada locus. P: probabilidad del Test. Los valores en negrita indican significación.

	<i>Est-1</i>		<i>Got-1</i>		<i>Got-2</i>		<i>Idh-1</i>		<i>Mdh-1</i>	
	χ^2	P								
CTTA	3,45	0,33	176,41	0,000d	76,15	0,000d	163,62	0,000d	2,04	0,56
CTAM	6,23	0,013d	43,53	0,000d	6,10	0,107	63,33	0,000d	0,28	0,964
CTGU	53,8	0,000d	57,59	0,000d	0,03	0,863	7,92	0,636	2,70	0,440
CTSI	5,65	0,130	43,05	0,000d	0,04	0,842	1,78	0,182	0,52	0,913
CPAG2	108,38	0,000d	118,25	0,000d	50,04	0,000d	6,20	0,102	0,00	1,000
CPAG1	12,82	0,000d	202,87	0,000d	8,98	0,002d	26,46	0,000d	0,03	0,86
CPAZ	0,03	0,998	82,12	0,000d	45,31	0,000e	204,59	0,000d	0,88	0,348
CPJI	0,02	0,900	0,00	1,000	0,19	0,665	4,73	0,193	--	--
CPAN	2,44	0,119	0,18	0,67	10,33	0,016d	2,73	0,436	--	--
CPTe	179,19	0,000d	161,08	0,000d	108,40	0,000d	62,28	0,000d	0,09	0,762
CPGY	9,01	0,173	106,60	0,000d	180,83	0,000d	32,11	0,000d	0,00	1,000
CPGA	36,97	0,000d	10,77	0,001d	5,81	0,016d	12,75	0,047d	0,00	1,000
	<i>Mdh-3</i>		<i>Mnr-1</i>		<i>Pgi-1</i>		<i>Pgm-1</i>		<i>Pgm-2</i>	
	χ^2	P								
CTTA	32,91	0,000e	10,95	0,012d	13,19	0,040d	0,54	0,46	91,99	0,000d
CTAM	23,34	0,000e	--	--	1,17	0,761	13,35	0,000d	45,39	0,000d
CTGU	41,38	0,000e	9,58	0,143	2,18	0,535	15,7	0,000d	60,21	0,000d
CTSI	37,22	0,000e	18,33	0,000d	5,95	0,114	5,5	0,019e	33,22	0,000d
CPAG2	14,80	0,002e	--	--	2,41	0,490	44,29	0,000d	30,19	0,000d
CPAG1	62,43	0,000d	15,13	0,000d	8,31	0,040d	64,52	0,000d	62,69	0,000d
CPAZ	68,75	0,000e	0,01	0,941	38,57	0,000d	21,82	0,000e	26,30	0,000d
CPJI	0,05	0,825	--	--	4,95	0,175	0,44	0,506	7,81	0,050
CPAN	20,21	0,000e	7,43	0,006d	74,39	0,000e	59,82	0,000d	4,38	0,223
CPTe	41,61	0,000e	76,70	0,000d	6,01	0,814	171,23	0,000d	105,31	0,000d
CPGY	76,17	0,000e	122,01	0,000d	25,62	0,004d	79,04	0,000d	125,51	0,000d
CPGA	38,28	0,000e	--	--	9,70	0,138	25,41	0,000d	18,55	0,000d

Tabla II.4.5. Resultados del test de neutralidad de Ewens-Watterson para cada *loci* polimórfico detectado en *Crambe*. **F** = valor promedio de la homocigosidad esperada según las proporciones de Hardy-Weinberg. **L95** = límite inferior del intervalo de confianza al 95% para el valor medio de la homocigosidad esperada bajo la hipótesis de neutralidad. **U95** = límite superior del intervalo de confianza al 95% para el valor medio de la homocigosidad esperada bajo la hipótesis de neutralidad. Valores de **F** en negrita indican significación.

	<i>Est-1</i>			<i>Got-1</i>			<i>Got-2</i>			<i>ldh-1</i>			<i>Mdh-1</i>		
	F	L95	U95												
CTTA	0,559	0,376	0,956	0,364	0,240	0,774	0,420	0,320	0,927	0,535	0,270	0,888	0,758	0,380	0,976
CTAM	0,525	0,500	0,895	0,325	0,297	0,564	0,495	0,359	0,933	0,318	0,312	0,877	0,826	0,356	0,939
CTGU	0,667	0,373	0,922	0,416	0,302	0,880	0,530	0,503	0,976	0,390	0,260	0,822	0,780	0,369	0,952
CTSI	0,496	0,349	0,873	0,297	0,293	0,854	0,510	0,502	0,966	0,657	0,501	0,961	0,651	0,365	0,931
CPAG2	0,831	0,368	0,941	0,435	0,252	0,805	0,501	0,373	0,948	0,491	0,365	0,946	0,975	0,503	0,975
CPAG1	0,777	0,501	0,975	0,363	0,259	0,828	0,652	0,503	0,980	0,440	0,301	0,916	0,943	0,505	0,981
CPAZ	0,956	0,373	0,978	0,581	0,375	0,976	0,502	0,276	0,865	0,683	0,282	0,880	0,834	0,504	0,989
CPJI	0,941	0,502	0,970	0,965	0,501	0,965	0,852	0,502	0,968	0,817	0,365	0,935	1,000	--	--
CPAN	0,670	0,502	0,973	0,500	0,500	0,971	0,464	0,363	0,944	0,649	0,371	0,946	1,000	--	--
CPTE	0,794	0,378	0,977	0,349	0,286	0,903	0,339	0,280	0,875	0,308	0,280	0,892	0,783	0,502	0,989
CPGY	0,786	0,325	0,942	0,574	0,381	0,975	0,438	0,271	0,885	0,553	0,384	0,978	0,989	0,502	0,989
CPGA	0,851	0,502	0,985	0,742	0,503	0,986	0,645	0,503	0,988	0,414	0,319	0,932	0,989	0,504	0,989
	<i>Mdh-3</i>			<i>Mnr-1</i>			<i>Pgi-1</i>			<i>Pgm-1</i>			<i>Pgm-2</i>		
	F	L95	U95												
CTTA	0,475	0,279	0,895	0,833	0,382	0,976	0,378	0,317	0,939	0,501	0,501	0,987	0,277	0,321	0,938
CTAM	0,362	0,308	0,877	1,000	--	--	0,381	0,365	0,937	0,583	0,502	0,969	0,534	0,367	0,939
CTGU	0,356	0,267	0,839	0,781	0,309	0,883	0,394	0,369	0,952	0,503	0,501	0,974	0,332	0,298	0,883
CTSI	0,473	0,260	0,779	0,902	0,502	0,966	0,432	0,350	0,931	0,500	0,500	0,959	0,552	0,358	0,919
CPAG2	0,479	0,376	0,950	1,000	--	--	0,622	0,360	0,947	0,440	0,365	0,947	0,311	0,310	0,901
CPAG1	0,383	0,313	0,902	0,774	0,503	0,982	0,450	0,373	0,962	0,496	0,353	0,954	0,346	0,308	0,898
CPAZ	0,395	0,275	0,897	0,979	0,501	0,989	0,349	0,270	0,893	0,503	0,502	0,989	0,449	0,316	0,946
CPJI	0,913	0,502	0,970	1,000	--	--	0,372	0,363	0,941	0,641	0,502	0,969	0,517	0,361	0,941
CPAN	0,388	0,357	0,944	0,572	0,502	0,973	0,318	0,224	0,709	0,432	0,368	0,944	0,466	0,370	0,947
CPTE	0,422	0,269	0,889	0,926	0,502	0,989	0,434	0,274	0,902	0,494	0,376	0,975	0,410	0,315	0,938
CPGY	0,373	0,314	0,929	0,958	0,502	0,989	0,312	0,276	0,891	0,451	0,379	0,967	0,322	0,316	0,935
CPGA	0,464	0,385	0,977	1,000	--	--	0,363	0,326	0,944	0,629	0,375	0,974	0,858	0,382	0,975

Todas las poblaciones analizadas de *C. tamadabensis* mostraron un número significativo de *loci* con exceso de heterozigosidad esperada (H_e) con respecto a la heterozigosidad esperada bajo equilibrio mutación-deriva (H_{eq}) (al menos 7 de 9 ó 10 polimórficos, $p < 0,05$, Tabla II.4.2) según el modelo de alelos independientes (IAM) en el test de cuello de botella (Cornuet & Luikart, 1996)), lo que indicaría que han experimentado reducciones recientes de sus tallas poblacionales. El test también fue significativo para tres poblaciones de *C. pritzelii* (CPAG1, CPAN y CPTE), con al menos 8 de 9 ó 10 *loci* polimórficos con exceso de heterozigosidad esperada. Otras tres poblaciones (CPAG2, CPGY y CPGA) mostraron un número similar de *loci* con exceso de heterozigosidad esperada, con desviaciones cercanas a niveles de significación para el test de cuello de botella ($p = 0,082-0,102$).

Respectivamente 13 y 17 alelos resultaron raros para *C. tamadabensis* y *C. pritzelii*, según las condiciones establecidas en el apartado de Material y Métodos (Tablas II.4.6 y II.4.7). En *C. tamadabensis*, la población con mayor presencia de alelos raros fue CTTA, con ocho (de los cuales cuatro se encuentran solamente en esta población), mientras que los cinco alelos raros restantes se encontraron tan solo en CTAM (tres) o en CTGU (dos). En *C. pritzelii*, la mayoría de los alelos raros se hallaron en las poblaciones CPTE (con 11 de 17) o CPAZ (9 de 17). En este taxón, el orden de las poblaciones según su cantidad total de alelos (reflejado en el parámetro de variabilidad intrapoblacional A_i) coincidió con el orden según el número de alelos raros detectados. Apenas se encontraron alelos raros en CPJI y CPAN (dos en cada una), o en CPGA (uno).

El cálculo de las probabilidades de pérdida para los alelos raros (L_o y L_e) se muestra en las Tablas II.4.6 y II.4.7. El cociente entre las pendientes de las líneas de regresión correspondientes a $-\log(L_o)$ y $-\log(L_e)$ arrojó valores de representatividad de $R = 0,389$ y $R = 0,268$ para *C. tamadabensis* y *C. pritzelii*, respectivamente (Fig. II.4.2), lo cual indica que un muestreo hipotético de una población elegida al azar dentro de cada especie representaría como promedio el 39% y el 27% de los alelos raros detectados.

Tabla II.4.6. Probabilidades de pérdida observada y esperada (L_o y L_e) para los 13 alelos que cumplieron los criterios de rareza (ver Material y Métodos) en *C. tamadabensis*. **frec**: frecuencia alélica media para las poblaciones donde el alelo está presente; **N**: número de poblaciones donde se detectó el alelo correspondiente; “Preferente” se refiere a la población donde el alelo tiene mayor frecuencia, donde sería más probable muestrearlo.

Alelo	frec	N	L_o	L_e	Poblaciones <i>C. tamadabensis</i>	Preferente
<i>Got-1a</i>	0,080	2	0,718	0,515	CTTA, CTGU	CTGU
<i>Got-1c</i>	0,047	2	0,826	0,683	CTTA, CTAM	CTTA
<i>Got-2a</i>	0,017	1	0,966	0,870	CTAM	CTAM
<i>Got-2d</i>	0,056	1	0,891	0,629	CTTA	CTTA
<i>Got-2f</i>	0,056	1	0,891	0,629	CTTA	CTTA
<i>ldh-1c</i>	0,032	1	0,937	0,769	CTAM	CTAM
<i>ldh-1e</i>	0,019	1	0,961	0,854	CTTA	CTTA
<i>ldh-1f</i>	0,068	1	0,869	0,571	CTGU	CTGU
<i>ldh-1g</i>	0,027	2	0,897	0,805	CTTA, CTGU	CTGU
<i>Mdh-3d</i>	0,016	1	0,968	0,878	CTAM	CTAM
<i>Mnr-1c</i>	0,012	1	0,976	0,907	CTGU	CTGU
<i>Mnr-1d</i>	0,015	2	0,941	0,885	CTTA, CTGU	CTTA
<i>Pgi-1e</i>	0,031	1	0,938	0,776	CTTA	CTTA

Tabla II.4.7. Probabilidades de pérdida observada y esperada (L_o y L_e) para los 17 alelos que cumplieron los criterios de rareza (ver Material y Métodos) en *C. pritzelii*. **frec**: frecuencia alélica media para las poblaciones donde el alelo está presente; **N**: número de poblaciones donde se detectó el alelo correspondiente; “Preferente” se refiere a la población donde el alelo tiene mayor frecuencia, donde sería más probable muestrearlo.

Alelo	frec	N	L_o	L_e	Poblaciones <i>C. pritzelii</i>	Preferente
<i>Est-1a</i>	0,030	1	0,940	0,611	CPAG2	CPAG2
<i>Est-1b</i>	0,020	3	0,887	0,727	CPAZ, CPJI, CPGY	CPJI
<i>Est-1e</i>	0,009	2	0,966	0,869	CPTE, CPGY	CPTE
<i>Got-1c</i>	0,046	4	0,685	0,469	CPAG2, CPAG1, CPTE, CPGY	CPTE
<i>Got-1f</i>	0,060	3	0,688	0,369	CPAG2, CPAG1, CPTE	CPAG2
<i>Got-1g</i>	0,053	4	0,647	0,418	CPAG2, CPAG1, CPAZ, CPTE	CPAG1
<i>Got-2a</i>	0,034	4	0,757	0,573	CPAG2, CPAZ, CPTE, CPGY	CPTE
<i>Got-2d</i>	0,033	3	0,818	0,586	CPAZ, CPJI, CPGY	CPJI
<i>Got-2f</i>	0,077	1	0,852	0,278	CPTE	CPTE
<i>ldh-1a</i>	0,079	1	0,849	0,270	CPTE	CPTE
<i>ldh-1e</i>	0,030	3	0,832	0,613	CPAG2, CPAG1, CPAZ	CPAG1
<i>ldh-1g</i>	0,056	4	0,629	0,396	CPAG1, CPAZ, CPTE, CPGA	CPTE
<i>Mdh-1a</i>	0,029	1	0,942	0,620	CPAG1	CPAG1
<i>Mdh-3b</i>	0,006	2	0,978	0,915	CPAZ, CPTE	CPTE
<i>Mdh-3g</i>	0,024	4	0,826	0,682	CPAG1, CPAZ, CPTE, CPGY	CPAG1
<i>Pgi-1a</i>	0,057	4	0,627	0,393	CPAZ, CPAN, CPTE, CPGY	CPAZ
<i>Pgi-1f</i>	0,015	1	0,971	0,789	CPAN	CPAN

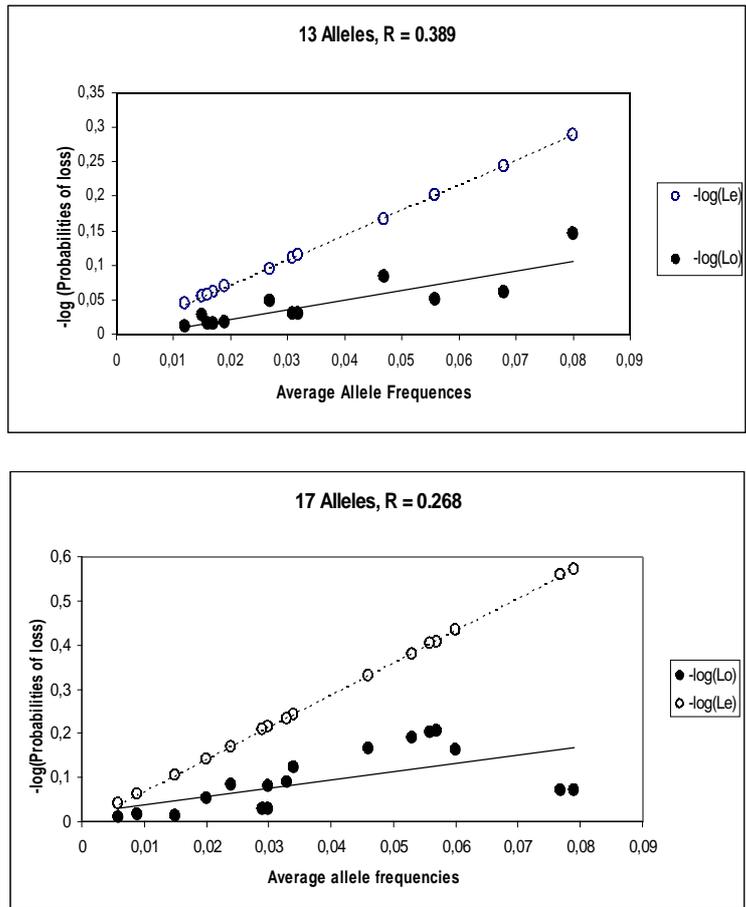


Figura II.4.2. Regresiones de la probabilidad de pérdida observada y esperada (L_o y L_e) respecto a la frecuencia media de los alelos raros (eje X) en los conjuntos de poblaciones de *C. tamadabensis* (arriba) y *C. pritzellii* (abajo). R se refiere al valor de representatividad.

Estructura de la variabilidad genética.

El índice de fijación (F_{IS}) global presentó una variación considerable entre los diferentes *loci* analizados en ambas especies, con valores positivos en casi todos los casos desde moderados a altos (indicando defecto de heterocigotos) excepto en *Mdh-1* y *Mdh-3*, donde estos valores fueron ligeramente negativos (Tabla II.4.8). Para todos los *loci*, una gran proporción de la diversidad génica total (H_T) de ambas especies correspondió al componente intrapoblacional (H_S). Por consiguiente, la proporción de variación atribuible a la subdivisión poblacional según los parámetros de F_{ST} de Wright (1951) y G_{ST} de Nei (1973) fue siempre de baja a moderada para todos los *loci*, sin que ninguno destacara por tener valores elevados. El locus *Pgm-2* fue el más discriminante entre poblaciones, con $F_{ST} = 0,170$ y $0,180$, $G_{ST} = 0,157$ y $0,171$, para *C. tamadabensis* y *C. pritzellii*, respectivamente.

Tabla II.4.8. Estadísticos de estructura poblacional de Wright (1951) y Nei (1973) para los *loci* polimórficos detectados en *C. tamadabensis* y *C. pritzelii*.

	Wright (1951)			Nei (1973)			
	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	H_S	H_T	D_{ST}	G_{ST}
<i>C. tamadabensis</i>							
EST-1	0,491	0,564	0,144	0,459	0,518	0,058	0,112
GOT-1	0,696	0,718	0,073	0,665	0,704	0,039	0,055
GOT-2	0,167	0,198	0,037	0,519	0,533	0,013	0,025
IDH-1	0,039	0,144	0,110	0,533	0,592	0,059	0,099
MDH-1	-0,031	0,009	0,039	0,250	0,257	0,008	0,029
MDH-3	-0,167	-0,136	0,027	0,590	0,602	0,011	0,019
MNR-1	0,378	0,395	0,028	0,123	0,125	0,002	0,014
PGI-1	0,163	0,219	0,066	0,613	0,649	0,036	0,055
PGM-1	0,190	0,215	0,031	0,487	0,496	0,009	0,019
PGM-2	0,455	0,548	0,170	0,588	0,698	0,110	0,157
Promedio	0,246	0,307	0,080	0,402	0,431	0,029	0,067
<i>C. pritzelii</i>							
EST-1	0,422	0,444	0,039	0,177	0,182	0,005	0,027
GOT-1	0,408	0,508	0,169	0,443	0,526	0,083	0,158
GOT-2	0,275	0,354	0,110	0,457	0,507	0,051	0,100
IDH-1	0,207	0,341	0,168	0,461	0,549	0,087	0,159
MDH-1	-0,055	0,012	0,064	0,061	0,065	0,004	0,056
MDH-3	-0,288	-0,193	0,073	0,526	0,565	0,038	0,068
MNR-1	0,512	0,596	0,173	0,100	0,120	0,019	0,163
PGI-1	0,120	0,245	0,142	0,604	0,697	0,093	0,134
PGM-1	0,372	0,453	0,128	0,496	0,562	0,066	0,117
PGM-2	0,189	0,335	0,180	0,546	0,659	0,113	0,171
Promedio	0,184	0,294	0,135	0,323	0,369	0,047	0,126
sin CPJI CPGA	0,204	0,258	0,067	0,359	0,382	0,022	0,059
Promedio Crambe	0,205	0,326	0,153	0,349	0,408	0,059	0,144
sin CPJI CPGA	0,220	0,307	0,112	0,376	0,420	0,043	0,104

De acuerdo con la uniformidad evidenciada entre *loci*, los valores del componente de la estructuración interpoblacional en ambas especies fueron bastante bajos (Tabla II.4.8), aunque más en *C. tamadabensis* ($F_{ST} = 0,080$, $G_{ST} = 0,067$) que en *C. pritzelii* ($F_{ST} = 0,135$, $G_{ST} = 0,126$). Cuando se reunieron todas las poblaciones de ambos taxones, estos valores se incrementaron ligeramente en comparación con *C. pritzelii* ($F_{ST} = 0,153$, $G_{ST} = 0,144$). Sin embargo, cuando quitamos de los cálculos las dos poblaciones de *C. pritzelii* que presentan los menores niveles de variabilidad en este estudio (CPJI y CPGA), encontramos un nivel muy bajo de estructuración genética interpoblacional para esta especie ($F_{ST} = 0,067$, $G_{ST} = 0,059$), similar al de *C. tamadabensis* (Tabla II.4.8). Los valores de estos parámetros, aunque bastante menores que al considerar todas las poblaciones en conjunto, se incrementaron considerablemente al volver a reunir ambos taxones ($F_{ST} = 0,112$, $G_{ST} = 0,104$).

Tabla II.4.9. Valores del análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) de la variación genética de las especies de *Crambe* analizadas. A: dos niveles jerárquicos (no hay grupos); B: tres niveles jerárquicos (dos grupos: *C. tamadabensis* y *C. pritzelii*); C: tres niveles jerárquicos (cuatro grupos: *C. tamadabensis*, *C. pritzelii*, CPJI y CPGA); D: tres niveles jerárquicos (dos grupos: *C. tamadabensis* y *C. pritzelii* sin CPJI ni CPGA).

A)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Significación
Entre poblaciones	448,23	0,363	14,85	P < 0,001***
Dentro de las poblaciones	2742,51	2,082	85,15	P < 0,001***
Total	3190,74	2,445		

B)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Significación
Entre grupos	121,08	0,229	8,84	P < 0,001***
Entre poblaciones intragrupos	327,15	0,283	10,91	P < 0,001***
Dentro de las poblaciones	2742,51	2,082	80,25	P < 0,001***
Total	3190,74	2,594		

C)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Significación
Entre grupos	278,75	0,291	11,40	P < 0,001***
Entre poblaciones intragrupos	169,48	0,178	6,99	P < 0,001***
Dentro de las poblaciones	2742,51	2,082	81,60	P < 0,001***
Total	3190,74	2,551		

D)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Significación
Entre grupos	112,78	0,245	9,26	P < 0,001***
Entre poblaciones intragrupos	169,48	0,177	6,70	P < 0,001***
Dentro de las poblaciones	2437,15	2,220	84,04	P < 0,001***
Total	2719,40	2,642		

*: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001;

En consonancia con los resultados de la diversidad genética media intrapoblacional (H_s), el mayor porcentaje de la variación según el análisis molecular de la varianza (AMOVA) para el modelo más simple de dos niveles jerárquicos (sin agrupar poblaciones) correspondió al componente intrapoblacional de la varianza (85,15%, $F_{ST} = 0,149$, Tabla II.4.9A). Esta proporción intrapoblacional de la variación disminuyó ligeramente al considerar tres niveles jerárquicos, al conformar dos grupos con las poblaciones de ambas especies en el análisis (80,25%, $F_{ST} = 0,198$, Tabla II.4.9B). La proporción de variación debida al componente de varianza entre poblaciones de una misma especie fue mayor que la debida a la varianza entre ambas especies (10,91% frente a 8,84%). Sin embargo, esta proporción se invirtió al considerar las dos poblaciones menos variables de *C. pritzelii*, CPJI y CPGA como dos grupos diferentes (6,99% de variación intragrupos frente a 11,40% entre grupos, Tabla II.4.9C). Esta tendencia se mantuvo al eliminar CPJI y CPGA del análisis

(6,70% entre poblaciones de una misma especie frente a 9,26% entre ambas especies, Tabla II.4.9D). En este caso, el componente intrapoblacional de la varianza aumentó con respecto a los otros dos modelos de tres niveles jerárquicos (84,04%, $F_{ST} = 0,160$).

La representación gráfica de las poblaciones en el espacio multivariante conformado por los dos primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (ACP) explicó tan sólo el 54,63% de la información contenida en la varianza total del conjunto de datos original a partir de 55 variables o alelos (Figura II.4.3). Cinco de las poblaciones de *C. pritzelii* (CPAG2, CPAG1, CPAN, CPTTE y CPGY) aparecieron formando un grupo muy compacto, con distancias muy pequeñas entre ellas. Las dos poblaciones menos variables de la especie (CPJI y CPGA) se mostraron claramente alejadas del resto y situadas en extremos opuestos con respecto al grupo principal, mientras que la población CPAZ se situó a medio camino entre CPJI y el grupo principal, aunque mucho más cercana a este grupo según el primer y más importante Componente Principal, el cual explicó el 33,34% de la varianza total. Por el contrario, todas las poblaciones de *C. tamadabensis* se agruparon estrechamente y se situaron relativamente alejadas de las poblaciones de *C. pritzelii*, con CTTA y CTGU ligeramente más diferenciadas.

Para el conjunto de poblaciones, el test de Mantel resultó significativo para un grado de correlación entre distancias geográficas y genéticas muy bajo ($r = 0,391$, $P < 0,01$), lo cual apoya un débil aislamiento por distancia. La correlación fue ligeramente mayor (aunque también muy baja) dentro de *C. pritzelii* ($r = 0,503$, $P < 0,05$) (Figura II.4.4).

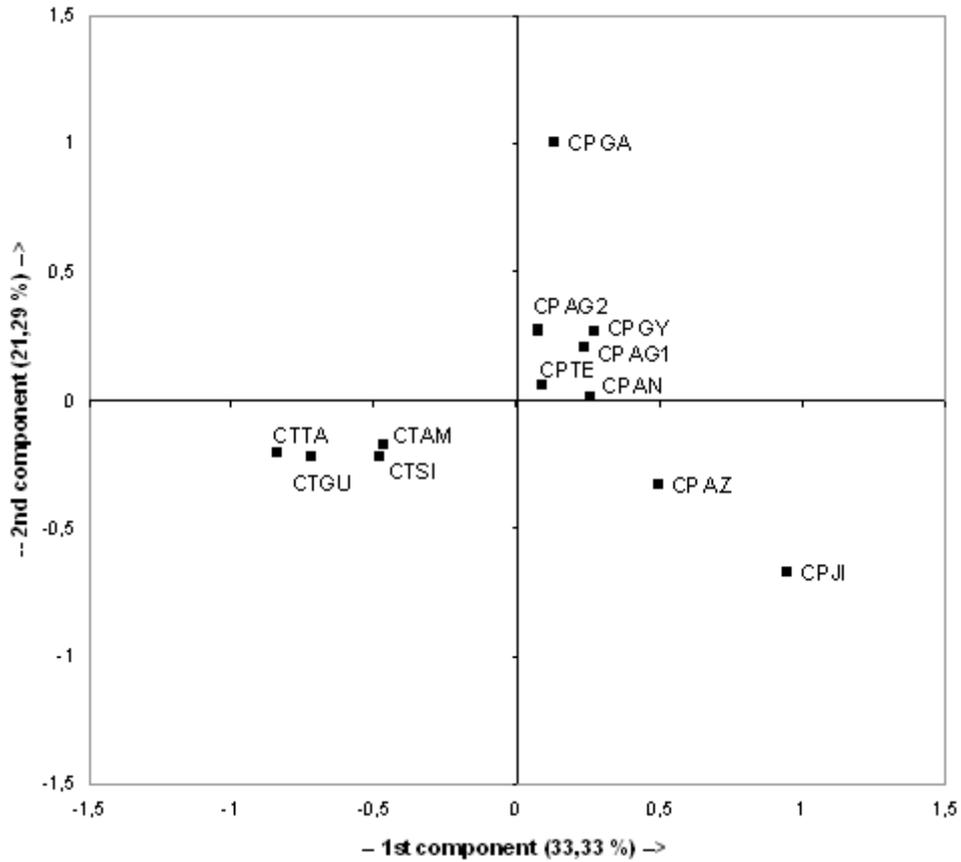


Figura II.4.3. Análisis de Componentes Principales basados en las frecuencias alélicas de las poblaciones de *C. tamadabensis* y *C. pritzelii* (ver Tabla II.3.1 de Material y Métodos para los códigos de poblaciones). La proporción de la variación total que explica cada componente se indica en paréntesis.

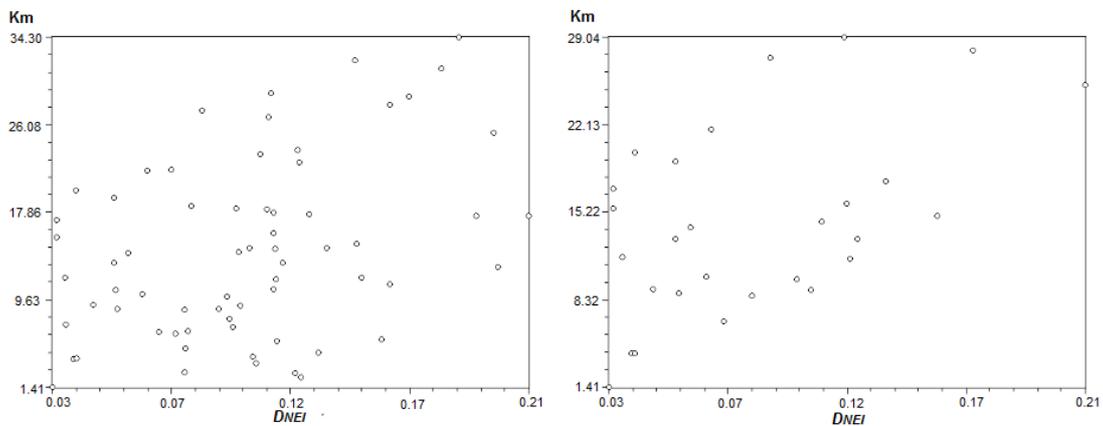


Figura II.4.4. Diagramas de dispersión entre distancias genéticas (Nei, 1978, eje X) y distancias geográficas (en kilómetros, eje Y) para todas las combinaciones posibles de pares de poblaciones muestreadas de las dos especies de *Crambe* en estudio (izquierda) y de *C. pritzelii* (derecha).

Relaciones entre poblaciones y taxones.

Los promedios de las identidades genéticas (Nei, 1978; ver Tabla II.4.10) entre pares de poblaciones de la misma especie ($I_{NEI} = 0,929 \pm 0,027$ para *C. tamadabensis* y $I_{NEI} = 0,923 \pm 0,043$ para *C. pritzelii*) resultaron significativamente mayores que la media de las identidades genéticas entre pares de poblaciones de diferentes taxones ($I_{NEI} = 0,877 \pm 0,034$), según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,0001$). No obstante, algunas de las identidades interespecíficas como las que relacionan CPAG2 y CPAG1 con CTAM y CTSI ($I_{NEI} = 0,906 - 0,923$) o CPTE con CTAM, CTGU y CTSI ($I_{NEI} = 0,904 - 0,928$) fueron bastante elevadas, y similares a los valores entre CTAM y el resto de poblaciones de *C. tamadabensis* ($I_{NEI} = 0,897 - 0,927$), o entre CTGU y CTSI ($I_{NEI} = 0,923$).

La identidad genética más baja entre todos los pares de poblaciones en estudio se halló entre CTTA y CPJI ($I_{NEI} = 0,800$). Las poblaciones CPJI y CPGA se mostraron como las poblaciones más alejadas genéticamente del resto de las de su propia especie, con valores de identidad promedio (0,883 y 0,879, respectivamente) cercanos al de la media entre pares de poblaciones de especies diferentes, teniendo además entre ellas el valor de identidad más bajo dentro de *C. pritzelii* ($I_{NEI} = 0,812$). La población con la que CPJI mostró una identidad elevada fue la más cercana geográficamente a ella (CPAZ, $I_{NEI} = 0,933$), al igual que sucedió con CPGA (CPGY, $I_{NEI} = 0,923$).

Tabla II.4.10. Estimación de la identidad de Nei (1978) (bajo la diagonal) y F_{ST} de Wright (sobre la diagonal) entre todas las combinaciones posibles entre pares de poblaciones. Los códigos de las poblaciones se corresponden con la Tabla II.3.1.

