



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Biología

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES
NATURALES DE ESPECIES VEGETALES AMENAZADAS: *ILEX PERADO*
SSP. LOPEZLILLOI (AQUIFOLIACEAE), *SILENE NOCTEOLENS*
(CARYOPHYLLACEAE) Y *SORBUS ARIA* (ROSACEAE)**



EDNA AMADA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Las Palmas de Gran Canaria
2011

D. JUAN LUIS GÓMEZ PINCHETTI, SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha hoy tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación a la tesis doctoral titulada “ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES DE ESPECIES VEGETALES AMENAZADAS: *ILEX PERADO* SSP. *LOPEZLILLOI* (AQUIFOLIACEAE), *SILENE NOCTOLENS* (CARYOPHYLLACEAE) Y *SORBUS ARIA* (ROSACEAE)”, presentada por la doctoranda D^a. Edna Amada González González y dirigida por los Doctores D. Pedro A. Sosa y D. Miguel Ángel González Pérez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, 30 de noviembre de 2011.

Fdo.: Juan Luis Gómez Pinchetti
Departamento de Biología
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

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

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES
DE ESPECIES VEGETALES AMENAZADAS: *ILEX PERADO* SSP. *LOPEZLILLOI*
(AQUIFOLIACEAE), *SILENE NOCTEOLENS* (CARYOPHYLLACEAE) Y
SORBUS ARIA (ROSACEAE)

Tesis Doctoral presentada por Dña. Edna Amada González González

Dirigida por el Dr. Pedro Sosa Henríquez y el Dr. Miguel Ángel González Pérez

El Director,

El Director,

La Doctoranda,

Las Palmas de Gran Canaria, 30 de noviembre de 2011.

Pedro Sosa Henríquez, Catedrático de Botánica del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y Miguel Ángel González Pérez Doctor en Biología y Personal Investigador del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria;

Hacen constar:

Que el trabajo de investigación “ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES DE ESPECIES VEGETALES AMENAZADAS: *ILEX PERADO* SSP. *LOPEZLILLOI* (AQUIFOLIACEAE), *SILENE NOCTEOLENS* (CARYOPHYLLACEAE) Y *SORBUS ARIA* (ROSACEAE)” realizado bajo nuestra dirección por la licenciada en Biología Ambiental Dña. Edna Amada González González, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Fdo.: Pedro Sosa Henríquez

Fdo.: Miguel Ángel González Pérez

Las Palmas de Gran Canaria, 30 de noviembre de 2011.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Biología

TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES
DE ESPECIES VEGETALES AMENAZADAS: *ILEX PERADO* SSP. *LOPEZLILLOI*
(AQUIFOLIACEAE), *SILENE NOCTEOLENS* (CARYOPHYLLACEAE) Y
SORBUS ARIA (ROSACEAE)

EDNA AMADA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

2011

*A mi familia que tanto añoro
por su amor y apoyo a través de la distancia.*

Agradecimientos

- ✿ Al Departamento de Biología y a la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por proporcionar los recursos y el lugar de trabajo para la realización de esta investigación.
- ✿ A mis tutores, Dr. Pedro Sosa Henríquez y Dr. Miguel Ángel González Pérez, que con toda dedicación y paciencia me han enseñado las técnicas de laboratorio, los principios esenciales de la Genética de la Conservación y, además, han pulido mis manuscritos.
- ✿ Al Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación y a la Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo que han depositado su confianza en mí al sufragar mis estudios a través de una beca MAEC-AECID.
- ✿ Al Programa de Mecenazgo Universitario INNOVA Canarias 2020[®] por la concesión de una Ayuda a mi investigación, especialmente a Nogal Metal, S.L y Vidrieras Canarias, S.A. por su patrocinio.
- ✿ Al Dr. Takeshi Torimaru por su cooperación tan desinteresada al compartir información no publicada sobre los microsátélites desarrollados para *Ilex leucoclada*.
- ✿ A Ángel Fernández y Cito Chinaea (Parque Nacional de Garajonay), a Manuel Marrero, Eduardo Carqué y Manuel Izquierdo (Parque Nacional del Teide) y a Álvaro Rodríguez Felipe (Parque Nacional de la Caldera de 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.
- ✿ A Nancy Cabanillas, Alicia Escandell, Juan Ojeda, Elisabeth Rivero y Carolina Medina por su colaboración en el muestreo y la recolección de datos de campo.

