

Análisis de la diversidad genética de poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae)

Edna Amada González González, Pedro A. Sosa y Miguel Ángel González-Pérez

La riqueza genética que nos ofrecen las poblaciones naturales de la flora en Canarias puede estar bajo riesgo. Con esto en mente, se desarrollaron marcadores moleculares (SSR) específicos para el análisis genético de *Silene nocteolens*, una planta herbácea que solo crece en el Teide; y *Sorbus aria*, 50 árboles que en Canarias están restringidos a Tenerife y La Palma. En *S. nocteolens* se encontró una gran variabilidad genética, poca diferenciación genética entre sus dos poblaciones y un bajo porcentaje autofecundación. En *S. aria* se reporta un carácter triploide, menor variabilidad genética en las muestras canarias que en las peninsulares y una diferenciación genética considerablemente alta.

Genetic richness that natural populations of flora offer us on Canary Islands may be at risk. With this in mind, we developed specific molecular markers (SSR) to analyze genetically two plant species: Silene nocteolens, a herbaceous plant that only grows in Teide mountain (Tenerife Island); and Sorbus aria, 50 trees which on the Canaries are restricted to Tenerife and La Palma Islands. In S. nocteolens we found a high genetic variability, low genetic differentiation between the only two natural populations and low selfing percentage. In S. aria we can report triploid character, lower genetic variability in the Canary samples than in samples from Iberian Peninsula and higher genetic differentiation.

Introducción

Por su gran riqueza biológica, el Archipiélago Canario ha sido integrado a uno de los 25 puntos calientes de biodiversidad mundial. Solo en lo referente a plantas, las Islas Canarias (que representan el 1,5% del territorio español) albergan más de la mitad de la flora endémica del estado español y esto ha despertado gran interés en la comunidad científica que ya considera a las Islas Canarias como auténticos laboratorios naturales para el estudio de la evolución. No obstante, la biodiversidad no está exenta de riesgos o amenazas; por lo cual es inminente actuar antes de que la erosión genética nos impida conservar este legado natural (Sosa, 2001).

El estado de alta vulnerabilidad de las poblaciones de muchos de los endemismos canarios no se debe solamente al impacto antropogénico sino que también es consecuencia de la propia dinámica de las poblaciones con un reducido número de individuos (Fernández-Palacios y Martín Esquivel, 2001). Los fenómenos de aislamiento y consanguinidad en estas poblaciones pueden ser muy acusados, siendo imprescindible redoblar los esfuerzos para evitar que la pérdida de diversidad en estos endemismos se torne irreversible, exhiban procesos de regresión por inestabilidad genética y/o demográfica y se generen extinciones locales de

sus poblaciones (Sosa et al., 2002; Oostermeijer et al., 2003).

Uno de los instrumentos más innovadores utilizados en la conservación genética de las poblaciones naturales son los marcadores mo-

Que las Islas Canarias atesoran una gran diversidad biológica a nivel de especies es un hecho ampliamente conocido, pero... ¿cuánto sabemos de la diversidad genética en esas especies?

falta logo



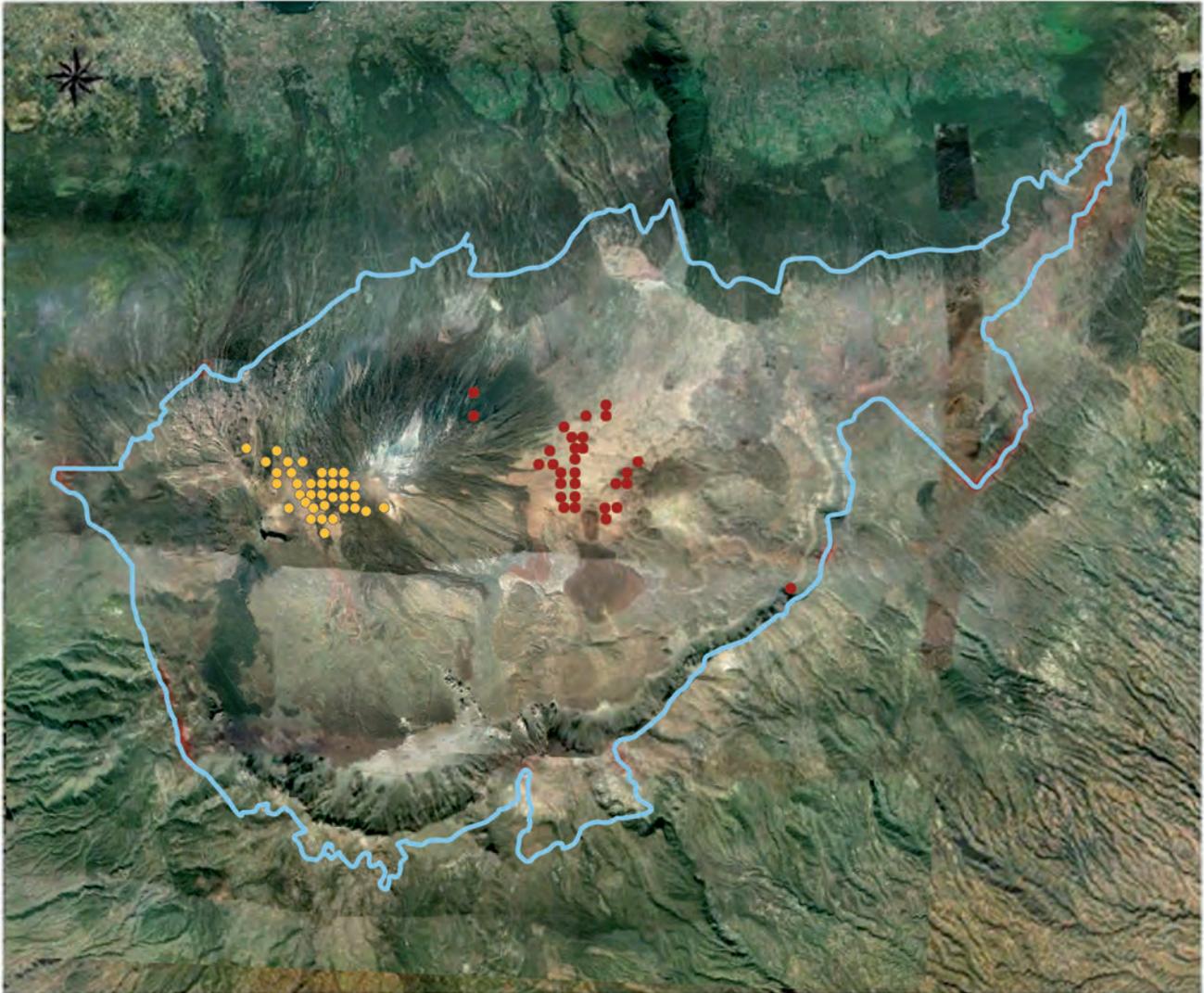
Artículo patrocinado por

Nogal Metal y Vidrieras Canarias

Figura 1. Distribución de *Silene nocteolens* en el Parque Nacional del Teide
Fuente: P.N. Teide

Localidades Naturales

- Pico Viejo
- Montaña Blanca
- P.N. El Teide



leculares. Estos marcadores son capaces de medir la diversidad genética en una amplia variedad de especies. Algunos marcadores, como los microsatélites, pueden detectar muchas variaciones en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población (es decir, son polimórficos). Además, son codominantes; esto es, re-

velan el genotipo completo de los individuos (rasgos dominantes y recesivos), sin los encubrimientos típicos de las características recesivas a causa de las dominantes (Akkak et al., 2009).