	CTTA	CTAM	CTGU	CTSI	CPAG2	CPAG1	CPAZ	CPJI	CPAN	CPTE	CPGY	CPGA
CTTA		0,055	0,024	0,040	0,098	0,088	0,107	0,208	0,094	0,073	0,088	0,142
CTAM	0,927		0,075	0,075	0,068	0,065	0,088	0,204	0,086	0,054	0,086	0,156
CTGU	0,970	0,897		0,060	0,101	0,083	0,102	0,200	0,073	0,060	0,074	0,147
CTSI	0,950	0,905	0,923		0,082	0,074	0,084	0,181	0,087	0,062	0,095	0,126
CPAG2	0,880	0,923	0,873	0,906		0,026	0,091	0,186	0,047	0,027	0,058	0,118
CPAG1	0,882	0,922	0,888	0,910	0,975		0,049	0,135	0,027	0,024	0,032	0,088
CPAZ	0,858	0,890	0,850	0,896	0,907	0,950		0,105	0,054	0,050	0,049	0,163
CPJI	0,800	0,818	0,810	0,848	0,859	0,898	0,933		0,130	0,140	0,145	0,249
CPAN	0,870	0,890	0,903	0,889	0,951	0,970	0,940	0,902		0,027	0,034	0,122
CPTE	0,892	0,928	0,904	0,921	0,974	0,974	0,945	0,889	0,967		0,030	0,111
CPGY	0,880	0,891	0,894	0,881	0,938	0,966	0,951	0,890	0,959	0,966		0,084
CPGA	0,841	0,824	0,830	0,860	0,891	0,917	0,848	0,812	0,877	0,886	0,923	

La estimación de flujo génico interpoblacional por medio del parámetro de número de migrantes por generación (Nm) según Wright (1931) se basa en la fórmula $F_{ST} = 1/(1 + 4Nm)$. Aunque el valor medio de F_{ST} para todos los pares de poblaciones en estudio fue algo más bajo que el de la distancia genética de Nei de 1978 ($F_{ST} = 0,092$ frente a $D_{NEI} = 0,105$), ambos parámetros se ajustaron a una relación lineal próxima a $D_{NEI} = F_{ST}$ ($y = 0,893x + 0,023$; $R^2 = 0,820$; Figura II.4.5A). Por el contrario, el ajuste de la línea de regresión entre los valores de Nm según los dos métodos de cálculo de flujo génico considerados fue muy bajo ($R^2 = 0,291$; Figura II.4.5B). En este caso, la línea de regresión que mejor se ajustó a los datos no fue la esperable para una relación lineal entre la distribución de un mismo parámetro calculado por dos métodos diferentes, sino la correspondiente a una relación logarítmica, dado que a valores altos de Nm obtenido a partir de F_{ST} se produce un estancamiento de los valores de Nm calculado a partir de los alelos privados.

El promedio de los valores de flujo génico entre todos los pares de poblaciones analizadas (Tabla II.4.11) calculado a partir del parámetro F_{ST} fue bastante elevado ($Nm = 3,526$). No obstante, el valor de flujo génico entre pares de poblaciones de una misma especie fue aún mayor ($Nm = 5,126 \pm 2,787$ dentro de *C. tamadabensis* y $Nm = 4,373 \pm 3,075$ en *C. pritzelii*) y significativamente superior en ambos casos al hallado entre pares de poblaciones de taxones diferentes ($Nm = 2,484 \pm 0,889$) según el test de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Los mayores valores dentro de cada taxón se encontraron entre CTTA y CTGU ($Nm = 10,388$) y entre CPAG1 y CPTe ($Nm = 10,229$), mientras que los únicos valores inferiores a la unidad fueron los hallados entre CTTA y CPJI ($Nm = 0,955$), CTAM y CPJI ($Nm = 0,978$) y entre CPJI y CPGA ($Nm = 0,754$). Dentro de *C. pritzelii*, el promedio de todas las combinaciones entre las dos poblaciones del geográficamente distante Valle de Agaete (CPAG2 y CPAG1) y las demás poblaciones de *C. pritzelii* sin CPJI y CPGA (CPAZ, CPAN, CPTe y CPGY) fue de $Nm = 6,547$, similar al promedio de todas las combinaciones de esas cuatro poblaciones entre sí ($Nm = 6,375$).

En cambio, el promedio de flujo génico entre todos los pares de poblaciones según el método de alelos privados (Slatkin, 1985) fue solamente una cuarta parte del estimado con F_{ST} ($Nm = 0,874$; Tabla II.4.11). Mientras que el promedio entre pares de poblaciones de *C. tamadabensis* se mantuvo algo

más elevado ($Nm = 1,209 \pm 0,484$), en *C. pritzelii* fue prácticamente idéntico a la del flujo génico interespecífico ($Nm = 0,846 \pm 0,395$ y $0,835 \pm 0,544$ respectivamente), con valores muy bajos entre poblaciones genéticamente cercanas ($Nm = 0,828$ entre CPAG1 y CPAZ, $Nm = 0,768$ entre CPAG2 y CPAN, $Nm = 0,874$ entre CPAN y CPTe o $Nm = 0,781$ entre CPTe y CPGY). En consecuencia, no hubo diferencias intra e interespecíficas significativas de flujo génico según los alelos privados ($P = 0,186$; test de Kruskal-Wallis).

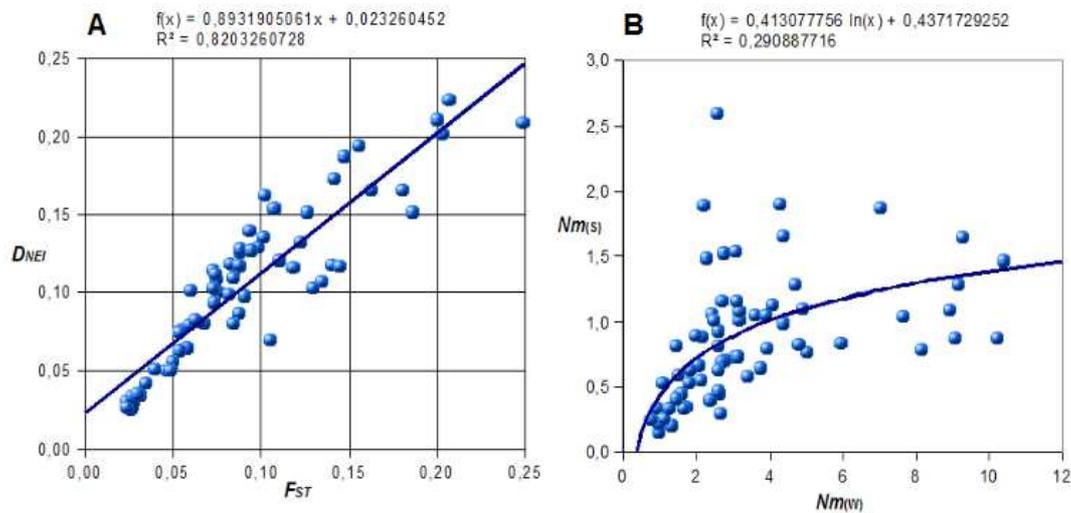


Figura II.4.5. Diagramas de dispersión de todas las combinaciones posibles de pares de poblaciones muestreadas de *Crambe* y líneas de regresión para **A**: la estimación de divergencia por F_{ST} y D_{NEI} . **B**: la estimación de flujo génico según el método de Wright (1931) [$Nm_{(W)}$] y el método de Slatkin (1985) [$Nm_{(S)}$].

Tabla II.4.11. Estimación de Nm según el método de alelos privados (Slatkin, 1985, bajo la diagonal) y según los estadísticos-F de Wright (Wright 1951, sobre la diagonal) entre todas las combinaciones posibles entre pares de poblaciones. Los códigos de las poblaciones se corresponden con la Tabla II.3.1.

	CTTA	CTAM	CTGU	CTSI	CPAG2	CPAG1	CPAZ	CPJI	CPAN	CPTe	CPGY	CPGA
CTTA		1,894	1,461	0,835	1,481	2,591	0,665	0,336	1,058	1,009	0,816	0,430
CTAM	4,310		1,534	0,738	0,584	1,049	0,925	0,157	0,298	1,654	0,448	0,202
CTGU	10,388	3,091		0,794	1,889	1,528	0,885	0,216	1,073	1,047	1,160	0,817
CTSI	5,958	3,064	3,946		0,704	0,729	0,695	0,260	0,629	0,647	0,399	0,348
CPAG2	2,297	3,408	2,219	2,790		1,644	1,009	0,534	0,768	1,277	1,129	0,634
CPAG1	2,581	3,625	2,767	3,149	9,295		0,828	0,453	1,085	0,872	1,038	0,469
CPAZ	2,080	2,591	2,192	2,726	2,505	4,806		0,547	0,982	1,285	1,102	0,339
CPJI	0,955	0,978	1,002	1,135	1,092	1,604	2,128		0,337	0,593	0,414	0,245
CPAN	2,423	2,671	3,183	2,625	5,010	8,915	4,362	1,679		0,874	1,866	0,528
CPTe	3,186	4,377	3,910	3,779	9,179	10,229	4,715	1,531	9,057		0,781	0,896
CPGY	2,592	2,663	3,130	2,392	4,076	7,657	4,904	1,472	7,040	8,169		1,159
CPGA	1,515	1,357	1,446	1,732	1,864	2,606	1,282	0,754	1,798	2,006	2,717	

En el análisis de asignación realizado con el software STRUCTURE, el parámetro ΔK empleado para inferir el número de *clusters* genéticos en nuestros datos (siguiendo a Evanno *et al.* 2005) tuvo un máximo para $K = 3$, aunque la probabilidad de ajuste del modelo a nuestros datos siguió aumentando hasta $K = 12$ (Figura II.4.6). Todas las poblaciones de *C. tamadabensis* pudieron considerarse como pertenecientes sin ambigüedades al *cluster* I, atendiendo a sus proporciones de asignación a dicho *cluster* ($q = 0,809 - 0,946$; Tabla II.4.12 y Figura II.4.7). Del mismo modo, las poblaciones CPAZ y CPJI se consideraron como pertenecientes sin ambigüedades al *cluster* II, con unas proporciones de asignación próximas a 1 ($q = 0,960$ y $q = 0,995$ respectivamente), mientras que CPGA se incluyó en el *cluster* III ($q = 0,972$). En cambio, la adscripción de las cinco poblaciones restantes de *C. pritzelii* a los *clusters* II o III se mostró complicada, debido a que sus coeficientes de asignación mostraron mezcla entre ambos grupos ($q = 0,302 - 0,555$). Estas poblaciones también mostraron proporciones de mezcla con el *cluster* I, bajas o moderadas ($q = 0,047 - 0,226$).

Según el modelo de computación geográfica de barreras al flujo génico implementado en el programa BARRIER y obtenido a partir de la matriz de distancias genéticas de Nei (1978), la primera barrera ("a" en la Figura II.4.7) separó las poblaciones de *C. tamadabensis* de las de *C. pritzelii* ($D_{NEI} = 0,136 - 0,099$). La segunda barrera en orden jerárquico, de acuerdo con el criterio de la distancia genética más alta asociada a alguno de los bordes entre poblaciones vecinas, aisló a CTAM con respecto a las poblaciones conespecíficas más cercanas (CTGU y CTTA, $D_{NEI} = 0,108$ y $0,076$ respectivamente). La tercera barrera aisló por completo a CPJI, separándola de CPAN y CPAZ ($D_{NEI} = 0,103$ y $0,069$ respectivamente). La cuarta barrera se inició en el borde entre CPAZ y CPAG2 ($D_{NEI} = 0,098$), continuando por los bordes que separan CPAZ de CPAG1 y CPAN ($D_{NEI} = 0,052$ y $0,062$ respectivamente) hasta intersectar con las barreras preexistentes "a" y "c". La quinta barrera separó a CPGY de CPGA ($D_{NEI} = 0,0801$), mientras que la sexta se originó entre CTGU y CTSI ($D_{NEI} = 0,0799$), intersectando con la barrera preexistente "a". Los valores "bootstrap" usados para testar la robustez de la primera barrera fueron obtenidos a partir de 100 matrices de distancias genéticas producto del remuestreo, y apoyaron únicamente el patrón geográfico de la barrera "a" que separa las poblaciones

de ambas especies (Figura II.4.7). Los valores para los bordes entre CTSI y las poblaciones de *C. pritzelii* CPAG2 y CPAZ ($D_{NEI} = 0,099$ y $0,110$ respectivamente), aunque significativos, decrecieron principalmente en favor del borde entre CTGU y CTSI (por donde pasaron 24 de 85 barreras resultantes del remuestreo aleatorio), y en menor medida del borde entre CPAZ y CPAG2 (7 barreras de 61). Otras barreras con cierto apoyo (no significativo) fueron la que separa CTAM del resto de poblaciones conespecíficas, y la que separa a CPAZ y CPJI.

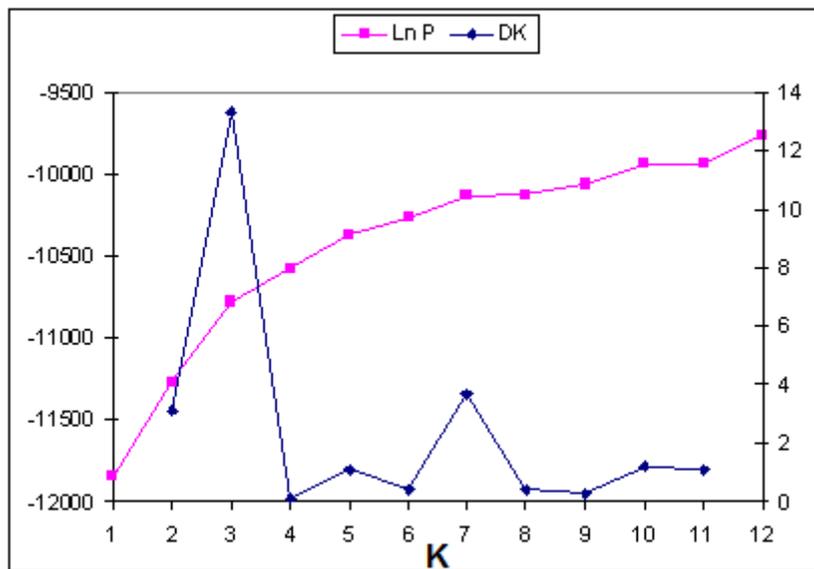


Figura II.4.6. Representación de los valores de los parámetros Ln P (ordenadas, eje de valores izquierdo) y ΔK (ordenadas, eje de valores derecho) frente a diferentes números de *clusters* (K) inferidos por el programa STRUCTURE ($K=1-12$).

Tabla II.4.12. Proporciones de asignación (q) poblacional a cada uno de los *clusters* inferidos por el programa STRUCTURE.

	(q) I	(q) II	(q) III
<i>C. tamadabensis</i>			
CTTA	0,946	0,025	0,029
CTAM	0,874	0,012	0,113
CTGU	0,809	0,172	0,018
CTSI	0,918	0,017	0,065
<i>C. pritzelii</i>			
CPAG2	0,131	0,413	0,456
CPAG1	0,185	0,355	0,460
CPAZ	0,018	0,023	0,960
CPJI	0,001	0,004	0,995
CPAN	0,143	0,302	0,555
CPTe	0,226	0,302	0,472
CPGY	0,047	0,472	0,481
CPGA	0,009	0,972	0,019

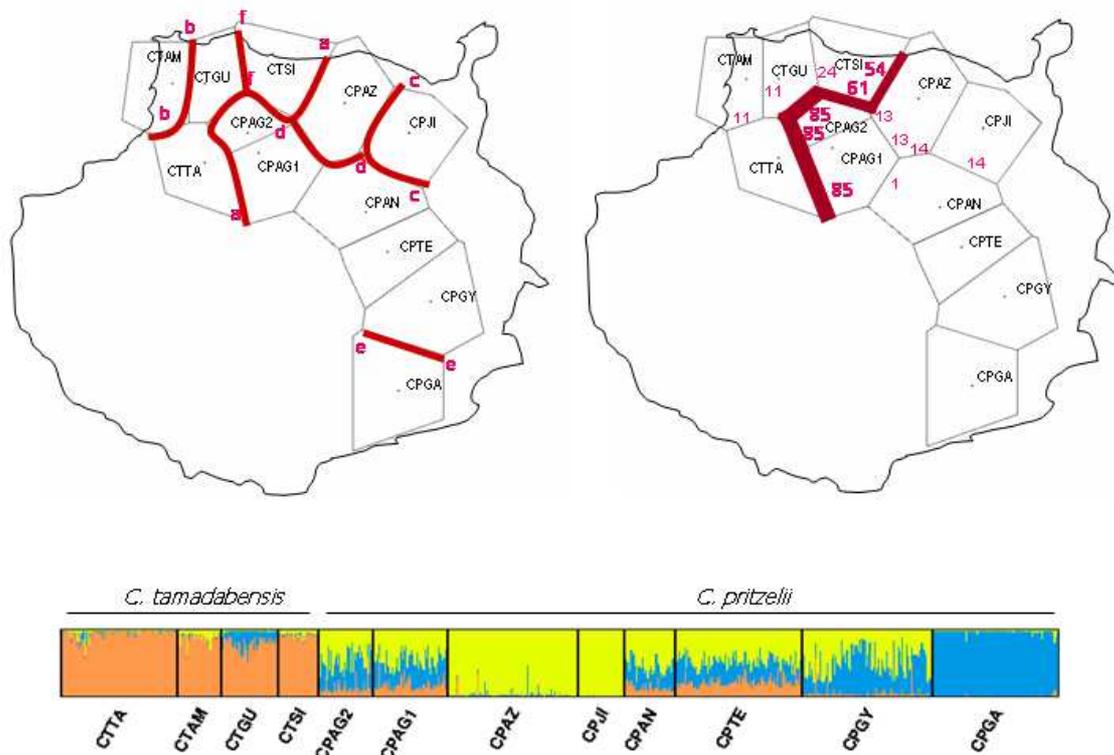


Figura II.4.7. Arriba: mapas realizados por el programa BARRIER con la teselación de Voronoi, donde se han dibujado las seis primeras barreras genéticas (izquierda) y los apoyos “bootstrap” (derecha) para la barrera de mayor magnitud, resultantes del cómputo a partir de 100 matrices provenientes de remuestreo. Sólo se han representado las barreras con un 50% o más de apoyo *bootstrap*. Abajo: diagrama realizado por el programa STRUCTURE; cada individuo está representado por una línea vertical, cuyos segmentos coloreados indican el coeficiente de pertenencia individual (q) a cada uno de los tres *clusters* inferidos (naranja, azul y amarillo para los *clusters* I, II y III, respectivamente) Las líneas negras verticales separan las distintas poblaciones.

Variabilidad y estructuración subpoblacional.

En la amplia mayoría de las poblaciones analizadas se apreció un claro descenso del número de alelos por *locus* (A_i) en cada uno de sus respectivos sectores subpoblacionales (Tabla II.4.13), que no se corresponde en general con un descenso en el número efectivo de alelos por *locus* (A_e): en algunos sectores este parámetro aumentó ligeramente. En consonancia con este resultado, en cada población se encontró al menos un sector con diversidad génica (H_e) similar al conjunto poblacional, mientras que la heterozigosis observada se elevó considerablemente en algunos de los sectores con respecto a su población.

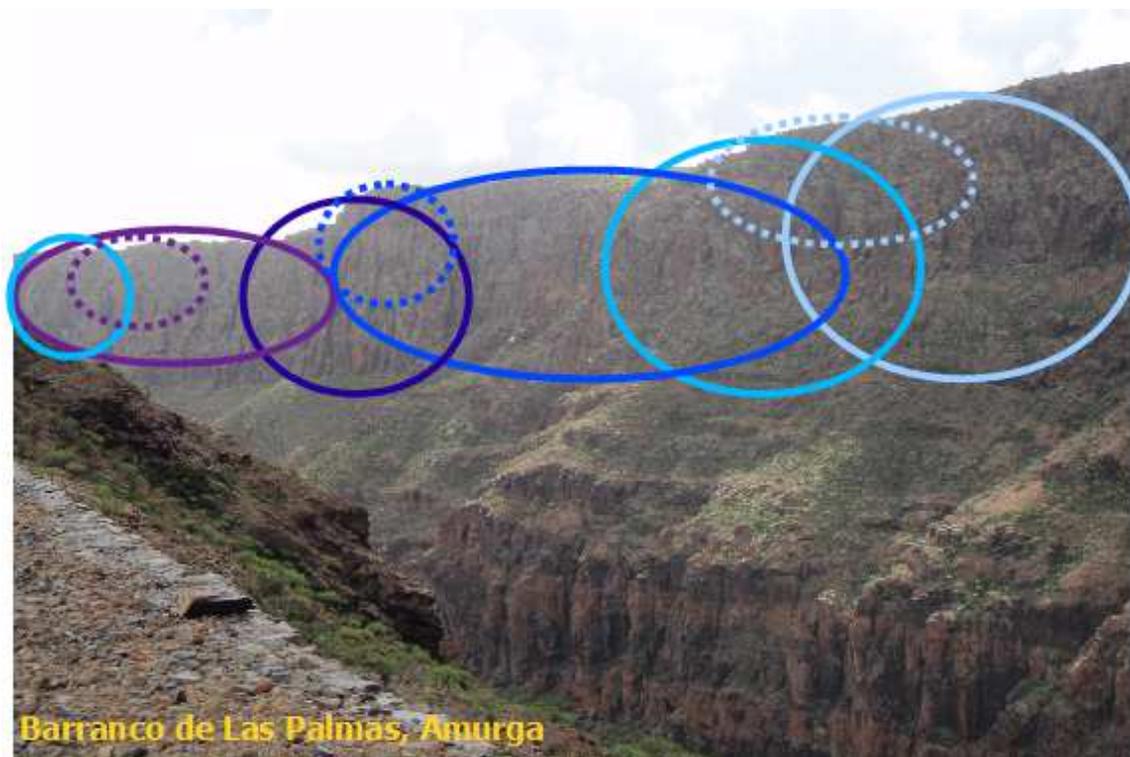
Tabla II.4.13. Indicadores básicos de variación isoenzimática en los diferentes sectores subpoblacionales muestreados de *Crambe tamadabensis* y *C. pritzelii*. Los valores en negrita corresponden a la población total. A_i = número medio de alelos por *locus*; N_e = número medio efectivo de alelos por *locus*; P = porcentaje de *loci* polimórficos (un *locus* se consideró polimórfico cuando se detectó más de un alelo)); H_o y H_e = heterocigosidad observada y esperada; F_{IS} = índice de fijación.

<i>Especie</i> /POBLACIÓN/Subpoblación	CÓDIGO	A_i	N_e	P	H_o	H_e	F_{IS}
<i>C. tamadabensis</i>							
TAMADABA	CTTA	3,4	2,0	83,3	0,320	0,411	0,183
Andenes de Guayedra	CTTA1	2,8	2,0	83,3	0,353	0,409	0,104
Barranco de La Palma	CTTA2	2,6	1,9	83,3	0,333	0,408	0,122
Faneque	CTTA3	2,8	1,8	83,3	0,280	0,370	0,173
AMAGRO	CTAM	2,6	1,9	75,0	0,242	0,396	0,371
MONTAÑA DE GUIA	CTGU	3,1	1,9	83,3	0,278	0,410	0,310
Cara oeste	CTGU1	2,8	2,0	83,3	0,279	0,408	0,278
Cara este	CTGU2	2,1	1,7	75,0	0,296	0,350	0,165
Barranco de Gáldar	CTGU3	1,9	1,6	75,0	0,250	0,332	0,207
CUESTA DE SILVA	CTSI	2,6	1,8	83,3	0,350	0,386	0,082
<i>C. pritzelii</i>							
AGAETE SAN PEDRO	CPAG2	2,7	1,7	75,0	0,227	0,331	0,302
Risco de La Escalera	CPAG2A	2,6	1,8	75,0	0,215	0,339	0,347
La Cardonera	CPAG2B	1,9	1,6	66,7	0,260	0,301	0,131
AGAETE BERRAZALES	CPAG1	2,8	1,8	83,3	0,246	0,369	0,319
Los Berrazales	CPAG1A	2,7	1,8	83,3	0,232	0,351	0,312
Barranco de Agaete	CPAG1B	2,3	2,0	75,0	0,322	0,421	0,148
AZUAJE	CPAZ	3,2	1,6	83,3	0,284	0,316	0,077
Barranco del Pagador	CPAZ1	2,3	1,6	75,0	0,323	0,319	-0,027
Barranco de Azuaje alto	CPAZ2	2,5	1,8	75,0	0,260	0,340	0,192
Barranco de Azuaje bajo	CPAZ3	2,8	1,6	83,3	0,275	0,289	0,026
RISCOS JIMÉNEZ	CPJI	1,9	1,6	66,7	0,178	0,168	-0,034
BARRANCO ANTONA	CPAN	2,5	1,8	75,0	0,330	0,384	0,126
TENTENIGUADA	CPTE	3,4	2,0	83,3	0,329	0,397	0,219
Barranco de La Coruña	CPTE1	2,6	1,8	75,0	0,317	0,360	0,070
Barranquillo La Pasadera	CPTE2	3,1	2,1	83,3	0,320	0,407	0,260
Camino al Roque Grande	CPTE3	2,8	2,0	83,3	0,386	0,412	0,060
Barranco de La Capellanía	CPTE4	2,3	1,8	66,7	0,285	0,368	0,230
Era de Mota	CPTE5	2,2	1,8	75,0	0,346	0,377	0,100
GUAYADEQUE	CPGY	3,1	1,9	83,3	0,271	0,356	0,283
Los Guaniles	CPGY1	2,8	1,8	83,3	0,293	0,346	0,207
Roque Negro	CPGY2	2,4	1,7	66,7	0,264	0,328	0,195
Cuevas Bermejas	CPGY3	2,3	1,6	66,7	0,258	0,310	0,115
Cañada de Los Burros	CPGY4	2,2	1,7	66,7	0,256	0,297	0,123
AMURGA	CPGA	2,3	1,5	75,0	0,206	0,255	0,241
Barranco de Las Palmas	CPGA1	2,0	1,6	58,3	0,206	0,249	0,368
Gallegos	CPGA2	2,3	1,5	75,0	0,210	0,252	0,177

El índice de fijación (F_{IS}) osciló considerablemente dentro de cada población (Tabla II.4.13), con valores similares o superiores en algunos de los sectores subpoblacionales a los de sus poblaciones respectivas, indicando la escasa incidencia de un posible efecto Wahlund ligado a nuestra estrategia de muestreo extensiva. En algunos núcleos subpoblacionales relativamente aislados y de pequeño tamaño se apreció un descenso de los valores de F_{IS} ,

acompañado de un descenso de la heterozigosidad esperada y del número medio de alelos por *locus*, y por un aumento de la heterozigosidad observada. Tales núcleos fueron los de la cara este de la Montaña de Guía (CTGU2), La Cardonera (CPAG2B), Barranco del Pagador (CPAZ1) o Era de Mota (CPTÉ5). Cabe destacar el pequeño núcleo acantonado en el Barranco de Agaete (CPAG1B), donde junto a un descenso de F_{IS} encontramos paradójicamente el mayor valor de heterozigosidad esperada de todas las poblaciones en estudio y un valor elevado de heterozigosidad observada.

Capítulo II.5. Discusión.



II.5.1 Variabilidad genética intrapoblacional e historia evolutiva.

Los niveles medios de variación genética isoenzimática detectados en *Crambe tamadabensis* y *C. pritzellii* son comparativamente mucho mayores que los valores medios proporcionados en la primera gran revisión bibliográfica sobre variabilidad poblacional con isoenzimas (Hamrick & Godt, 1989) para plantas endémicas en general ($A_i = 1,39$; $P = 26,0$; $H_e = 0,063$) y para taxones ampliamente distribuidos ($A_i = 1,72$; $P = 43,0$; $H_e = 0,159$). Los parámetros de variación intrapoblacional de las dos especies de *Crambe* en estudio superan también a los publicados en la primera revisión realizada para endemismos canarios con isoenzimas (Francisco-Ortega *et al.*, 2000), donde ya se enfatizaba la alta variabilidad genética de la flora canaria ($A_i = 1,66$; $H_s = 0,137$ $H_T = 0,186$) en relación con la de otros archipiélagos oceánicos. En la revisión posterior para endemismos canarios de Pérez de Paz y Caujapé-Castells (2013), donde se incluyen también las especies usadas en Francisco-Ortega *et al.* (2000), se obtienen niveles de variabilidad isoenzimática ligeramente superiores ($A_i = 1,76$; $P = 42,4$; $H_e = 0,166$). Considerando que la mayoría de las especies incluidas, desde la revisión anterior, no fueron muestreadas intensivamente (ver Caujapé-Castells 2010), es probable que la diversidad genética promedio de la flora canaria sea aún bastante mayor que la obtenida en esos estudios previos.

Al igual que en muchas de las especies estudiadas con posterioridad a Francisco-Ortega *et al.* (2000), las poblaciones de *Crambe* en este estudio se muestrearon de forma intensiva; esto es, recolectando un número de muestras proporcional al tamaño poblacional (con un mínimo de 29 muestras por población), pero incidiendo además en toda el área de ocupación de la población, con el fin de estimar con la mayor precisión posible la variabilidad genética poblacional existente.

Sin embargo, independientemente del tipo de muestreo empleado, la distribución de la variabilidad genética encontrada entre los diferentes estudios realizados en especies de flora endémica canaria no es homogénea. Pérez de Paz y Caujapé-Castells (2013), en la búsqueda de las causas de esta alta variabilidad, concluyen que los niveles encontrados se correlacionan más con factores bióticos, filogenéticamente determinados (principalmente sistema de

cruzamiento, número de cromosomas y nivel de ploidía), que con factores abióticos, dependientes de la geografía insular. Aunque no debe desestimarse la cercanía del archipiélago canario al continente africano como un factor importante a la hora de propiciar mayores niveles de diversidad genética en muchos endemismos (García-Verdugo *et al.*, 2009; Pérez de Paz & Caujapé-Castells, 2013).

Los niveles tan elevados de variabilidad genética encontrados en *Crambe*, aunque ligeramente superiores, están más en concordancia con los obtenidos en otras especies de Brassicaceae canarias que fueron muestreadas exhaustivamente (Vilches *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006; Fernández-Palacios, 2009) con posterioridad a la revisión de Francisco-Ortega *et al.* (2000). Por lo tanto, este resultado enfatiza que, para hacer cualquier valoración del nivel de variabilidad genética de un taxón de distribución restringida, es necesario tener en cuenta su historia evolutiva y comparar los resultados con otros taxones más ampliamente distribuidos de similar adscripción filogenética, en concordancia con lo ya apuntado por previos análisis (Webb, 1984; Karron, 1987, 1988; Gitzendanner & Soltis, 2000; Crawford *et al.*, 2001; Duminil *et al.*, 2007, 2009; Pérez de Paz & Caujapé-Castells, 2013). Todos estos autores coinciden en señalar al sistema de cruzamiento (autogamia frente a autoincompatibilidad) como factor determinante de los niveles de diversidad genética dentro de cada grupo filogenético.

En un gran número de especies de la familia Brassicaceae, se ha descrito un sistema de autoincompatibilidad esporofítico homomórfico (es decir, que no implica dimorfismo floral). Este sistema actúa a nivel de la recepción del grano de polen por la superficie estigmática (donde ocurre la reacción de autoincompatibilidad) y su control genético está determinado por un único *locus* S con múltiples alelos presentes en una población (Bateman, 1955; Gibbs, 1986, 1988; Barrett, 1988; Byers & Meagher, 1992; Richards, 1997. Se favorece así una mitigación del impacto de la consanguinidad y un aumento de la variabilidad genética poblacional a costa de restringir las posibilidades de intercambio genético a individuos genéticamente no emparentados.

En consecuencia, estudios previos de variabilidad genética poblacional

en taxones donde se ha verificado autoincompatibilidad dentro de la tribu Brassiceae (Cruciferae), han encontrado niveles elevados de variación genética y tan sólo moderados de variabilidad interpoblacional, como por ejemplo en *Brassica oleraceae* (usando isoenzimas y RAPDs, Lannér-Herrera *et al.*, 1996), en el complejo multiespecífico *Brassica oleraceae* (con isoenzimas, Lázaro & Aguinagalde, 1998), en *Raphanus raphanistrum* (con isoenzimas, Kercher & Conner, 1996) o en *Crambe maritima* (con ISSRs, Bond *et al.*, 2005). En los casos de *Crambe maritima* y *Raphanus raphanistrum* se alude a la autoincompatibilidad como una de las posibles causas para explicar la alta variabilidad encontrada en las poblaciones. Se han obtenido resultados similares con isoenzimas en otras especies endémicas canarias de Brassicaceae con alogamia comprobada como *Lobularia canariensis* (Borgen, 1997), las diferentes especies de *Parolinia* (Fernández-Palacios, 2010), o *Matthiola bolleana* (Sánchez *et al.*, 2006).

Aunque en *Crambe pritzelii* y *C. tamadabensis* la autoincompatibilidad no se ha comprobado por medio de estudios de biología reproductiva, existen varios precedentes de su existencia en *C. tatarica* (East, 1940; Fryxell, 1957), *C. maritima* (Scott & Randall, 1976) o en el endemismo canario *C. arborea*, en el cual se comprueba una incompatibilidad alta y baja autogamia (Calero & Santos, 1988).

Los altos niveles de variabilidad encontrados en *Crambe* por el presente estudio (y como se seguirá viendo en detalle más adelante) apoyan la hipótesis de que tanto *C. tamadabensis* como *C. pritzelii* son taxones presumiblemente autoincompatibles.

Junto con el tipo de sistema reproductivo, Pérez de Paz y Caujapé-Castells (2013) encontraron diferencias significativas de variabilidad según el número de cromosomas y el nivel de ploidía en endemismos canarios. Concretamente, los taxones con mayores números cromosómicos ($X > 10$) tendieron a tener también una mayor diversidad genética, tal y como aventuraban Hamrick *et al.* (1979) y, para la flora canaria, Pérez de Paz (2002) y Pérez de Paz *et al.* (2007). Esto es debido, presumiblemente, a la mayor cantidad de quiasmas (recombinaciones entre pares de cromosomas) que se producen durante la meiosis y que se traduce en una mayor diversidad de gametos y de genotipos (Stebbins, 1950; Richards, 1997). Asimismo, los

taxones poliploides suelen tener una mayor variabilidad genética que los diploides (Levin, 2002; López-Pujol *et al.*, 2006; Pickup & Young, 2008; Sampson & Byrne, 2012). En *Brassicaceae*, la poliploidía en general ha desempeñado un importante papel en la evolución de la familia (Marhold & Lihová, 2006), y se ha evidenciado un evento antiguo de triplicación del genoma común a la línea filogenética de la tribu *Brassiceae* (Lysak *et al.*, 2005, 2007; Lysak & Lexer, 2006), por lo que es probable que los números cromosómicos altos representen estados más primitivos de historia evolutiva, correspondiendo las dotaciones cromosómicas bajas a casos genealógicamente derivados de fusión de cromosomas (Lysak *et al.*, 2007; Schubert, 2007).