- ✿ Al Dr. Gerard Oostermeijer por brindarnos su cooperación tanto en campo como en el análisis de los datos de *Silene nocteolens*.
- ✿ A Agustín Naranjo por su cooperación en campo y por la creación del mapa de distribución de las muestras de *Silene nocteolens*.
- ✿ Al Dr. Francisco Torrado por su ayuda en el conocimiento del complejo geológico Teide – Pico Viejo.
- ✿ Al Dr. Arnoldo Santos-Guerra por la revisión de la taxonomía de *Silene*.
- ✿ A la Dra. Pilar García por ayudarnos en la clonación de *Sorbus aria*.
- ✿ A todos los becarios y el resto del personal investigador del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. De manera muy especial a Elisabet Rivero Santana, Técnico de Laboratorio, de quien recibí un gran respaldo en el procesamiento de las muestras.
- ✿ A mi familia por su amor y apoyo emocional: A mi padre por las palabras de aliento y motivación, a mi madre por sus consejos y por las horas de intercesión, a mi hermano y mi cuñada por escribirme y recordarme lo mucho que se enorgullecen de mí, a mi hermana por el contacto diario y buen humor... Fucho a todos!
- ✿ A mi abuelita postiza (Doña Gilma) por acompañar a mis viejos y recordarme en sus oraciones; a los pastores Suso y Hortencia y a la familia Pérez-Reyes por todas atenciones... muchas gracias.
- ✿ Pero por sobre todas las cosas al “Único y Sabio Dios” (Judas 1:25) que es “mi amparo, fortaleza y pronto auxilio en las tribulaciones” (Salmos 46:1); a quien debo todos mis logros sean grandes o pequeños.

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS	xxiii
------------------	-------

ÍNDICE DE FIGURAS	xxv
-------------------	-----

ANTECEDENTES	1
1.1. INTRODUCCIÓN	3
1.1.1. <i>CONSERVACIÓN GENÉTICA DE LA BIODIVERSIDAD VEGETAL</i>	4
1.1.2. <i>MARCADORES MOLECULARES</i>	7
1.2. GENÉTICA DE POBLACIONES	11
1.2.1. <i>VARIABILIDAD GENÉTICA</i>	12
1.2.1.1. RIQUEZA ALÉLICA	12
1.2.1.2. POLIMORFISMO	13
1.2.1.3. HETEROCIGOSIDAD OBSERVADA	14
1.2.1.4. HETEROCIGOSIDAD ESPERADA	14
1.2.2. <i>ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES</i>	15
1.2.2.1. EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG	16
1.2.2.2. ANÁLISIS DE AUTOCORRELACIÓN ESPACIAL	17
1.2.3. <i>DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE LAS POBLACIONES</i>	18
1.2.3.1. DISTANCIA GENÉTICA	18
1.2.3.2. COEFICIENTE DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y AMOVA	19
1.2.3.3. DENDROGRAMAS UPGMA Y NJ	21
1.2.3.4. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES	22
1.2.3.5. ANÁLISIS BAYESIANO	23
1.2.4. <i>SISTEMAS DE CRUZAMIENTO</i>	24
OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GENERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
EL COMPLEJO <i>ILEX</i>	31
3.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS	33