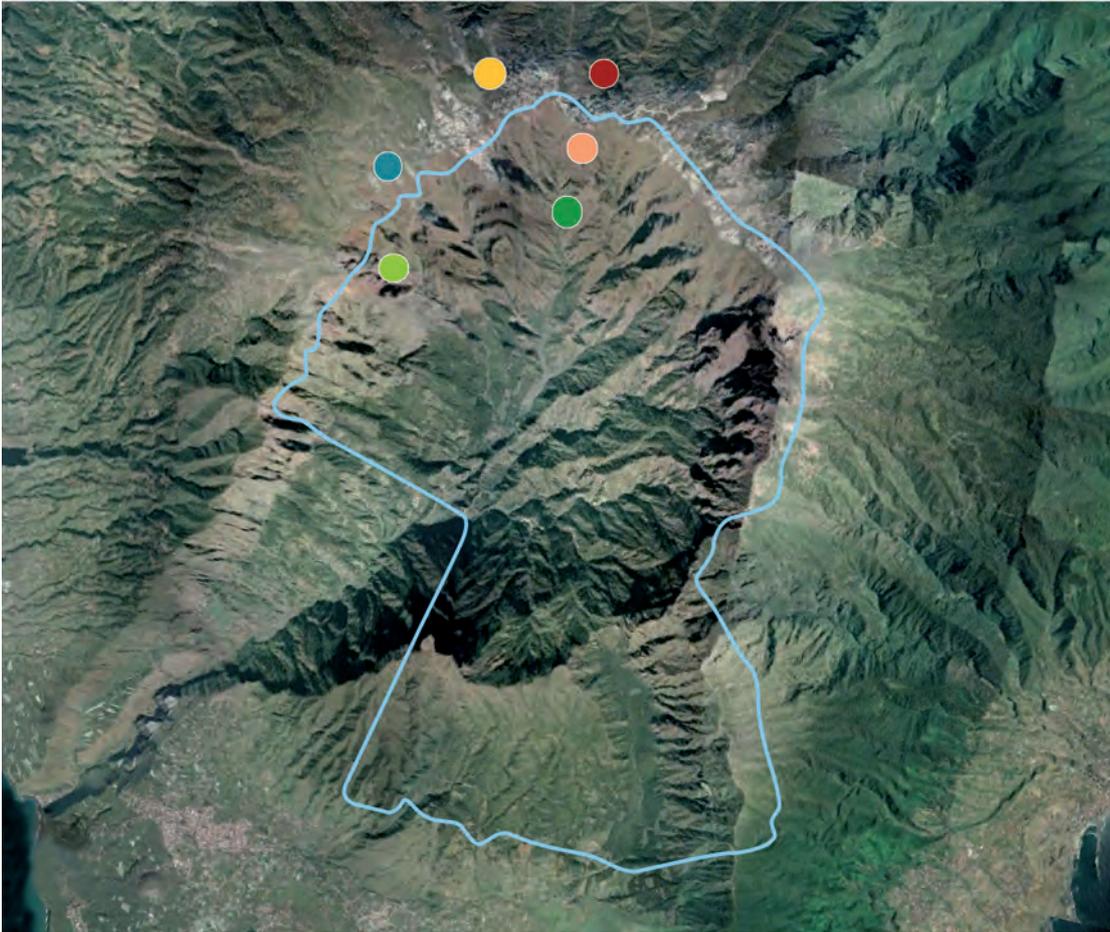
Silene nocteolens es una planta herbácea, endémica del Teide (Tenerife) de la que hasta el momento se conocen sólo dos poblaciones se-

paradas por aproximadamente seis kilómetros (Fig. 1), mientras que *Sorbus aria* es una especie arbórea distribuida en casi toda Europa y parte de Asia que en Canarias solamente se ha reportado para La Palma (Fig. 2) y Tenerife (Fig. 3) ya que crece a determinada altura; además, sus individuos son muy pocos y se encuentran bastante separados entre

Figura 2. Ubicación de *Sorbus aria* en el Parque Nacional de la Caldera de Taburiente

Localidades Naturales

- | | |
|--------------------------|------------------------------|
| ■ Curva del Observatorio | ■ Parcela Grande |
| ■ Los Andenes | ■ Espigón del Norte |
| ■ Espigón de Roque | ■ El Espigón |
| | □ P.N. Caldera de Taburiente |



sí, lo que dificulta su reproducción cruzada.

En esta investigación el objetivo principal fue cuantificar la variabilidad genética (diversidad) existente en las poblaciones naturales de *S. nocteolens* y *S. aria* del archipiélago canario, determinar cuán parecidas son las poblaciones de cada especie entre sí (diferenciación genética) y averiguar la organización espacial de sus genotipos (estructuración genética). Así, esperamos contribuir a la Biología de la Con-

servación de estas especies vegetales canarias a través del establecimiento de programas de conservación genética.

Materiales y métodos

Recolección de muestras

Se tomaron unas cuantas hojas de cada planta y se almacenaron en bolsas de cierre hermético con gel de sílice para deshidratarlas y conservarlas hasta la extracción de su ADN.

En el caso de *Silene nocteolens* se contó con muestras de 471 individuos procedentes tanto de las dos poblaciones naturales existentes (Montaña Blanca y Pico Viejo) como de plántulas germinadas (201 descendientes) de semillas recolectadas a partir 14 plantas madres (12 de Montaña Blanca y 2 de Pico Viejo) (Tabla 1, Fig. 4).

Para *Sorbus aria* se analizaron 195 muestras. De La Palma se han registrado 46 ejemplares de cinco localidades separadas geográficamente.

Figura 3. Ubicación de *Sorbus aria* en el Parque Nacional del Teide

Localidades Naturales

- Los Cachorros
- Guajara
- P.N. El Teide



Las 4 muestras de Tenerife provienen de las dos únicas localidades descritas en esta isla (Guajara y Los Cachorros). Finalmente, dispusimos de muestras recogidas en los Parques Nacionales de Cabañeros, Aigüestortes, Picos de Europa y Sierra Nevada (Tabla 2).

Análisis genético

Los microsatélites (SSR), la base de este estudio, son marcadores hipervariables con alta reproducibili-

dad; pero con la desventaja de que deben ser caracterizados para cada taxón específico, lo que encarece el proceso.

Una vez obtenido el ADN de cada planta y seleccionados los cebadores más eficientes, se procedió a la multiplicación del ADN (amplificaciones) a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las condiciones generales de amplificación fueron: 3 min de desnaturalización a 94 °C; 30-35 ciclos de 45 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s

de hibridación a la temperatura (T_m) correspondiente y 45 s de elongación a 72 °C; seguidos de 5 a 30 min de elongación a 72 °C.