Las especies de *Crambe* contienen un número cromosómico básico ($X = 15$) que se encuentra entre los más altos de la familia (Warwick & Al-Shehbaz, 2006). Este dato, junto a los indicios de antiguas duplicaciones génicas observados en algunos zimogramas (ver apartado correspondiente en Material y Métodos), hace probable la hipótesis de que las especies de la sección *Dendrocrambe* provienen directamente de antiguos taxones hexaploides. Por lo tanto, el número cromosómico básico puede haber sido uno de los factores determinantes para explicar la detección de elevados niveles de variabilidad genética en estas dos especies canarias de *Crambe*.

Además, se puede apreciar que la rareza y la disminución del tamaño poblacional, por sí solos, no se corresponden de modo general con una variabilidad genética más baja (Figura II.4.1). Notablemente, la distribución restringida de *C. tamadabensis* está asociada a unos niveles medios de variación genética poblacional sustancialmente mayores que los de la más ampliamente distribuida *C. pritzelii*, y las dos especies poseen el mismo número de alelos privados.

Todas las poblaciones de *C. tamadabensis* y varias de *C. pritzelii* muestran evidencias de haber pasado por cuellos de botella (Tabla II.4.2), pero ambos taxones han prosperado con números censales similares (generalmente sobre los 500 individuos por población, aunque muchas poblaciones han fluctuado esporádicamente hacia números más reducidos), en acantilados aislados que pueden haber servido de refugio. Este hecho parece haber sido suficiente para el mantenimiento de una parte sustancial de la variabilidad

genética y de la viabilidad a largo plazo en estos taxones presumiblemente alógamos.

Tan sólo unas pocas poblaciones de *C. pritzelii* (CPJI y CPGA) reflejan pérdida de variabilidad asociada a tallas poblacionales pequeñas. Un ejemplo similar en la misma tribu se encuentra en *Brassica* (Lázaro & Aguinagalde, 1998), donde se halló baja variación genética en el endemismo *B. macrocarpa* (restringido a unos pocos islotes del noroeste de Sicilia), en el endemismo *B. hilarionis* de la isla de Chipre, y en varias poblaciones extremadamente pequeñas (menos de 100 individuos) de las especies más comunes *B. rupestris* (en zonas de pastoreo) y *B. montana*. Sin embargo, el endemismo canario *B. bourgouai* mantuvo niveles de variación isoenzimática similares a la media del género (Lázaro & Aguinagalde, 1998), a pesar de que solamente consiste en una ínfima población en la isla de La Palma.

II.5.2 Desviaciones del equilibrio poblacional y estructuración genética subpoblacional.

Todas las poblaciones de *Crambe* en estudio (a excepción de CPJI) mostraron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) para la mayoría de los *loci*, con una deficiencia generalizada de heterocigotos respecto de lo esperado. Sin embargo, estas desviaciones no ocurren en todos los *loci*, sino en un rango comprendido entre cinco y nueve de diez *loci* polimórficos, según las diferentes poblaciones (Tabla II.4.4). El número de *loci* con desviaciones de equilibrio de H-W significativas podría ser algo menor en algunas poblaciones, pues aquellos *loci* que aparecieron solapados en los cromatogramas (*Got-1*, *Got-2*, *Pgm-1* y *Pgm-2*, ver apartado correspondiente en Material y Métodos) fueron también los que mostraron desviaciones significativas del equilibrio de H-W en un mayor número de poblaciones (Tabla II.4.4), como consecuencia probable de una subestimación de la heterocigosidad observada. Para algunos autores (Soltis & Soltis, 1989; Viljoen *et al.*, 1996), cuando en las poblaciones naturales se detecta una combinación de *loci* en equilibrio con otros que no lo están, debemos descartar la acción de factores externos (por ejemplo la deriva y el flujo génico) como responsables de la estructuración intrapoblacionales, puesto que tenderían a actuar sobre todos

los *loci* por igual.

Por otro lado, al no estar en desequilibrio los mismos *loci* en todas las poblaciones, podemos descartar también la selección como causa fundamental de la estructura intrapoblacional, teniendo en cuenta que todos los *loci* que utilizamos pueden considerarse neutrales (Tabla II.4.5). El caso de *Mdh-3* (donde existe desequilibrio por exceso de heterocigotos en todas las poblaciones menos CPJI) podría considerarse una excepción, aunque cabe también recordar que en la enzima MDH se presentan los zimogramas de interpretación más complicada (ver apartado correspondiente en Material y Métodos), en donde se evidencian mejor las huellas de duplicaciones aún presentes en estas especies cuyo mecanismo de segregación desconocemos, a falta de cruces controlados experimentales. Consecuentemente, el *locus Mdh-3* podría corresponderse con un gen que se expresa aún parcialmente duplicado y en donde no habría que descartar la existencia de algunos fenotipos heterocigotos fijados. Contrariamente, el *locus Mdh-1*, con interpretación igualmente complicada y en donde se evidencia más claramente una posible duplicación (Figura II.3.21 y II.3.22), fue el único que se halló en equilibrio de H-W en todas las poblaciones; aunque los fenotipos observados pudieron interpretarse de acuerdo a las pautas usuales de herencia mendeliana codominante para plantas diploides, podrían también corresponder a productos segregantes de más de un gen.

En la práctica, en las poblaciones naturales de las especies de plantas vasculares no se suelen cumplir los principios ideales del equilibrio de H-W debido a causas inherentes a la propia dinámica poblacional, pues el tamaño poblacional puede variar (a veces bruscamente), y es común que exista un cierto nivel de consanguinidad, se solapen las generaciones, haya limitaciones en el flujo del polen, existan limitaciones en la dispersión de las semillas o se den irregularidades en la distribución espacial de los hábitats apropiados para la especie. Así mismo, factores externos como la fluctuación del tamaño poblacional, la deriva genética o la existencia de cuellos de botella, conducen a una magnificación de las desviaciones.

En las poblaciones naturales de *Crambe*, además de las desviaciones del equilibrio H-W, encontramos niveles moderadamente elevados del índice de fijación en la mayoría de las poblaciones (F_{IS} , Tabla II.4.2), que indican la

existencia de cierta consanguinidad, con el consiguiente exceso de homocigotos. Cuando las poblaciones son lo suficientemente grandes, comienzan a no producirse todos los apareamientos aleatorios posibles por todo el ámbito de la población, y consecuentemente se pueden dar estructuraciones genéticas locales, que en este caso se ven favorecidas por características de la biología reproductiva de las especies. En efecto, tanto en *C. tamadabensis* como en *C. pritzellii* se ha constatado polinización entomófila (Marrero & Navarro, 2004; Santana *et al.*, 2008), a la vez que las observaciones en el campo confirman que en esta polinización participan principalmente florícolas generalistas de escaso o moderado recorrido, como pequeños coleópteros y dípteros. No existen adaptaciones especiales para la dispersión de las semillas por barocoria (Marrero & Navarro, 2004; Santana *et al.*, 2008), ya que los frutos maduros suelen caer por mera agitación de las inflorescencias, generalmente a muy poca distancia del pie parental.

Puesto que se muestreó exhaustivamente toda el área de ocupación en todas las poblaciones, los niveles moderados de índices de fijación obtenidos se pueden explicar como efecto de una fuerte estructuración genética intrapoblacional, más que como reflejo de otros procesos que pudieran conducir a un exceso de homocigotos. Por ejemplo, el efecto Wahlund, implicaría la agrupación en una sola población de individuos distribuidos continuamente en el espacio pero pertenecientes a más de una cohorte reproductiva (por la existencia de estructuración intrapoblacional del flujo génico en diferentes áreas de la superficie total de ocupación poblacional). No obstante, la escasa incidencia del efecto Wahlund en nuestro muestreo se apoya en el hecho de que el descenso del número absoluto de alelos en muchos sectores subpoblacionales (reflejado en el parámetro A) se debe fundamentalmente a alelos de baja frecuencia, y en que se observan valores igualmente elevados de F_{IS} en algunos sectores subpoblacionales repartidos por todas las poblaciones (Tabla II.4.13).

Presumiblemente, la estructuración genética intrapoblacional detectada en estas especies de *Crambe* ha sido modulada por fluctuaciones poblacionales recurrentes que en ocasiones pueden ser drásticas (ver fichas de las poblaciones muestreadas en Material y Métodos). El hecho de que todas las poblaciones de *C. tamadabensis* y varias de *C. pritzellii* mostraron

evidencias de haber pasado por un cuello de botella reciente (Tabla II.4.2) apoya esta hipótesis. Otras poblaciones de *C. pritzelii*, como por ejemplo CPGY (la mayor en tamaño de las estudiadas) se hallan en situación cercana al cuello de botella. Dicha población se extiende a lo largo de 4,5 km en una de las laderas del Barranco de Guayadeque, con una talla poblacional estimada de 49.525 individuos, pero *C. pritzelii* no es mencionada en ninguno de los inventarios florísticos elaborados hace 40 años en una de las áreas donde es particularmente abundante en la actualidad (Bramwell & Navarro, 1976), y se puede deducir que la especie era poco conocida para amplios tramos del barranco en aquellas fechas (ver antecedentes corológicos de la especie en Material y Métodos). Hay que tener en cuenta que no todos los cuellos de botella pueden detectarse mediante el test propuesto por Cornuet y Luikart (1996), dado que las poblaciones, dependiendo de su tamaño (Luikart & Cornuet, 1998) se pueden recuperar de sus desviaciones genéticas en un tiempo relativamente corto (unas pocas decenas de generaciones). Además, el test tiene algunas limitaciones prácticas importantes que pueden llevar a identificar solamente un 50-75% de las poblaciones naturales que han sufrido cuellos de botella recientes (Luikart & Cornuet, 1998), normalmente aquellas en las que éstos han sido más severos.

Existen algunas poblaciones de tamaño muy reducido donde se observa el menor número de *loci* que se desvían del equilibrio de Hardy-Weinberg, como CTSI y CPAN (cinco *loci*) o el caso mencionado de CPJI, (Tabla II.4.4). En las poblaciones más pequeñas, lo esperado según la teoría generalmente aceptada de genética poblacional son situaciones donde se favorecerían los procesos de endogamia que conllevan un aumento de los niveles de consanguinidad, que se verían reflejados en el índice de fijación (F_{IS}) (Wright, 1931). No obstante, estas poblaciones de *Crambe* presentan un índice de fijación bastante menor (Tabla II.4.2). Este resultado va además acompañado de un descenso en los valores de la heterozigosidad esperada o del número de alelos por *locus* (los parámetros en cuyo valor se esperaría un mayor descenso tras una reducción de talla poblacional) y de unos valores de heterozigosidad observada relativamente elevados (Tabla II.4.2). Esto mismo ocurre en ciertos sectores subpoblacionales de tamaño reducido que se encuentran acantonados y relativamente aislados del resto de la población a la que

pertenece, como CTGU2, CTGU3, CPAG2B, CPAG1B, CPAZ1 y CPTÉ5 (Tabla II.4.13).

La existencia de núcleos poblacionales pequeños y acantonados con índices de fijación bajos, junto a los valores más elevados de los núcleos y poblaciones grandes refuerza la evidencia de la presencia en estas especies de *Crambe* del sistema de cruzamiento autoincompatible esporofítico homomórfico típico de la familia *Brassicaceae*. En las poblaciones grandes suele haber un mayor polimorfismo de alelos S de autoincompatibilidad, lo cual permite apareamientos entre individuos allegados que podrían favorecer la homocigosis en los loci aloenzimáticos (Gibbs, 1988; Barrett, 1988; Byers & Meagher, 1992; Richards, 1997; Fernández-Palacios *et al.*, 2007; Busch & Schoen, 2008). Éste sistema de incompatibilidad se considera el más eficaz en poblaciones pequeñas, ya que actúa a nivel de la recepción del polen por el estigma, e impide el cruce entre individuos que contienen el mismo alelo de incompatibilidad.

En poblaciones que hayan sufrido un descenso drástico del número de efectivos es más probable la pérdida de alelos S, y por tanto la menor disponibilidad de cruces compatibles. En el género endémico canario *Parolinia* (*Brassicaceae*), con sistema de cruzamiento autoincompatible esporofítico homomórfico comprobado, la tasa S de autogamia de Karron y el índice ISI (que evalúan los niveles de compatibilidad) se correlacionan positivamente con el tamaño poblacional, lo que refleja un mayor polimorfismo del *locus* S en las poblaciones grandes (Fernández-Palacios, 2010). Todas las poblaciones de *Parolinia* muestran defecto de heterocigotos con la excepción de la única conocida para el taxón críticamente amenazado *P. glabriuscula* (con valor de F_{IS} ligeramente negativo), acantonada en el interior de la Caldera de Bandama en el noreste de Gran Canaria (cuyas paredes parecen haber servido de refugio) (Fernández-Palacios, 2010).

En *Crambe*, se puede considerar a la población CPJI, de tamaño similar a la de *P. glabriuscula*, y con F_{IS} ligeramente negativo, como la población más presionada por factores adversos que limitan su tamaño. A pesar de la menor variabilidad genética encontrada, la presumible reducción del número de cruzamientos conllevaría el mantenimiento de los niveles de heterocigosidad observada, lo que habría causado la falta de estructuración génica.

II.5.3 Cohesión intraespecífica y variabilidad genética interpoblacional: la importancia del flujo génico frente a los efectos de la deriva génica.

La partición interpoblacional de la variabilidad genética inferida de la G_{ST} de Nei (0,067 para *C. tamadabensis* y 0,126 para *C. pritzelii*, ver Tabla II.4.8) y el Análisis Molecular de la Varianza (Tabla II.4.9) indican una alta cohesión genética dentro de cada especie, en fuerte contraste con los altos niveles de fragmentación estimados para la flora canaria ($G_{ST} = 0,280$; Francisco-Ortega *et al.*, 2000). Presumiblemente, muchos de los valores medios de G_{ST} evaluados en Francisco-Ortega *et al.* (2000) podrían deberse a sobreestimaciones como resultado de un muestreo restringido en términos de número y distribución de individuos (Caujapé-Castells, 2010; Pérez de Paz & Caujapé-Castells, 2013). En cambio, los valores obtenidos en *Crambe* se basan en un muestreo exhaustivo del área de ocurrencia de sus poblaciones, y son mucho más cercanos a los obtenidos en especies endémicas alógamas en general ($G_{ST} = 0,179$; Hamrick & Godt, 1997).

Caujapé-Castells (2010), mediante evaluaciones empíricas a partir de los mismos datos de *C. tamadabensis* y *C. pritzelii*, comprobó que el incremento de G_{ST} resultante de la eliminación de muestras por todo el área de distribución de las poblaciones fue mínimo para diferentes grados de reducción (hasta un 80%) del tamaño muestral (incremento máximo de 6,0% en *C. tamadabensis*), mientras que cuando se eliminaron las muestras de diferentes extremos poblacionales G_{ST} aumentó más ostensiblemente (17,9-67,2% al eliminar un 80% de las muestras, máximo de 100,0% al eliminar un 60% de las muestras para uno de los extremos poblacionales en *C. tamadabensis*). Se puede deducir por tanto de ese estudio que el muestreo realizado en *Crambe* es bastante robusto frente a las diferencias de tamaño muestrales, que las poblaciones están irregularmente estructuradas, y que la desaparición de una parte del área de una población puede resultar en un cambio en sus frecuencias alélicas.

En *C. pritzelii*, las dos poblaciones menos variables (CPJI, CPGA) explican la mayor parte de la divergencia interpoblacional encontrada en la

especie, según lo estimado por el parámetro G_{ST} (Tabla II.4.8) y el Análisis de Componentes Principales (Figura II.4.3). Teniendo en cuenta la menor variabilidad genética de estas dos poblaciones, la ausencia de alelos exclusivos de la especie y su bajo número de alelos raros (Tabla II.4.7), la divergencia genética detectada dentro de *C. pritzelii* parece deberse a oscilaciones de las frecuencias alélicas que pueden reflejar tanto (i) los efectos de la fragmentación poblacional inducida por el pastoreo, más probablemente en los alrededores de CPJI, donde una población mucho mayor pudo haber existido en el pasado (ver corología actualizada de la especie y la ficha de esta población en Material y Métodos), como (ii) eventos fundadores relativamente recientes. La segunda posibilidad es más probable en poblaciones como CPGA, situada en un área relativamente húmeda del macizo aislado de Amurga, en el sureste de Gran Canaria. De hecho, CPJI y CPGA parecen tener algo de peso en la baja correlación detectada entre distancias geográficas y genéticas en el test de Mantel (Figura II.4.4), ya que además se encuentran en márgenes del área de distribución de la especie, a una distancia relativamente alejada de las poblaciones más cercanas.

La alta cohesión genética dentro de cada especie contrasta con las estimaciones de flujo génico según el método de alelos privados (Slatkin, 1985), cuyos valores de Nm son mucho más reducidos en *C. pritzelii* que en *C. tamadabensis* ($Nm = 0,846$ frente a $Nm = 1,209$). Algunos de los valores más bajos de Nm obtenidos ocurren incluso entre poblaciones genéticamente cercanas y contiguas geográficamente (Tabla II.4.11), lo cual puede ser una consecuencia de los cuellos de botella recurrentes ya discutidos (Tabla II.4.2). Lo mismo sugiere la detección generalizada de alelos raros y exclusivos esparcidos por toda el área de distribución de cada taxon (Tabla II.4.1). Lógicamente el escenario basado en los alelos raros entra en conflicto con los altos niveles generalizados de flujo génico inferido por los F-estadísticos de Wright (1951) ya comentado, especialmente en *C. pritzelii* (Tabla II.4.11).

A pesar de haber sido ampliamente criticadas por parte de, por ejemplo, Bossart & Prowell (1998), Whitlock & McCauley (1999), o Jost (2008), las medidas indirectas de flujo génico adquieren significado cuando son empleadas solamente como medidas comparativas de divergencia interpoblacional, y han suministrado comparaciones relevantes en muchos casos (Waples, 1987;

Slatkin & Burton, 1989; Cockerham & Weir, 1993; Bohonak, 1998, 1999; Neigel, 2002). Los problemas prácticos en la estimación de frecuencias de alelos raros en los estudios electroforéticos (como ha notado Waples [1987]) sugieren que F_{ST} es probablemente un método comparativo más relevante que la aproximación de los alelos privados (Slatkin & Burton 1989). La estimación de Nm según la formulación de Wright (1931) depende de F_{ST} , que en *Crambe* está fuertemente correlacionada con la distancia genética de Nei (1978), mientras que la estimación de Nm según Slatkin (1985) presenta valores dispares entre poblaciones contiguas y existe un estancamiento en estos valores de flujo génico frente a valores altos de Nm según el método de Wright (Figura II.4.5).

Por lo tanto, la visión en conjunto de las estimaciones de flujo génico disponibles en *Crambe* ofrece dos posibilidades de interpretación no necesariamente excluyentes. Por un lado, se puede argüir que los niveles de flujo génico interpoblacional dentro de cada especie de *Crambe* son altos en conjunto, y que las estimaciones derivadas del método de Slatkin (1985) están radicalmente sesgadas por diversos factores. Por otro lado, se puede sostener que el flujo génico podría encontrarse parcialmente interrumpido en la actualidad debido a la fragmentación poblacional, y que las estimaciones por medio de F_{ST} indican en realidad cohesión genética interpoblacional relacionada con las dinámicas poblacionales históricas.

De acuerdo con el análisis de asignación y estructuración poblacional de STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), las poblaciones de *C. tamadabensis* son genéticamente homogéneas (Figura II.4.7), mientras las de *C. pritzelii* están más diferenciadas y se distribuyen en dos grupos. Como ya mostraron previamente Rosenberg *et al.* (2002), en otro contexto, el análisis con STRUCTURE separó en primer lugar las poblaciones aisladas que contienen una menor variabilidad (como CPJI y CPGA), mientras que inferió un origen mixto (clusters II y III) para los individuos de las poblaciones más variables (Tabla II.4.12), lo que refleja “mezcla genética” entre poblaciones próximas, consistente con el escenario de altos niveles de flujo génico. Teniendo en cuenta que los métodos bayesianos asignan individuos a subconjuntos de poblaciones mucho más eficientemente con marcadores de alta tasa de mutación que con aloenzimas (Estoup *et al.*, 1998; Waples & Gaggiotti, 2006),

la interpretación asumida de estos resultados es que las dos poblaciones menos variables de *C. pritzelii* divergen tanto en las frecuencias alélicas que interfieren en la estimación del número de grupos de poblaciones. Notablemente, las poblaciones CPJI y CPGA son las únicas (además de Azuaje, CPAZ) asignadas sin ambigüedad por STRUCTURE a los grupos II y III; cuando ambas poblaciones fueron eliminadas del análisis, la nueva estimación de K fue de dos grupos de poblaciones, y cada población de *C. tamadabensis* y de *C. pritzelii* (incluida CPAZ) fue asignada sin ambigüedad a los grupos I y II, respectivamente (Figura II.5.1).

Tabla II.5.1. Proporciones de asignación (q) poblacional a cada uno de los clusters inferidos por el programa STRUCTURE, eliminando del análisis las poblaciones CPJI y CPGA.

	(q) I	(q) II
<i>C. tamadabensis</i>		
CTTA	0,982	0,018
CTAM	0,880	0,120
CTGU	0,882	0,118
CTSI	0,939	0,061
<i>C. pritzelii</i>		
CPAG2	0,110	0,890
CPAG1	0,176	0,824
CPAZ	0,004	0,996
CPAN	0,077	0,923
CPTE	0,111	0,889
CPGY	0,033	0,967

II.5.4 Relaciones interespecíficas en el género *Crambe*: un caso de especiación incipiente.

Los valores del componente interpoblacional de la variabilidad genética global (G_{ST} y F_{ST} , Tabla II.4.8) calculados para *C. tamadabensis* y *C. pritzelii* se incrementaron al considerar agrupaciones interespecíficas de poblaciones, lo cual indica niveles reducidos de flujo génico entre ambas especies. Esta es una evidencia de aislamiento reproductivo incipiente entre ambas especies que es congruente con la distinción taxonómica existente.

Las identidades genéticas medias entre pares de poblaciones inter e

intraespecíficas de *Crambe tamadabensis* y *C. pritzelii* son significativamente diferentes ($I_{NEI} = 0,877$ y $I_{NEI} = 0,929 - 0,934$ respectivamente), y la identidad genética media entre ambas especies es estrechamente similar a los valores interespecíficos encontrados para especies canarias de los géneros *Parolinia* (*Brassicaceae*) ($I_{NEI} = 0,754 - 0,914$; Fernández-Palacios *et al.*, 2006), *Lotus* (*Fabaceae*) de los pinares de Gran Canaria ($I_{NEI} = 0,822 - 0,939$; Oliva-Tejera *et al.*, 2005), o en especies costeras de *Lotus* ($I_{NEI} = 0,823 - 0,894$; Oliva-Tejera *et al.*, 2006). Estas identidades medias interespecíficas son aún menores que muchas de las obtenidas entre especies canarias de *Argyranthemum* (Francisco_ortega *et al.*, 1996), *Sonchus* (Kim *et al.*, 1999) o *Tolpis* (Crawford *et al.*, 2006)

Algunas de las identidades interespecíficas que relacionan CPAG2, CPAG1, CPAN y CPTTE con algunas poblaciones de *C. tamadabensis* están dentro del rango de valores más común entre pares de poblaciones conoespecíficas. No obstante, este grupo de poblaciones altamente variables de *C. pritzelii* presenta identidades genéticas más altas con el resto de poblaciones de ambas especies, y además con un rango de identidades entre ellas mucho más alto ($I_{NEI} = 0,938 - 0,975$) (Tabla 4.10). La situación es por lo general muy parecida si tomamos en consideración los alelos compartidos por pares de poblaciones interespecíficas (Tabla II.4.1), lo que parece una indicación más de la existencia de flujo génico ancestral y especiación reciente.

Similarmente a lo sostenido por Crawford *et al.* (2006) en otro contexto, la incipiente divergencia genética intra e interespecífica detectada en *C. tamadabensis* y *C. pritzelii* debe haber venido precedida por una diferenciación morfológica rápida, y por la putativa aparición de barreras fenológicas. No se detectaron especímenes híbridos en las poblaciones naturales, a pesar de que varias poblaciones de estas especies se encuentran muy cercanas en el espacio. Esto está en sintonía con los resultados de los análisis filogenéticos de la sección *Dendrocrambe* (Francisco-Ortega *et al.*, 2002), que indican que la hibridación no ha desempeñado un papel primordial en la historia evolutiva de las especies macaronésicas de *Crambe*. La explicación más frecuente para interpretar la alta similitud encontrada a través de los *loci* isoenzimáticos entre especies congénicas de islas oceánicas es que la reciente y rápida radiación que sigue al establecimiento ha sido demasiado rápida para permitir diferencias

sustanciales a nivel de *loci* neutrales como los isoenzimáticos (Crawford, Whitkus & Stuessy, 1987b; Crawford & Stuessy, 1997).

En parcial desacuerdo con la falta de resolución filogenética encontrada por Francisco-Ortega *et al.* (2002), la alta variación isoenzimática detectada en esta tesis en *C. tamadabensis* y *C. pritzelii* apunta hacia una diferenciación genética incipiente (pero consistente), modulada por cuellos de botella debidos al pastoreo y la deriva génica. A pesar de que algunas poblaciones de *C. tamadabensis* ocurren en algunas de las partes más antiguas de Gran Canaria, se puede argumentar razonablemente que ambas especies representan un evento de reciente especiación a partir de un ancestro muy cercano a *C. scoparia* (ver Francisco-Ortega *et al.*, 2002). En este contexto, la similitud genética entre algunas poblaciones de *C. tamadabensis* y *C. pritzelii* (Tabla II.4.10) reflejarían el flujo génico ancestral y la reciente especiación.

II.5.5 Implicaciones para la conservación *in situ* y *ex situ*.

A pesar de que ambas especies han conseguido mantener con éxito altos niveles de variación genética y cohesión interpoblacional dentro de cada especie (Tabla II.4.8), el impacto generalizado del pastoreo (así como de otras actividades humanas intensivas como la deforestación y la agricultura) ha afectado a las mayores poblaciones estudiadas, que han sido sometidas a fluctuaciones de tamaño históricas (Tabla II.4.2). Además, los datos de variación genética intrapoblacional obtenidos en *Crambe* están escasamente correlacionados con las tallas poblacionales, especialmente en las poblaciones pequeñas (Figura II.4.1). En consecuencia, es más plausible interpretar los altos valores generalizados en los indicadores de diversidad genética como efecto de los altos niveles de flujo génico intra e interpoblacional, promovidos en gran medida por el sistema de autoincompatibilidad esporofítico asumido para estos taxones.

En este contexto, el hecho de que varias poblaciones (como CPAN y CPAG2 en *C. pritzelii*) contengan niveles mayores de variabilidad genética que otras poblaciones de tamaño similar como CPJI y CPGA (ver Tablas II.4.2 y II.3.1), se debe posiblemente a su cercanía a otras poblaciones conespecíficas

grandes y altamente variables, que fomenta la incorporación de variación genética a través de los altos niveles de flujo génico (Tabla II.4.11). Como se ha discutido en el apartado anterior, la interpretación de los datos de flujo génico entre pares concretos de poblaciones no debe tomarse de forma literal, y deben considerarse además otros factores que complementen esta explicación, como la existencia de flujo génico con otras poblaciones pequeñas que no fueron muestreadas (más frecuentes alrededor de CPAN) y la posibilidad de que hayan existido poblaciones de mucho mayor tamaño en el pasado

Consecuentemente, el pastoreo pone en riesgo la supervivencia poblacional en estos taxones de *Crambe* solamente cuando éste reduce las poblaciones a pequeños grupos poblacionales aislados que no pueden mantener niveles suficientes de flujo génico con otras poblaciones (al igual que lo detectado en *Atractylis preauxiana* [Asteraceae] con RAPDs por Caujapé-Castells *et al.* [2008]). Por su exigüidad censal, tales núcleos no pueden contrarrestar las consecuencias fatales de, por ejemplo, la pérdida de variabilidad genética en el *locus S* (ver apartados anteriores).

Los resultados de esta tesis evidencian, por tanto, que estas especies de *Crambe* tienen una considerable capacidad de recuperación demográfica y genética siempre y cuando se preserven los niveles actuales de flujo génico intraespecíficos. En consecuencia, las medidas de protección *in situ* y de control del pastoreo deberían ser las vías más efectivas para su conservación y gestión.

Como se ha enfatizado previamente, estos taxones contienen aún niveles muy altos de variación genética neutral, que debería preservarse *ex situ* en el banco de germoplasma del JBCVCSIC para su uso eventual en futuros reforzamientos o reintroducciones, siguiendo las indicaciones en Bacchetta *et al.* (2008). De acuerdo con la fórmula $P = 1 - (G_{ST})^n$ (Hamrick *et al.*, 1991), el número mínimo de poblaciones (n) necesario para conservar el 99% de la variabilidad genética detectada en *Crambe tamadabensis* y *C. pritzelii* correspondería a dos y tres, respectivamente. Se sugiere así la recolección intensiva de semillas en las poblaciones CTTA y CTGU para *C. tamadabensis*, y CPAG1, CPTE y CPAN para *C. pritzelii*. Estas poblaciones ostentan los mayores valores de heterozigosidad esperada en sus respectivas

especies, y son por consiguiente aquellas que podrían garantizar la representación del máximo de diversidad genética natural en instalaciones para la conservación *ex situ*.

Puesto que debe aspirarse a mantener la conectividad genética existente dentro de estas especies como estrategia de conservación *in situ* más apropiada, las poblaciones mencionadas más arriba son también (junto a CPGY) aquellas donde deberían enfocarse principalmente los esfuerzos de conservación, ya que son las que más contribuyen en la cohesión genética actual dentro de sus respectivas especies (G_{ST} [Nei, 1973], θ [Weir & Cockerham, 1984], ver Tabla II.5.2). Sin embargo, se cree oportuno indicar que CPGA, de ubicación más remota, debería merecer también una protección *in situ* especial, ya que es genética y ecológicamente singular. Consideramos factible que esta población represente un evento de colonización reciente en la mitad meridional de la isla, y tal vez contenga adaptaciones locales que pudieran conducir a una diferenciación incipiente si se desarrollasen barreras al flujo génico.

Tabla II.5.2. Efecto de la eliminación de cada una de las poblaciones en el valor del componente interpoblacional de la variación genética.

	G_{ST} (Nei, 1973)	θ (W&C, 1984)
<i>C. tamadabensis</i>	0,067	0,074
sin CTTA	0,077	0,114
sin CTAM	0,044	0,053
sin CTGU	0,061	0,084
sin CTCA	0,056	0,068
 <i>C. pritzelii</i>	 0,126	 0,134
sin CPAG2	0,128	0,136
sin CPAG1	0,140	0,147
sin CPAZ	0,125	0,131
sin CPJI	0,093	0,116
sin CPAN	0,136	0,140
sin CPTE	0,138	0,154
sin CPGY	0,136	0,153
sin CPGA	0,098	0,096

Finalmente, como ha sido ampliamente discutido en otros trabajos de conservación para endemismos canarios (como por ejemplo en Rumeu *et al.*, 2014), el éxito de estas pautas *in situ* sugeridas está supeditado a la implementación de acciones que efectivamente cumplan con la protección del hábitat a través de la erradicación de los impactos producidos por herbívoros

introducidos, especialmente cabras y conejos. De otro modo, seguir nuestras indicaciones genéticas tendrá solamente un efecto limitado (como mucho) en el estado de conservación *in situ* de estos endemismos de Gran Canaria.

II.6 Bibliografía.