3.1.1.	<i>ILEX PERADO SSP. LOPEZLILLOI (G. KUNKEL) A. HANSEN & SUNDING</i>	34
3.1.2.	<i>ILEX PERADO SSP. PLATYPHYLLA (WEBB & BERTHEL.) TUTIN</i>	36
3.1.3.	<i>ILEX CANARIENSIS POIR.</i>	37
3.1.4.	<i>ILEX AZORICA GAND.</i>	39
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.2.1.	RECOGIDA DE MUESTRAS Y POBLACIONES	41
3.2.2.	ANÁLISIS GENÉTICOS	44
3.2.3.	ANÁLISIS DE DATOS	45
3.2.3.1.	GENOTIPADO	45
3.2.3.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	46
3.3.	RESULTADOS	48
3.3.1.	CEBADORES Y PROTOCOLOS FUNCIONALES	48
3.3.2.	NIVELES DE DIVERSIDAD GENÉTICA	49
3.3.2.1.	FRECUENCIAS ALÉLICAS	49
3.3.2.2.	VARIABILIDAD GENÉTICA	50
3.3.3.	ESTRUCTURA GENÉTICA EN LAS POBLACIONES	52
3.3.3.1.	EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG	52
3.3.4.	DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE LAS POBLACIONES	53
3.3.4.1.	IDENTIDAD Y DISTANCIA GENÉTICA	53
3.3.4.2.	COEFICIENTE DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y AMOVA	55
3.3.4.3.	UPGMA Y NJ	58
3.3.4.4.	ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES	60
3.3.4.5.	ANÁLISIS BAYESIANO	61
3.4.	DISCUSIÓN	63
3.4.1.	NATURALEZA CLÓNICA DE <i>ILEX PERADO SSP. LOPEZLILLOI</i>	63
3.4.2.	DIVERSIDAD GENÉTICA	64
3.4.3.	IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN GENÉTICA	69
<u>SILENE NOCTOLENS</u>		71
4.1.	SILENE NOCTOLENS WEBB & BERTHEL	73
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	79
4.2.1.	RECOGIDA DE MUESTRAS Y POBLACIONES	79
4.2.2.	ANÁLISIS GENÉTICOS	82
4.2.2.	ANÁLISIS DE DATOS	84
4.2.2.1.	GENOTIPADO	84

4.2.2.2.	DINÁMICA REPRODUCTIVA	84
4.2.2.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
4.3.	RESULTADOS	88
4.3.1.	CEBADORES Y PROTOCOLOS FUNCIONALES	88
4.3.2.	NIVELES DE DIVERSIDAD GENÉTICA	89
4.3.2.1.	FRECUENCIAS ALÉLICAS	89
4.3.2.2.	VARIABILIDAD GENÉTICA	90
4.3.3.	ESTRUCTURA GENÉTICA EN LAS POBLACIONES	92
4.3.3.1.	EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG	92
4.3.3.2.	ANÁLISIS DE AUTOCORRELACIÓN ESPACIAL	93
4.3.4.	DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE LAS POBLACIONES	96
4.3.4.1.	IDENTIDAD Y DISTANCIA GENÉTICA	96
4.3.4.2.	COEFICIENTE DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y AMOVA	97
4.3.4.3.	UPGMA	98
4.3.4.4.	ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES	99
4.3.4.5.	ANÁLISIS BAYESIANO	100
4.3.5.	DINÁMICA REPRODUCTIVA	103
4.4.	DISCUSIÓN	106
4.4.1.	DIVERSIDAD GENÉTICA	106
4.4.2.	DINÁMICA REPRODUCTIVA	111
4.4.3.	IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN GENÉTICA	114
<u>SORBUS ARIA</u>		117
5.1.	SORBUS ARIA (L.) CRANTZ	119
5.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	123
5.2.1.	RECOGIDA DE MUESTRAS Y POBLACIONES	123
5.2.2.	ANÁLISIS GENÉTICOS	123
5.2.3.	CLONACIÓN	126
5.2.1.1.	LIGADO	127
5.2.1.2.	TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS COMPETENTES	128
5.2.1.3.	AMPLIFICACIÓN DE COLONIAS	131
5.2.1.4.	SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN	132
5.2.4.	ANÁLISIS DE DATOS	133
5.2.4.1.	GENOTIPADO	133
5.2.4.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	134