Procesamiento de datos

Los productos de la amplificación del ADN fueron analizados usando un Secuenciador Genético ABI 3130XL y el genotipado fue determinado utilizando los programas GENSCAN 2.02 y GENOTYPER 1.1 (Applied Biosystems, Inc.). Los datos obtenidos

Tabla 1. Número de individuos y parámetros genéticos y reproductivos de *Silene nocteolens* por estadio y población

POBLACIÓN	ESTADIO	CÓDIGO	N°	A	H _o	H _e	P	F _{IS}	Me
Montaña Blanca	Plántulas	MB-PL	159		0,557	0,654	100%	0,185	0,503
	Juveniles	MB-JU	26	7,00	0,546	0,667	100%	0,200	0,313
	Virginales	MB-VI	24	7,50	0,574	0,686	100%	0,160	0,308
	Vegetativos	MB-VE	26	7,33	0,616	0,701	100%	0,098	0,237
	Reproductores Jóvenes	MB-RJ	26	6,33	0,615	0,667	100%	0,100	0,129
	Reproductores Adultos	MB-RA	37	6,17	0,631	0,698	100%	0,075	0,129
Total MB			293	9,50	0,578	0,683	100%		
Pico Viejo	Plántulas	PV-PL	42		0,421	0,581	100%	0,455	
	Juveniles	PV-JU	26	9,50	0,681	0,782	100%	0,121	
	Virginales	PV-VI	30	10,67	0,724	0,771	100%	0,063	
	Vegetativos	PV-VE	23	8,33	0,636	0,756	100%	0,178	
	Reproductores Jóvenes	PV-RJ	25	9,50	0,693	0,768	100%	0,103	
	Reproductores Adultos	PV-RA	27	9,83	0,656	0,756	100%	0,152	
Total PV			173	13,67	0,649	0,773	100%		
TOTAL			471	15,83	0,612	0,707	100%		

"N°" es el número de individuos analizados por estadio o población. Número medio de alelos por locus (A), Heterocigocidad observada (H_o), Heterocigocidad esperada (H_e), Porcentaje de loci polimórficos (P), Coeficiente de endogamia [$F_{IS} = 1 - (H_o^{estadio} / H_e^{total})$] e Índice de mortalidad por estadio de vida (M_e).

para cada individuo y locus amplificado se incluyeron en una matriz de doble entrada (individuo/locus) para posteriormente introducirse en el programa TRANSFORMER 3B.01 (Caujapé-Castells y Baccari-Rosas, 2005) que permite exportar los datos a otros programas de análisis genético.

Es importante destacar que, debido a su carácter triploide, en el caso de *Sorbus aria* hemos medido la diversidad en términos del número total de fenotipos alélicos en las poblaciones. Como consecuencia, algunos de los análisis necesitaron la utilización de un programa distinto para cada especie. La Tabla 3 detalla los recursos informáticos utilizados en la caracterización genética de las especies estudiadas.

Resultados

Hemos desarrollado cebadores específicos para ambos taxones en estudio y tras numerosas pruebas se han definido aquellos microsátelites funcionales, optimizando las condiciones para su uso en cada especie, publicándose en la revista internacional *Conservation Genetics Resources* (González-González et al., 2010).

Silene Nocteolens

En general, la especie mostró un alto grado de diversidad genética ($A = 15,83$ y $H_e = 0,707$). Los valores de la población de Pico Viejo fueron superiores a la detectados en Montaña Blanca tanto en riqueza alélica (A) como en heterocigocidad esperada (H_e), pero el polimorfismo (P) fue del 100% en todos los casos (Tabla 1).

El dendrograma UPGMA (Fig. 5) que muestra la separación de las

poblaciones de *S. nocteolens* con un 97% de fortaleza. En Montaña Blanca los reproductores jóvenes se separan del resto de los estadios (con 57% de fortaleza), mientras que en Pico Viejo son los juveniles y virgina-



Tabla 2. Número de muestras y parámetros genéticos de *Sorbus aria* por localidad

LOCALIDAD	CÓDIGO	LUGAR	Nº	NF	H	P
Guajara y Los Cachorros	GYCT	Tenerife	4	1	0,004	0,72%
Curva del Observatorio	COBP	La Palma	3	2	0,004	1,45%
El Espigón y Espigón del Roque de Los Muchachos	EYMP	La Palma	6	10	0,024	7,25%
La Parcela Grande	PAGP	La Palma	5	5	0,015	3,62%
Los Andenes	LANP	La Palma	29	15	0,039	10,87%
El Espigón del Norte	EPNP	La Palma	3	0	0,000	0,00%
Canarias			50	28	0,056	20,29%
Parque Nacional Cabañeros	PNCA	Península	6	6	0,014	4,35%
Parque Nacional Aigüestortes	PNAI	Península	36	83	0,093	60,14%
Parque Nacional Picos de Europa	PNPE	Península	51	97	0,097	70,29%
Parque Nacional Sierra Nevada	PNSN	Península	52	63	0,119	45,65%
Península			145	131	0,127	94,93%
TOTAL			198	138	0,149	100,00%

"Nº" es el número de individuos analizados por estadio o población. Número de fragmentos polimórficos (NF), Diversidad genética (H), Porcentaje de loci polimórficos (P)

les quienes se disgregan del resto de los individuos y con mayor fuerza (72%).

En términos generales, la diferenciación genética obtenida mediante el coeficiente de F_{ST} entre las poblaciones de *Silene nocteolens* fue bastante baja (0,053). Valores de F_{ST} por

debajo de 0,15 representan una escasa diferenciación genética; entre 0,15 y 0,25 indican que las poblaciones se encuentran considerablemente diferenciadas y si las cifras son superiores a 0,25 se consideran poblaciones fuertemente diferenciadas genéticamente (Sosa et al., 2002).

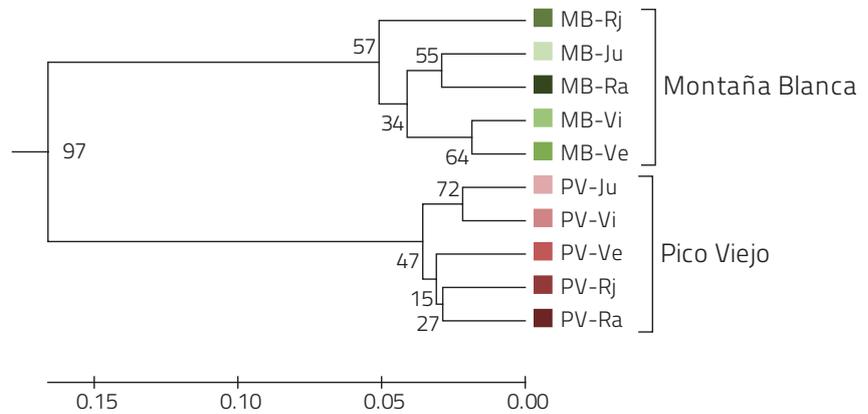
Los datos obtenidos oscilaron entre 0,006 y 0,080 (Tabla 4) y los valores medios confieren a Montaña Blanca un coeficiente de diferenciación algo mayor ($\bar{F}_{ST} = 0,017$) que el encontrado en Pico Viejo ($\bar{F}_{ST} = 0,009$).

Por su parte, el flujo genético general entre las poblaciones fue de



Figura 4. Germinación de semillas de *Silene nocteolens* en invernadero procedentes de Pico Viejo (izquierda) y Montaña Blanca (derecha)

Figura 5. Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) entre los estadios de vida y poblaciones de *Silene nocteolens*



$N_m = 4,486$ y varió de 2,877 entre los vegetativos de Pico Viejo y los reproductores jóvenes de Montaña Blanca (PV-Ve/MB-Rj) a 41,105 entre los virginales y juveniles de Pico Viejo (PV-Vi/PV-Ju). Puesto que todos los valores son mayores que uno, se deduce que existe un gran flujo genético entre ambas poblaciones.

Un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en los valores de F_{ST} muestra de manera gráfica (Fig. 6) que a pesar de la poca diferenciación genética detectada, se trata de dos poblaciones distintas. Las coordenadas explican el 84,77% de la varianza.

Mediante el análisis bayesiano (que incluyó 256 individuos, 6 loci y

2 poblaciones) se pudieron asignar los individuos a cada una de las dos poblaciones, o lo que es lo mismo, las dos poblaciones de *Silene nocteolens* están claramente definidas (Fig. 7) desde el punto de vista genético.