- Aguilera F, Brito A, Castilla C, Díaz A, Fernández-Palacios JM, Rodríguez A, Sabaté F, Sánchez J. 1994. *Canarias: economía, ecología y medio ambiente*. La Laguna, Spain: F. Lemus.
- Anderson JK, Warwick SI. 1999. Chromosome number evolution in the tribe Brassiceae (Brassicaceae): evidence from isozyme number. *Plant Systematics and Evolution* 215: 255-284.
- Arús P. 1983. *Metodología de electroforesis horizontal en gel de almidón para muestras de hoja de almendro*. Cabrils, España: IRTA.
- Bacchetta G, Bueno A, Fenu G, Jiménez-Alfaro B, Mattana E, Piotto B, Virevaire M. 2008. *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias, España: La Caixa.
- Bañares Á, Blanca G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S, eds. 2003. *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza. 1.069 pp.
- Bañares Á, Blanca G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S, eds. 2009. *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. Adenda 2008*. Madrid: Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino)-Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. 155 pp.
- Barrett SCH. 1988. The evolution, maintenance and loss of self-incompatibility systems. In: Lovett J, Lovett L, eds. *Reproductive Strategies of Plants: Patterns and Strategies*. New York, USA: Oxford University Press, 98-124.
- Barrett SCH, Kohn JR. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size. In: Falk D, Holsinger K, eds. *Genetics and conservation of rare plants*. New York, USA: Oxford University Press, 3-30.
- Barrett SCH. 1996. The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society Ser. B* 351: 725-733.
- Bateman AJ. 1955. Self-incompatibility systems in angiosperms. III. Cruciferae. *Heredity* 9: 53-68.
- Batista FA, Bañares-Baudet Á, Caujapé-Castells J, Carqué-Álamo E, Marrero-Gómez M, Sosa PA. 2001. Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* (Cistaceae) from the Canary Islands: intraspecific and interspecific comparisons and implications for genetic conservation. *American Journal of Botany* 88: 1582-1592.
- Batista FA, Sosa PA. 2002. Allozyme diversity in natural populations of *Viola palmensis* Webb & Berth. (Violaceae) from La Palma (Canary Islands): implications for conservation genetics. *Ann. Bot.* 90: 725-733.
- Bengtsson BO, Weibull P, Ghatnekar L. 1995. The loss of alleles by sampling: a study of the common outbreeding grass *Festuca ovina* over three geographic scales. *Hereditas* 122: 221-238.
- BOC. 2001. Decreto 151, de 23 de julio, por el que se crea el catálogo de especies amenazadas de Canarias. *Boletín oficial de Canarias* 97: 11101-11111.
- Bohonak AJ, Davies N, Roderick GK, Villablanca FX. 1998. Is population genetics mired in the past?. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 360-360.
- Bohonak AJ. 1999. Dispersal, gene flow and population structure. *Quarterly Review of Biology* 74: 21-45.
- Bond JM, Daniels R, Bioret F. 2005. Genetic diversity in *Crambe maritima* along the English Channel: the role of ocean currents in determining population structure. *Ecography* 28: 374 -384.
- Borgen L. 1987. *Lobularia* (Cruciferae). A biosystematic study with special reference to the Macaronesian region. *Opera Botanica* 91: 1-96.
- Borgen L. 1997. Genetic differentiation in endemic *Lobularia* (Brassicaceae) in the

- Canary Islands. *Nordic Journal of Botany* 16: 487-503.
- Bornmüller J. 1903. Ergebnisse zweier botanischer Reisen nach Madeira und den Canarischen Inseln. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 33: 387-492.
- Bossart JL, Prowell DP. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 202-206.
- Bramwell D. 1969. The genus *Crambe* (Cruciferae) in the Canary Islands flora. *Cuadernos de Botánica Canaria* 6: 5-12.
- Bramwell D. 1973. New species of Cruciferae from Canary Islands. *Cuadernos de Botánica Canaria* 17: 19-26.
- Bramwell D, Ortega J, Navarro B. 1976. *Helianthemum tholiforme*, a new species of Cistaceae from Gran Canaria. *Botanica Macaronésica* 2: 69-74.
- Bramwell D. 1995. A new name for *Crambe gigantea* (Ceb. & Ort.) Bramwell. *Botánica Macaronésica* 22:111.
- Brassel KE, Reif D. 1979. A procedure to generate Thiessen polygons. *Geographical Analysis* 325: 31-36.
- Braun AKH. 1862. *Crambe pritzelii* Bolle. In: *Appendix Plantarum Novarum et Minus Cognitarum, quae in Horto Regio Botanico Berolinensi Coluntur 1861*. Berlín, 10.
- Burchard O. 1929. Beiträge zur Ökologie und Biologie der kanarenpflanzen. *Biblioth. Bot.* 24(98): (i) 1-262.
- Busch JW, Schoen DJ. 2008. The evolution of self-incompatibility when mates are limiting. *Trends in Plant Science* 13: 128-136.
- Byers DL, Meagher TR. 1992. Mating availability in small populations of plant species with homomorphic sporophytic self-incompatibility. *Heredity* 68: 353-59.
- Calero A, Santos A. 1988. Biología reproductiva de especies amenazadas en la flora canaria. *Lagascalia* 15(extra): 661-664.
- Caujapé-Castells J, Pérez de Paz J, Febles R, Fernández-Palacios O, Suárez-García C, Mora S, Navarro P, Olangua M, Jaén R, Sosa F, Torrent R. 2001. *Manual de laboratorio del Jardín Canario "Viera y Clavijo" I. Isoenzimas en gel horizontal de almidón*. Cabildo Insular de Gran Canaria (sin publicar).
- Caujapé-Castells J, Baccarani-Rosas M. 2005. Transformer-3: a program for the analysis of molecular population genetic data. EXEGEN Software y Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" (<http://www.bioclimac.com/mbdna/index.php/editions-a-pricing/transformer-3>).
- Caujapé-Castells J. 2006. *Brújula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones*. Las Palmas de Gran Canaria: EXEGEN.
- Caujapé-Castells J, Naranjo-Suárez J, Santana I, Baccarani-Rosas M, Cabrera-García N, Marrero M, Carqué E, Mesa R. 2008. Population genetic suggestions to offset the extinction ratchet in the endangered Canarian endemic *Atractylis preauxiana* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 273: 191-199.
- Caujapé-Castells J. 2010. General G_{ST} and θ inflation due to biased intrapopulation sampling, and its consequences for the conservation of the Canarian Flora. *Conservation Genetics* 11: 709-720.
- Caujapé-Castells J, Castellano JJ, Ramos R, Henríquez V, Sabbagh I, Quintana-Trujillo FM, Rodríguez JF. 2013. Transformer-4 version 2.0.1, a free multi-platform software to quickly reformat genotype matrices of any marker type, and archive them in the *Demiurge* information system. *Molecular Ecology Resources* 13: 484-493.
- Chen J, Smith DL. 2001. Amide hydrogen exchange shows that malate dehydrogenase is a folded monomer at pH 5. *Protein Science* 10: 1079-1083.
- Christ KHH. 1887. *Spicilegium Canariense*. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 9: 86-172.
- Clayton JW, Tretiak DN. 1972. Amine citrate buffer for pH control in starch gel

- electrophoreses. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 29: 1169-1172.
- Cockerham CC. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-84.
- Cockerham CC. 1973. Analyses of gene frequencies. *Genetics* 74: 679-700.
- Cockerham CC, Weir BS. 1993. Estimation of gene flow from *F*-statistics. *Evolution* 47(3): 855-863.
- Cornuet JM, Luikart G. 1996. Description and evaluation of two tests for detecting recent bottlenecks. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Crawford DJ, Stuessy TF, Silva M. 1987a. Allozyme divergence and the evolution of *Dendroseris* (Compositae: Lactuceae) on the Juan Fernandez Islands. *Systematic Botany* 12: 435-443.
- Crawford DJ, Whitkus R, Stuessy TF. 1987b. Plant evolution and speciation on oceanic islands. In: Urbanska KM, ed. *Differentiation patterns in higher plants*. London, UK: Academic Press, 183-199.
- Crawford DJ. 1989. Enzyme Electrophoresis and Plant Systematics. In: Soltis DE, Soltis PS, eds. *Isozymes in Plant Biology* Vol. 4. Hong Kong: Dioscorides Press, 146-64.
- Crawford DJ, Stuessy TF. 1997. Plant speciation on oceanic islands. In: Iwatsuki K, Raven PH, eds. *Evolution and diversification in land plants*. Tokyo, Japan: Springer-Verlag, 249-267.
- Crawford DJ. 2000. Plant macromolecular systematics in the past 50 years: one view. *Taxon* 49: 479-501.
- Crawford DJ, Ruiz E, Stuessy TF, Tepe E, Aqueveque P, Gonzalez F, Jensen RJ, Anderson GJ, Bernardello G, Baeza CM, Swenson U, Silva M. 2001. Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation. *American Journal of Botany* 88(12): 2195-2203.
- Crawford DJ, Archibald JK, Santos-Guerra A, Mort ME. 2006. Allozyme diversity within and divergence among species of *Tolpis* (Asteraceae-Lactuceae) in the Canary Islands: systematic, evolutionary, and biogeographical implications. *American Journal of Botany* 93(4): 656-664.
- De Candolle AP. 1821. *Crambe*. In: De Candolle AP, ed. *Regni vegetabilis systema naturale*, Vol. 2. Paris: Treuttel et Würtz, 650-656.
- DeJode DE, Wendel JF. 1992. Genetic diversity and origin of the Hawaiian Islands cotton, *Gossypium tomentosum*. *American Journal of Botany* 79: 1311-1319.
- Del Arco M, Salas M, Acebes JR, Marrero MC, Reyes-Betancort JA, Pérez de Paz PL. 2002. Bioclimatology and climatophilous vegetation of Gran Canaria (Canary Islands). *Ann. Bot. Fennici* 39: 15-41.
- Dolan RW. 1995. The rare, serpentine endemic *Streptanthus morrisonii* (Brassicaceae) species complex, revisited using isozyme analysis. *Syst. Bot.* 20: 338-346.
- Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Jordano P, Salvini D, Vendramin GG, Petit RJ. 2007. Can population genetic structure be predicted from life-history traits? *American Naturalist* 169: 662-672.
- Duminil J, di Michele M. 2009. Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems* (2009): 1-15.
- Duminil J, Hardy OJ, Petit RJ. 2009. Plant traits correlated with generation time directly affect inbreeding depression and mating system and indirectly genetic structure. *BMC Evolutionary Biology* 9: 177 doi:10.1186/1471-2148-9-177.
- East EM. 1940. The distribution of self-sterility in the flowering plants. *Proceedings of the American Philosophical Society* 82: 449-518.
- Elisens WJ. 1992. Genetic divergence in *Galvezia* (Scrophulariaceae): evolutionary and biogeographic relationships among South American and Galápagos species. *American Journal of Botany* 79, 198-206.
- Ellstrand NC, Elland DR. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and*

- Systematics* 24: 217-242.
- Estoup A, Rousset F, Michalakis Y, Cornuet JM, Adriaamanga M, Guyomard R. 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology* 7: 339-353.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Ewens W. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Pop. Biol.* 3: 87-112.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier L. 2003. Analysis of Population Subdivision. In: Balding D, Bishop M, Cannings C, eds. *Handbook of Statistical Genetics*, 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons Ltd., 713-750.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Excoffier L, Lischer H. 2011. Arlequin ver. 3.5.1.3. An integrated software package for population genetics data analysis. User Manual. Berna, Suiza: Swiss Institute of Bioinformatics. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35>
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1687.
- Fernández-Palacios O, Pérez de Paz J, Febles R, Caujapé-Castells J. 2006. Duplicaciones y diversidad genética de *Parolinia ornata* (Brassicaceae: Matthioleae), endemismo de Gran Canaria en relación a dos congéneres más restringidos y otros taxones isleños y continentales. *Botanica Macaronésica* 26: 19-54.
- Fernández-Palacios O. 2009. Biodiversidad morfológico-reproductiva y genética del género endémico canario *Parolinia* Webb (Brassicaceae). Tesis doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Francisco-Ortega J, Crawford DJ, Santos-Guerra A, Carvalho JA. 1996. Isozyme differentiation in the endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae: Anthemideae) in the Macaronesian Islands. *Pl. Syst. Evol.* 202: 137-152.
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Kim SC, Crawford DJ. 2000. Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *American Journal of Botany* 87(7): 909-919.
- Francisco-Ortega J, Fuertes-Aguilar J, Kim SC, Santos-Guerra A, Crawford DJ, Jansen RK. 2002. Phylogeny of the Macaronesian endemic *Crambe* section *Dendrocrambe* (Brassicaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 89(12): 1984-1990.
- Frankham R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations?. *Heredity* 78: 311-327.
- Frankham R. 1998. Inbreeding and extinction: island populations. *Conservation Biology* 12: 665-675.
- Fryxell PA. 1957. Mode of reproduction of higher plants. *The Botanical Review* 23(3): 135-233.
- García A, Wildpret W. 1996. *Crambe microcarpa* Santos (Brassicaceae). In: Gómez-Campo C, ed. *Libro Rojo de Especies Vegetales Amenazadas de las Islas Canarias*. Santa Cruz de Tenerife: Viceconsejería de Medio Ambiente, Gobierno de Canarias, 228-229.
- García-Cabezón A, Sventenius ER, González M, Jordan A, González C. 1955. *Index seminum quae Hortus Acclimatationis Plantarum Aitutapae*. Instituto Nationalis

- Investigationum Agrarium (Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae). Puerto de la Cruz, Tenerife: Jardín de Aclimatación de Plantas de La Orotava, 1: 3-11.
- García-Cabezón A, Sventenius ER, González M, Jordan A, González C. 1956. *Index seminum quae Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae*. Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae). Puerto de la Cruz, Tenerife: Jardín de Aclimatación de Plantas de La Orotava, 1: 3-14.
- García-Cabezón A, Sventenius ER, González M, Jordan A, González C. 1957. *Index seminum quae Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae*. Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae). Puerto de la Cruz, Tenerife: Jardín de Aclimatación de Plantas de La Orotava, 1: 3-14.
- García-Verdugo C, Fay MF, Granado-Yela C, Rubios de Casas R, Balaguer L, Besnard G, Vargas P. 2009. Genetic diversity and differentiation processes in the ploidy series of *Olea europaea*: a multiscale approach from subspecies to island populations. *Molecular Ecology* 18: 454-467.
- García-Verdugo C, Sajeva M, La Mantia T, Harrouni C, Msanda F, Caujapé-Castells J. 2015. Do island plant populations really have lower genetic variation than mainland populations? Effects of selection and distribution range on genetic diversity estimates. *Molecular Ecology* 24: 726-741.
- Gibbs PE. 1986. Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism?. *Plant Systematics and Evolution* 154: 285-323.
- Gibbs PE. 1988. Self-incompatibility mechanisms in flowering plants: some complications and clarifications. *Lagascalia* 15: 17-28.
- Gitzendanner MA, Soltis PS. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87(6): 783-792.
- Gottlieb LD. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216: 373-80.
- Gottlieb LD. 1984. Isozyme evidence and problem solving in plant systematics. In: Grant WF, ed. *Plant Biosystematics*. Academic Press Canada, 343-57.
- Goudet J. 2000. FSTAT version 2.9.3. A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Hamrick JL, Linhart YB, Mitton JB. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 173-200.
- Hamrick JL, Godt MJW. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, eds. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, 43-63.
- Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk DA, Holsinger K, eds. *Genetics and conservation of rare plants*. New York, USA: Oxford University Press, 75-86.
- Hamrick JL, Godt MJW. 1997. Effects of life history traits. In: Silvertown J, Franco M, Harper MJL, eds. *Plant life histories — ecology, phylogeny and evolution*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 102-118.
- Hansen A, Domínguez J. 1993. La isla de Gran Canaria. In: El-Mir AJ, ed. *Geografía de Canarias*. Las Palmas de Gran Canaria: Editorial Prensa Ibérica, 645-660.
- Hardy GH. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 28: 49-50.
- Helenurm K, Ganders FR. 1985. Adaptive radiation and genetic differentiation in Hawaiian *Bidens*. *Evolution* 39: 753-765.
- Hubisz M, Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9(5): 1322-1332.
- International Union for the Conservation of Nature (IUCN). Red List of Threatened Species. Ver. 2015.3. (<http://www.iucnredlist.org/>).
- I.T.G.M.E. (Instituto Tecnológico Geominero de España). 1992. *Memoria y mapa*

- geológico de España, escala: 1:100.000. Gran Canaria: hoja nº 21-21/21-22. Madrid: Proyecto MAGNA. Ministerio de Educación y Ciencia.
- Jost L. 2008. G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17: 4015-4026.
- Karron JD. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* 1: 47-58.
- Karron JD. 1988. Breeding systems and levels of inbreeding depression in geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 76(3): 331-40.
- Kephart SR. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *American Journal of Botany* 77(5): 693-712.
- Kercher S, Conner JK. 1996. Patterns of genetic variability within and among populations of wild radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 83(11): 1416-1421.
- Kim S-C, Crawford DJ, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A. 1999. Adaptive radiation and genetic differentiation in the woody *Sonchus* alliance (Asteraceae: Sonchinae) in the Canary Islands. *Pl. Syst. Evol.* 215: 101-118.
- Kunkel G. 1969. Notas misceláneas. *Cuadernos de Botánica Canaria* 5: 45-51.
- Kunkel G. 1977. *Endemismos canarios. Inventario de las plantas vasculares endémicas en la provincia de Las Palmas. Monografías*, 15. Madrid: Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza (ICONA). Servicio de publicaciones agrarias. 436 pp.
- Lannér-Herrera C, Gustafsson M, Fält A-S, Bryngelsson T. 1996. Diversity in natural populations of wild *Brassica oleracea* as estimated by isozyme and RAPD analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43: 13-23.
- Lázaro A, Aguinalalde I. 1998. Genetic diversity in *Brassica oleracea* L. (Cruciferae) and wild relatives ($2n = 18$) using isozymes. *Annals of Botany* 82: 821-828.
- Levin DA. 2002. *The role of chromosomal change in plant evolution*. New York: Oxford University Press.
- Lewis PO, Crawford DJ. 1995. Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozymic diversity than widespread congeners in the genus *Polygonella* (Polygonaceae). *American Journal of Botany* 82: 141-149.
- L'Héritier de Brutelle CL. 1785. *Stirpes Novae, aut minus cognitae, quas descriptionibus et iconibus illustrae* 6: 151 (tab. 72).
- Lid J. 1968. Contributions to the Flora of Canary Islands. *Skr. Norske Vidensk. Akad. Oslo. I. Matem. Naturv. kl.* 23: 1-212.
- Linné C. 1781 (1782). *Supplementum Plantarum Systematis Vegetabilium Editionis Decimae Tertiae, Generum Plantarum Editiones Sextae, et Specierum Plantarum Editionis Secundae*. Linné C, ed. Brunsvigae, 299.
- López-Pujol J, Bosch M, Simon J, Blanché C. 2006. Diversitat isoenzimática de la flora vascular silvestre dels Països Catalans. *Butlletí de la Institució Catalana d'Historia Natural* 74: 5-28.
- Luikart G, Cornuet JM. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12: 228-237.
- Lysak MA, Koch MA, Pecinka A, Schubert I. 2005. Chromosome triplication found across the tribe Brassiceae. *Genome Res.* 15: 516-525.
- Lysak MA, Lexer C. 2006. Towards the era of comparative evolutionary genomics in Brassicaceae. *Plant. Syst. Evol.* 259: 175-198.
- Lysak MA, Cheung K, Kitschke M, Bures P. 2007. Ancestral chromosomal blocks are triplicated in Brassicaceae species with varying chromosome number and genome size. *Plant Physiology* 145: 402-410.
- Manni F, Guérard E, Heyer E. 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's

- algorithm. *Human Biology* 76(2): 173-190.
- Manni F, Guérard E. 2004. *Barrier vs. 2.2. Manual of the user*. Paris, France: Population genetics team, Museum of Mankind (Musée de l'Homme) [Publicación distribuída por los autores].
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Marhold K, Lihová J. 2006. Polyploidy, hybridization and reticulate evolution: lessons from the Brassicaceae. *Plant Systematics and Evolution* 259: 143-174.
- Marrero Á. 1984. Sobre plantas reliócticas de Gran Canaria: comentarios corológico-ecológicos. *Botánica Macaronésica* 12-13: 51-62.
- Marrero Á, Jorge MS, Bramwell D. 1988. *Estudio para la conservación de la diversidad genética y recursos naturales de la flora endémica de Canarias (C.O.D.I.G.E.N.)*. Jardín Botánico "Viera y Clavijo". Cabildo Insular de Gran Canaria.
- Marrero Á, Navarro B. 2003. *Crambe tamadabensis* Prina et Marrero Rodr. In: Bañares Á, Blanca G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S, eds. *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza, 212-213.
- Maruyama T, Fuerst PA. 1985. Population bottlenecks and non equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics* 111: 675-689.
- Membrives-Fernández N, Pedrola-Monfort J, Caujapé-Castells J. 2001. Relative influence of biological versus historical factors on isozyme variation of the genus *Androcymbium* (Colchicaceae) in Africa. *Pl. Syst. Evol.* 229: 237-260.
- Menéndez G, Sventenius ER, Bolinaga J, González C. 1947. *Index seminum quae Hortus Acclimatationis Plantarum Arautapae*. Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae). Puerto de la Cruz, Tenerife: Jardín de Aclimatación de Plantas de La Orotava, 1: 3-15.
- Monmonier M. 1973. Maximum-difference barriers: An alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis* 3: 245-261.
- Montelongo V, Moraleda C. 1979. *Cheirolophus falcisectus* una nueva especie de Asteraceae de Gran Canaria. *Botánica Macaronésica* 5: 67-76.
- Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Haufler CH. 1996. Proteins: isozyme electrophoresis. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK, eds. *Molecular Systematics*. Sunderland, USA: Sinauer Associates, Inc., 51-120.
- Navarro B, Naranjo J, Navarro J. 2003. Inventarios 2000-2003. Inventarios de campo del Jardín Canario (no publicado). Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo", Cabildo Insular de Gran Canaria.
- 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, USA* 90: 3321-3323.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei M, Chesser RK. 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics* 47: 253-259.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York. USA: Columbia University Press, 176-187.
- Neigel JE. 2002. Is F_{ST} obsolete?. *Conservation Genetics* 3: 167-173.
- Oliva-Tejera F, Caujapé-Castells J, Naranjo-Suárez J, Navarro-Déniz J, Acebes-Ginovés JR, Bramwell D. 2005. Population genetic differentiation in taxa of *Lotus* (Fabaceae: Loteae) endemic to the Gran Canaria pine forest. *Heredity* 94: 199-206.
- Oliva-Tejera F, Caujapé-Castells J, Navarro-Déniz J, Reyes-Betancort A, Scholz S, Baccarani-Rosas M, Cabrera-García N. 2006. Patterns of genetic divergence of three Canarian endemic *Lotus* (Fabaceae): implications for the conservation of the endangered *L. kunkelii*. *American Journal of Botany* 93(8): 1116-1124.

- Ortega J, Navarro B. 1977. Estudios en la flora de Macaronesia: algunos números de cromosomas III. *Botanica Macaronésica* 3: 73-79.
- Pérez de Paz J. 1980. Contribución al Atlas palinológico de Endemismos Canario-macaronésicos 3. *Botánica Macaronésica* 7: 77-112.
- Pérez de Paz J. 2002. La biología reproductiva. Importancia y tipos de estudios. In: Bañares-Baudet A, ed. *Biología de la conservación de plantas amenazadas*. Madrid: Organismo Autónomo de Parques Nacionales, 71-132.
- Pérez de Paz J, Fernández-Palacios O, Caujapé-Castells J, Olangua-Corral M, Febles R. 2007. Biología reproductiva, filogenia, diversidad genética y poblaciones naturales en las islas Canarias y situaciones continentales. Tenerife: *III Congreso de Biología de la Conservación de Plantas*, 88–90.
- Pérez de Paz J, Caujapé-Castells J. 2013. A review of the allozyme data set for the Canarian endemic flora: causes of the high genetic diversity levels and implications for conservation. *Annals of Botany* 111(6): 1059-1073.
- Pickup M, Young AG. 2008. Population size, self-incompatibility and genetic rescue in diploid and tetraploid races of *Rutidosia leptorrhynchoides* (Asteraceae). *Heredity* 100: 268-274.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM. 1998. *Bottleneck, a program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data*. Montpellier, France: Laboratoire de Modélisation et Biologie Evolutive, Institut National de la Recherche Agronomique.
- Prina AO, Bramwell D. 2000. A new species of *Crambe* (Brassicaceae) from La Gomera, Canary Islands, Spain. *Ann. Bot. Fennici* 37: 301-302.
- Prina AO, Marrero Á. 2001. *Crambe tamadababensis* (Brassicaceae, Brassicaceae), una nueva especie para Gran Canaria. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 58(2): 245-249.
- Prina AO, Martínez-Laborde JB. 2008. A taxonomic revision of *Crambe* section *Dendrocrambe* (Brassicaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 156:291-304.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pritchard JK, Wen X, Falush D. 2010. *Documentation for structure software: Version 2.3*. Chicago, Usa: Department of Human Genetics, Universidad de Chicago. <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>
- Raelson JV, Grant WF. 1989. An isoenzyme study in the genus *Lotus* (Fabaceae). Experimental protocols and genetic basis of electrophoretic phenotype. *Theor. Appl. Genet.* 77: 595-607.
- Raymond M, Rousset F. 1995. Genepop: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Richards AJ. 1997. *Plant breeding systems*. London, UK: Chapman and Hall.
- Rivas-Goday S, Esteve-Chueca F. 1965. Ensayo fitosociológico de la *Crassi-Euphorbietea macaronésica* y estudio de los tabaibales y cardonales de Gran Canaria. *Anal. Inst. Bot. A. J. Cavanilles* 22: 220-339.
- Rivas-Martínez S, Arnaiz C, Barreno E, Crespo A. 1977. Apuntes sobre las provincias corológicas de la Península Ibérica e Islas Canarias. *Opuscula Bot. Pharm. Complutensis* 1: 1-48.
- Rivas-Martínez S, Wildpret W, Del Arco M, Rodríguez O, Pérez de Paz PL, García A, Acebes JR, Díaz TE, Fernández-González F. 1993. Las comunidades vegetales de la isla de Tenerife. *Itin. Geobot.* 7: 169-374.
- Rohlf FJ. 1998. *NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis version 2.02j*. Setauket, New York, USA: Applied Biostatistics Inc.
- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW. 2002. Genetic structure of human populations. *Science* 298: 2381-2385.
- Rousset F. 2000. Inferences from spatial population genetics. In: Balding D, Bishop M, Cannings C, eds. *Handbook of Statistical Genetics*. Wiley & Sons, Ltd.

- Rumeu B, Vargas P, Jaén-Molina R, Nogales M, Caujapé-Castells J. 2014. Phylogeography and genetic structure of the threatened Canarian *Juniperus cedrus* (Cupressaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 175: 376-394.
- Salas M, del Arco M, Acebes JM, Naranjo A, González R. 2003. Los retamares de *Retama rhodorhizoides* Webb & Berthel. en Gran Canaria: *Echio decaisnei-Retametum rhodorhizoidis* ass. nov. *Vieraea* 31: 201-206.
- Sampson JF, Byrne M. 2012. Genetic diversity and multiple origins of polyploid *Atriplex nummularia* Lindl. (Chenopodiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 105: 218–230.
- Sánchez JL, Reyes-Betancort JA, Scholz S, Caujapé-Castells J. 2004. Patrones de variación genética poblacional en el endemismo canario *Matthiola bolleana* Webb ex Christ. *Botánica Macaronésica* 25: 3-13.
- Sánchez JL, Caujapé-Castells J, Reyes-Betancort JA, Scholz S. 2006. Population genetics of *Matthiola bolleana* (Brassicaceae) in the Canary Islands. *Plant Systematics and Evolution* 262: 139-151.
- Santana A. 1993. La evolución del paisaje (I). In: El-Mir AJ, ed. *Geografía de Canarias*. Las Palmas de Gran Canaria: Editorial Prensa Ibérica, 197-212.
- Santana I, Naranjo J. 2003. *Crambe scoparia* Svent. In: Bañares Á, Blanca G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S, eds. 2003. *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza, 658-659.
- Santana I. 2009. *Crambe scoparia* Svent. In: *Evaluación de especies catalogadas de Canarias* (Expte. CRASCO 01/2009). Documento interno. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias.
- Santana I, Naranjo J, Soto M. 2009. *Crambe pritzelii* Bolle. In: Bañares Á, Blanca G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S, eds. *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. Adenda 2008*. Madrid: Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino)-Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas, 92-93.
- Santos-Guerra A. 1976. Notas sobre la vegetación potencial de la isla de El Hierro (1). *Anal. Inst. Bot. Cavanilles* 33: 249-261.
- Santos-Guerra A, Fernández M. 1978. Plantae in loco natali ab Eric Sventenius inter annos MCMXLIII - MCMLXXI lectae, in Herbario ORT Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimationis Plantarum Aрутapae) sunt. *Index Sem. Hort. Acclim. Plant. Aрутapae* 1978, 3: 67-140.
- Santos-Guerra A. 1983. *Vegetación y flora de la Palma*. Santa Cruz de Tenerife: Editorial Interinsular Canaria.
- Santos-Guerra A. 2013. *Crambe santosii*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2013: e.T180561A7648251. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T180561A7648251.en>
- Saturno, O. 2007. *Vegetación del Macizo de Amurga. Memoria final 2007*. Trabajo de investigación inédito. Las Palmas de Gran Canaria: Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo", Cabildo de Gran Canaria.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. *Arlequin: a software for population genetic data*. Ginebra, Suiza: Genetics and Biometry Laboratory, Universidad de Ginebra.
- Schubert I. 2007. Chromosome evolution. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 1-7.
- Schulz OE. 1919. Cruciferae-Brassicaceae, pars prima, Subtribus I. Brassicinae et II. Raphaninae. In: Engler A, ed. *Das Pflanzenreich*, Vol. 70. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1–290.
- Scott GAM, Randall RE. 1976. *Crambe maritima* L. *Journal of Ecology* 64(3): 1077-1091.
- Shields CRT, Orton J, Stuber CW. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the eletrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: Tanskley SD, Orton TJ, eds. *Isozymes in Plant Genetics Breeding, Part A*.

- New York, USA: Elsevier Science Publishing Company Inc., 443-468.
- Slatkin M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39(1): 53-65.
- Slatkin M, Barton NH. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43(7): 1349-1368.
- Smith JF, Pham TV. 1996. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). *American Journal of Botany* 83: 717-726.
- Soltis DE, Haufler CH, Darrow DC, Gastony GJ. 1983. Starch Gel Electrophoresis of Ferns: A Compilation of Grinding Buffers, Gel and Electrode Buffers, and Staining Schedules. *American Fern Journal* 73 (1): 9-27.
- Soltis PS, Soltis DE, Gottlieb LD. 1987. Phosphoglucosyltransferase gene duplications in *Clarkia* (Onagraceae) and their phylogenetic implications. *Evolution* 41(3): 667-671.
- Soltis PS, Soltis DE. 1988. Estimated rates of intragametophytic selfing in lycopods. *American Journal of Botany* 75: 248-256.
- Sosa PA, Lindstrom SM. 1999. Isozymes in macroalgae (seaweeds): genetic differentiation, genetic variability and applications in systematics. *Eur. J. Phycol.* 34: 427-442.
- Soto M. 2010. *Proyecto de restauración de los hábitats de los Espacios Naturales Protegidos (LIC's) de Pílancones, Tauro, Fataga, Inagua, Amurga y Parque Rural del Nublo en relación a las especies amenazadas*. Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo", Cabildo de Gran Canaria.
- Soto ME. 2015. *D-ALLOZ-100*. http://www.demiurge-project.org/matrix_digests/D-ALLOZ-100.
- Stebbins GL. 1942. The genetic approach to problems of rare and endemic species. *Madroño* 6: 241-272.
- Stebbins GL. 1950. *Variation and evolution in plants*. New York: Columbia University Press.
- Stebbins GL. 1980. Rarity of plant species: a synthetic viewpoint. *Rhodora* 82: 77-86.
- Suárez C. 1982. Aportaciones a la distribución y ecología de *Senecio appendiculatus* (L. fil) var. *preauxiana* Sch. Bip. y *Senecio hadrosomus* Svent. en Gran Canaria. *Botánica Macaronésica* 10: 58-92.
- Suárez C. 1994. *Estudio de los relictos actuales del monte verde en Gran Canaria*. Las Palmas de Gran Canaria: Cabildo Insular de Gran Canaria, Consejería de Política Territorial del Gobierno de Canarias. 617 pp.
- Suárez-García C, Pérez de Paz J, Febles R, Caujapé-Castells J. 2009. Genetic diversity and floral dimorphism in *Limonium dendroides* (Plumbaginaceae), a woody Canarian species on the way of extinction. *Plant Syst. Evol.* 280: 105-117.
- Sunding P. 1972. The vegetation of Gran Canaria. *Skr. Norske Vidensk. Akad. Oslo I. Matem. Naturv. Kl. S.* 29: 1-186.
- Sventenius ER. 1953. *Specilegium canariense*. *Boletín del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas* 13(28): 57-70.
- Sytsma KJ, Schaal BA. 1985. Genetic variation, differentiation, and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data. *Evolution* 39: 582-593.
- Vallejos CE. 1983. Enzyme activity staining. In: Tanksley SD, Orton TJ, eds. *Isozymes in plant genetics and breeding, part A*. Amsterdam, New York: Elsevier, 469-516.
- Vilches B, Roca A, Naranjo J, Navarro B, Bramwell D, Caujapé-Castells J. 2004. Estructura espacial de la variación genética de *Erysimum albescens* (Cruciferae) en Gran Canaria: implicaciones para la conservación *ex situ*. *Botánica Macaronésica* 25: 15-30.
- Viljoen AM, Van Wyk BE, Van der Bank H, Smith GF, Van der Bank M. 1996. A chemotaxonomic and biochemical evaluation of the identity of *Aloe candelabrum* (Aloaceae). *Taxon* 45: 461-471.
- Waples RS. 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution* 41(2): 385-400.

- Waples RS, Gaggiotti O. 2006. What is population?. An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* 15: 1419-1439.
- Warwick SI, Gugel RK. 2003. Genetic variation in the *Crambe abyssinica* – *C. hispanica* – *C. glabrata* complex. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 291-305.
- Warwick SI, Al-Shehbaz IA. 2006. Brassicaceae: Chromosome number index and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution* 259: 237-248.
- Watterson GA. 1978. The homozygosity test of neutrality. *Genetics* 88: 405-417.
- Webb CJ. 1984. Constraints on the evolution of plant breeding systems and their relevance to systematics. In: Grant WF, ed. *Plant Biosystematics*. New York, USA: Academic Press, 249-270.
- Weeden NF. 1983. Plastid isozymes. In: Tanksley SD, Orton TJ, eds. *Isozymes in plant genetics and breeding, part A*. New York: Elsevier, 139-156.
- Weinberg W. 1908. Über den Nachweis der Verebung beim Menschen. *Jahresch. Verein f. Vaterl. Naturk in Wütterberg* 64: 368-382.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Weir BS. 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Assoc. Inc.
- Wendel JF, Weeden NF. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis DE, Soltis PS, eds. *Isozymes in Plant Biology*. Oregon, USA: Dioscorides Press, 5-45.
- Whitlock MC, McCauley DE. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm + 1)$. *Heredity* 82: 117-125.
- Williamson PS, Werth CR. 1999. Levels and patterns of genetic variation in the endangered species *Abronia macrocarpa* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* 86(2): 293-301.
- Wright S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16(2): 97-159.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- XLSTAT. 2004. Statistical software, version 7.5.2 for Microsoft Excell. Addinsoft Inc.
- Yeh FC, Yang R-C, Boyle TBJ, Ye Z-H, Mao JX. 1997. *PopGene version 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis*. Alberta, Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta.
- Young AB, Brown AHD. 1996. Comparative population genetic structure of the rare woodland shrub *Daviesia suaveolens* and its common congener *D. mimosoides*. *Conservation Biology* 10: 1220-1228.

Capítulo III. Filogenia y filogeografía de los taxones endémicos del género *Ruta* en Canarias.



Ruta oreojasme. Montaña la Gorra.

Capítulo III.1. Introducción al género *Ruta*.



Roque Cano, La Gomera.

Introducción.