5.3. RESULTADOS	136
5.3.2. CEBADORES FUNCIONALES SORBUS ARIA	136
5.3.3. CLONACIÓN	138
5.3.4. NIVELES DE DIVERSIDAD GENÉTICA	141
5.3.4.1. FRECUENCIAS ALÉLICAS	141
5.2.2.1. VARIABILIDAD GENÉTICA	142
5.3.5. ESTRUCTURA GENÉTICA EN LAS POBLACIONES	143
5.3.5.1. EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG	143
5.3.6. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE LAS POBLACIONES	144
5.3.6.1. IDENTIDAD Y DISTANCIA GENÉTICA	144
5.3.6.2. COEFICIENTE DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y AMOVA	145
5.3.6.3. UPGMA Y NJ	146
5.3.6.4. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES	149
5.3.6.5. ANÁLISIS BAYESIANO	149
5.4. DISCUSIÓN	151
5.4.1. TRIPLOIDÍA EN SORBUS ARIA	151
5.4.2. DIVERSIDAD GENÉTICA	157
5.4.3. CONSIDERACIONES PARA LA CONSERVACIÓN GENÉTICA	161
CONCLUSIONES	163
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA	169
<hr/>	
ANEXOS	205
<hr/>	
I. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES NATURALES ESTUDIADAS	207
II. FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LAS POBLACIONES DE <i>ILEX</i>	209
III. FRECUENCIAS ALÉLICAS POR TAXONES DEL GÉNERO <i>ILEX</i>	213
IV. DETALLES DE LA TOMA DE MUESTRAS DE <i>SILENE NOCTEOLENS</i>	217
V. FRECUENCIAS ALÉLICAS EN <i>SILENE NOCTEOLENS</i> POR POBLACIÓN	221
VI. FRECUENCIAS ALÉLICAS EN <i>SILENE NOCTEOLENS</i> POR ESTADIOS	225
VII. FRECUENCIAS ALÉLICAS EN PARENTELAS DE <i>S. NOCTEOLENS</i>	229

VIII.	DIAGRAMA DEL PROTOCOLO DE CLONACIÓN	231
IX.	FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LAS POBLACIONES DE <i>SORBUS ARIA</i>	233
X.	FRECUENCIAS ALÉLICAS DE <i>SORBUS ARIA</i> SEGÚN REGIONES	237
XI.	LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	241

Índice de Tablas

Tabla 1 Número de individuos de <i>Ilex</i> recolectados por especie, localidad e isla	41
Tabla 2 Poblaciones de <i>Ilex</i> sometidas al análisis estadístico	43
Tabla 3 Microsatélites ensayados en el género <i>Ilex</i>	45
Tabla 4 Microsatélites con amplificación positiva y polimorfismo para el género <i>Ilex</i>	48
Tabla 5 Proporción de alelos exclusivos detectados en el género <i>Ilex</i>	49
Tabla 6 Parámetros de diversidad genética para las poblaciones del género <i>Ilex</i>	50
Tabla 7 Índices de diversidad genética por especie o subespecie del género <i>Ilex</i>	50
Tabla 8 Análisis de probabilidad de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en poblaciones del género <i>Ilex</i>	523
Tabla 9 Identidad y distancias genéticas de Nei entre las poblaciones analizadas del género <i>Ilex</i>	54
Tabla 10 Valores de identidad genética media entre taxones.....	54
Tabla 11 Coeficiente de diferenciación genética y número de migrantes para las poblaciones de <i>Ilex</i>	57
Tabla 12 Análisis jerárquico de varianza molecular de la diversidad genética de <i>Ilex</i> sp.....	58
Tabla 13 Sistemas reproductivos y ciclos de vida en el género <i>Silene</i> y similares.....	74
Tabla 14 Estadios del ciclo de vida considerados en <i>Silene nocteolens</i>	79
Tabla 15 Número de muestras recogidas de <i>Silene nocteolens</i> por fecha, estadio y población.....	80
Tabla 16 Progenies de <i>Silene nocteolens</i> por población	81
Tabla 17 Individuos de <i>Silene nocteolens</i> sometidos a análisis estadístico	81
Tabla 18 Microsatélites ensayados en <i>Silene nocteolens</i>	83
Tabla 19 Descripción de los microsatélites desarrollados para <i>Silene nocteolens</i>	83
Tabla 20 Secuencia de los seis cebadores funcionales en <i>Silene nocteolens</i>	88
Tabla 21 Condiciones específicas ensayadas para los cebadores de <i>Silene nocteolens</i>	89
Tabla 22 Parámetros de diversidad genética de <i>Silene nocteolens</i> según el estadio de vida y población.....	91
Tabla 23 Índices de diversidad genética por estadios en <i>Silene nocteolens</i>	91
Tabla 24 Análisis de probabilidad de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg según estadios de vida y poblaciones de <i>Silene nocteolens</i>	92
Tabla 25 Análisis de probabilidad de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg según parcelas en la población de <i>Silene nocteolens</i> de Montaña Blanca	93
Tabla 26 Identidad y distancias genéticas de Nei entre estadios por población de <i>Silene nocteolens</i>	96
Tabla 27 Coeficiente de diferenciación genética y número de migrantes para las poblaciones de <i>Silene nocteolens</i> según estadio de vida	97
Tabla 28 Análisis jerárquico de varianza molecular de la variación genética de <i>Silene nocteolens</i>	98