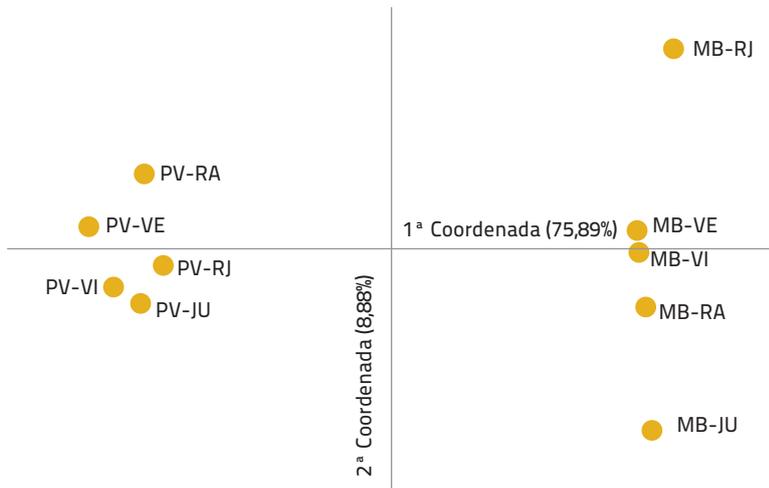
El coeficiente de endogamia (F_{IS}) mide la magnitud de la homocigosis en relación con la expectativa al asu-

mir el apareamiento al azar dentro de una población. Para todos los estadios de vida y en ambas poblaciones los valores de F_{IS} fueron positivos, lo que implica que existe un defecto de heterocigóticos (o sea, un exceso de homocigóticos) en cada uno de ellos (Tabla 1). Hemos notado cierto grado de relación entre estos

Tabla 3. Programas informáticos utilizados en la caracterización genética de las poblaciones naturales estudiadas

ANÁLISIS	PROGRAMA INFORMÁTICO	REFERENCIA	PÁGINA WEB
Genotipado	GenScan 2.02 y GenoTyper 1.1	Applied Biosystems, Inc.	-
Transformación de datos	Transformer 3b.01	Caujapê-Castells y Baccari-Rosas, 2005	• http://www.demiurge-project.org
Índices de variabilidad, Identidades genéticas y Distancias genéticas	PopGene 3.2	Yeh et al., 1997	• http://www.ualberta.ca/~fyeh/
UPGMA y NJ	Populations 1.2.30Beta PopTree 2 Rapidplot 3.0 Philip 3.5C Mega 4	Langella, 2005 Takezaki et al., 2010 Black, 1995 Felsenstein, 1993 Kumar et al., 2001	• http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/ • http://homes.bio.psu.edu/people/faculty/nei/software.htm • http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/data.2.html • http://www.be.embnnet.org/phylihelp/phylip.html • http://www.megasoftware.net/
Bayesiano	Structure 2.2	Falush et al., 2007	• http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html
Hardy-Weingberg	GenePop V4 Arlequin 3.11	Rousset, 2008 Excoffier et al., 2005	• http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm • http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/Arlequin35Updates.html
PCoA y Coeficientes de diferenciación	GeneAEx 6.4 Arlequin 3.11	Peakall y Smouse, 2006 Excoffier et al., 2005	• http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAEx/genalex_download.php • http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/Arlequin35Updates.html
Correlación y regresión	PAWS Statistics 18	IBM Company, Chicago, IL	-
Test de alelos nulos	Micro-Checker	Oosterhout et al., 2004	• http://www.microchecker.hull.ac.uk/
Sistema de cruzamiento	MLTR	Ritland, 2002	• http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html
Secuenciación	BioEdit 5.0.6	Hall, 2001	• http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html

Figura 6. Análisis de Coordenadas Principales basado en los valores de F_{ST} para las poblaciones naturales de *Silene nocteolens*



resultados y los índices de mortalidad registrados para esta especie ya que al cruzar los valores de endogamia con la tasa de mortalidad de las poblaciones (Fig. 8) observamos re-

sultados significativos entre estas variables para Montaña Blanca ($R^2 = 0,6721$; $P = 0,04$); pero no significativos para Pico Viejo ($R^2 = 0,5289$; $P = 0,09$).

Finalmente, los parámetros del sistema de cruzamiento revelaron una proporción de autofecundación de 29,7% ($t_m = 0,703$) y una paternidad efectiva ($1/r_p$) de 6,329 en el caso de Montaña Blanca; esto último sugiere que para cada planta madre de esta población existen aproximadamente 6 padres distintos que logran una fecundación efectiva. En Pico Viejo los resultados fueron algo mayores (34,7%; $t_m = 0,653$ y $1/r_p = 7,692$).

Figura 7. Diagrama de barras para los agrupamientos inferidos (K = 2) con el análisis bayesiano para *Silene nocteolens*

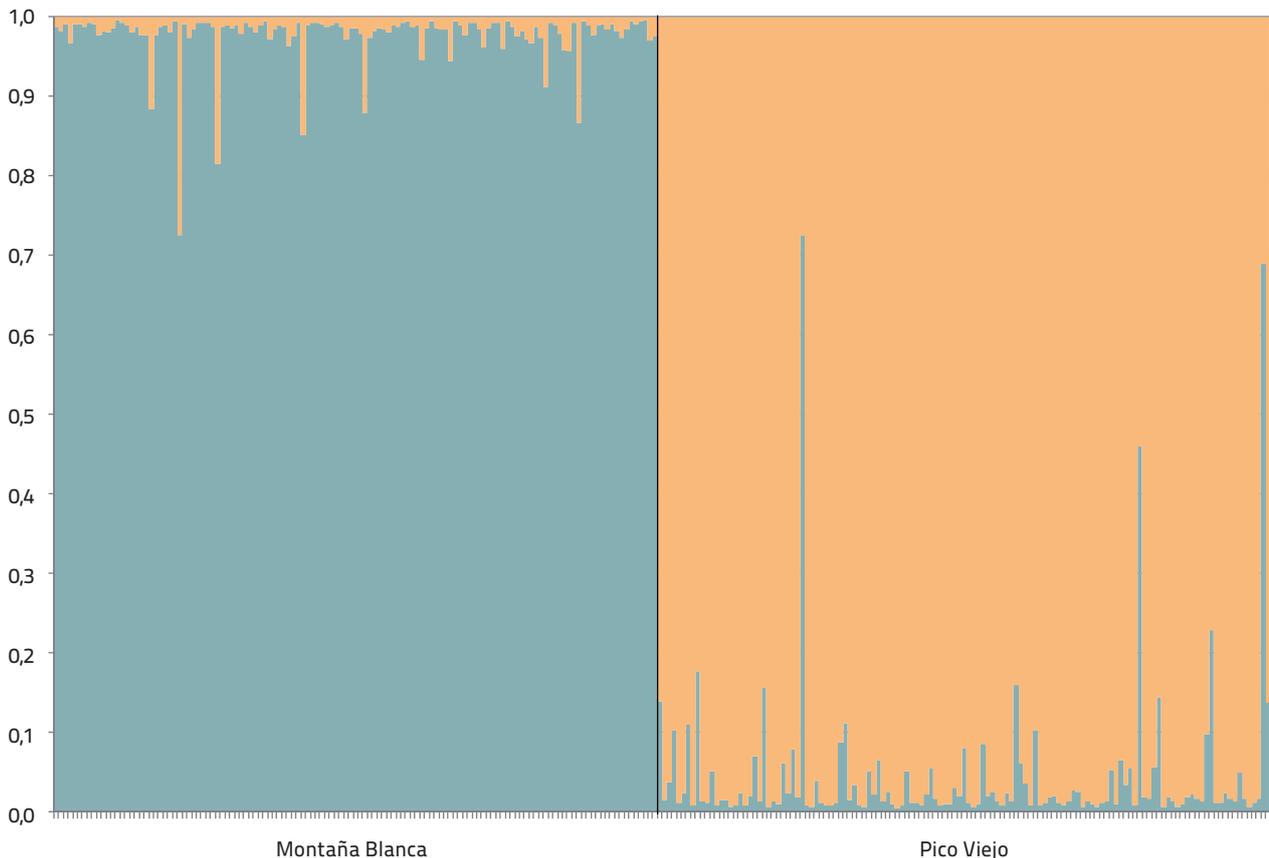
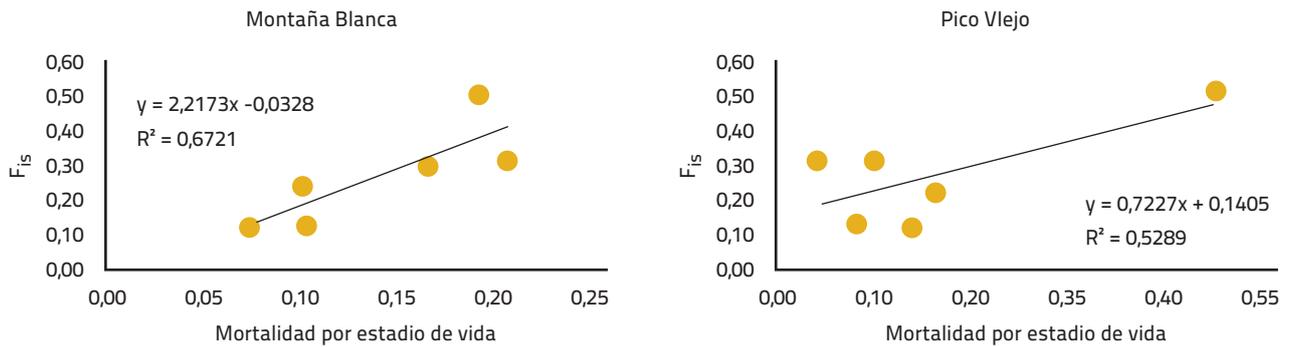