Las variables morfológicas han sido, hasta hace poco tiempo, las únicas que se consideraban válidas para discriminar entre diferentes unidades taxonómicas. Un problema inherente a estas variables es que están muy influenciadas por el ambiente; es decir, su rango de variación puede estar condicionado por factores externos, y consecuentemente pueden llegar a ser adaptativas, coincidiendo morfologías de muchos individuos que se encuentran en un determinado ambiente ligeramente diferencial con respecto al que se halla normalmente el taxón. Si bien es tarea del taxónomo distinguir entre los caracteres morfológicos diagnóstico de los que no lo son, existe otro problema frecuente relacionado con las variables morfológicas (incluidas las que nos proporcionan caracteres diagnóstico) que puede complicar en mayor medida la clasificación taxonómica: la presencia de homoplasias (convergencias evolutivas).

Por el contrario, muchos caracteres diagnóstico pueden pasar desapercibidos o no ser sistemáticamente examinados si no se analizan sistemáticamente la mayoría de las poblaciones que pueden existir en la presumible área de distribución de un taxón. En ese caso, las diferencias morfológicas halladas en una población o grupo de poblaciones se suelen atribuir erróneamente a variables sin significado diagnóstico. Esta situación ocurre con mayor probabilidad en taxones congénicos que han resultado de una radiación insular relativamente reciente (con frecuencia muy parecidos morfológicamente entre sí), y en aquellos grupos taxonómicos cuyos caracteres morfológicos diagnóstico no están bien definidos o están sujetos a controversia.

La tecnología molecular del ADN ha permitido en los últimos tiempos incorporar nuevas variables que se han convertido en una herramienta muy útil para ayudar en la discriminación taxonómica, ya que se mantienen como caracteres invariables durante la vida de un organismo. Paralelamente a la sistemática clásica (basada en los caracteres morfológicos), en la década de 1990 nació la sistemática molecular, que se centra en los cambios en las secuencias de ADN que son compartidos por un subconjunto de taxones (las sinapomorfías). Esta disciplina ha tenido un desarrollo tan espectacular desde

sus inicios que los datos moleculares han revolucionado el trabajo en sistemática, con la aparición del sistema de clasificación de angiospermas basado en el análisis cladístico de ciertas secuencias consenso del ADN (APG, 1998, 2003, 2009).

Sin embargo, como en muchos casos de radiación en islas la especiación reciente no se traduce en una diferenciación genética rápida, los marcadores moleculares de ADN no logran discriminar entre algunos casos que resultan claros para la taxonomía basada en variables morfológicas. Esta realidad, constatable en muchos linajes vegetales canarios, indica la necesaria complementariedad de las variables morfológicas y moleculares para la caracterización taxonómica de la flora del archipiélago.

Desde principios de los 90, se han generado numerosas filogenias que incluyen taxones canarios para muchos de los géneros que han radiado en gran medida, con numerosas especies endémicas de estas islas. Desde un primer momento, el marcador mayoritariamente empleado fue, casi exclusivamente, la región del ADN ribosómico nuclear conocida como ITS (Böhle *et al.*, 1996; Panero *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Susanna & García-Jacas, 2009; Helfgott *et al.*, 2000; Francisco-Ortega *et al.*, 1997, 2001, 2002; Molero *et al.*, 2002; Pelsner *et al.*, 2002; Mort *et al.*, 2002). En la actualidad, los trabajos que han usado las regiones ITS continúan siendo mayoritarios, aunque en la última década ha habido una tendencia a combinar esta región con otras, fundamentalmente del ADN cloroplástico (Bräuchler *et al.*, 2004; Trusty *et al.*, 2004, 2005; Guzmán & Vargas, 2005, 2010; Barber *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Escobar-García *et al.*, 2009; Zimmerman, 2010), o con otro tipo de marcadores como ISSR, ETS o AFLPs (Dlugosch & Parker, 2007; Talavera *et al.*, 2011; Vitales *et al.*, 2014).

Sin embargo, el nivel de resolución entre especies congénicas muy estrechamente relacionadas suele ser bajo en la mayoría de reconstrucciones filogenéticas llevadas a cabo en géneros que han experimentado una alta tasa de radiación evolutiva. Una de las principales limitaciones de los datos de secuencias de ADN generados sobre la flora canaria es que la región ITS ha mostrado poca capacidad de resolución para muchos de los linajes estudiados (Böhle *et al.* 1996; Allan *et al.* 2003, Francisco-Ortega *et al.* 2002). Puesto que

hasta hace poco tiempo solamente se utilizaba una región del ADN (o unas pocas), por cada linaje analizado, se limitaba muchísimo de partida la resolución de problemas filogenéticos relevantes para la conservación de esta flora.

Otra limitación de conocimiento importante de la mayoría de análisis filogenéticos de endemismos vegetales canarios ha sido el escaso número de muestras analizadas por taxón. Incluso en análisis filogeográficos, los muestreos han sido también, por lo general, de uno (o muy pocos) individuos por población. En consecuencia, durante mucho tiempo se asumió que no había variabilidad intrapoblacional (y solamente cierta variabilidad inter-poblacional) en las secuencias de ADN. Aunque esto puede ser cierto en el caso de los ITS, no ocurre así con algunas secuencias cloroplásticas, tal y como algunos trabajos recientes muestran en *Olea* (García-Verdugo *et al.*, 2010) o *Juniperus* (Rumeu *et al.*, 2011, 2014).

Las tres especies endémicas de Canarias reconocidas actualmente en el género *Ruta* L. (*Rutaceae*) conforman un grupo de origen presumiblemente monofilético (Salvo *et al.*, 2008), con poblaciones conocidas en cuatro de las siete islas: La Gomera (*R. microcarpa* Svent.apud Agullo *et al.*), Gran Canaria (*R. oreojasme* Webb & Berthel.), Tenerife y La Palma (*R. pinnata* L.f.). De acuerdo con el síndrome insular (es decir, la tendencia de las especies insulares a tener tallas mayores, Lomolino *et al.*, 2006), las tres especies canarias de *Ruta* alcanzan portes sensiblemente mayores que sus congéneres continentales, aunque en el caso de *R. oreojasme* (caméfito con ramas tortuosas) recuerda ligeramente al de sus congéneres continentales con hábito leñoso.

Muchas de las poblaciones y áreas de ocurrencia de estas especies han sido descubiertas recientemente, probablemente a causa de las dificultades del terreno donde éstas se alojan. Así, muchas poblaciones conespecíficas se encuentran frecuentemente separadas por barrancos profundos en la misma isla, o incluso en islas diferentes en el caso de *R. pinnata*. Pero también muchas poblaciones de estos taxones han pasado desapercibidas debido a la escasa exploración botánica de ciertas partes escasamente habitadas de las

islas y a la poca atención que se le ha dado a estos endemismos en concreto.

Recientemente, se han descubierto nuevas poblaciones de *R. oreojasme* en el sureste de Gran Canaria, algunas de ellas de tamaño considerable (Navarro *et al.*, 2003; Saturno, 2007; Olangua, 2009). En consecuencia, se ha descubierto que el área de ocupación de la especie es mucho más amplia de lo que se consideraba, ya que hasta el momento era conocida solamente de modo puntual (Soto, 2009; Olangua, 2009; Soto *et al.*, 2011). De forma similar, se han descubierto recientemente nuevas poblaciones presumiblemente pertenecientes a *R. microcarpa* en el norte de La Gomera (Marrero & Jorge, 1988; Mesa, 1996, 2005; Mesa *et al.*, 2003). Sin embargo, algunos de los investigadores que mejor conocen la circunscripción canaria del género piensan que todavía existe un escaso conocimiento sobre el número de poblaciones y áreas de distribución de algunas especies, como por ejemplo *R. pinnata* en Tenerife y La Palma (Mesa, 2008).

Los bosques termoesclerófilos, que corresponderían al hábitat primario de estas tres especies, son también la formación vegetal peor conservada en las islas Canarias, ya que se encuentran en las zonas preferentes de asentamientos humanos y actividades agrícolas históricas, debido a la bondad climática y a la existencia de buenos suelos y abundantes recursos hídricos (González *et al.*, 1986; Delgado *et al.*, 2001; González-Artiles, 2006). Por lo tanto, la distribución actual tan fragmentada que presentan las tres especies canarias de *Ruta* no es ajena a la situación de su hábitat natural (sobre todo en el caso de *R. pinnata* y *R. microcarpa*), mientras que muchas de las poblaciones remanentes se encuentran aún sometidas a pastoreo intensivo (o a pastoreo por ganado guanil en las poblaciones alejadas de áreas habitadas de *R. oreojasme*). En consecuencia, *R. oreojasme* y *R. microcarpa* se encuentran catalogadas como amenazadas mientras que *R. pinnata* presenta poblaciones de muy pequeño tamaño al menos en la isla de Tenerife (Mesa, 2008), aunque no se considera amenazada.

Las relaciones entre las especies canarias de *Ruta* se han estudiado hasta ahora en el marco de una filogenia general de las Rutáceas (Salvo *et al.*, 2008), que las agrupaba como un clado fuertemente diferenciado. Sin embargo, como es el caso de las filogenias que se realizan al nivel de familia, el esquema de muestreo usado en el citado trabajo perseguía una

representación taxonómica de la región canaria, sin poner ningún énfasis en la distribución poblacional o insular conocida de estos taxones.

La compleja distribución geográfica de las tres especies canarias de *Ruta* y las diferencias morfológicas existentes entre algunas poblaciones de *R. pinnata* y de *R. microcarpa* (Santos, 1996; Soto *et al.*, 2011) sugieren que su diversidad genética puede hallarse fuertemente estructurada en el espacio. Además, los trabajos anteriores podrían estar afectados por una considerable falta de resolución a consecuencia de no estar basados en un muestreo poblacional exhaustivo. Por lo tanto, los datos filogenéticos publicados hasta la fecha probablemente nos están indicando solamente las relaciones más elementales entre estas especies.

Recientemente, se han publicado también estudios de genética de poblaciones (con microsatélites) en *R. microcarpa* (Meloni *et al.*, 2013) y en *R. oreojasme* (Meloni *et al.*, 2015). Los resultados de estas investigaciones en *R. oreojasme* han constatado la presencia de considerables niveles de diversidad genética y cierta estructuración interpoblacional, mientras que en *R. microcarpa* se detectó una escasez de genotipos acorde con el pequeño tamaño de sus poblaciones, su aislamiento y la elevada incidencia de clonalidad. La alta diferenciación interpoblacional en este último taxón se halló fuertemente influenciada por efectos de la deriva genética, de modo que no pudo detectarse un patrón de estructuración genética espacial (Meloni *et al.*, 2013).

Capítulo III.2. Objetivos.

A partir de un muestreo exhaustivo a nivel poblacional e insular de las especies del género *Ruta* endémicas de las Islas Canarias, se han llevado a cabo análisis filogenéticos y filogeográficos para alcanzar los siguientes objetivos:

Utilizar las secuencias de cuatro regiones del ADNcp para esclarecer los patrones históricos, evolutivos y geográficos existentes entre las poblaciones de los tres taxones endémicos actualmente reconocidos dentro del archipiélago canario (*R. oreojasme*, *R. pinnata* y *R. microcarpa*) e inferir procesos de flujo génico inter e intra-específico.

Comprobar si los análisis filogenéticos permiten resolver las dudas asociadas a la identidad específica de algunas de las poblaciones recientemente descubiertas de estos tres taxones y, si es así, valorar sus implicaciones a nivel taxonómico.

Extraer directrices genéticas que contribuyan a la mejor conservación y gestión de las tres especies endémicas canarias del género *Ruta*, independientemente de su grado de amenaza.

Capítulo III.3. Material y Métodos.



El *curator* del herbario del JBCVCSIC, Águedo Marrero, durante los muestreos en Riscos del Juel, Taguluche. La Gomera.

III.3.1 *Ruta oreojasme* Webb & Berthel., *Ann. Sci. Nat., Bot.* (2), 13 (1840).

Descripción.

Caméfito muy leñoso, con olor característico, de hasta 40 cm de alto, con ramas cortas, tortuosas y nodosas, corteza lisa y glandulosa. Hojas de color verde claro a azul-glaucos y de aproximadamente 6 cm de largo, coriáceas, carnosas, con puntos negros glandulosos, pinnatisectas o subcoronopifolias, con 3-5-7 lóbulos. Pecíolo normalmente craso, cilíndrico. Lóbulos ovados u ovado-lanceolados, peciolados, con 1-3 nervios patentes. Corimbos cortos, terminales, con pocas flores, en racimos flexibles subdicotómicamente divididos, bracteados. Brácteas pequeñas, linear-lanceoladas, sésiles y caducas. Cáliz muy corto, craso, coriáceo, con 4 dientes ovados y obtusos. Pétalos amarillos, erectos y aquillados, ovado-redondeados, cóncavos, con márgenes enteros y con puntos glandulosos. Filamentos estaminales filiformes y antera elongado-ovada. Gineceo con 4 ovarios, 5 en flores pentámeras. Estilo mucho más corto que los estambres, atenuado hacia el ápice. Fruto una cápsula marrón clara, dehiscente, lisa y con 4 lóbulos (5 en flores pentámeras), con el dorso convexo y con los ápices obtusos, divaricatos. Semillas pequeñas y negras, elongadas, reniformes, reticuladas, la cubierta con puntos muy pequeños glandulosos (adaptado de Webb [1840]).

Hábitat y estado de conservación.

Especie endémica de Gran Canaria, de aptencias eminentemente rupícolas y en andenes con escaso suelo de retención. Forma parte de las comunidades de roquedos y cantiles de la clase fitosociológica *Greenovio–Aeonietea*, desde los 150 hasta los 950 msnm. Restringida al cuadrante sureste de la isla, la mayoría de sus poblaciones están concentradas en el Macizo de Amurga, en paredes de los laderones exteriores y de los barrancos interiores, donde es relativamente abundante.

Categoría de amenaza IUCN (post 1997): VU B2b(ii)c(ii,iv). La fuerte presión ganadera acontecida en la zona de distribución de este taxón debió influir en el desarrollo y conservación de algunas poblaciones, debido

principalmente al pisoteo y artificialización que éste produce (Soto *et al.*, 2010). Actualmente, la presión continúa por la presencia de abundante ganado cabrío cimarrón en todas las poblaciones del Macizo de Amurga. Aunque la especie no es de las más palatables para el ganado, se han observado esporádicamente ejemplares ramoneados. La mayor garantía de protección la constituye su óptimo desarrollo como planta rupícola, en lugares inaccesibles.

Gran parte de sus poblaciones se encuentran en áreas protegidas por los Lugares de Importancia Comunitaria (LICs) de Amurga y de Fataga, este último perteneciente a la Red de Espacios Naturales de Canarias (Paisaje Protegido de Fataga). Existen semillas de la mayoría de las poblaciones almacenadas en el Banco de Germoplasma del JBCVCSIC.

En los censos realizados por Soto (2009) y Soto *et al.* (2010) se contabilizaron un total de 33.613 individuos de la especie repartidos en 10 poblaciones.

Antecedentes corológicos.

Webb (1840), para la descripción de la especie usa material recolectado por M. Despréaux en bordes de precipicios del Barranco de Guayedra, el cual la considera bastante rara en el lugar. Trabajos posteriores la vuelven a citar para Guayedra (Christ, 1887; Pitard & Proust, 1909; Lindinger, 1926; Burchard, 1929) en base al hallazgo de M. Despréaux. La especie no ha sido localizada nunca más en dicho lugar.

La especie no es citada para ningún otro lugar hasta que Lindinger (1926) la da a conocer para el Barranco de Fataga (sin localidad), y Burchard (1929) para el mismo barranco en los alrededores de Arteara (250m). La misma localidad de Barranco de Fataga a 250 y 300 m se repite para Menéndez *et al.* (1952) y García Cabezón *et al.* (1954, 1964, 1966, 1969). Kunkel (1969) la cita para el Barranco de Fataga a 850 m, y para un emplazamiento muy cercano al anterior, en los riscos occidentales del Roque Almeida entre los 950 y 1050 msnm (Kunkel, 1971).

Sunding (1972) añade la cita de "Bco. Berriol" (Barranco de Berriol), 130-200 m. En Bramwell & Bramwell (1974) aparece citada para los barrancos de Fataga y Tirajana (sin precisar más) y para "Mogan, cliffs in the lower zone,

200-600m". Kunkel (1977) la cita como dudosa en Guayedra, la vuelve a citar para el Barranco de Fataga (Arteara) y Tirajana, y añade otras citas poco precisas en Los Vicentes, Ayagaures y Barranco de Arguineguín. Santos & Fernández (1980) publican pliegos de *Ruta oreojasme* inéditos de Sventenius del Barranco de Fataga, 450 m.

En los inventarios que figuran en la Base de Datos del JBCVCSIC (Navarro *et al.*, 2003) se la cita para nuevas localidades en el Alto de La Gorra, 460 m (emplazamiento que se correspondería con la cita de Kunkel [1977] de Ayagaures); en riscos del Barranco de Tirajana, en transecto por el fondo del barranco; en el Barranco del Toro, Amurga, 425-450 m; y en el Barranco Hondo, 400 m.

Soto (2009) y Soto *et al.* (2010) encuentran que casi todas las poblaciones conocidas del *taxón* tienen un área de ocupación mucho mayor que la descrita hasta entonces, y añaden tres poblaciones nuevas (citadas en Saturno [2007]): El Gallego, Barranco de Las Palmas y de Las Culatillas; Barranco del Taliscal del Águila; Barranco del Cañizo. Olangua (2009) añade las poblaciones del Puntón de Navarro y Andenes del Sito (Cumbre de Amurga), Barranco de La Galga (al este de la Cumbre de Amurga) y Talayón de la Cogolla (en el Barranco de Los Vicentes). La población del Roque de El Sao estudiada por Soto (2009) y Olangua (2009) podría corresponderse con las citas poco precisas de Barranco de Tirajana (Bramwell & Bramwell, 1974; Kunkel, 1977).

Por último, cabe recordar que al igual que en la localidad correspondiente al pliego tipo (Guayedra), las citas de Mogán (Bramwell & Bramwell, 1974, 1994, 2001) y Barranco de Arguineguín (Kunkel, 1977) no han podido ser confirmadas con posterioridad.

II.3.2 *Ruta pinnata* L.f. *Suppl. Pl.* 232 (1782).

Descripción.

Nanofanerófito de hasta dos metros, muy ramificado desde la base. Planta de hojas pinnadas, con tres pares de hojuelas opuestas, lanceoladas, la impar aserrada, con pequeños puntos glandulosos; pétalos amarillos, planos y subcrenulados; cápsula redondeada carnosa de color marrón anaranjado (adaptado de Paláu [1785], en su traducción ilustrada del libro *Supplementum Plantarum* de Carl Linnaeus [1782]).

Hábitat y estado de conservación.

Especie de medianías bajas de Tenerife y La Palma, en formaciones termoesclerófilas, normalmente en andenes de riscos escarpados, con suelos más o menos profundos, en los que se acumula suelo húmico. Altitudes comprendidas entre los 100 y 600 msnm.

Categoría de amenaza IUCN (post 1997): NT. Entre los factores que motivan su escasez actual se encuentran los usos agrícolas intensivos que tuvieron lugar en el pasado, con preferencia en las cotas altitudinales donde se encuentra la planta, y el uso tradicional que tuvo la planta en la medicina popular. Muchas de sus poblaciones se encuentran dentro de espacios protegidos de la Red de Espacios Naturales de Canarias: Parque Rural de Teno, Paisaje Protegido Acantilado de La Culata, Paisaje Protegido Campeches, Tigaiga y Ruiz, Parque Rural de Anaga, Parque Natural Corona Forestal, Monumento Natural Barranco de Fasnía y Güímar, Reserva Natural Especial Barranco del Infierno y Parque Natural Las Nieves.

Mesa (2008) estima para Tenerife unos 2000-3000 individuos repartidos en alrededor de una veintena de poblaciones, la mayoría de muy pequeño tamaño y conformadas por núcleos dispersos. Las poblaciones mayores se encuentran en los municipios de Candelaria y Fasnía en el este de la isla, y en los escarpes de Teno entre Garachico y Los Silos, donde es relativamente abundante. Se desconoce el número de poblaciones y de individuos para la isla de La Palma.

Antecedentes corológicos.

La especie, que carece de descripción completa, “habita entre las peñas cerca del puerto de la Orotava” (Linnaeus, 1782). Webb & Berthelot (1840) la sitúan entre el puerto de La Orotava y Fuente del Rey, Rincón de Buenavista y cultivada en La Laguna, en Tenerife; y en La Palma, cerca de La Galga, donde la dan como abundante. Bornmüller (1904) la cita para Tenerife en Punta del Hidalgo (Bajamar); y en La Orotava, “cultivada en huertos”. Burchard (1929) añade las citas de Montañeta de la Horca en el Puerto de la Cruz, y de la base del Roque del Tablero de Afur, 600 m, en Anaga. El mismo autor la cita en Hermigua de Arriba, en el noreste de La Gomera.

Ceballos & Ortuño (1976) añaden las localidades de Taganana (Bourgeau), Tegueste, Tacoronte y Fasnía. Santos & Fernández (1980) publican pliegos inéditos de esta especie de Sventenius que se conservan en el herbario de La Orotava (ORT): Montaña de la Horca, El Guincho (Garachico) a 300 m, Masca, La Guancha y Barranco del Infierno (Adeje). Barquín & Voggenreiter (1988), en el estudio preliminar de un atlas fitocorológico para las Canarias occidentales añaden localidades en Teno Bajo, Icod, El Tanque, Ladera de Tigaiga y en el Barranco del Río en Arico. Bramwell & Bramwell (1974, 1983, 1990) indican: “esporádica en la zona baja, 150-600 m, Buenavista, La Rambla, Montaña de Las Arenas, Punta del Hidalgo, El Escobonal, Adeje”. Mesa (1999) la localiza en Roque Negro de Afur (Anaga). Por último, Mesa (2008) la cita además para el Barranco de Chacorche en Iguete de Candelaria y para el Barranco de Badajoz en Güímar.

III.3.3 *Ruta microcarpa* Svent.apud Agullo *et al.*, *An. Real Soc. Espan. Fis & Quim. Ser. B, Ixiii.* 197 (1967), in adnot.

Descripción.

Arbusto de unos 0,5 m de alto (en algunas poblaciones hasta 1,5 m), densamente ramificado, con la corteza de los tallos viejos longitudinalmente fisurada. Hojas imparipinnadas, 3-7 folioladas, glabras, ligeramente carnosas, densamente punticuladas por la presencia de glándulas; foliolos linear-lanceolados con el margen ligeramente crenado, el apical mayor, largamente peciolado. Inflorescencias terminales paniculado-corimbosas; flores tetrámeras, raramente pentámeras, en este caso estériles; sépalos triangular-obtusos, glabros; pétalos amarillo-sulfúreos, obtusos con el margen eroso; estambres apenas superando los pétalos. Fruto globoso, de 4-5 mm de diámetro, subcarnoso, amarillento al madurar. Semilla negra, granulosa, tuberculada (adaptado de Sventenius [1969] y Mesa *et al.* [2003]).

Hábitat y estado de conservación.

Endemismo del norte y oeste de la isla de La Gomera, que habita en matorrales heterogéneos asociados a bosques termoesclerófilos, en derrubios de laderas y gleras. Algunas poblaciones se hallan también en zonas muy escarpadas y en paredones. Existe una clara diferenciación climática entre las poblaciones del norte de la isla, que se sitúan en el piso bioclimático con ombrotipo seco-subhúmedo, y las del oeste, en climas de ombrotipo semiárido superior.

Categoría de amenaza IUCN (2015): EN B2ab (ii,iii). La categoría de amenaza IUCN (post 1997), que era CR B2ab (iii,v), ha sido modificada debido fundamentalmente al descubrimiento de dos nuevas poblaciones en el noreste insular que presentan además tamaños poblacionales mayores (Mesa, 2005, 2008). Aunque la especie es presumiblemente poco palatable para el ganado, entre los factores de amenaza cabe destacar que algunas de las poblaciones se encuentran sometidas a un pastoreo intensivo. Algunos enclaves donde crece la especie se encuentran ocupados por especies exóticas muy invasoras

como *Opuntia sp.* (especialmente en las poblaciones del oeste de la isla). El pequeño tamaño de algunas poblaciones las hace sensibles a factores estocásticos que pueden llevar a la extinción, como parece haber sucedido en los riscos de Abrante, en Agulo (Mesa, 2008). Algunas de sus poblaciones se encuentran dentro de espacios protegidos de la Red de Espacios Naturales de Canarias: Monumento Natural Lomo del Carretón, Parque Rural Valle Gran Rey, Monumento Natural Roque Cano y Parque Natural Majona.

En los censos realizados por Mesa *et al.* (2003) se contabilizaron un total de 264 individuos de la especie repartidos en 6 poblaciones (Mulagua, Roque Cano, Risco de Las Zulas, Caraballo [Taguluche], Teguerquenche [Alojera] y Lomo del Carretón [Alojera]). Mesa (2008) añade a los anteriores los individuos de dos poblaciones nuevas del noreste de la isla para sumar un total de 716 ejemplares en 8 poblaciones, de los cuales 653 corresponden a 6 poblaciones del norte de la isla y 63 a dos poblaciones del oeste de la isla.

Antecedentes corológicos.

La descripción formal de la especie se encuentra en Sventenius (1969), en base a pliegos de herbario recolectados en 1945 en la región “austro occidental” de La Gomera. Santos & Fernández (1980) publican pliegos inéditos de Sventenius de *Ruta* provenientes de La Gomera que se conservan en el herbario de La Orotava (ORT), todos ellos anteriores a 1967, determinándolos como *Ruta microcarpa*: riscos de Agulo; riscos de la ruda, Alojera; Andenitos Verdes, Alojera; riscos por detrás del túnel de Agulo. A partir de aquí se ha considerado siempre a todas las poblaciones de La Gomera como pertenecientes a *Ruta microcarpa*, a pesar de que el propio Sventenius sólo consideró a localidades del oeste de la isla (en donde sí encajaría Alojera) en su descripción de la especie, y de que Burchard (1929) determinó especímenes de Hermigua como *Ruta pinnata*. Marrero & Jorge (1988) encuentran una nueva población en el Roque Caraballo, en los altos de Taguluche, municipio de Hermigua. Mesa (1996) descubre otra población nueva en el Roque Cano. Mesa *et al.* (2003) añaden las poblaciones del risco de las Zulas en Agulo y las proximidades de la presa de Mulagua en Hermigua. Mesa (2005) encuentra la especie en dos nuevas localidades por encima del

pueblo de Hermigua: Las Hoyetas, por encima de la ermita de San Juan; y en el Barranco de Monteforte. Por último, hay que indicar que se sabe de la existencia de una población de *Ruta microcarpa* en el canal de Guadá, en Valle Gran Rey, al suroeste de la isla (Mesa, 1996).

III.3.4 Muestreo.

Se muestrearon hojas frescas (1-5 g), a partir de las cuales se llevó a cabo la extracción del ADN de un total de 126 individuos de 19 localidades (11 de *Ruta oreojasme*, cinco de *Ruta pinnata* y cuatro de *Ruta microcarpa*, ver Tabla III.3.1) que representan toda el área de distribución de estos tres taxones (Figura III.3.1). Durante los muestreos, una de las poblaciones adscritas a *R. microcarpa* de La Gomera (Taguluche) fue determinada provisionalmente por nuestro grupo del JBCVCSIC como *R. pinnata*, siendo considerada como tal en los subsiguientes análisis.

Se prestó especial atención en la recolección de muestras que no estuviesen contaminadas por hongos u otros parásitos, siguiendo la metodología explicada en Caujapé-Castells *et al.* (2011). Las hojas recolectadas de un mismo individuo se depositaron en una bolsa con cierre hermético, a la cual se añadió gel de sílice para una rápida desecación. Con esto evitamos que la hoja, aún viva y ante el estrés hídrico, produzca compuestos secundarios como fenoles, que perjudicarían la calidad del ADN obtenido en la extracción (McKersie *et al.*, 1998). Cada bolsa fue etiquetada de forma que en todo momento se podía identificar a qué individuo y población correspondían las muestras de su interior. Se recolectó al menos un pliego testigo por localidad, que se depositó en el herbario LPA del JBCVCSIC.

Tabla III.3.1. Detalles de las localidades (Códigos, UTM y altitud) en las distintas Islas Canarias. (C= Gran Canaria, T=Tenerife, P= La Palma, G= La Gomera) donde se recolectaron los individuos de cada una de las especies de *Ruta* analizadas. H: Haplotipos hallados en cada población (ver Figura III.4.4).

Especie/Localidad	Isla	Código	U.T.M.	Altitud	H
<i>Ruta oreojasme</i>					
1. Montaña La Gorra	C	orGorr	28RDR 405 770	350 m	E
2. Cho Domingo	C	orDom	28RDR 405 785	475 m	I
3. Las Yeguas	C	orYeg	28RDR 425 770	475 m	B
4. Montañeta Redonda	C	orRed	28RDR 420 765	325 m	D,E
5. Los Culatones	C	orCul	28RDR 420 755	275 m	B
6. Arteara	C	orArt	28RDR 440 800	400 m	B
7. Barranco del Cañizo	C	orBca	28RDR 430 750	175 m	D,J
8. Barranco Taliscal del Águila	C	orAGui	28RDR 455 755	300 m	C
9. Gallegos	C	orGall	28RDR 480 805	725 m	A,F
10. Barranco de Las Palmas	C	orPal	28RDR 495 795	450 m	A,G
11. El Sao	C	orSao	28RDR 495 825	350 m	H
<i>Ruta pinnata</i>					
12. Genovés (Garachico)	T	piGen	28 RCS 290 390	300 m	N
13. Barranco de Herques (Fasnia)	T	piHer	28 RCS 580 255	525 m	O
14. Lomo de Las Nieves	P	piNie	28 RBS 265 780	700 m	K,L
15. Riscos de Juel (Taguluche)	G	piTag	28 RBS 875 165	600 m	M
<i>Ruta microcarpa</i>					
16. Teguerquenche (Alojera)	G	miTeg	28 RBS 720 155	550 m	P
17. Mulagua (Hermigua)	G	miMulll	28 RBS 840 145	475 m	M
18. Roque Cano	G	miCan	28 RBS 780 195	400 m	M
19. Camino de El Cedro	G	miCed	28 RBS 825 145	550 m	M

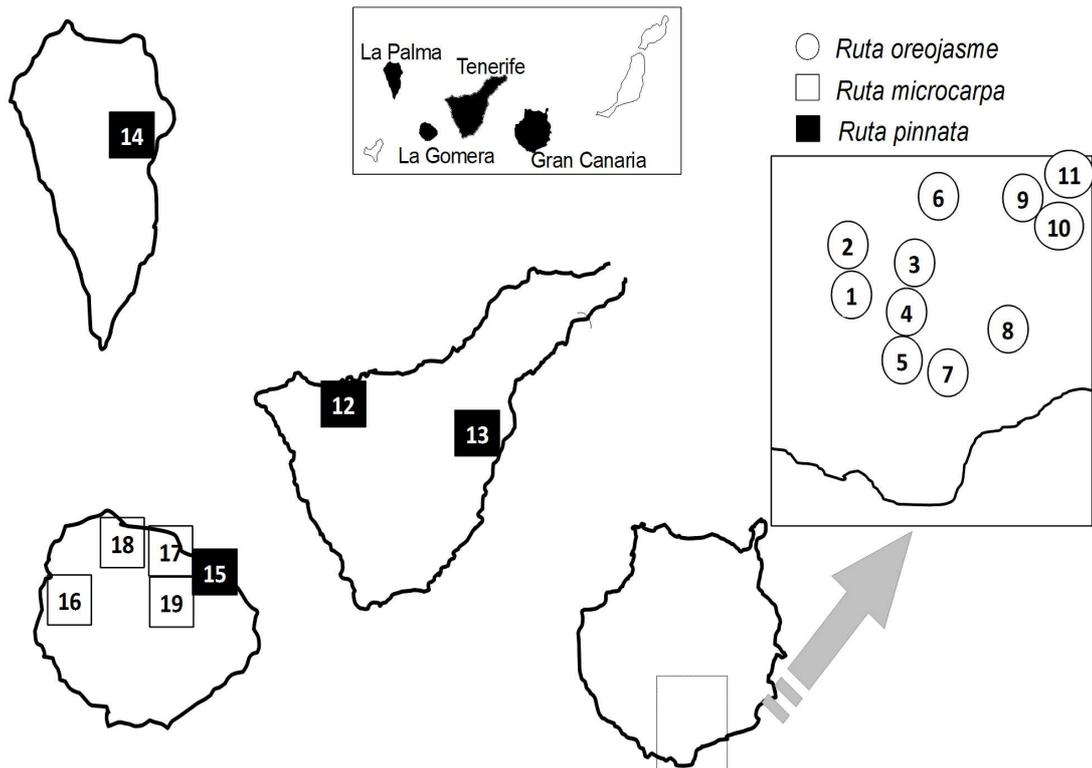


Figura III.3.1. Mapa con las localidades muestreadas de *Ruta oreojasme* de la isla de Gran Canaria, *R. pinnata* de las islas de Tenerife, La Gomera y La Palma, y *R. microcarpa* de La Gomera. Los números se corresponden con los de la Tabla III.3.1.

III.3.5 Procesamiento de muestras.

Extracción de ADN.

Las extracciones de ADN se realizaron a partir de hojas frescas o completamente desecadas en gel de sílice, empleando el método CTAB 2X (Doyle & Doyle, 1987; Palmer *et al.*, 1988), con algunas modificaciones contempladas en Caujapé-Castells *et al.* (2011).