Tabla 29 Número de individuos, índices de variación genética, coeficiente de endogamia y tasa de mortalidad para la población natural de <i>Silene nocteolens</i> de Montaña Blanca ..	103
Tabla 30 Parámetros del sistema de cruzamiento para <i>Silene nocteolens</i>	104
Tabla 31 Poblaciones y muestras de <i>Sorbus aria</i> sometidas a análisis estadístico	123
Tabla 32 Microsatélites ensayados en <i>Sorbus aria</i>	125
Tabla 33 Descripción de los microsatélites desarrollados para <i>Sorbus aria</i>	125
Tabla 34 Cebadores y temperatura de hibridación de los individuos clonados	126
Tabla 35 Datos espectrofotométricos de las muestras	127
Tabla 36 Resumen de los valores utilizados en la clonación de <i>Sorbus aria</i> en células competentes.....	127
Tabla 37 Proporciones utilizadas para el ligado en vector	128
Tabla 38 Requerimientos para el medio SOC	129
Tabla 39 Requerimientos para la elaboración del medio de cultivo "LB"	129
Tabla 40 IPTG y X-GAL	130
Tabla 41 Reactivos para amplificación de colonias	132
Tabla 42 Secuencia de los nueve cebadores funcionales en <i>Sorbus aria</i>	136
Tabla 43 Condiciones específicas ensayadas para los cebadores de <i>Sorbus aria</i>	138
Tabla 44 Porcentaje de genotipos idénticos encontrados en <i>Sorbus aria</i> por población	141
Tabla 45 Diversidad genética detectada en las poblaciones de <i>Sorbus aria</i>	142
Tabla 46 Análisis de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg de <i>Sorbus aria</i> según poblaciones y loci.....	144
Tabla 47 Identidad y distancia genética de Nei entre las poblaciones de <i>Sorbus aria</i>	145
Tabla 48 Coeficiente de diferenciación genética para las poblaciones de <i>Sorbus aria</i>	146
Tabla 49 Análisis jerárquico de varianza molecular de la diversidad genética de <i>Sorbus aria</i>	146

Índice de Figuras

Fig. 1 <i>Ilex perado</i> ssp. <i>lopezlilloi</i>	34
Fig. 2 Distribución de <i>Ilex perado</i> ssp. <i>lopezlilloi</i> en el Parque Nacional de Garajonay	35
Fig. 3 <i>Ilex perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	36
Fig. 4 <i>Ilex canariensis</i>	38
Fig. 5 <i>Ilex azorica</i>	39
Fig. 6 Procedencia de las muestras recolectadas del género <i>Ilex</i>	42
Fig. 7 Perfil de amplificación utilizado para el género <i>Ilex</i>	48
Fig. 8 Representación gráfica de los valores medios de F_{ST} obtenidos entre las poblaciones y taxones estudiados.	56
Fig. 9 Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei para las poblaciones del género <i>Ilex</i> analizadas	59
Fig. 10 Neighbor-Joining individual para las poblaciones del género <i>Ilex</i> analizadas	60
Fig. 11 Análisis de coordenadas principales para los individuos de las poblaciones analizadas del género <i>Ilex</i>	61
Fig. 12 Diagrama de barras para las proporciones inferidas con el análisis bayesiano en las poblaciones de <i>Ilex</i>	62
Fig. 13 <i>Silene nocteolens</i>	76
Fig. 14 Distribución de <i>Silene nocteolens</i> en el Parque Nacional del Teide	77
Fig. 15 Plántulas de <i>Silene nocteolens</i> germinadas a partir de semillas procedentes de Montaña Blanca y Pico Viejo	80
Fig. 16 Perfil de amplificación SASN60	88
Fig. 17 Perfil de amplificación SASN55	89
Fig. 18 Distribución geográfica de los individuos de <i>Silene nocteolens</i> según parcelas	94
Fig. 19 Correlograma para las muestras de <i>Silene nocteolens</i> del grupo uno de Montaña Blanca	95
Fig. 20 Correlograma para las muestras de <i>Silene nocteolens</i> del grupo dos de Montaña Blanca	95
Fig. 21 Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei entre estadios por población de <i>Silene nocteolens</i>	98
Fig. 22 Análisis de coordenadas principales para los individuos naturales de <i>Silene nocteolens</i> a partir de las distancias genéticas de Nei por estadios y población	99
Fig. 23 Análisis de coordenadas principales basado en los valores de F_{ST} para los distintos estadios de vida de las poblaciones naturales de <i>Silene nocteolens</i>	100
Fig. 24 Gráficos para la determinación del valor más probable de K siguiendo el análisis bayesiano. LnPPD vs K e Incremento de LnPPD vs K	101
Fig. 25 Diagrama de barras para las proporciones inferidas (K = 2) con el análisis bayesiano en las poblaciones de <i>Silene nocteolens</i>	102