Figura 8. Correlación entre la tasa de mortalidad y el coeficiente de endogamia (homocigosis) en *Silene nocteolens*


Sorbus aria

Los valores de diversidad genética estimados para las muestras de *Sorbus aria* de Canarias revelan una baja variabilidad genética (Tabla 2). Los resultados muestran casi cinco veces más fragmentos polimórficos (NF) en la Península que los encontrados para las ejemplares cana-

rios. También son mayores los valores para heterocigosidad (H) y el porcentaje de loci polimórficos (P). La variabilidad genética detectada en las poblaciones de la Península están significativamente relacionadas con el tamaño de la muestra ($R^2 = 0,93$).

El dendrograma UPGMA basado en las frecuencias genéticas entre

poblaciones (Fig. 9) muestra una clara disgregación de las muestras de *Sorbus aria* procedentes del archipiélago canario con respecto a los ejemplares de la Península. Con excepción de la separación entre los parques nacionales de Sierra Nevada y Picos de Europa que presentan una fortaleza del 74%, todas las poblaciones manifiestan una defi-

Tabla 4. Coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) y flujo genético (N_m) para las poblaciones de *Silene nocteolens*. En rojo los menores valores y en amarillo los valores más altos

	MB-JU	MB-VI	MB-VE	MB-RJ	MBRA	PV-JU	PV-VI	PV-VE	PV-RJ	PV-RA
MB-JU		11,842	14,925	8,490	18,301	3,587	3,427	2,997	4,004	3,448
MB-VI	0,021		30,601	11,588	15,982	4,013	3,685	3,356	4,396	3,857
MB-VE	0,016	0,008		15,009	21,477	4,026	3,876	3,485	4,745	4,360
MB-RJ	0,029	0,021	0,016		13,339	3,172	3,013	2,877	3,575	3,575
MBRA	0,013	0,015	0,012	0,018		4,079	3,710	3,368	4,327	3,816
PV-JU	0,065	0,059	0,058	0,073	0,058		41,105	24,186	28,184	21,437
PV-VI	0,068	0,064	0,061	0,077	0,063	0,006		26,071	28,615	26,625
PV-VE	0,077	0,069	0,067	0,080	0,069	0,010	0,009		26,447	26,104
PV-RJ	0,059	0,054	0,050	0,065	0,055	0,009	0,009	0,009		28,212
PV-RA	0,068	0,061	0,054	0,065	0,061	0,012	0,009	0,009	0,009	

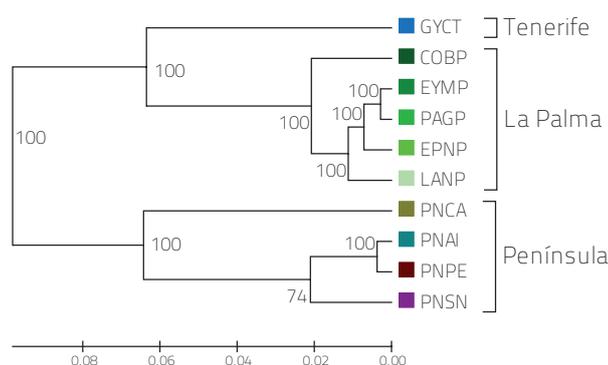
Flujo genético (arriba) y coeficiente de diferenciación genética (abajo)

nición absoluta (100%). El diagrama Neighbour-joining (Fig. 10) corrobora estos resultados a nivel individual.

En términos generales la diferenciación genética media para la especie fue considerablemente alta ($\bar{F}_{ST} = 0,562$) (Tabla 5). Si consideramos la procedencia de las muestras, se observa que $\bar{F}_{ST} = 0,398$ para las poblaciones de La Palma y $\bar{F}_{ST} = 0,362$ para las peninsulares. Puesto que se cuenta con solo una población de Tenerife, esta determinación no procede; sin embargo, al integrarla con las poblaciones de La Palma para formar el conglomerado "Canarias" se obtuvo un valor de $\bar{F}_{ST} = 0,552$.

Al comparar entre localidades se han obtenido valores de $\bar{F}_{ST} = 0,859$ (Tenerife / La Palma), $\bar{F}_{ST} = 0,640$ (Tenerife / Península) y $\bar{F}_{ST} = 0,614$ (La Palma / Península), en orden descendente. Entre Canarias y la Penín-

Figura 9. Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) entre las poblaciones de *Sorbus aria*



sula $\bar{F}_{ST} = 0,618$. El flujo genético (N_m) osciló desde 0,006 entre la población de Tenerife y la conformada por las muestras del Espigón del Norte en La Palma (GYCT – EPNP); hasta 3,969 entre el Espigón del Roque de los Muchachos (EYMP) y la Parcela Grande (PAGP), ambas de La Palma.