Previamente a la extracción del ADN se llevó a cabo el machacado del material vegetal en un homogeneizador automático Retsch (“Mixer Mill”), en el cual podemos machacar 20 muestras al mismo tiempo. Se colocó unos 300 mg de hoja troceada en el interior de un tubo de 2 ml de base ancha, junto con dos bolitas de vidrio o de metal, para ayudar a la trituración de las muestras. Las muestras así contenidas en los tubos (a su vez dentro de unos recipientes

especiales que quedan enganchados a los brazos del homogeneizador automático), se trituraron durante 3 minutos a una frecuencia de 30 ciclos por segundo. Al final del proceso se obtuvo un polvo muy fino, que se sometió al protocolo de extracción. En dicho protocolo, se llevó a cabo la lisis química y por choque térmico de las membranas celulares añadiendo a cada tubo diferentes soluciones (principalmente CTAB 2X y SEVAG) a 65° C. Posteriormente, el ADN se separó por centrifugación, quedando en el sobrenadante, separado del resto de componentes celulares que, al ser más densos, quedan en fases inferiores dentro del tubo. La adición de isopropanol favoreció la precipitación del ADN. Posteriormente se lavó el pellet resultante con etanol al 70%, repitiendo el lavado para favorecer la eliminación de los compuestos secundarios que puedan haber co-precipitado con el ADN. Este precipitado de ADN finalmente se resuspendió en tampón TE (Tris-EDTA) para su posterior conservación en frío.

Evaluación cualitativa del ADN extraído.

La comprobación de la calidad del ADN extraído se realizó por medio de su electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para la tinción de los geles se utilizó la solución SYBR Safe (Invitrogen), que se une específicamente a las moléculas de ADN, y cuando se las somete a luz UV emiten fluorescencia. Durante la electroforesis, la molécula de ADN, que está cargada negativamente en la solución, migra hacia el polo positivo, separándose de los pocillos en función de su tamaño. El tiempo de ejecución depende del tamaño del gel y de su concentración de agarosa, pero normalmente se prolongó durante 1 h a una intensidad de corriente de 90 mA. Una vez acabada la electroforesis, se procedió a la visualización y fotografiado de las bandas con el equipo de imagen "Alphaimager".

La intensidad y características de las bandas en el gel nos permite comprobar la calidad de los extractos y tener una orientación aproximada de la concentración de ADN en los mismos: una muestra de ADN se considera de alta concentración y calidad cuando aparece como una única banda próxima a los pocillos de carga de las muestras e intensamente teñida, lo cual indica que el ADN extraído está prácticamente intacto y que es abundante. En cambio, el

ADN que se ha degradado en el proceso de extracción se visualiza como varias bandas de diferentes tamaños o un “smear” (mancha difusa) a lo largo del carril de migración, que delata la presencia de muchos fragmentos con amplio rango de tamaño. El ARN celular aparece como una banda difusa en la parte del gel más alejada del origen de migración, por ser de menor tamaño que el ADN.

Evaluación cuantitativa del ADN extraído.

Una vez comprobada la calidad de los extractos de ADN, se procedió a conocer su concentración, ya que los protocolos de amplificación empleados con posterioridad requieren de esta información. La evaluación cuantitativa del ADN se realizó mediante la medición de su absorbancia en un espectrofotómetro ND-2000c (NanoDrop), que hace incidir un haz de luz monocromática a través de una muestra y mide la cantidad de luz que ésta absorbe en cada rango de longitud de onda (λ).

Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm, y dado que 1 unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN bicatenario (que es el que se obtiene después de realizar la extracción), los espectrofotómetros pueden calcular de forma fiable la concentración del ADN, midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}). Conocer la concentración de ADN que hay en los extractos nos va a permitir ajustarla dentro del rango que se requiere para la amplificación de las regiones seleccionadas y que, generalmente, fue de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Por otro lado, realizando mediciones de absorbancia a 280 nm (A_{280}) y a 230 nm (A_{230}), se puede determinar la concentración de otros componentes (especialmente proteínas y fenoles) que hayan podido precipitar con el ADN en el proceso de extracción. Los ratios A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} indican la proporción de ADN en la solución respecto a las impurezas, y por lo tanto el grado de pureza de las muestras. En un extracto con alta concentración de impurezas, éstas pueden interferir en el posterior proceso de amplificación del ADN, que es fundamental para el buen desarrollo de las técnicas de secuenciación en las que se basa esta parte de la tesis.

Para evaluar con la mayor precisión posible la calidad de la muestra, se calcularon los ratios de absorbancia A260/A280 y A260/A230. Las muestras con valores de 1,8 y en torno a 2 para los ratios A260/280 y A260/230 (respectivamente) son consideradas de pureza adecuada. Aquellas muestras para las que no se obtuvieron estos valores de absorbancia tuvieron que ser purificadas en columnas (Gene Elute PCR Clean-Up Kit, Sigma), que por medio de membranas de celulosa y diversas soluciones lavan el ADN de impurezas.

III.3.6 Amplificación del ADN.

Las reacciones de amplificación del ADN están basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Mullis, 1985). Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de la enzima ADN polimerasa para replicar hebras de ADN cuando se someten a ciclos donde se alternan diferentes grados de altas temperaturas, por lo que al finalizar la PCR se obtendrá un gran número de copias de la región de interés. La polimerasa utilizada en la presente investigación fue la de la bacteria *Thermus aquaticus*, que se conserva su actividad a temperaturas de más de 45°C. Para iniciar la reacción, la ADN polimerasa necesita desoxinucleótidos (dNTPs), que va añadiendo como cadena complementaria a la hebra de ADN molde, y dos cebadores ('primers'), que son secuencias cortas de unos 20 nucleótidos idénticas a las que flanquean la región del ADN que va a ser amplificada.

Las reacciones de amplificación se prepararon para un volumen final de 25µl (Tabla III.3.2), con los siguientes componentes: tampón 10x (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3); dNTPs (100 mM), BSA (20 mg/ml), los correspondientes cebadores a una concentración de 20 mM y la *Taq* polimerasa (5U/µl). El BSA o albúmina de suero de bovino se añadió para atenuar los efectos de los compuestos secundarios presentes en los extractos de ADN. La *Taq* polimerasa siempre se añadió en último lugar (agitando la mezcla de amplificación para homogeneizar sus componentes), y las reacciones se preparon en una cama fría de hielo escarchado.

La premezcla de PCR se preparó para un total de 48 reacciones que se corresponden con el número de pocillos de las placas adaptadas al

termociclador empleado (BioRad) para llevar a cabo las reacciones de PCR. En cada pocillo se depositaron entre 1-2 μL de ADN (50-100 ng) y entre 23-24 μL de premezcla para PCR).

Tabla III.3.2. Componentes de la premezcla para cada reacción de amplificación.

Producto	Volumen
Tampón 10x	2,50 μl
DNTPs (100 mM)	0,50 μl
BSA (20 mg/ml)	1 μl
Cebador <i>forward</i> (20 mM)	0,25 μl
Cebador <i>reverse</i> (20 mM)	0,25 μl
<i>Taq</i> polimerasa (5U/ μl)	0,30 μl
ADN (ng/ μL)	1-2 μl
Volumen final ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$)	25,00 μl

Las regiones seleccionadas para secuenciación fueron cuatro de las propuestas por Shaw *et al.* (2007), dado su potencial discriminatorio intra e interespecífico elevado, que ya había sido comprobado para varios linajes de la flora canaria por el departamento de biodiversidad molecular del JBCVCSIC (Jaén-Molina, datos sin publicar); se trata de los espaciadores intergénicos *psbA-trnH*, *rps16-trnK*, *trnT-trnL* y *atpB-rbcL*. El empleo de los cebadores específicos propuestos por estos autores (Tabla III.3.3) permitió la amplificación (y posterior secuenciación) de estas cuatro regiones, para lo que se establecieron programas concretos de tiempos y temperaturas en el termociclador, según la pareja de cebadores empleada.

El programa definido en el termociclador para la amplificación de la región *psbA-trnH* fue: 94°C (T^a de desnaturalización) durante 2 minutos; seguido de la repetición de los siguientes tres pasos, durante 30 ciclos: 94°C durante 30 segundos, 54,3°C (T^a de anillamiento) durante 1 minuto, y 72°C durante 1 minuto; y finalmente, un paso de 72°C (T^a de elongación) durante 5 minutos.

El programa para la amplificación de la región *rps16-trnK* fue: 95°C

durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 50,7°C durante 1 minuto y 65°C durante 1 minuto, y de un último paso de 65°C durante 5 minutos. El programa para la amplificación de la región *trnT-trnL* fue: 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 50 segundos, 55°C durante 50 segundos y 72°C durante 1 minuto y medio, y de un último paso de 72°C durante 10 minutos.

Finalmente, el programa para la amplificación de la región *atpB-rbcL* fue: 94°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 48°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y de un último paso de 72°C durante 10 minutos.

Tabla III.3.3. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de las diferentes regiones utilizadas.

Región	Primer	Secuencia (5´-3´)	Referencia
<i>psbA-trnH</i>	psbA trnH ^{GUG}	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	Shaw <i>et al.</i> , 2005 Shaw <i>et al.</i> , 2005
<i>rps16-trnK</i>	rpS16x2F2 trnK ^{(UUU)x1}	AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC	Shaw <i>et al.</i> , 2007 Shaw <i>et al.</i> , 2007
<i>trnT-trnL</i>	A2 B	CAA ATGCGATGCTCTAACCT TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC	Taberlet <i>et al.</i> , 1991 Taberlet <i>et al.</i> , 1991
<i>atpB-rbcL</i>	atpB_F rbcL_R	GAAGTAGTAGGATTGATTCTC TACAGTTGCCATGTACCAG	Manen <i>et al.</i> , 1994 Manen <i>et al.</i> , 1994

Secuenciación del ADN.

Los productos amplificados en la PCR (amplicones) que después de su electroforesis se visualizaron como una única banda intensa y con el tamaño esperado en los geles de agarosa, se consideraron como resultantes de una amplificación exitosa. Estos productos fueron enviados a Macrogen Inc. (Corea) para su secuenciación bidireccional (secuencias sentido y antisentido) en un secuenciador 3730XL ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU).

Para las reacciones de secuenciación se utilizaron los mismos cebadores que los empleados en la amplificación, pero a una concentración menor (5 µM). Para la preparación de las muestras y su envío al servicio de secuenciación, se siguieron los protocolos y recomendaciones indicadas en la página web de esta compañía.

III.3.7 Edición y alineamientos de secuencias.

Tras la secuenciación, desde el servicio de Macrogen Inc. se nos facilitaron vía web los archivos correspondientes con la información de la secuencia de cada una de las diferentes regiones del ADN_{cp} para cada una de las muestras (individuos) enviados a secuenciar. Estos archivos contienen un cromatograma (gráfico de la sucesión de picos obtenidos por cromatografía, cada uno de los cuales corresponde a una base nitrogenada del ADN) y la secuencia correspondiente leída por el secuenciador automático, que fue editada usando el programa Bioedit v.5.0.6 (Hall, 2007). Con la edición se pueden detectar y corregir los errores de lectura por parte del secuenciador, que ocurren más frecuentemente al final de la secuencia, pues los picos del cromatograma van perdiendo definición, por debilitamiento de la señal. Se revisaron de forma manual, las secuencias complementarias “forward” y “reverse”, ya que de esta forma se pueden solucionar las posibles dudas surgidas de la lectura de una única secuencia.

Una vez que las secuencias “forward” y “reverse” para cada una de las muestras fueron revisadas y editadas, se generó con el programa Bioedit la secuencia consenso correspondiente (con un número de ambigüedades o errores minimizado tras la edición).

Las secuencias consenso obtenidas para todas las muestras analizadas para cada región de ADN seleccionada pasaron a formar parte de una matriz de secuencias alineadas por cada región. Posteriormente, se combinaron y concatenaron en una única matriz todas las secuencias de las cuatro regiones del ADN_{cp} para todas las muestras analizadas.

De esta única matriz concatenada final se extrajeron las secuencias idénticas para individuos de una misma localidad. De esta forma, sólo se analizaron las secuencias que eran representativas de cada variante hallada por localidad/población. Esta matriz simplificada contenía 37 secuencias de 2904 nucleótidos de longitud (con 317 nucleótidos para *psbA-trnH*, 685 nucleótidos para *rps16-trnK*, 926 nucleótidos para *trnI-trnL* y 976 nucleótidos para *atpB-rbcL*).

El alineamiento de la matriz concatenada se realizó con las ocho iteraciones que vienen por defecto en el programa MUSCLE (Edgar, 2004), una

de las herramientas para alineamientos múltiples implementada en el software Geneious v5.4 (Drummond *et al.*, 2011). El alineamiento automático generado por este programa reconoce y asigna los *indels*, o zonas de las secuencias donde ha habido una inserción de nucleótidos, o una delección (Figura III.3.2).

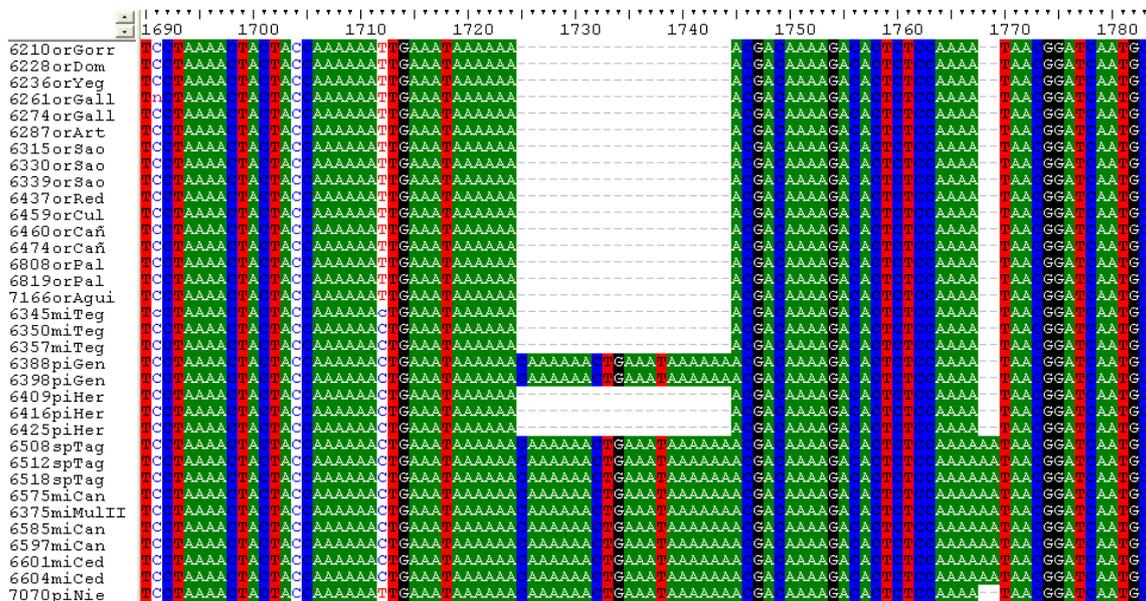


Figura III.3.2. Imagen ejemplo de la ventana del programa Bioedit v.5.0.6 donde se muestra parte del alineamiento múltiple de las secuencias concatenadas de las regiones *psbA-trnH*, *rps16-trnK*, *trnT-trnL* y *atpB-rbcL*, en individuos pertenecientes a las poblaciones muestreadas. Cada base nucleotídica está representada por un color diferente, y para las posiciones donde ocurren cambios entre secuencias (incluidos los *indels*) no hay un color de fondo.

III.3.8 Análisis de datos.

Debido a que las diferencias morfológicas a menudo visibles no están acompañadas por niveles comparables de polimorfismo molecular, en la flora canaria no existe “barcoding gap” (Jaén-Molina, 2014; Jaén-Molina *et al.*, 2014), por lo cual, para la discriminación entre taxones nos fijamos en caracteres diagnóstico (incluyendo *indels*) en lugar de en criterios basados en las distancias genéticas intra e inter poblacionales (distancias- p) (que no consideran los *indels*).

La matriz final de 47 secuencias concatenadas se utilizó para la búsqueda heurística de los árboles de máxima parsimonia (MP) con el software PAUP 4.0 (Swofford 2003), asignándole a todos los caracteres el mismo peso y orden en el análisis, y siendo los *indels* tratados como un quinto estado de

carácter. Se usó el algoritmo *Tree Bisection-Reconnection* (TBR) de intercambio de ramas con 10 réplicas aleatorias de adición paso a paso, y se conservaron los mejores árboles de parsimonia con la opción *MulTrees*. Los índices de consistencia (CI), de homoplasia (HI), de consistencia reestandarizado (RC) y de retención (RI) fueron calculados. El apoyo estadístico de las ramas se evaluó por medio de 500 réplicas *bootstrap* (Felsenstein 1985) con adición de secuencias aleatoria, e intercambio de ramas TBR.

La misma matriz de secuencias concatenadas sirvió de punto de partida para el análisis bayesiano (BI) llevado a cabo con el programa *MrBayes v.3.0b4* (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). El modelo evolutivo se determinó usando el programa *MrModeltest 2.2* (Nylander, 2004). Basándose en el Akaike Information Criterion (AIC; Akaike, 1979), el modelo de sustitución que mejor se adaptó a nuestros datos de secuencias de ADNcp fue el HKY85, bajo distribución gamma de variabilidad, después de 1.100.000 iteraciones con remuestreos cada 200 iteraciones y un burn-in previo de 100.000 iteraciones. Se desarrollaron dos procesos independientes de la cadena de Monte Carlo – Markov, que convergieron tras aproximadamente 300.000 iteraciones. Los árboles resultantes se usaron para estimar la topología y los parámetros, y para generar un árbol consenso por la regla de la mayoría simple (>50%). Este árbol consenso fue construido y visualizado usando el programa *TreeView* (Page, 1996). Las Probabilidades Posteriores (PP) se calcularon como una estimación de apoyo a cada clado (Alfaro *et al.*, 2003).

Las relaciones genealógicas entre haplotipos fueron inferidas utilizando el algoritmo de parsimonia estadística implementado en el software *TCS 1.21* (Clement *et al* 2000). El número máximo de diferencias entre haplotipos se calculó con intervalos de confianza del 95%, tratando los *indels* como un quinto carácter. Éstos se distribuían de la siguiente forma: *psbA-trnH* 149 (7 pb), *psbA-trnH* 196 (20 pb), *psbA-trnH* 252 (2 pb), *rps16-trnK* 272 (51 pb), *rps16-trnK* 364 (20 pb), *rps16-trnK* 402 (2 pb), *trnT-trnL* 608 (21 pb), *trnT-trnL* 819 (1 pb), *trnT-trnL* 921 (1 pb), *atpB-rbcL* 13 (1 pb), *atpB-rbcL* 40 (1 pb), *atpB-rbcL* 304 (30 pb).

Resultados

Las secuencias no alineadas obtenidas de la región *psbA-trnH* tuvieron una longitud entre 288 pb en *Ruta oreojame* (menos la población de El Sao) y en Teguerquenche (*R. microcarpa*), y 308 pb en Tagulucho (*R. pinnata*) y las poblaciones de *R. microcarpa* del norte de La Gomera (Mulagua, camino de El Cedro y Roque Cano). Las secuencias no alineadas de la región *rps16-trnK* tuvieron una longitud mínima de 611 pb en Herques (*R. pinnata*), y una longitud máxima de 661 en todas las muestras de *R. oreojasme* menos Los Culatones. La longitud de las secuencias no alineadas de *trnT-trnL* fue la que más varió intrapoblacionalmente en *R. oreojasme*, oscilando entre 901 pb (la menor longitud de entre todas las muestras) y 904 pb, excepto para la población de Cho Domingo, en donde la secuencia tuvo la longitud máxima de entre todas las muestras, con 924 pb. Las secuencias no alineadas de la región *atpB-rbcL* oscilaron entre los 940 pb en Genovés, Tagulucho (*R. pinnata*) y las poblaciones de *R. microcarpa* del norte de La Gomera, y los 971 pb en la población de Teguerquenche (*R. microcarpa*).

La matriz de secuencias concatenadas alineadas (*psbA-trnH*, *rps16-trnK*, *trnT-trnL*, *atpB-rbcL*) contenía 37 secuencias correspondientes a los tres taxones canarios endémicos de *Ruta* y 2903 caracteres. Se encontraron tres microsatélites altamente variables, que fueron tipificados como el mismo carácter para todos los taxones, debido a su variabilidad intrapoblacional en *Ruta oreojasme* y a la observación de ciertas convergencias entre algunas poblaciones de este taxón con otras de *R. pinnata* y *R. microcarpa*. Debido a que la información suministrada por los *indels* (fragmentos de secuencia, de longitud variable, que corresponden a inserciones o deleciones que ha experimentado el ADN a lo largo del proceso evolutivo) era potencialmente informativa, éstos fueron incluidos en el análisis como un quinto carácter.

La matriz resultante de la codificación de los 12 *indels* detectados contenía 2746 caracteres (2707 constantes y 39 variables, de los que 5 no son informativos y 34 son potencialmente informativos). Dos de los *indels* contenían un carácter variable informativo. El *indel* de mayor longitud (51 pb) se encontró en todas las muestras de *Ruta oreojasme*, mientras que cuatro *indels* consistieron en la inserción de un único par de bases.

La mayor divergencia entre secuencias (0,55%) correspondió a la hallada entre la muestra 6261 de la población de Gallegos (*Ruta oreojasme*) y las muestras de Teguerquenche (*R. microcarpa*). De entre todas las poblaciones de *R. pinnata* y *R. microcarpa*, las secuencias más divergentes (0,40%) se hallaron entre la población de Herques (*R. pinnata*) y Teguerquenche (*R. microcarpa*).

III.4.1 Análisis filogenéticos (*psbA-trnH*, *rps16-trnK*, *trnT-trnL*, *atpB-rbcL*).

Los análisis de máxima parsimonia (MP) dieron lugar a 24 árboles de 47 pasos cada uno. El árbol consenso estricto se muestra en la Figura III.4.1. La Figura III.4.2 muestra uno de los 24 árboles máximo parsimoniosos, que tenían índice de consistencia (CI) de 0,872, índice de homoplasia (HI) de 0,128, índice de consistencia reestandarizado (RC) de 0,853 e índice de retención (RI) de 0,978. La topología de este árbol es similar a la del árbol consenso estricto de la Figura III.4.1, pero en esta representación la longitud de las ramas viene dada por el número de sustituciones de nucleótidos que han ocurrido entre las 37 secuencias analizadas a lo largo del proceso evolutivo, y por el número de inserciones/deleciones que se han producido (ya que los *indels* se codificaron como un 5º estado de carácter, según se explica en Material y Métodos).

Según la topología resultante de este análisis de MP, las poblaciones de *Ruta oreojasme* ocupan una posición basal, con 9 pasos de diferenciación respecto del ancestro hipotético común de las poblaciones de *Ruta pinnata* y *Ruta microcarpa*. Las poblaciones de estos dos taxones se distribuyeron en dos clados principales (clados I y II en Figura III.4.2): el clado I corresponde exclusivamente a la población de Herques (sur de Tenerife), y está sustentado por un buen apoyo *de bootstrap* (99% BS) y por 5 pasos o cambios de estado de carácter. El clado II, con un menor apoyo *bootstrap* (60% BS), se dividió a su vez en dos sub-clados.

Uno de ellos (el subclado IIa, 64% BS) se corresponde con *Ruta pinnata* del Lomo de Las Nieves (La Palma), de Genovés (norte de Tenerife) y de

Taguluche (La Gomera), y con tres poblaciones de *Ruta microcarpa* de La Gomera. En este subclado, la población de *R. pinnata* de Lomo de Las Nieves ocupa una posición basal (2 pasos, 77% BS) respecto de la población de Genovés, que junto a la población de Taguluche y al complejo de poblaciones de *R. microcarpa* del norte de La Gomera constituyen un grupo separado (3 pasos, 87% BS). Dentro de este último grupo, el complejo de poblaciones de *Ruta microcarpa* del norte de La Gomera y la población de *Ruta pinnata* de Taguluche, también de La Gomera, muestran 2 cambios de estado de carácter (86% BS) respecto a la población de *Ruta pinnata* de Genovés. El otro subclado (IIb, 100% BS), se corresponde con *Ruta microcarpa* de Teguerquenche (La Gomera) y está apoyado por un número alto de cambios (8) y por un valor *bootstrap* del 100%.

El análisis de inferencia bayesiana resultó en un total de 8252 árboles. El árbol consenso con las probabilidades posteriores (PP) de apoyo a cada grupo se muestra en la Figura III.4.3. La topología de este árbol es similar a la del árbol consenso estricto resultante del análisis de máxima parsimonia, puesto que ambos comparten la mayoría de los clados. *Ruta oreojasme* nuevamente ocupa una posición basal (100% PP), y la población de Herques de Tenerife (100% PP) ocupa una posición basal dentro del grupo de poblaciones de *R. pinnata* y *R. microcarpa*. La principal diferencia con respecto a la topología resultante del análisis de MP es la posición basal que ocupa la población del Lomo de Las Nieves (100% PP) con respecto al resto de poblaciones de *R. pinnata* y de las poblaciones de *R. microcarpa*. El clado correspondiente a la población de *Ruta microcarpa* de Teguerquenche constituye un grupo hermano (100% PP) del complejo de poblaciones de *R. microcarpa* del norte de La Gomera, junto a las poblaciones de *R. pinnata* de Genovés (del norte de Tenerife) y Taguluche (La Gomera) con un apoyo del 81% de PP. Dentro de este último grupo (100% PP), nuevamente la población de Genovés (*R. pinnata*) queda en un clado diferenciado (85% PP) del que agrupa a la población de Taguluche (*Ruta pinnata*) con el complejo de poblaciones de *R. microcarpa* del norte de La Gomera (54% PP).

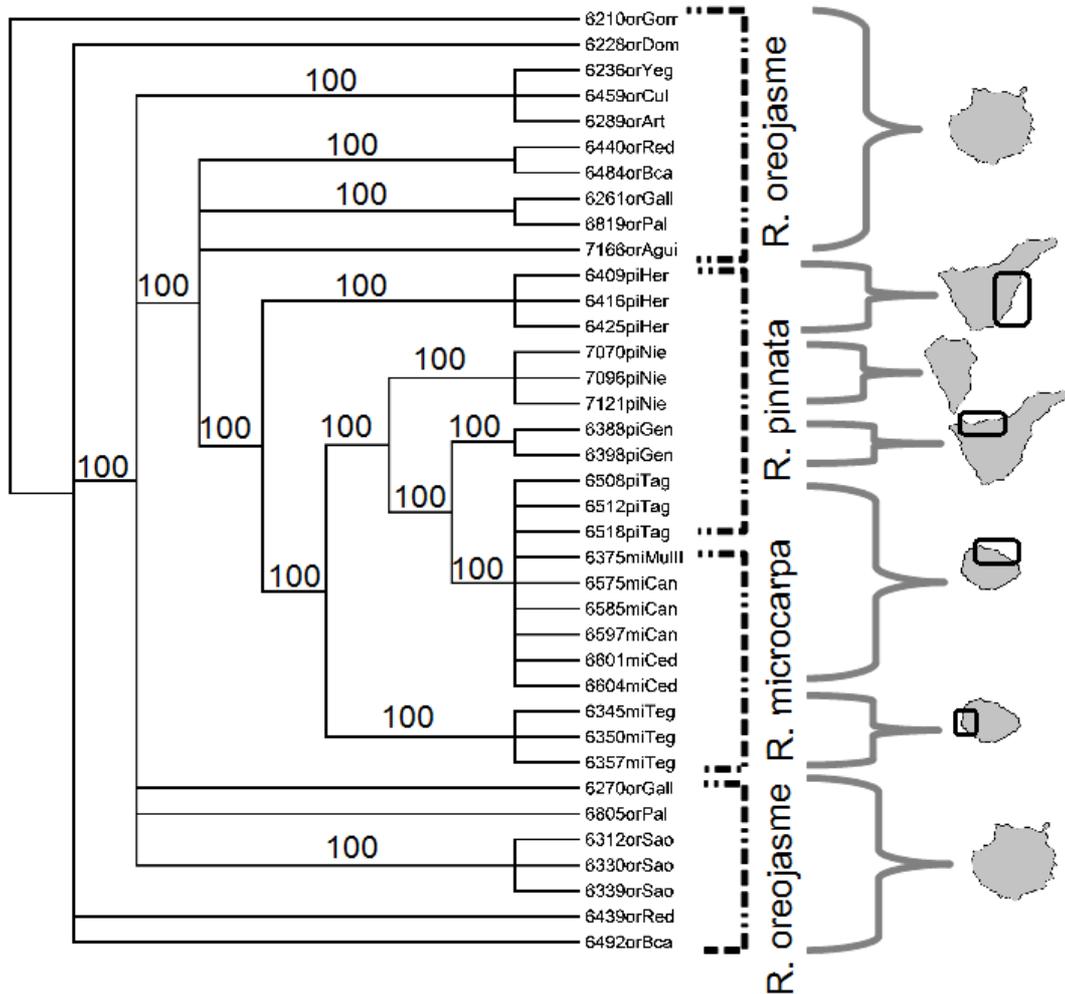


Figura III.4.1. Árbol consenso estricto de los 24 árboles resultantes del análisis de máxima parsimonia a partir de la matriz de datos concatenada (*psbA-trnH*, *rps16-trnK*, *trnT-trnL* y *atpB-rbcL*) para las 19 poblaciones de las especies canarias de *Ruta* analizadas en esta tesis doctoral. Los códigos de cada muestra se corresponden con los de las poblaciones en la Tabla III.3.1, mientras que los números de cada muestra corresponden a los códigos de etiquetado del Banco de ADN del JBCVCSIC.

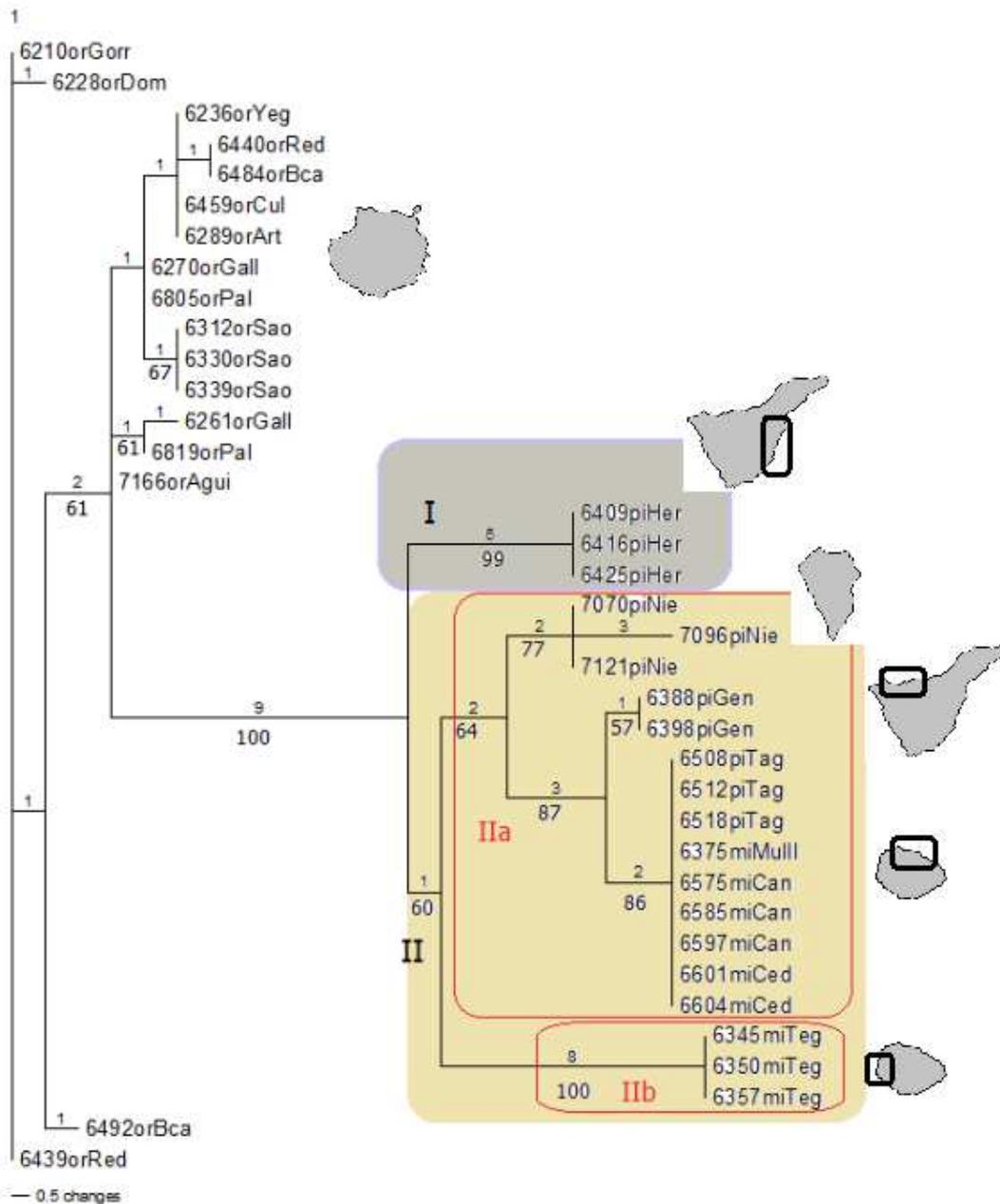


Figura III.4.2. Uno de los 24 árboles más parsimoniosos resultante del análisis de la matriz de datos combinada (*psbA-trnH*, *rps16-trnK*, *trnT-trnL* y *atpB-rbcL*) para las 19 poblaciones de las especies canarias de *Ruta* incluidas en este estudio. El número de pasos (cambios evolutivos) y el valor *bootstrap* (apoyo a cada clado) se indica encima y debajo de cada rama, respectivamente. Los códigos de cada muestra se corresponden con los de las poblaciones en la Tabla III.3.1, mientras que los números de cada muestra corresponden a los códigos de etiquetado del Banco de ADN del JBCVCSIC.