Fig. 26 Coeficiente de endogamia por estadio de vida y correlación entre la mortandad y el coeficiente de endogamia en la población de <i>Silene nocteolens</i> de Montaña Blanca...	104
Fig. 27 <i>Sorbus aria</i>	120
Fig. 28 Ubicación de <i>Sorbus aria</i> en el Parque Nacional de la Caldera de Taburiente	121
Fig. 29 Ubicación de <i>Sorbus aria</i> en el Parque Nacional del Teide	122
Fig. 30 Placa mostrando colonias de células competentes tras la clonación	131
Fig. 31 Perfil de amplificación para colonias	132
Fig. 32 Perfil de amplificación para la secuenciación de fragmentos de ADN	133
Fig. 33 Perfil de amplificación SASN5572	137
Fig. 34 Perfil de amplificación SASN57	137
Fig. 35 Perfil de amplificación SASN58	137
Fig. 36 Foto del gel de electroforesis para la reamplificación de colonias	138
Fig. 37 Secuencias de las colonias (células clonadas con <i>Sorbus aria</i>) para el microsatélite SA07.....	139
Fig. 39 Distribución de la ploidía y ocurrencia de alelos exclusivos en <i>Sorbus aria</i>	140
Fig. 38 Perfil de fragmentos del microsatélite SA07 observado en <i>Sorbus aria</i> y secuencias correspondientes de la clonación de estos fragmentos que confirman la naturaleza triploide de esta especie en Canarias	140
Fig. 40 Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei entre las poblaciones de <i>Sorbus aria</i>	147
Fig. 41 Neighbor-Joining individual para las poblaciones de <i>Sorbus aria</i>	148
Fig. 42 Análisis de coordenadas principales para las poblaciones naturales de <i>Sorbus aria</i> ..	149
Fig. 43 Diagrama de barras para las proporciones inferidas con el análisis bayesiano para las poblaciones de <i>Sorbus aria</i>	150

Antecedentes



1.1. Introducción

Los recursos biológicos sustentan prácticamente todas nuestras necesidades: alimentos, medicinas, prendas de vestir, materiales de construcción, oxígeno liberado por las plantas, control del clima, reciclado de nutrientes por los bosques y las nuevas tecnologías van revelando muchos usos potenciales día a día (Beattie, 1995).

Por desgracia parece que solo empezamos a apreciar nuestros recursos cuando estos comienzan a mermar. Según Frankel *et al.* (1995), en Inglaterra, donde la industrialización germinó antes que en otros países europeos, se podían reconocer los cambios en la vegetación ya a finales del siglo XIX. De ahí que desde entonces se haya atribuido gran parte de la pérdida de la riqueza biológica a los efectos de las actividades humanas relacionadas con el progreso industrial. Pese a todo, este también fue el génesis de los movimientos de conservación y de la percepción de la biodiversidad.