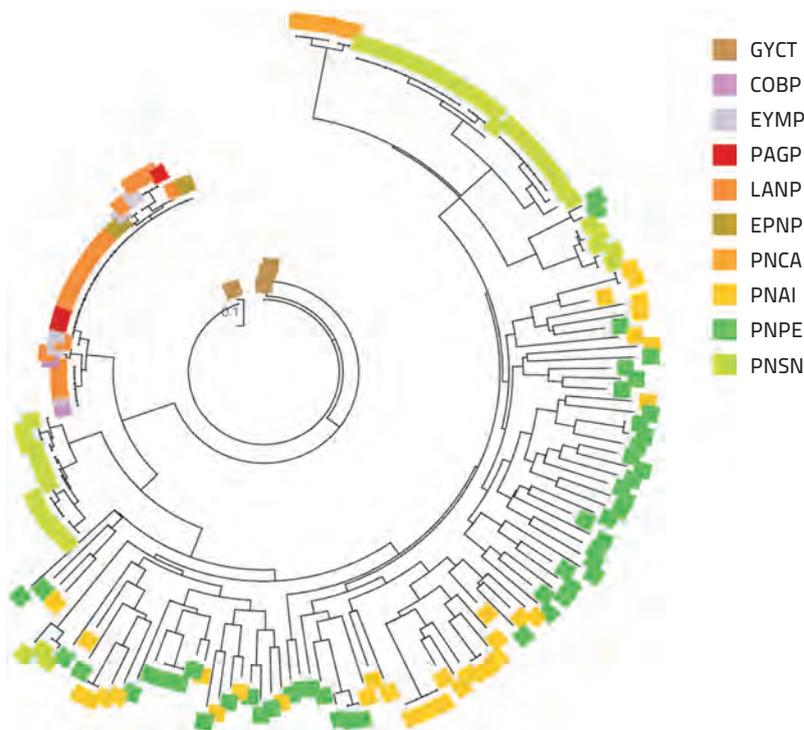
El análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias de Nei (1972) (Fig. 11) refleja gráficamente cómo las muestras de Canarias se separan de las peninsulares. Las coordenadas explican el 57,91% de la varianza. La base de datos para el análisis bayesiano

Tabla 5. Coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) y flujo genético (N_m) para las poblaciones de *Sorbus aria*. En rojo los menores valores y en amarillo los valores más altos

	GYCT	COBP	EYMP	PGAP	LANP	EPNP	PNCA	PNAI	PNPE	PNSN
GYCT		0,025	0,046	0,039	0,108	0,006	0,016	0,200	0,207	0,235
COBP	0,910		0,636	0,209	0,233	0,036	0,020	0,214	0,219	0,274
EYMP	0,845	0,282		3,969	0,447	0,215	0,023	0,232	0,240	0,314
PGAP	0,865	0,545	0,059		0,555	1,875	0,023	0,221	0,224	0,286
LANP	0,699	0,518	0,359	0,310		0,411	0,037	0,155	0,174	0,208
EPNP	0,975	0,875	0,537	0,118	0,378		0,019	0,266	0,260	0,305
PNCA	0,941	0,927	0,914	0,914	0,871	0,929		0,286	0,300	0,306
PNAI	0,556	0,538	0,519	0,531	0,617	0,484	0,466		2,193	0,435
PNPE	0,547	0,533	0,510	0,527	0,590	0,491	0,454	0,102		0,494
PNSN	0,515	0,477	0,443	0,467	0,546	0,451	0,449	0,365	0,336	

Flujo genético (arriba) y coeficiente de diferenciación genética (abajo)

Figura 10. Neighbour-joining individual para las poblaciones de *Sorbus aria*. Los códigos corresponden a las poblaciones de la Tabla 2



incluyó 195 individuos, 9 loci y 10 poblaciones de *Sorbus aria*; obteniéndose la máxima probabilidad de los datos en $K = 5$, sugiriendo que las poblaciones analizadas se pueden agrupar en 5 grupos. Como puede apreciarse en el histograma de barras (Fig. 12), existe una gran diferencia entre las muestras de *Sorbus aria* de Canarias (GYCT, COBP, EYMP, PAGP, EPNP y LANP) y las muestras peninsulares. En las muestras de la Península destaca la fuerte relación entre los individuos del Parque Nacional Aigüestortes (PNAI) y

los del Parque Nacional Picos de Europa (PNPE). Los individuos del Parque Nacional Cabañeros (PNCA) están algo emparentados con los primeros (PNAI) y, finalmente, los del Parque Nacional Sierra Nevada (PNSN) ostentan correspondencia con todas las poblaciones peninsulares muestreadas.

Discusión

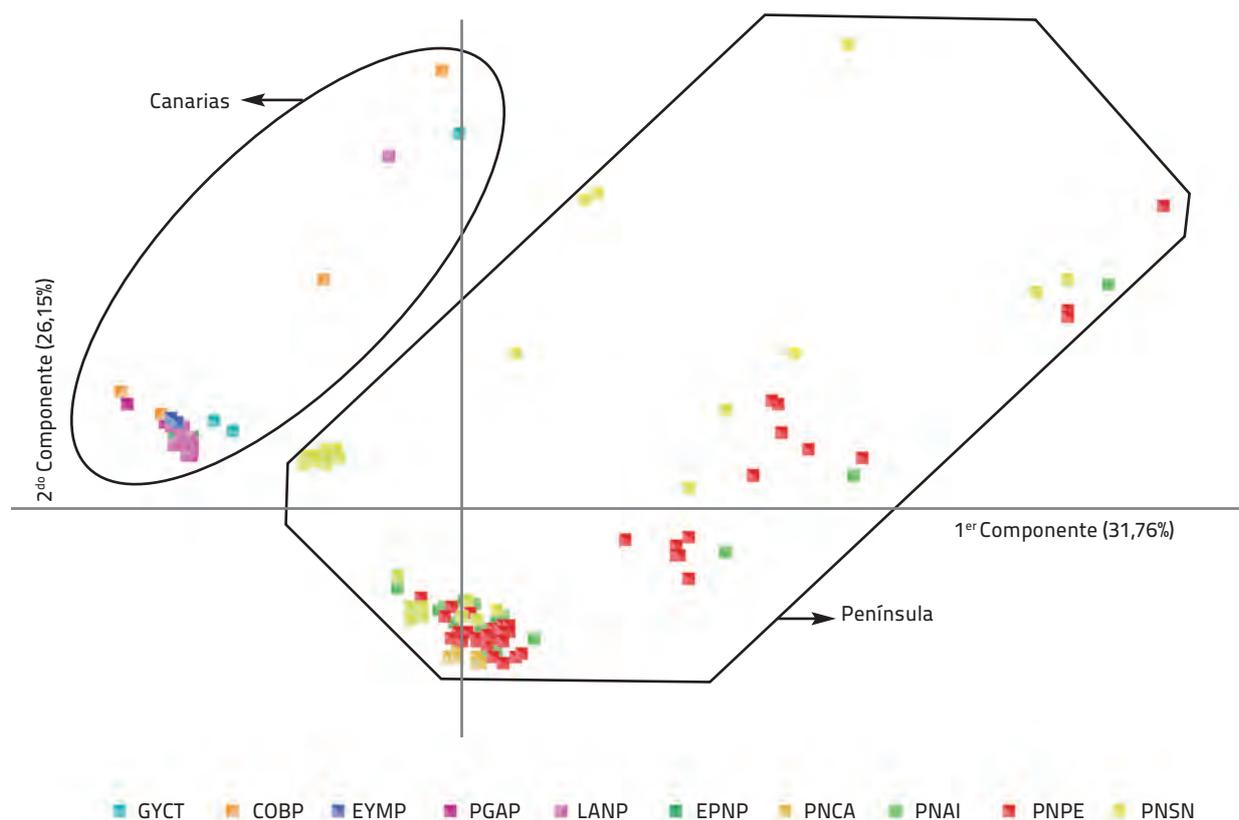
Gracias al desarrollo, optimización y utilización de cebadores específicos se ha logrado detectar la varia-

bilidad genética en *Silene nocteolens* y *Sorbus aria*. Existe una mayor diversidad genética en la población de Pico Viejo que en la de Montaña Blanca; esto puede estar relacionado con lo que Bañares et al. (2004) describieron como una "aparente estabilidad" reflejada por un lento proceso expansivo de la población de Montaña Blanca en los últimos años. También se encontró mayor diversidad genética en las muestras peninsulares de *S. aria* en comparación con las canarias. Esta diferenciación genética puede ser consecuencia de un cuello de botella reciente que posiblemente ha sufrido la especie en Canarias dando lugar a una separación genética de las mismas, aunque no descartamos la posibilidad de que *S. aria* haya sufrido la consecuencia de un efecto fundador.