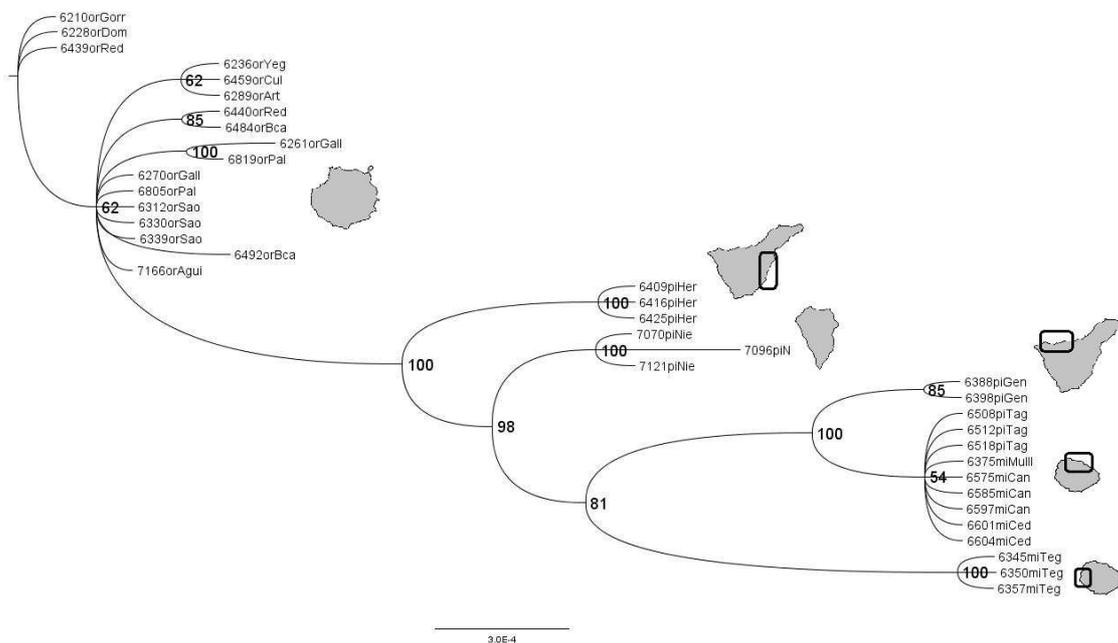


Figura III.4.3. Árbol consenso (50% *majority rule*) obtenido por el análisis bayesiano de la matriz combinada de *psbA-trnH*, *rps16-trnK*, *trnT-trnL* y *atpB-rbcL*. Los valores de apoyo de cada nodo en la topología resultante se indican como probabilidades posteriores (PP). Los códigos de cada muestra se corresponden con los de las poblaciones en la Tabla III.3.1, mientras que los números de cada muestra corresponden a los códigos de etiquetado del Banco de ADN del JBCVCSIC.

II.4.2 Red de haplotipos.

Se identificaron un total de 16 haplotipos (Tabla III.4.4), ninguno de los cuales estuvo presente en todas las poblaciones. Diez de ellos correspondieron a las 11 poblaciones analizadas del endemismo de Gran Canaria *R. oreojasme*, que se revela así como poseedor de una alta diversidad genética, aunque sin estructuración geográfica evidente (se encontró una mezcla de haplotipos entre algunas de sus poblaciones). Se encontraron haplotipos exclusivos para las poblaciones de El Sao, Barranco del Águila, Cho Domingo, Gallegos, Barranco de Las Palmas y Barranco del Cañizo, aunque las tres últimas comparten otro haplotipo con alguna otra población.

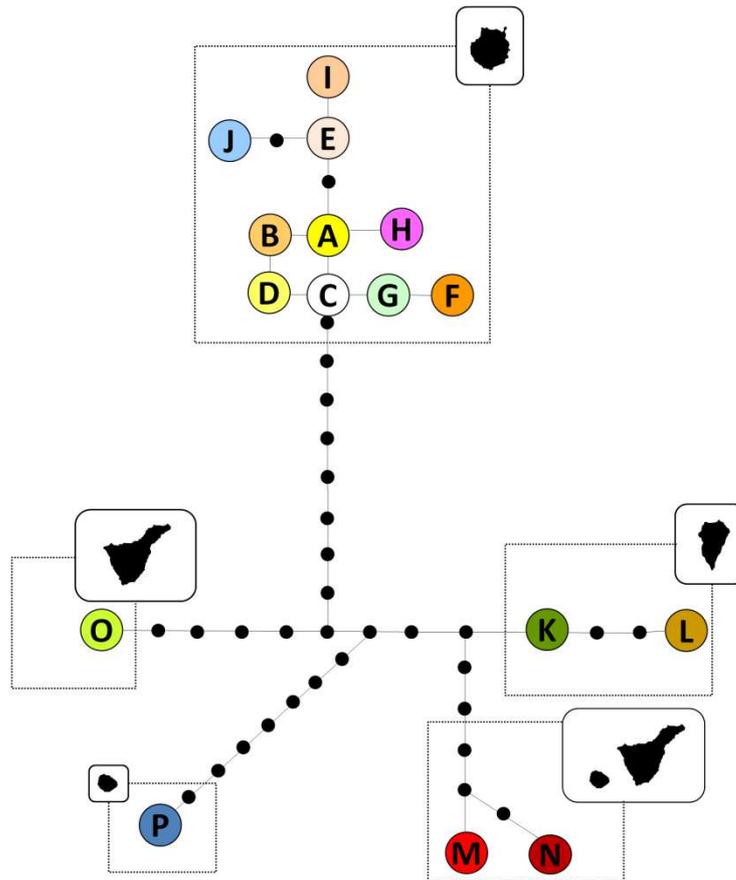
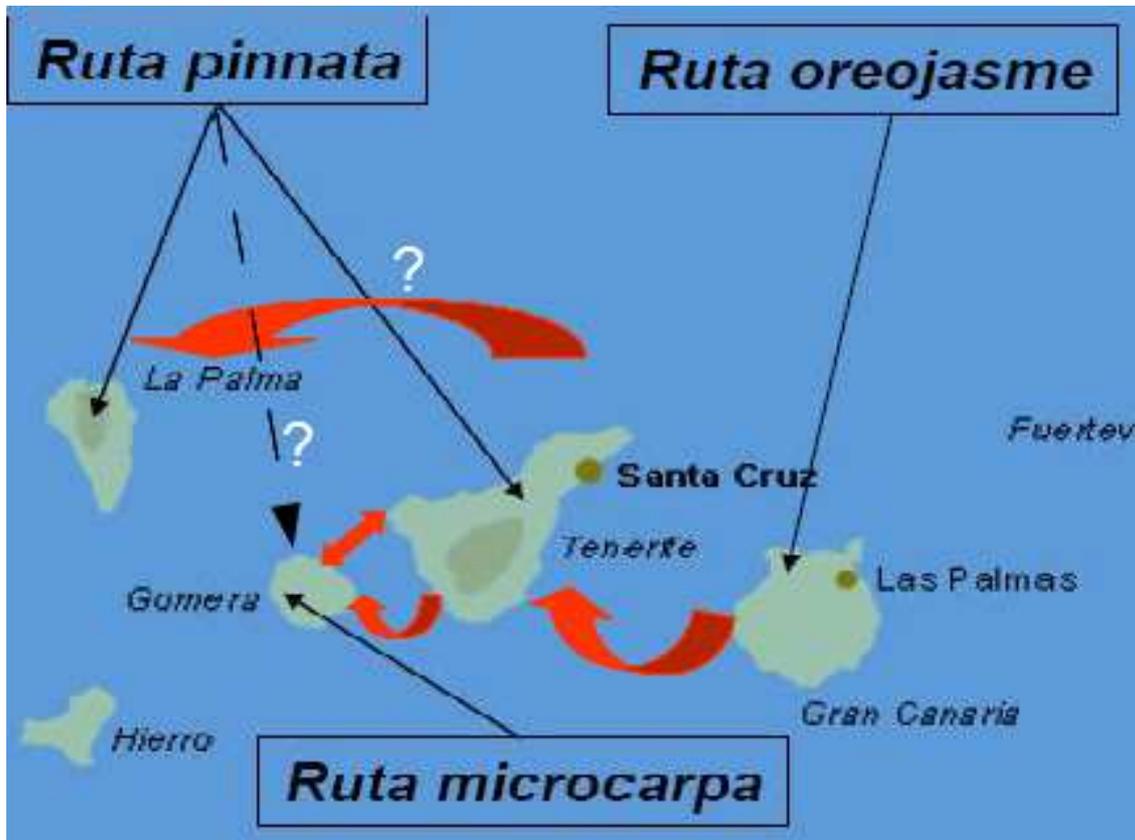


Figura III.4.4. Representación gráfica de las relaciones genealógicas de los diferentes taxones del género *Ruta* según los haplotipos inferidos por el programa TCS 1.21 considerando los *indels* como un quinto carácter. Las letras (A-P) se corresponden con los diferentes haplotipos detectados en cada una de las poblaciones analizadas e incluidas en la Tabla III.3.1 de Material y Métodos. Se indican las islas (Gran Canaria, Tenerife, La Palma y La Gomera) en las que se ha identificado los diferentes haplotipos. Los círculos en negro indican el número de cambios nucleotídicos detectados entre los haplotipos.

Cada una de las poblaciones adscritas a las dos especies restantes contenían un único haplotipo, salvo Lomo de Las Nieves de *R. pinnata* (La Palma), donde se distinguieron dos haplotipos distintos, separados por tres cambios. Todas las poblaciones del complejo del norte de La Gomera (tres poblaciones de *R. microcarpa* y la población de Taguluche de *R. pinnata*), compartieron el mismo haplotipo, que es también el más frecuente en Canarias aunque está restringido a la isla de La Gomera. Las relaciones genealógicas obtenidas en las redes de haplotipos fueron igual de informativas que las topologías de los análisis filogenéticos de máxima parsimonia (en donde también se usó la información contenida en los *indels*). Las poblaciones de

Herques y Lomo de Las Nieves (*R. pinnata*) se mostraron más cercanas al hipotético ancestro común de estas dos especies (con cinco y cuatro cambios, respectivamente), mientras que la población de Genovés y las poblaciones del norte de La Gomera (tres poblaciones de *R. microcarpa* y la población de Taguluche de *R. pinnata*) quedaron como poblaciones más derivadas a partir de un haplotipo muy próximo a Lomo de Las Nieves (4 cambios evolutivos). Por su parte, la población de Teguerquenche (*R. microcarpa*) quedó separada del resto de poblaciones y linajes por ocho cambios nucleotídicos.

Capítulo III.5. Discusión.



Discusión.

Según los trabajos de investigación más recientemente publicados, los endemismos insulares canarios de *Ruta* son el producto de un único evento de colonización desde el continente, seguido de una diversificación en el propio archipiélago (Salvo *et al.*, 2008, 2010). Tanto nuestros análisis de máxima parsimonia como bayesianos dan una posición basal para *Ruta oreojasme* (100% BS, 100% PP), lo que refuerza su posición como taxón actual más próximo al ancestro hipotético de las otras especies de *Ruta* que se distribuyen en Canarias. Además, nuestros análisis filogenéticos señalan a la isla de Gran Canaria como centro de dispersión del género *Ruta* en el archipiélago, como ha sido evidenciado hasta la fecha para algunos otros géneros que han radiado en las islas (p. ej. Francisco-Ortega *et al.*, 2001; Meimberg *et al.*, 2006). Sin embargo, Salvo *et al.* (2010) infieren a La Gomera como área ancestral del género *Ruta* dentro de Canarias, desde donde tendrían lugar una serie de dispersiones.

Los intervalos de confianza de los eventos obtenidos en las reconstrucciones cronológicas de Salvo *et al.* (2010) se infirieron a lo largo de internodos, y (como suele ser habitual en este tipo de análisis) dieron rangos de divergencia temporal muy amplios para Canarias, con una ventana de 13-2,6 Ma para la colonización de La Gomera, y de 14,9-0,3 Ma para la colonización de Gran Canaria. Este amplio rango va (en el caso de La Gomera), desde la etapa más temprana de formación de la isla de Gran Canaria, hasta 1 Ma después de la finalización del segundo ciclo constructivo, o Ciclo Roque Nublo (5,3-3,7 Ma).

Salvo *et al.* (2010) asumen que sus resultados podrían depender de la incertidumbre temporal asociada a las horquillas de estos internodos (ver Ree & Smith, 2008), y de la complejidad del encaje temporal del modelo “dispersal-extinction-cladogenesis” (DEC) usado (ver Clark *et al.*, 2008). Los pasos de colonización entre islas propuestos deben contemplarse como una hipótesis de partida que puede ser testada en futuros estudios basados en un muestreo infraespecífico y geográfico más amplio (Salvo *et al.*, 2010). Por todo ello, es plausible que pudiera haber tenido lugar un evento de colonización entre islas justo después de la finalización del ciclo Roque Nublo.

Este período geológico de Gran Canaria, que estuvo acompañado de una actividad volcánica violenta, y que se supone causó la extinción de gran parte de la biodiversidad insular (Hausen, 1962; Marrero & Francisco-Ortega, 2001; Emerson, 2003; Whittaker *et al.*, 2008; pero ver Anderson *et al.*, 2009), podría explicar la menor diversidad de haplotipos o la posición derivada de los taxones de esta isla (de formación anterior a las más occidentales) obtenidas en algunos de los análisis filogenéticos realizados (p. ej. Vitales *et al.*, 2014; López de Heredia *et al.*, 2014). Por otro lado, la alta diversidad de haplotipos detectados para los taxones grancanarios de *Ruta* (10 del total de 16, Figura III.4.4), unido al hecho de que se infieran dos únicos haplotipos para La Gomera (uno para cada uno de los linajes evolutivos hallados), también contradicen la hipótesis ya mencionada de Salvo *et al.* (2010).

Tanto en los árboles filogenéticos obtenidos por máxima parsimonia (MP) como por inferencia bayesiana (BI), la población de Herques del sur de Tenerife (*R. pinnata*) ocupa una posición basal respecto del resto de poblaciones de *R. pinnata* y *R. microcarpa* (clado I en Figura III.4.2). Este taxón ocupa una posición intermedia entre *R. oreojasme* y el resto de taxones (clado II). Por otro lado, es notable la mayor diferenciación filogenética detectada en nuestros análisis entre *R. pinnata* del sur de Tenerife y las poblaciones de *R. pinnata* en sentido estricto (hay que recordar que el *locus classicus* de la especie se encuentra en el norte de Tenerife, y la población más cercana de las muestreadas fue Genovés), que entre estas últimas poblaciones de *R. pinnata* y *R. microcarpa*.

La separación entre los taxones que quedan agrupados en el clado II (Figura III.4.2) parece tener un origen menos claro, con una topología próxima a una politomía, evidenciada por el bajo apoyo *bootstrap* obtenido para este clado en análisis de MP (60%), el mayor apoyo de los subclados IIa (resto de poblaciones de *Ruta pinnata* y tres poblaciones de *Ruta microcarpa* del norte de La Gomera, 64% de BS) y IIb (Teguerguenche, 100% BS), y el intercambio de posiciones entre las poblaciones de Lomo de las Nieves (*R. pinnata* de La Palma) y Teguerguenche (*R. microcarpa* de La Gomera) en el análisis de inferencia bayesiana. Hipotetizamos que esta indefinición podría deberse a que el linaje ancestral de ambas especies generó tres o más linajes descendientes al mismo tiempo. La red de haplotipos obtenida, que parece señalar la

existencia de un evento de especiación múltiple en varias islas (ver discusión más abajo) también apoya esta posibilidad.

En la red de haplotipos resultante (Fig. III.4.4), no se observa una estructura geográfica en las poblaciones de *Ruta oreojasme*, para las que se detectó un número elevado de haplotipos compartidos entre algunas poblaciones (quedan conectadas formando un bucle o *loop*), que probablemente evidencian la existencia de flujo génico reciente entre las mismas (como p.ej. entre las poblaciones que ocupan áreas más orientales de Gran Canaria y son contiguas entre sí, como Gallegos y Barranco de Las Palmas). Los haplotipos exclusivos en varias poblaciones sugieren la existencia de acervos genéticos únicos, más frecuentes en áreas que se corresponden con los extremos de distribución de esta especie (Cho Domingo, Gallegos, Bco. de Las Palmas, El Sao).

Las diferencias detectadas entre la población de Lomo de las Nieves (con dos haplotipos exclusivos) que la separa del resto de poblaciones actualmente adscritas a *Ruta pinnata* (Herques, Genovés y Tagulucho) sugieren que puede existir un nuevo endemismo canario del género *Ruta*, exclusivo en la isla de La Palma.

Aunque la red de haplotipos obtenida no permite establecer un patrón claro de dispersión inter-insular desde Gran Canaria, la posición cercana de la población de Herques del sur de Tenerife y del Lomo de Las Nieves de La Palma a los haplotipos más ancestrales comunes de estas dos especies (Figura III.4.4), parece indicar que hubo un ancestro común a *Ruta pinnata* y *Ruta microcarpa* que estuvo presente en esas dos islas, y probablemente en La Gomera.

A partir de este hipotético ancestro, presumiblemente cuatro linajes (correspondientes a las zonas geográficas del sur de Tenerife, oeste de La Gomera, La Palma, y norte de La Gomera junto con norte de Tenerife) pudieron haber diversificado de modo independiente. No obstante, es también posible que la población de Teguerguenche (*R. microcarpa*) iniciara un proceso de diferenciación anterior y totalmente independiente a la diversificación que tuvo lugar posteriormente en La Palma, el norte de Tenerife y norte de La Gomera.

Las notables diferencias genéticas detectadas para esta población, tanto por Máxima Parsimonia, como por Inferencia Bayesiana, y por las relaciones

genealógicas entre haplotipos (8 pasos evolutivos exclusivos a partir de un estado ancestral común), parecen sugerir que la población de Teguerquenche podría representar un taxón distinto del resto de poblaciones consideradas actualmente como *Ruta microcarpa*. Por otro lado, las poblaciones del norte de Tenerife y norte de La Gomera son las que poseen los haplotipos más recientes, derivados a partir de un haplotipo muy próximo al detectado para la población de Lomo de Las Nieves (*R. pinnata*), pero con 4 pasos evolutivos en común que las hace diferenciarse de dicha población (Lomo de Las Nieves de La Palma).

Según Sanmartín *et al.* (2008), tres modelos principales de diversificación de especies han sido identificados en las Islas Canarias: 1) “stepping-stone”, que implicaría un único evento de colonización desde el continente, seguido de eventos de colonización consecutivos desde las islas más antiguas hasta las más jóvenes; 2) varios eventos de colonización independientes desde el continente, seguido de especiaciones dentro de cada isla; y 3) eventos de colonizaciones entre islas compartiendo hábitats ecológicos similares. Descartando por el momento para *Ruta* el modo de diversificación de varios eventos independientes de colonización (según la filogenia de Salvo *et al.*, 2008, 2010), el modo de diversificación que mejor se ajusta a nuestros datos es el 3, con varias salvedades.

En primer lugar se evidencia una primera etapa compatible con el modelo de “stepping stone” desde Gran Canaria (isla más antigua de entre todas en las que se distribuye el género en la actualidad) hasta llegar al sur de Tenerife; a partir de aquí ocurrió, con gran probabilidad, una colonización múltiple entre islas.

En segundo lugar, el hábitat donde se encuentran los taxones reconocidos actualmente no es similar. El clima del sur de Gran Canaria es mucho más árido que el del norte de las islas occidentales, hallándose actualmente *R. oreojasme* en ecosistemas que se salen del ámbito del bosque termoesclerófilo, en el piso bioclimático del cardonal-tabaibal (*Aeonio–Euphorbio canariensis* sigmetum [Rivas-Goday & Steve, 1965; Sunding, 1972]). Los linajes de Herques (sur de Tenerife) y Teguerquenche (oeste de La Gomera), que presumiblemente se originaron a partir de un hipotético ancestro común de *R. pinnata* y *R. microcarpa*, se encuentran actualmente en pisos

bioclimáticos intermedios entre el ocupado por *R. oreojasme* y las poblaciones de *R. pinnata* o *R. microcarpa* que se corresponden con los haplotipos más derivados de la red genealógica de haplotipos (Figura III.4.4). A partir de un haplotipo común y muy cercano a *R. pinnata* de La Palma, pudieron diferenciarse las poblaciones del norte de Tenerife y de La Gomera, estas últimas asentadas, actualmente, en pisos bioclimáticos similares al de la población de *R. pinnata* de La Palma. En este sentido, Francisco-Ortega *et al* (2000) encontraron un patrón de colonización similar en *Crambe* sect. *Dendrocrambe*, desde el bosque termoesclerófilo más árido (*C. sventenii*) hasta los pisos bioclimáticos de la laurisilva y el pinar.

III.5.1 Consideraciones taxonómicas y de conservación.

En los estudios de genética de poblaciones (con microsatélites) en *Ruta microcarpa* (Meloni *et al.*, 2013), se incluyeron las mismas poblaciones que las muestreadas aquí para toda la isla de La Gomera (y consideradas todas ellas como *R. microcarpa*). En dicho estudio se detectó una alta diferenciación interpoblacional en este taxón: la población de Teguerquenche mostró alta diferenciación con el resto de poblaciones congénéricas ($F_{ST} = 0,399-0,499$), pero fue similar a la hallada entre otros pares de poblaciones, debido fundamentalmente a una fuerte deriva genética causada por fluctuaciones poblacionales recientes, sin detectarse un patrón claro de estructuración genética espacial.

A la vista de nuestros resultados con secuencias del ADNcp, parece lógico considerar a todo el complejo de poblaciones del norte de La Gomera (las poblaciones de Roque Cano, Mulagua y camino de El Cedro adscritas a *R. microcarpa* y la población de Taguluche, determinada por nuestro grupo provisionalmente como *R. pinnata*) como una misma unidad evolutiva, completamente separada de la población de Teguerquenche del oeste insular. Dada su cercanía en nuestros análisis filogenéticos a la población de Genovés (norte de Tenerife), que a su vez se halla geográficamente muy cercana al *locus classicus* de *Ruta pinnata*, se estima que todas las poblaciones del norte de La Gomera (incluidas las no muestreadas) deberían considerarse, al menos

de forma provisional, como *R. pinnata*.

En cuanto a la población de Teguerquenche, su ubicación en la zona de la isla correspondiente al *locus classicus* de *R. microcarpa* (Sventenius, 1969), la convierte en la única población confirmada de la especie junto a otro núcleo poblacional muy cercano. Juntos suman la cantidad de 63 efectivos (Mesa *et al.*, 2003) para la especie, a la espera de confirmar la existencia de una población que podría pertenecer a la especie en Valle Gran Rey, en el suroeste insular (Mesa, 1996). Dado que la categoría de amenaza IUCN (post 1997), que era CR B2ab (iii,v), fue modificada en 2013 a EN B2ab (ii,iii) (IUCN, 2015), debido al descubrimiento de nuevas poblaciones en el norte de la isla, se propone cambiar nuevamente la categoría de amenaza a la anterior, CR B2ab (iii,v).

Nuestros resultados apoyan que la población debe ser la unidad evolutiva y funcional a la hora de establecer estrategias y programas de conservación, como así lo indican también otros estudios que se están llevando a cabo en el JBCVCSIC y, en los que se ha detectado una alta variabilidad a niveles infra-específicos tanto en linajes de amplia distribución (*Periploca laevigata*, García-Verdugo *et al.*, 2015) como en linajes de distribución más restringida (*Dorycnium broussonetii*, Jaén-Molina *et al.*, en prep.). Es importante destacar que estos resultados obtenidos con ADNcp resuelven mejor las relaciones entre estas poblaciones que los datos de microsatélites nucleares de Meloni *et al.* (2013), que a priori deberían haber sido más resolutivos, por el mayor polimorfismo que normalmente se espera cuando se aplica la última técnica citada.

Respecto a las poblaciones adscritas a *Ruta pinnata* del sur de Tenerife y de La Palma, por la posición que ocupan en los árboles filogenéticos, su distribución en la red de haplotipos (no hay un agrupamiento de haplotipos que se corresponda con las poblaciones de *Ruta pinnata* actualmente aceptadas) y el número de cambios evolutivos que se observan entre sus haplotipos, podrían tratarse de taxones independientes, aunque es la población de Herques (sur de Tenerife) la que se separa más claramente de la población de Genovés, la más cercana geográficamente al *locus classicus* de la especie. Además, las observaciones realizadas sobre los pliegos testigo por parte de Águedo Marrero, *curator* del Herbario del JBCVCSIC y colaborador destacado de esta

investigación, parecen indicar que existen evidencias morfológicas (que no fueron consideradas en la actual clasificación taxonómica) que indican que *Ruta* cf. *pinnata* del norte de La Gomera no sería el mismo taxón que “*Ruta pinnata*” de La Palma, ni tampoco que *Ruta pinnata* del norte de Tenerife.

Por último, hay que constatar que, atendiendo a los resultados de esta tesis, sería necesario realizar una revisión taxonómica exhaustiva para el género *Ruta* en Canarias, incluyendo el mayor número de poblaciones posibles, distribuidas por toda el área de extensión de cada taxón, especialmente en la isla de Tenerife, donde aún no está claro el número de taxones que podría albergar el género. En esta hipotética revisión taxonómica se debería revisar los caracteres diagnóstico, tradicionalmente utilizados, para distinguir entre las especies canarias de *Ruta*. Por ejemplo, el tamaño de los frutos, designado por Sventenius (1969) para distinguir a *Ruta microcarpa*, ha llevado a confusiones (Águedo Marrero, com. pers.), cuando realmente existen otros caracteres más discriminantes. Este es un problema que no es raro dentro de la tribu Ruteae, donde los caracteres usados tradicionalmente para distinguir entre diferentes géneros se solapan o sugieren relaciones contradictorias entre grupos hermanos (Townsend, 1986).

III.6 Bibliografía.

- Akaike H. 1979. A bayesian extension of the minimum AIC procedure of autoregressive model fitting. *Biometrika* 66: 237-242.
- Alfaro ME, Zoller S, Lutzoni F. 2003. Bayes or bootstrap. A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Molecular Biology and Evolution* 20: 255-266.
- Allan GJ, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, *et al.* 2004. Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: Loteae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 123-138.
- Anderson CL, Channing A, Zamuner AB. 2009. Life, death and fossilization on Gran Canaria - implications for Macaronesian biogeography and molecular dating. *Journal of Biogeography* 36(12): 2189-2201.
- APG. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Missouri Botanical Garden Press 85(4): 531-553.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141(4): 399-436.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161(2): 399-436.
- Barber JC, Finch CC, Francisco-Ortega J, *et al.* 2007. Hybridization in Macaronesian *Sideritis* (Lamiaceae): evidence from incongruence of multiple independent nuclear and chloroplast sequence datasets. *Taxon* 56: 74-88.
- Barquín E, Voggenreiter V. 1988. *Prodromus del Atlas Fitocorológico de las Canarias Occidentales. Parte I: Flora autóctona y especies de interés especial*. Bonn-La Laguna, Tenerife: ICONA. 1316 pp.
- Böhle UR, Hilger HH, Martin WF. 1996. Island Colonization and Evolution of the Insular Woody Habit in *Echium* L. (Boraginaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21): 11740-11745.
- Bornmüller J. 1904. Ergebnisse zweier botanischer nach Madeira und der Canarischen Inseln. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 33: 387-492.
- Bräuchler C, Meimberg H, Abele T, *et al.* 2005. Polyphyly of the genus *Micromeria* (Lamiaceae) – evidence from cpDNA sequence data. *Taxon* 54: 639-650.
- Bramwell D, Bramwell ZI. 1974. *Wild flowers of the Canary Islands*. Cabildo Insular de Tenerife. 261 pp.
- Bramwell D, Bramwell ZI. 1983. *Flores silvestres de las islas Canarias* (2ª edición). Madrid: Editorial Rueda. 284 pp.
- Bramwell D, Bramwell ZI. 1994. *Flores silvestres de las islas Canarias* (3ª edición). Madrid: Editorial Rueda. 376 pp.
- Bramwell D, Bramwell ZI. 2001. *Flores silvestres de las islas Canarias* (4ª edición). Madrid: Editorial Rueda. 437 pp.
- Burchard O. 1929. Beiträge zur Ökologie und Biologie der kanarenpflanzen. *Biblioth. Bot.* 24(98): (i) 1-262.
- Caujapé-Castells J, Jaén-Molina R, Cabrera N, Curbelo L. 2011. *Manual del Banco de ADN de la Flora Canaria*. Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN, Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada CSIC, Cabildo de Gran Canaria (<http://www.bioclimac.com/mbdna/index.php/dna-bank/docu>

[men-tation/dna-bank-lab-manual](#)).

- Ceballos L, Ortuño F. 1976. *Estudio sobre la vegetación y flora forestal de las Canarias Occidentales*, 2ª edición. Santa Cruz de Tenerife: Cabildo Insular de Tenerife. 433 pp.
- Clark JR, Ree RH, Alfaro ME, King MG, Wagner WL., Roalson EH. 2008. A comparative study in ancestral range reconstruction methods: retracing the uncertain histories of insular lineages. *Systematic Biology* 57:693-707.
- Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- Christ KHH. 1887. *Spicilegium Canariense*. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 9: 86-172.
- Delgado JD, Arévalo JR, Fernández-Palacios JM. 2001. Fragmentación de los ecosistemas forestales. In: Fernández-Palacios JM, Martín-Esquível JL, eds. *Naturaleza de las islas Canarias. Ecología y Conservación*. Santa Cruz de Tenerife: Editorial Turquesa, 173-179.
- Dlugosch KM, Parker IM. 2007. Molecular and life history trait variation across the native range of the invasive species *Hypericum canariense*: evidence of ancient patterns of colonization via pre-adaptation?. *Molecular Ecology* 16(20): 4269-4283.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, et al. 2011. Geneious Pro 5.6.2. Disponible en <http://www.geneious.com/>
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Resources* 32(5): 1792-1797. Disponible en <http://www.drive5.com/muscle>
- Emerson BC. 2003. Genes, geology and biodiversity: faunal and floral diversity on the island of Gran Canaria. *Anim. Biodiv. Conserv.* 26: 9-20.
- Escobar-García P, Schönswetter P, Fuertes-Aguilar J, Nieto-Feliner G, Schneeweiss GM. 2009. Five molecular markers reveal extensive morphological homoplasy and reticulate evolution in the *Malva* alliance (Malvaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 226-239.
- Francisco-Ortega J, Crawford DJ, Santos-Guerra A, et al. 1997. Origin and evolution of *Argyranthemum* (Asteraceae: Anthemideae) in Macaronesia. In: Givnish TJ, Sytsma KJ, eds. *Molecular evolution and adaptive radiation*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 407-431.
- Francisco-Ortega J, Barber JC, Santos-Guerra A, et al. 2001. Origin and evolution of the endemic genera of Gonosperminae (Asteraceae: Anthemideae) from the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 88: 161-169.
- Francisco-Ortega J, Fuertes-Aguilar J, Kim SC, et al. 2002. Phylogeny of the Macaronesian endemic *Crambe* section *Dendrocrambe* (Brassicaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 89: 1984-1990.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- García-Cabezón A, Sventenius ER, González M, Jordan A, González C. 1954. *Index seminum quae Hortus Acclimatationis Plantarum Arotapae*. Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimatationis Plantarum Arotapae). Puerto de la Cruz, Tenerife: Jardín de Aclimatación de Plantas de La Orotava, 1: 3-13.
- García-Cabezón A, Sventenius ER, Pérez A, González C. 1964. *Index seminum quae*

- Hortus Acclimatationis Plantarum Arautapae*. Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae). Puerto de la Cruz, Tenerife: Jardín de Aclimatación de Plantas de La Orotava, 1: 3-13.
- García-Cabezón A, Sventenius ER, Pérez A, González C. 1966. *Index seminum quae Hortus Acclimatationis Plantarum Arautapae*. Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae). Puerto de la Cruz, Tenerife: Jardín de Aclimatación de Plantas de La Orotava, 1: 3-13.
- García-Cabezón A, Sventenius ER, Bello IT, González C. 1969. *Index seminum quae Hortus Acclimatationis Plantarum Arautapae*. Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae). Puerto de la Cruz, Tenerife: Jardín de Aclimatación de Plantas de La Orotava, 1: 3-20.
- García-Verdugo C, Forrest AD, Fay MF, Vargas P. 2010. The relevance of gene flow in metapopulation dynamics of an oceanic island endemic, *Olea europaea* subsp. *guanchica*. *Evolution* 64: 3525-3536.
- García-Verdugo C, Sajeva M, La Mantia T, Harrouni C, Msanda F, Caujapé-Castells J. 2015. Do island plant populations really have lower genetic variation than mainland populations? Effects of selection and distribution range on genetic diversity estimates. *Molecular Ecology* 24: 726-741.
- González-Artilles FJ. 2006. *El bosque termófilo en Gran Canaria*. Tesis doctoral. Las Palmas de Gran Canaria: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- González N, Rodrigo J, Suárez C. 1986. *Flora y vegetación del archipiélago Canario*. Las Palmas de Gran Canaria: EDIRCA. 335 pp.
- Guzmán B, Vargas P. 2005. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, *trnL-trnF*, and *matK* sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 644-660.
- Guzmán B, Vargas P. 2010. Unexpected synchronous differentiation in Mediterranean and Canarian *Cistus* (Cistaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12: 163-174.
- Hall T. 2007. BioEdit, version 7.0.9. CA: Computer Program and documentation, Carlsbad, *Ibis Biosciences*. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
- Helfgott DM, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, *et al.* 2000. Biogeography and breeding system evolution of the woody *Bencomia* alliance (Rosaceae) in Macaronesia based on ITS sequence data. *Systematic Botany* 25: 82-97.
- Hausen. 1962. New contributions to the geology of Gran Canaria, Canary Islands. *Soc. Sci. Fenn., Com. Phys.-Math.* 27(1): 1-418.
- International Union for the Conservation of Nature (IUCN). Red List of Threatened Species. Ver. 2015.3. (<http://www.iucnredlist.org/>).
- Jaén-Molina R. 2014. *Aplicabilidad del concepto "código de barras de ADN" a la flora endémica de Canarias*. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna.
- Jaén-Molina R, Marrero-Rodríguez Á, Reyes-Betancort A, Santos-Guerra A, Naranjo-Suárez J, Caujapé-Castells J. 2014. Molecular taxonomic identification in the absence of a 'barcoding gap': a test with the endemic flora of the Canarian oceanic hotspot. *Molecular Ecology Resources* 15: 42-56.
- Kim S-C, Crawford DJ, Jansen RK, *et al.* 1999. The use of a non-coding region of chloroplast DNA in phylogenetic studies of the subtribe Sonchinae (Asteraceae: Lactuceae). *Plant Systematics and Evolution* 215: 85-99.
- Kim S-C, Lee C, Mejías JA. 2007. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA *matK* gene and ITS of nrDNA sequences reveals polyphyly of the genus *Sonchus* and new relationships among the subtribe Sonchinae (Asteraceae: Cichorieae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 578-597.
- Kunkel. 1969. Exsiccati Selecti Florae Canariensis. *Cuadernos de Botánica Canaria* 7:

- Kunkel. 1971. Gran Canaria – Excursiones Especiales. I. De Fataga al Roque Almeida. *Cuadernos de Botánica Canaria* 12: 37-40.
- Kunkel G. 1977. *Endemismos canarios. Inventario de las plantas vasculares endémicas en la provincia de Las Palmas. Monografías*, 15. Madrid: Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza (ICONA). Servicio de publicaciones agrarias. 436 pp.
- Lindinger. 1926. Beiträge zur Kenntnis von Vegetation und Flora der kanarischen Inseln. *Abh. Gebiet. Auslandkunde* 21: 1-350.
- Linnaeus C. 1782. *Supplementum plantarum Systematis vegetabilium Editionis decimae tertiae, Generum plantarum Editionis sextae, et Specierum plantarum Editionis secundae*. Brunsvigae. 647 pp.
- Lomolino MV, Sax DF, Riddle BR, Brown JH. 2006. The island rule and a research agenda for studying ecogeographical patterns. *Journal of Biogeography* 33: 1503-1510.
- López de Heredia U, López R, Collada C, Emerson BC, Gil L. 2014. Signatures of volcanism and aridity in the evolution of an insular pine (*Pinus canariensis* Chr. Sm. Ex DC in Buch). *Heredity* 113: 240-249.
- Manen JF, Natali A, Ehrendorfer F. 1994. Phylogeny of Rubiaceae-Rubieae inferred from the sequence of a cpDNA intergene region. *Plant Systematics and Evolution* 190: 195-211.
- Marrero Á, Jorge MS, Bramwell D. 1988. *Estudio para la conservación de la diversidad genética y recursos naturales de la flora endémica de Canarias (C.O.D.I.G.E.N.)*. Jardín Botánico “Viera y Clavijo”. Cabildo Insular de Gran Canaria.
- Marrero Á, Francisco-Ortega J. 2001. Evolución en islas. La forma en el tiempo. In: Fernández-Palacios JM, Martín Esquivel JL, eds. *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y conservación*. Santa Cruz de Tenerife: Turquesa Ediciones, 141-150.
- McKersie BD, Senaratna T, Walker MA, Kendall E, Hetherington P. 1988. Deterioration of the membrane during aging in plants: evidence for free radical mediation. In: Noodeon LD, Leopold AC, eds. *Senescence and Aging in Plants*. New York: Academic Press, 442-461.
- Meimberg H, Abele T, Bräuchler C, McKay JK, Pérez de Paz PL, Heubl G. 2006. Molecular evidence for adaptive radiation of *Micromeria* Benth. (Lamiaceae) on the Canary Islands as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences and ISSR fingerprint data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 566-578.
- Meloni M, Reid A, Caujapé-Castells J, Marrero A, Fernández-Palacios JM, Mesa-Coeillo RA, Conti E. 2013. Effects of clonality on the genetic variability of endangered rare, insular species: the case of *Ruta microcarpa* from the Canary Islands. *Ecol. Evol.* 3:1569-1579.
- Meloni M, Reid A, Caujapé-Castells J, Soto M, Fernández-Palacios JM, Conti E. 2015. High genetic diversity and population structure in the endangered Canarian endemic *Ruta oreojasme* (Rutaceae). *Genetica* doi: 10.1007/s10709-015-9855-0
- Menéndez G, Sventenius ER, et al. 1952. *Index seminum quae Hortus Acclimatationis Plantarum Arautapae*. Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimatationis Plantarum Arautapae). Puerto de la Cruz, Tenerife: Jardín de Aclimatación de Plantas de La Orotava.
- Mesa R. 1996. *Seguimiento de la flora amenazada de La Gomera, El Hierro y La Palma. III*. Documento interno. Viceconsejería de Medio Ambiente, Gobierno de Canarias. 180 pp.
- Mesa R. 1999. *Flora Amenazada de la isla de Tenerife II*. Documento interno. Viceconsejería de Medio Ambiente. Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente.

Gobierno de Canarias.

- Mesa R, Acevedo A, Rodríguez S. 2003. *Ruta microcarpa* Svent. In: Bañares Á, Blanca G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S, eds. *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza, 470-471.
- Mesa R. 2005. *Referencia de experto F01523. Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias.
- Mesa R. 2008a. *Ruta pinnata* L. fil. Documento interno. Viceconsejería de Medio Ambiente. Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente. Gobierno de Canarias.
- Mesa R. 2008b. *Ruta microcarpa* L. fil. Documento interno. Viceconsejería de Medio Ambiente. Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente. Gobierno de Canarias.
- Molero J, Garnatje T, Rovira A, et al. 2002. Karyological evolution and molecular phylogeny in Macaronesian dendroid spurges (*Euphorbia* subsect. *Pachycladae*). *Plant Systematics and Evolution* 231: 109-132.
- Mort ME, Soltis DE, Soltis PS, et al. 2002. Phylogenetics and Evolution of the Macaronesian Clade of Crassulaceae Inferred from Nuclear and Chloroplast Sequence Data. *Systematic Botany* 27: 271-288.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 Pt 1: 263-273.
- Navarro B, Naranjo J, Navarro J. 2003. Inventarios 2000-2003. Inventarios de campo del Jardín Canario (no publicado). Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo", Cabildo Insular de Gran Canaria.
- Nylander J. 2004. MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University 2. Programa distribuido por los autores.
- Olangua M. 2009. *Ruta oreojasme* Webb & Berthel. *Seguimiento de poblaciones de especies amenazadas (2009)*. Documento interno. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial. Gobierno de Canarias.
- Page RDM. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- Palau A. 1785. *Parte práctica de Botánica del Caballero Carlos Linneo, que comprende las clases, órdenes, géneros, especies y variedades de las plantas, con sus caracteres genéricos y específicos, sinónimos mas selectos, nombres triviales, lugares donde nacen y propiedades*. Tomo III. Madrid: Imprenta Real. 801 pp.
- Palmer JD, Jansen RK, Michaels HJ, et al. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1180-1206.
- Panero JL, Francisco-Ortega J, Jansen RK, Santos-Guerra A. 1999. Molecular evidence for multiple origins of woodiness and a New World biogeographic connection of the Macaronesian Island endemic *Pericallis* (Asteraceae: Senecioneae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 13886-13891.
- Pelser PB, Gravendeel B, Van der Meijden R. 2002. Tackling speciose genera: species composition and phylogenetic position of *Senecio* sect. *Jacobaea* (Asteraceae) based on plastid and nrDNA sequences. *American Journal of Botany* 89(6): 929-939.
- Pitard J, Proust L. 1909. *Les Iles Canaries. Flore de l'Archipel*. Paris: Librairie des sciences naturelles Paul Klincksieck. 502 pp.

- Ree RH, Smith SA. 2008. Maximum-likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Systematic Biology* 57:4-14.
- Rivas-Goday S, Esteve-Chueca F. 1965. Ensayo fitosociológico de la *Crassi-Euphorbietea macaronesica* y estudio de los tabaibales y cardonales de Gran Canaria. *Anal. Inst. Bot. A. J. Cavanilles* 22: 220-339.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rumeu B, Caujapé-Castells J, Blanco-Pastor JL, Jaén-Molina R, Nogale M, Elias RB, Vargas P. 2011. The Colonization History of *Juniperus brevifolia* (Cupressaceae) in the Azores Islands. *Plos ONE* 6(11): e27697. doi:10.1371/journal.pone.0027697
- Rumeu B, Vargas P, Jaén-Molina R, Nogales M, Caujapé-Castells J. 2014. Phylogeography and genetic structure of the threatened Canarian *Juniperus cedrus* (Cupressaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 175: 376-394.
- Salvo G, Bacchetta G, Ghahremaninejad F, Conti E. 2008. Phylogenetic relationships of Ruteae (Rutaceae): new evidence from the chloroplast genome and comparisons with non-molecular data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49:736-748.
- Salvo G, Ho SY, Rosenbaum G, Ree R, Conti E. 2010. Tracing the temporal and spatial origins of island endemics in the Mediterranean region: a case study from the citrus family (*Ruta* L., Rutaceae). *Systematic Biology* 59(6): 705-722.
- Sanmartín I, van der Mark P, Ronquist F. 2008. Inferring dispersal: a Bayesian, phylogeny-based approach to island biogeography, with special reference to the Canary Islands. *J. Biogeo.* 35: 428-449.
- Santos A, Fernández M. 1980. Plantae in loco natali ab Eric Sventenius inter annos MCMXLIII - MCMLXXI lectae, in Herbario ORT Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae). *Index Sem. Hort. Acclim. Plant. Arautapae* 1979, 3: 53-94.
- Santos A. 1996. *Ruta pinnata* L. fil. (Rutaceae). In: Gómez-Campo C, et al., eds. *Libro Rojo de Especies Vegetales Amenazadas de las Islas Canarias*. Santa Cruz de Tenerife: Viceconsejería de Medio Ambiente, Consejería de Política Territorial. Gobierno de Canarias, 520-521.
- Saturno, O. 2007. *Vegetación del Macizo de Amurga. Memoria final 2007*. Trabajo de investigación inédito. Las Palmas de Gran Canaria: Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo", Cabildo de Gran Canaria.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, et al. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Soto M. 2010. *Proyecto de restauración de los hábitats de los Espacios Naturales Protegidos (LIC's) de Pílancones, Tauro, Fataga, Inagua, Amurga y Parque Rural del Nublo en relación a las especies amenazadas*. Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo", Cabildo de Gran Canaria.
- Soto M, Saturno Ó, Santana I, Naranjo J. 2010. *Ruta oreojasme* Webb. In: Bañares Á, Blanca G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S, eds. 2010. *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. Adenda 2010*. Madrid: Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino)-Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas, 128-129.
- Soto M, Jaén R, Marrero-Rodríguez Á, Meloni M, Conti E, Caujapé-Castells J. 2011.

- Filogeografía y conservación de endemismos insulares canarios amenazados del género *Ruta* (Rutaceae). Es Mercadal, Menorca: *V Congreso Biología de la Conservación de Plantas*, 74.
- Sunding P. 1972. The vegetation of Gran Canaria. *Skr. Norske Vidensk. Akad. Oslo I. Matem. Naturv. Kl. S.* 29: 1-186.
- Susanna A, Garnatje T, García-Jacas N. 1999. Molecular phylogeny of *Cheirolophus* (Asteraceae: Cardueae-Centaureinae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant Systematics and Evolution* 214: 147-160.
- Sventenius ER. 1969. Plantae macaronesienses novae vel minus cognitae II. *Index Sem. Hort. Acclim. Plant. Arautapae* (1969) 4: 41-43.
- Swofford DL. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Talavera M, Balao F, Casimiro-Soriguer R, Ortiz MÁ, Terrab A, Arista M, Ortiz PL, Stuessy TF, Talavera S. 2011. Molecular phylogeny and systematics of the highly polymorphic *Rumex bucephalophorus* complex (Polygonaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 659-670.
- Townsend CC. 1986. Taxonomic revision of the genus *Haplophyllum* (Rutaceae). *Hooker's Icones Plantarum, Vol. XL, parts I, II, and III*. Kent, U.K.: Bentham-Moxon Trustees.
- Trusty JL, Olmstead RG, Bogler DJ, Santos-Guerra A, Francisco-Ortega J. 2004. Using molecular data to test a biogeographic connection of the Macaronesian genus *Bystropogon* (Lamiaceae) to the New World: a case of conflicting phylogenies. *Systematic Botany* 29(3): 702-715.
- Trusty JL, Olmstead RG, Bogler J, Santos-Guerra A, Sá-Fontinha S, Francisco-Ortega J. 2005. Molecular phylogenetics of the Macaronesian-endemic genus *Bystropogon* (Lamiaceae): palaeo-islands, ecological shifts and interisland colonizations. *Mol. Ecol.* 14: 1177-1189.
- Vitales D, Garnatje T, Pellicer J, Vallés J, Santos-Guerra A, Sanmartín I. 2014. The explosive radiation of *Cheirolophus* (Asteraceae, Cardueae) in Macaronesia. *BMC Evol. Biol.* 14(1): 118 doi:10.1186/1471-2148-14-118.
- Webb PB. 1840. Notice sur le Parolinia, nouveau genre de la famille des Crucifères, et sur des espèces à ajouter à la flore des Canaries. *Annales des Sciences Naturelles, Partie Botanique, sér. 2* 13: 129-139.
- Webb PB, Berthelot S. 1840. *Histoire naturelle des Iles Canaries*. Tomo 3, Parte 2: *Phytographia Canariensis*, sectio I. Paris. 220 pp + ilustraciones.
- Whittaker RJ, Triantis KA, Ladle RJ. 2008. A general dynamic theory of ocean island biogeography. *Journal of Biogeography* 35: 977-994.
- Zimmermann NFA, Ritz CM, Hellwig FH. 2010. Further support for the phylogenetic relationships within *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae) from nrITS and *trnL-trnF* IGS sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 286: 39-58.

Capítulo IV. Conclusiones.

Conclusiones

IV.1 VARIABILIDAD GENÉTICA DE ENDEMISMOS DEL GÉNERO *CRAMBE* EN GRAN CANARIA.

1) Los niveles promedio de variación genética isoenzimática detectados en *Crambe tamadabensis* y *C. pritzelii* son considerablemente altos a pesar de lo esperado *a priori* por su condición de endemismos insulares amenazados, especialmente en el caso de la más restringida y amenazada *C. tamadabensis*. Los niveles de diversidad genética encontrados en estos taxones están en concordancia con su adscripción filogenética, y especialmente con su sistema de cruzamiento presumiblemente alógamo y su alta dotación cromosómica.

2) Prácticamente todas las poblaciones estudiadas de *Crambe* han sufrido reducciones drásticas de tamaño poblacional a lo largo de su historia, asociadas a cuellos de botella genéticos en la mayoría de ellas. Sin embargo, si bien las poblaciones grandes muestran siempre una alta diversidad genética, ésta no es significativamente menor en todas las poblaciones pequeñas, sino solamente en las que están más aisladas. Se evidencia así indirectamente que el sistema de autoincompatibilidad común en la familia Brassicaceae actúa más eficazmente en las poblaciones más pequeñas, promoviendo la heterozigosidad.

3) Los niveles de estructuración interpoblacional detectados en las dos especies de *Crambe* analizadas indican una alta cohesión genética, en contraposición con los altos niveles de fragmentación estimados para la flora canaria. Atribuimos este resultado al hecho de que en *Crambe* se siguió un muestreo exhaustivo del área de ocurrencia de sus poblaciones, al contrario que en la mayoría de los estudios isoenzimáticos realizados con especies canarias antes del año 2000. Este resultado refuerza la hipótesis de que un muestreo intensivo a nivel poblacional es indispensable para estimar con un mínimo sesgo los niveles de fragmentación y flujo génico inter-poblacional.

4) En *C. pritzelii*, la mayor parte de la divergencia interpoblacional se explica

por la desviaciones de las frecuencias alélicas de sus dos poblaciones menos variables, que reflejan los efectos de la deriva genética inducida por la fragmentación poblacional, el pastoreo y, posiblemente, de eventos fundadores relativamente recientes.

5) Las poblaciones de *C. tamadabensis* son genéticamente muy próximas entre sí, y la población de Tamadaba (la mayor de la especie), vertebrada la elevada cohesión genética. Las poblaciones más variables de *C. pritzelii* son genéticamente similares con independencia de las mayores distancias geográficas existentes entre ellas, y en general mantienen niveles altos de flujo génico. Las poblaciones de *C. tamadabensis* se comportan de forma similar, según las estimaciones de flujo génico en las que tienen un mayor peso los alelos más comunes.

6) Los marcadores moleculares aloenzimáticos sí muestran diferenciación genética incipiente, pero consistente, entre ambos taxones, que es congruente con un escenario de reciente especiación. Por lo tanto, este caso de estudio ilustra que los efectos de los cuellos de botella y la deriva génica, unidos a un muestreo sesgado, pueden enmascarar la detección de sutiles diferencias genéticas entre especies. Estos marcadores moleculares, como se esperaba, tuvieron un poder de asignación poblacional mucho menor a nivel individual, sobre todo dentro del conjunto de poblaciones altamente variables de *C. pritzelii*.

7) La diferenciación genética entre las especies de *Crambe* habría venido precedida por una diferenciación morfológica rápida y, a falta de barreras geográficas, por la presumible aparición de barreras fenológicas, que previenen la introgresión y homogeneización en aquellas zonas donde se solapan las áreas de distribución de ambas especies.

8) *Crambe pritzelii* y *C. tamadabensis* tienen una considerable capacidad de recuperación demográfica y genética si se preserva la conectividad poblacional actual. Las medidas de protección *in situ* y de control del pastoreo en las poblaciones más importantes para el mantenimiento de la cohesión genética

deberían ser las estrategias más efectivas para su conservación y gestión. Asimismo, un número relativamente bajo de poblaciones pueden garantizar la representación de su ingente variación genética neutral, con lo que semillas de las mismas deberían preservarse en colecciones *ex situ* como el Banco de Germoplasma del JBCVCSIC.

IV.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y FILOGEOGRÁFICOS DEL GÉNERO *RUTA* EN CANARIAS

1) Nuestros análisis de máxima parsimonia (MP) y de inferencia bayesiana (BI) sugieren a *Ruta oreojasme* como la especie actual más próxima al ancestro hipotético de las otras especies del género *Ruta* que se distribuyen en las Islas Canarias.

2) La alta variabilidad genética detectada (ADNcp) entre las poblaciones actualmente adscritas a *Ruta pinnata*, sugieren que pueden estar representando diversidad críptica o variabilidad morfológica que no fue considerada en el momento de su clasificación taxonómica. Especialmente, la población del Lomo de las Nieves de La Palma (con dos haplotipos exclusivos) y la población de Herques del sur de Tenerife, muestran claras diferencias respecto al resto de poblaciones analizadas. Esto está en sintonía con las evidencias morfológicas observadas para *Ruta pinnata* (Soto *et al.*, 2011; Marrero com. pers.), y que distinguen a la población del Lomo de las Nieves de La Palma, de las poblaciones del norte de La Gomera (p. ej. Taguluche) y del norte de Tenerife (Genovés).

3) Debido a las amplias diferencias genéticas (ADNcp) detectadas entre la población de Teguerquenche y el resto de poblaciones adscritas a *Ruta microcarpa*, y a que la población de Teguerquenche está ubicada en la zona de la isla correspondiente al *locus classicus* de *R. microcarpa* (Sventenius, 1969), se propone considerar a esta población como la única que se corresponde con este taxón.

4) Nuestros resultados también sugieren que el complejo de poblaciones del norte de La Gomera (Roque Cano, Mulagua y camino de El Cedro) adscritas a

Ruta microcarpa, por la posición que ocupan en los árboles filogenéticos y por compartir un haplotipo con la población de Taguluche (*R. cf. pinnata*) deben ser consideradas, al menos de forma provisional, como *R. pinnata*.

5) Es necesario realizar una revisión taxonómica exhaustiva del género *Ruta* en Canarias, ampliando el número de poblaciones analizadas de forma que se abarque toda el área de extensión de cada taxón, especialmente en la isla de Tenerife (Bco. del Infierno, Anaga o La Orotava).

6) Los análisis filogeográficos realizados apuntan a Gran Canaria como el centro de dispersión del género *Ruta* en el archipiélago canario. Además, se sugiere que a partir de un hipotético ancestro, pudieron haber diversificado de modo independiente cuatro linajes que llevaron a cabo una colonización interinsular múltiple (Tenerife, Gomera y La Palma).

7) La red de haplotipos apunta a un patrón de colonización desde el cardonal-tabaibal (*R. oreojasme*), pasando por el termófilo (*R. pinnata* y *R. microcarpa*) y hasta los márgenes de la laurisilva (*R. pinnata*)

8) Nuestros resultados apoyan que la población debe ser la unidad evolutiva y funcional a la hora de establecer estrategias y categorías de conservación, por lo tanto, proponemos que la categoría de amenaza de *Ruta microcarpa* sea revisada, ya que según nuestros resultados está únicamente representada por la población de Teguerquenche.

Anexo I: pliegos testigo.

Pliegos testigo de las poblaciones muestreadas de *Crambe* L. en Gran Canaria.

LPA33086: *Crambe tamadabensis*. Andenes de La Breña, Guayedra (Tamadaba). Moisés Soto. 13-V-2006. **LPA20074:** *Crambe tamadabensis*. Gran Canaria, Gáldar. Amagro. UTM: 28RDS3311. B. Navarro, J. Naranjo, J. Navarro, F. Oliva, M. Soto, O. Saturno. 27-XI-2003. **LPA33088:** *Crambe tamadabensis*. Montaña de Guía, cara oeste. Moisés Soto. 11-V-2006. **LPA33091:** *Crambe tamadabensis*. Risco Alto del Cabro, Barranco del Calabozo (Cuesta de Silva). Moisés Soto. 12-V-2006. **LPA33094:** *Crambe pritzelii*. Las Escaleras, al norte de San Pedro, Agaete, 300 m. Moisés Soto. 12-V-2006. **LPA19943:** *Crambe pritzelii*. Agaete, Los Berrazales. A Roca, J. Naranjo, J. Navarro. 31-III-2000. **LPA19944:** *Crambe pritzelii*. Teror, Riscos de Jiménez. J. Naranjo, F. Oliva, B. Vilches, J. Navarro. 29-VI-2001. **LPA10804:** *Crambe pritzelii*. Rocas y laderas de Tenteniguada. José Alonso. 29-V-1974. **LPA10184:** *Crambe pritzelii*. Barranco de Guayadeque, 1200 m. Á. Marrero. 4-IV-1985. **LPA10168:** *Crambe pritzelii*. Cordillera de Las Fuentecillas (La Umbría del Gallego), Aldea Blanca. J. Alonso. 8-V-1974.

Pliegos testigo de las poblaciones muestreadas de *Ruta* L. en Canarias.

LPA28994: *Ruta oreojasme*. Gran Canaria, San Bartolomé de Tirajana. Divisoria Ayagaures - Los Vicentes, Montaña La Gorra, 375 - 400 m. UTM: 28RDR407776. J. Caujapé, M. Soto. 25-V-2010. **LPA28993:** *Ruta oreojasme*. Gran Canaria, San Bartolomé de Tirajana. Divisoria Ayagaures - Los Vicentes, Cho Domingo, 475 - 500 m. UTM: 28RDR406788. J. Caujapé, M. Soto. 25-V-2010. **LPA28996:** *Ruta oreojasme*. Gran Canaria, San Bartolomé de Tirajana. Degollada las Yeguas, carretera a Fataga, 485 m. UTM: 28RDR430775. J. Caujapé, M. Soto. 25-VI-2010. **LPA29003:** *Ruta oreojasme*. Gran Canaria, San Bartolomé de Tirajana. Los Culatones, al sur de la Degollada de Las Yeguas, 300 - 350 m, oeste. UTM: 28RDR423756. J. Caujapé, M. Soto. 25-VI-2010. **LPA29000:** *Ruta oreojasme*. Gran Canaria, San Bartolomé de Tirajana. Risco del Portillo sobre Arteara, 600 m. UTM: 28RDR443800. M. Meloni, A. Reid, J. Caujapé-Castells, M. Soto. 03-VI-2010. **LPA29005:** *Ruta oreojasme*. Gran Canaria, San Bartolomé de Tirajana. Amurga, Barranco del Cañizo. UTM: 28RDR434770. J. Caujapé, M. Soto. 25-VI-2010. **LPA28998:** *Ruta oreojasme*. Gran Canaria, Santa Lucía de Tirajana. Los Gallegos sobre Caidero Negro, 500 - 550 m. UTM: 28RDR482811. J. Caujapé, M. Soto, A. Reid. 01-VI-2010. **LPA29007:** *Ruta*

oreojasme. Gran Canaria, San Bartolomé de Tirajana. Amurga, Barranco de Las Palmas, 450 - 550 m. UTM: 28RDR497803. J. Caujapé, M. Soto. 09-VII-2010. **LPA29002:** *Ruta oreojasme*. Gran Canaria, Santa Lucía de Tirajana. Barranco de Tirajana, Cañada del Sao, 400 m. UTM: 28RDR495825. M. Meloni, A. Reid, J. Caujapé, M. Soto. 03-VI-2010. **LPA29008:** *Ruta pinnata*. Tenerife, Fasnía. Barranco de Erques, 525 m. UTM: 28RCS583258. J. Caujapé, M. Meloni. 10-VI-2010. **LPA28839:** *Ruta cf. microcarpa*. La Gomera, Hermigua. Riscos de La Gollada del Ramonal, sobre Taguluche, 625 m. UTM: 28RBS877165, en matorral termoesclerófilo al borde inferior del monte verde. Á. Marrero, J. Caujapé. 18-VII-2010. **LPA23587:** *Ruta microcarpa*. La Gomera, Hermigua, por encima del embalse de Malagua (Mulagua), 450 - 460 m. UTM: 28RBS8414. En andenes y laderas, en matorral entre el termoesclerófilo y el tabaibal. Á. Marrero, R. China, A. García, J. Caujapé, J. Naranjo, R. Jaén. 09-IV-2008. **LPA28843:** *Ruta microcarpa*. La Gomera, Vallehermoso. Laderas de Roque Cano, al pie del Roque, 425 - 450 m, exposición noreste. UTM: 28RBS786194. En matorral termoesclerófilo (sabinar) denso. Á. Marrero, J. Caujapé. 29-VII-2010. **LPA28852:** *Ruta microcarpa*. La Gomera, Hermigua. Cañada de los Tiles, camino al Cedro, 400 m, exposición oeste - suroeste. UTM: 28RBS832152. Zona potencial del termoesclerófilo en el límite del monte verde, laderas entre terrazas de cultivos en zona antropizada. Á. Marrero, J. Caujapé. 29-VII-2010.

Anexo II: matrices de datos.

Matriz de genotipos de *Crambe*.

La matriz con los genotipos de cada uno de los individuos muestreados para cada *loci* isoenzimático puede consultarse en el sistema de información Demiurge (<http://www.demiurge-project.org/>), en la hoja de diversidad genética D-ALLOZ-100 (Soto, 2015).

Matriz de caracteres variables de *Ruta*.

Se muestran a continuación los caracteres variables de las secuencias de las cuatro regiones del ADNcp analizadas, para cada uno de los 37 individuos finalmente usados en los análisis filogenéticos. Los números de los encabezados corresponden a las posiciones dentro de cada secuencia. Los indels de más de un carácter se muestran simplificados con la letra "I". Se incluyen los datos de los tres microsatélites altamente variables detectados (encabezado en rojo), que no fueron utilizados en los análisis, debido a la existencia de posibles convergencias entre individuos de *Ruta oreojasme* e individuos de poblaciones de otros taxones (se muestra la parte variable de sus correspondientes secuencias de poli-A).

psbA - trnH

	4	6	26	53	94	120	149-155	182	195	203-222	203	223	259-260	276	284	315
6210orGorr	C	A	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	T	A
6228orDom	C	A	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	T	A
6236orYeg	C	T	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	T	A
6439orRed	C	A	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	T	A
6440orRed	C	T	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	A	A
6459orCul	C	T	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	T	A
6261orGall	C	A	C	T	A	G	-	A	C	-	-	T	-	G	A	A
6270orGall	C	A	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	T	A
6805orPal	C	A	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	T	A
6819orPal	C	A	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	A	A
6289orArt	C	T	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	T	A
6312orSao	C	A	C	T	A	G		C	C	-	-	T	-	G	T	A
6330orSao	C	A	C	T	A	G		C	C	-	-	T	-	G	T	A
6339orSao	C	A	C	T	A	G		C	C	-	-	T	-	G	T	A
6484orBca	C	T	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	A	A
6492orBca	C	A	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	A	A
7166orAgui	C	A	C	T	A	G	-	C	C	-	-	T	-	G	A	A
6409piHer	C	A	C	G	A	G	-	C	C	-	-	C	-	A	A	A
6416piHer	C	A	C	G	A	G	-	C	C	-	-	C	-	A	A	A
6425piHer	C	A	C	G	A	G	-	C	C	-	-	C	-	A	A	A
7070piNie	A	A	T	G	A	G	-	C	C		T	C	-	G	A	A
7096piNie	A	A	T	T	A	G	-	C	A		T	C	-	G	A	A
7121piNie	A	A	T	G	A	G	-	C	C		T	C	-	G	A	A
6389piGen	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C	-	G	A	A
6398piGen	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C	-	G	A	A
6508spTag	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C		G	T	A
6512spTag	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C		G	T	A
6518spTag	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C		G	T	A
6345miTeg	A	A	C	G	A	A	-	C	C	-	-	C	-	G	T	C
6350miTeg	A	A	C	G	A	A	-	C	C	-	-	C	-	G	T	C
6357miTeg	A	A	C	G	A	A	-	C	C	-	-	C	-	G	T	C
6375miMull	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C		G	T	A
6575miCan	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C		G	T	A
6585miCan	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C		G	T	A
6597miCan	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C		G	T	A
6601miCed	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C		G	T	A
6604miCed	A	A	C	G	T	G	-	C	C		C	C		G	T	A

rps16 - trnK

	135-136	218	245	274-324	286	364-383	397	402-403	426	552	634
6210orGorr	-	C	T	I	A	-	A	I	A	T	C
6228orDom	-	C	T	I	A	-	A	I	A	T	C
6236orYeg	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6439orRed	-	C	T	I	A	-	A	I	A	T	C
6440orRed	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6459orCul	A	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6261orGall	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6270orGall	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6805orPal	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6819orPal	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6289orArt	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6312orSao	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6330orSao	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6339orSao	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6484orBca	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6492orBca	-	C	T	I	A	-	A	I	A	G	C
7166orAgui	-	C	T	I	T	-	A	I	A	T	C
6409piHer	A	C	T	-	-	-	A	-	A	T	C
6416piHer	A	C	T	-	-	-	A	-	A	T	C
6425piHer	A	C	T	-	-	-	A	-	A	T	C
7070piNie	A	C	T	-	-	-	A	I	A	T	C
7096piNie	AA	C	T	-	-	I	A	I	A	T	C
7121piNie	A	C	T	-	-	-	A	I	A	T	C
6389piGen	A	C	G	-	-	-	C	I	C	T	C
6398piGen	A	C	G	-	-	-	C	I	C	T	C
6508spTag	A	C	G	-	-	-	C	I	A	T	C
6512spTag	A	C	G	-	-	-	C	I	A	T	C
6518spTag	A	C	G	-	-	-	C	I	A	T	C
6345miTeg	-	A	T	-	-	-	A	I	C	T	A
6350miTeg	-	A	T	-	-	-	A	I	C	T	A
6357miTeg	-	A	T	-	-	-	A	I	C	T	A
6375miMull	A	C	G	-	-	-	C	I	A	T	C
6575miCan	A	C	G	-	-	-	C	I	A	T	C
6585miCan	A	C	G	-	-	-	C	I	A	T	C
6597miCan	A	C	G	-	-	-	C	I	A	T	C
6601miCed	A	C	G	-	-	-	C	I	A	T	C
6604miCed	A	C	G	-	-	-	C	I	A	T	C

	trnT - trnL						atpB - rbcL							
	69	197-208	608-628	770	819	921	13	40	92	304-333	541-545	546	671	779
6210orGorr	A	AA	-	G	T	-	-	-	C	-	AAA	T	A	A
6228orDom	A	AA	I	G	T	-	-	-	C	-	AAA	T	A	A
6236orYeg	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AAA	T	A	A
6439orRed	A	AA	-	G	T	-	-	-	C	-	AAA	T	A	A
6440orRed	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AAAA	T	A	A
6459orCul	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AAAA	T	A	A
6261orGall	A	-	-	T	-	-	-	-	C	-	AA	T	A	A
6270orGall	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AA	T	A	A
6805orPal	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AA	T	A	A
6819orPal	A	-	-	T	-	-	-	-	C	-	AA	T	A	A
6289orArt	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AAA	T	A	A
6312orSao	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AAAA	T	A	A
6330orSao	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AAAA	T	A	A
6339orSao	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AAAA	T	A	A
6484orBca	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AAA	T	A	A
6492orBca	A	AA	-	G	T	-	-	-	C	-	AAA	T	A	A
7166orAgui	A	-	-	G	-	-	-	-	C	-	AAA	T	A	A
6409piHer	G	-	-	G	-	C	T	A	T	-	A	T	C	C
6416piHer	G	-	-	G	-	C	T	A	T	-	A	T	C	C
6425piHer	G	-	-	G	-	C	T	A	T	-	A	T	C	C
7070piNie	G	A	-	G	-	C	-	A	T	-	AA	T	A	A
7096piNie	G	A	-	G	-	C	-	A	T	-	AA	T	A	A
7121piNie	G	A	-	G	-	C	-	A	T	-	AA	T	A	A
6389piGen	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A
6398piGen	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A
6508spTag	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A
6512spTag	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A
6518spTag	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A
6345miTeg	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	I	A	A	A	A
6350miTeg	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	I	A	A	A	A
6357miTeg	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	I	A	A	A	A
6375miMull	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A
6575miCan	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A
6585miCan	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A
6597miCan	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A
6601miCed	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A
6604miCed	G	AA	-	G	-	C	-	A	T	-	-	T	A	A