La diferenciación genética en *S. nocteolens* fue muy baja ($F_{ST} = 0,053$) y, por ende, el flujo genético es considerablemente alto ($N_m = 4,486$); esto sugiere que las poblaciones pueden estar compartiendo información genética a pesar de la distancia. Por su parte, la diferenciación genética encontrada entre los ejemplares *S. aria* de Tenerife y La Palma desaconseja el movimiento de individuos de una isla a otra, con el propósito de evitar la ruptura de la cohesión y adaptaciones locales que puedan haberse desarrollado en cada isla de forma independiente.

Los parámetros del sistema de cruzamiento revelan valores de autotofecundación del orden del 32% en *S. nocteolens*; es decir, que la mayor

Figura 11. Análisis de Coordenadas Principales para las poblaciones naturales de *Sorbus aria*



parte de la descendencia se produce por apareamiento entre individuos no emparentados. Es factible que estemos observando un efecto de erosión de la depresión endogámica a través de diferentes estadios de vida ya que en las fases más jóvenes existe un importante número de individuos homocigóticos que no alcanzan el siguiente estadio vital; razón por la cual el grado de endogamia es menor en los estadios sucesivos. Así, los índices de endogamia se relacionan con la tasa de mortalidad entre estadios.

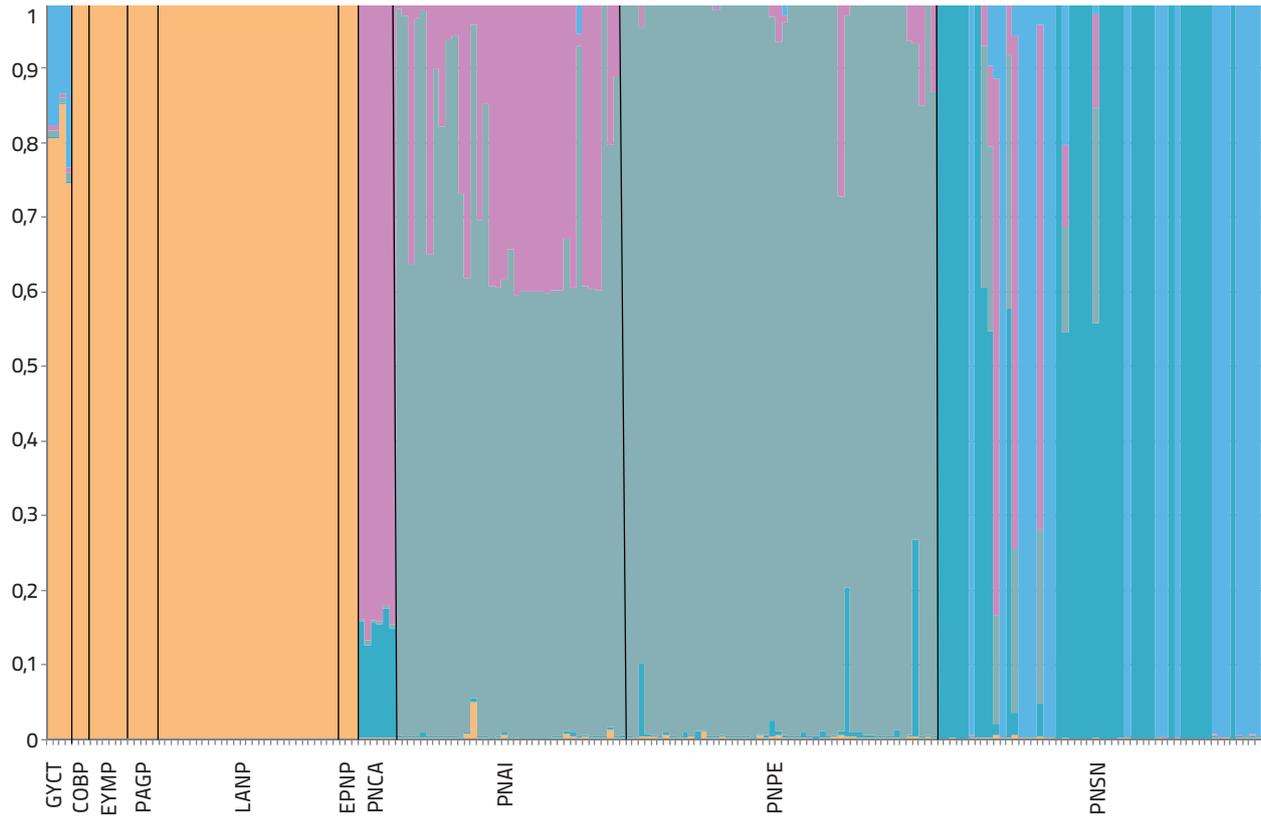
Finalmente, es posible que en Canarias (y en algunas muestras tri-

ploides peninsulares también) no estemos frente a *S. aria sensu stricto*, sino más bien delante de uno de los miembros triploides del "agregado *Sorbus aria*" descrito por Nelson-Jones et al. (2002) o de un híbrido entre estas especies. Por todo ello, consideramos que es imprescindible una revisión exhaustiva a nivel taxonómico de los ejemplares de *S. aria* presentes en los parques nacionales de Canarias antes de afrontar cualquier estrategia de conservación que fuese a emprenderse con este taxón en el archipiélago canario.

Conclusiones

1. Los microsatélites desarrollados para *S. nocteolens* y *S. aria* son útiles para identificar y diferenciar de forma objetiva la identidad genética de los individuos de estas especies.
2. Existe gran diversidad genética en las poblaciones de *S. nocteolens*. El bajo nivel de diferenciación genética sugiere abundante flujo genético entre sus dos únicas poblaciones.
3. La baja diversidad genética en las poblaciones canarias de *S. aria* y sus altos niveles de diferenciación

Figura 12. Diagrama de barras para las proporciones inferidas (K=5) con el análisis bayesiano en las poblaciones de *Sorbus aria*



genética desaconsejan la movilización de individuos entre islas.

4. Parece que *Silene nocteolens* se reproduce predominante por exogamia; los niveles de endogamia rondan el 30% y el exceso de ho-

mocigóticos merma a lo largo del ciclo de vida de las plantas, presumiblemente por selección natural.

5. La información genética aquí brindada debería considerarse en el

desarrollo de los planes de recuperación de estas especies amenazadas del Archipiélago Canario.

Agradecimientos

A Ángel Bañares, Manuel Marrero, Eduardo Carqué y Manuel Izquierdo (Parque Nacional del Teide) y a Álvaro Rodríguez Felipe (Parque Nacional Caldera del Taburiente); también al personal de los parques nacionales de Cabañeros, Aigüestortes, Picos de Europa y Sierra Nevada por su asistencia en la recolección de muestras

y al Dr. Gerard Oosteimeijer por su cooperación en el análisis de los datos de *Silene nocteolens*. Un especial agradecimiento al Dr. Pedro A. Sosa (Director de Investigación y de Tesis), Dr. Miguel Ángel González-Pérez (Co-Director de Tesis) y Elisabet Rivero Santana (Técnico de Laboratorio) por sus horas de trabajo y su amistad.

Referencias

- Akkak, A.; Scariot, V.; Torrello Marinoni, D., Boccacci, P.; Beltramo, C. y R. Botta (2009): "Development and Evaluation of Microsatellite Markers in Phoenix dactylifera L. and their others *Phoenix* Species", *Biologia Plantarum*, 53, 164-166.
- Bañares, A.; Blanca, G.; Güemes, J.; Moreno, J.C. y S. Ortiz (2004): *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*, Madrid, España.
- Black IV WC (1995): "FROTRAN Programs for Analysis of RAPD-PCR Markers in Populations", *Colorado State University*, Colorado, EEUU.
- Caujapé-Castells, J. y M. Baccarani-Rosas (2005): "Transformer-3: a Program for Analysis of Molecular Population Genetic Data", *EXEGEN software*, Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo".
- Excoffier, L.; Laval, G. y S. Schneider (2005) "Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis", *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Falush, D.; Stephens, M. y J.K. Pritchard (2007): "Inference of Population Structure using Multilocus Genotype Data: Dominant Markers and Null Allele", *Molecular Ecology Note*, 7, 574-578.
- Felsenstein, J. (1993): "PHYLIP: Phylogeny Inference Package, Versión 3.5C", *Department of Genetic*, University of Washington, Seattle, EEUU.
- Fernández-Palacios, J.M. y J.L. Martín Esquivel (2001): "Las Islas como Experimento de Laboratorio", en Fernández Palacios, J.M. y J.L. Martín Esquivel (eds.): *Naturaleza de las Islas Canarias: Ecología y Conservación*. Santa Cruz de Tenerife, Publicaciones Turquesa S.L., págs. 39-44.
- González-González, E.A.; González-Pérez, M.A.; E. Rivero y P.A. Sosa (2010): "Isolation and Characterization of Microsatellite Loci in *Sorbus aria* (Rosaceae)", *Molecular Ecology Resources*, 2, 341-343.
- Hall, T. (2001) "BioEdit version 5.0.6". *Department of Microbiology*, North Carolina State University.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B. y M. Nei (2001): "MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software", *Bioinformatics*, 17, 1244-1245.
- Langella, O. (2005): "Populations 1.2.30". *Laboratoire Populations, Génétique et Evolution*, Centre National de la Recherche Scientifique, Francia.
- Nei, M. (1972): "Genetic Distance between Populations", *American Naturalist*, 106, 283-292.
- Nelson-Jones, E.B.; Briggs, D. y A.G. Smith (2002): "The Origin of Intermediate Species of the Genus *Sorbus*", *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 953-963.
- Oostermeijer, J.G.B.; Luijten, S.H. y J.C.M. den Nijs (2003): "Integrating Demographic and Genetic Approaches in Plant Conservation", *Biological Conservation*, 113, 389-398.
- Oosterhout, C.V.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M y P. Shipley (2004) "MICRO-CHECHER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data". *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- Peakall, R. y P.E. Smouse (2006): "GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel", *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Ritland, K. (2002): "Extensions of Models for the Estimation of Mating Systems Using n Independent loci", *Heredity*, 88, 221-228.
- Rousset, F. (2008) "GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux". *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- Sosa, P.A. (2001): "Genes, Poblaciones y Especies", en Fernández Palacios, J.M. y J.L. Martín Esquivel (eds.): *Naturaleza de las Islas Canarias: Ecología y Conservación*. Santa Cruz de Tenerife, Publicaciones Turquesa S L, págs. 151-155.
- Sosa, P.A.; Batista, F.; González, M.A. y N. Bouza (2002): "La Conservación Genética de las Especies Amenazadas": en Bañares, A. (eds.): *Biología de la conservación de plantas amenazadas*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España, págs. 133-160.
- Takezaki, N.; Nei, M. y K. Tamura (2010): "POPTREE2: Software for Constructing Population Trees from Allele Frequency Data and Computing Other Population Statistics with Windows Interface", *Molecular Biology and Evolution*, 27, 747-752.
- Yeh, F.C.; Yang R.C.; Boyle T.; Ye Z.H. y J.X. Mao (1997): "Popgene, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis", *Molecular Biology and Biotechnology Centre*, University of Alberta, Alberta.

Glosario

Alelo: cada una de las formas en que puede presentarse un gen en un determinado locus de cromosomas homólogos.

Cebador: pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN.

Dendrograma: diagrama en forma de árbol que organiza los datos en subcategorías que a su vez se dividen en otras hasta llegar al nivel de detalle deseado.

Efecto fundador: pérdida de la variación genética que se produce cuando una nueva población se forma a partir de un número muy pequeño de individuos provenientes de una población más grande.

Endémico: taxón biológico que se halla exclusivamente en determinado bioma.

Endogamia: reproducción entre individuos emparentados; contrario a exogamia.

Fenotipo: la expresión del genotipo; este último es el código de instrucciones.

Flujo genético: transferencia de alelos de una población a otra.

Heterocigoto: célula o individuo diploide con alelos diferentes en uno o más loci de sus cromosomas homólogos; contrario al homocigoto que presenta alelos iguales.

Locus: posición que ocupa un gen en el genoma. El plural es loci.

Microsatélites: secuencias de ADN en las que un fragmento (de uno a seis nucleótidos) se repite de manera consecutiva; también se les llama SSR.

Marcador molecular: fragmentos específicos de ADN que pueden ser identificados en todo el genoma.

Neighbour-Joining: (NJ) algoritmo de agrupamiento de arriba a abajo que no asume la existencia de un reloj molecular.

Nucleótido: molécula constituida por una base nitrogenada, una pentosa y un grupo de ácido fosfórico. Unidad básica que compone los ácidos nucleicos (ADN y ARN).

Polimorfismo: locus genético que está presente en dos o más alelos distintos, de forma que el alelo más raro tiene una frecuencia mayor o igual a 1% (0,01) en la población general.

Reloj molecular: hipótesis que afirma la existencia de una relación directa entre el tiempo y la cantidad de cambios evolutivos.

Taxón: término general para cada una de las categorías taxonómicas, como la especie, clase, orden o división.

Triploide: célula u organismo con tres complementos cromosómicos, de forma que posee un número total de cromosomas que es triple del haploide (3N).

UPGMA: (siglas de "Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means") algoritmo de agrupamiento de abajo a arriba que recibe una matriz de distancias y a partir de ella genera un dendrograma. Asume la existencia de un reloj molecular evolutivo.

Reseña curricular

Edna Amada González González nació en Panamá, es licenciada en Biología Ambiental por la Universidad de Panamá y obtuvo el Máster en Ciencias Ambientales por la Universidad Tecnológica de Panamá. Actualmente forma parte del grupo de investigación "Biogeografía, Conservación y Territorio" y se encuentra finalizando su tesis doctoral en la ULPGC bajo el título "Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas".

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar, Campus Tafira
 E-mail: edna.gonzalez101@alu.ulpgc.es
 Teléfono: 928454543
 Fax: 928452922

Pedro A. Sosa nació en Gran Canaria y es licenciado en Biología por la Universidad de La Laguna. Profesor catedrático en el departamento de Biología de la ULPGC, del que también fue director; actualmente lidera el grupo de investigación "Biogeografía, Conservación y Territorio" fungiendo como investigador principal de varios proyectos de conservación genética en desarrollo.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar, Campus Tafira
 E-mail: psosa@dbio.ulpgc.es
 Teléfono: 928454550
 Fax: 928452922

Miguel Ángel González-Pérez nació en Tenerife y es licenciado en Biología por la Universidad de La Laguna. Obtuvo el premio extraordinario de Tesis Doctoral 2002 (Ciencias Experimentales) y actualmente es investigador científico en el grupo "Biogeografía, Conservación y Territorio" del departamento de Biología de la ULPGC.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar, Campus Tafira
 E-mail: mgonzalez@proyinves.ulpgc.es
 Teléfono: 928454543
 Fax: 928452922