El hito histórico de la conservación de la naturaleza fue el establecimiento del Parque Nacional Yellowstone en Estados Unidos hacia 1874. Aunque en un principio el énfasis estuvo en la preservación de los ecosistemas; la aparición del concepto “biodiversidad”, más de un siglo después, significó la integración de la ecología y la genética en términos de conservación, ya que vino a representar la diversidad en todos y cada uno de los niveles de la organización biológica: comunidades, especies, organismos y genes (CBD, 1992; Frankel *et al.*, 1995; Frankham *et al.*, 2009). En este aspecto, los recursos genéticos están teniendo más relevancia en la conservación de los recursos naturales tal como se ve reflejado en el propio Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD, 1992; Comisión Europea, 2006).

Por otro lado, es un hecho ampliamente reconocido que las islas oceánicas, como las Canarias, son extensiones territoriales que atesoran una gran diversidad biológica; muchas veces exclusiva de cada isla en particular. Esa amplia diferenciación biológica no evita que las poblaciones de especies singulares y el número de individuos en cada población sean muy bajos, razón por la cual es imprescindible actuar antes de que la erosión genética nos

impida conservar su riqueza alélica (Fernández-Palacios y Martín Esquivel, 2001; Francisco-Ortega y Santos, 2001; González-Pérez *et al.*, 2009b; Sosa *et al.*, 2010a).

Sin embargo, la conservación de la diversidad biológica es un concepto en el que se encuentran implicados aspectos científicos, técnicos, sociológicos y económicos con el objetivo de implementar acciones específicas que finalicen en la reducción de los niveles actuales de pérdida de la biodiversidad (Bañares *et al.*, 2002; Primack & Ros, 2002; Heywood & Iriondo, 2003). Por ello, previo a la planificación de la recuperación de una especie vegetal amenazada que se encuentre en regresión y con escasos efectivos, se debe conocer su estado biológico, identificar sus etapas críticas y averiguar las causas de las variaciones en etapas de vida demográficamente sensitivas (Schemske *et al.*, 1994; Young & Clarke, 2000, Bañares *et al.*, 2002; Bañares *et al.*, 2004; González-Pérez *et al.*, 2008; Sosa *et al.*, 2010b).

El estado de alta vulnerabilidad de las poblaciones de buena parte de los endemismos canarios no se debe solamente al impacto antropogénico, sino que también puede ser consecuencia de la propia dinámica de las poblaciones que tienen un reducido número de individuos; en las cuales, los fenómenos de aislamiento y consanguinidad son muy acusados. Por esto, se hace imprescindible redoblar los esfuerzos y desarrollar programas y proyectos de conservación que eviten que el desgaste genético en estos endemismos se torne irreversible, exhiba procesos de regresión por inestabilidad genética y/o demográfica y consecuentemente se produzca la extinción local de sus poblaciones (Silvertown & Charlesworth, 2001; Sosa, 2001; Oostermeijer *et al.*, 2003; Frankham *et al.*, 2009; Sosa *et al.*, 2010b).

1.1.1. Conservación Genética de la Biodiversidad Vegetal

La imperante necesidad de descubrir la riqueza genética contenida en las especies en riesgo ha dado paso al nacimiento de la Conservación Genética; una rama científica relativamente joven fundamentada en más de un siglo de avances en teoría evolutiva (incluyendo genética de poblaciones, genética cuantitativa, cultivo de plantas y crianza de animales) que se ha constituido en

una disciplina cuantitativa cuya fortaleza recae en la fiabilidad de sus predicciones (Frankham *et al.*, 2009).

Según Frankham *et al.* (2009) la conservación genética es la aplicación de la genética teórica y técnica para reducir el riesgo de extinción en las especies amenazadas, con el fin último de preservar las especies como entidades dinámicas capaces de hacer frente a los cambios ambientales. Sin embargo, desde una perspectiva metodológica; es la población, más que la especie, la unidad funcional evolutiva y ecológica donde deberían concentrarse los esfuerzos multidisciplinarios para la conservación genética porque es en esta donde se producen los cambios genéticos y demográficos fundamentales que determinarán la viabilidad y, por ende, la capacidad adaptativa de las distintas especies (Schemske *et al.*, 1994; Sosa *et al.*, 2002). Además, la cantidad de variación genética en una población puede jugar un importante papel en el ecosistema por la relación que existe entre las especies (Frankham *et al.*, 2009).

Las aplicaciones más importantes de la genética de la conservación se derivan de la capacidad de ayudar a crear una imagen más precisa de los patrones y procesos de las especies en peligro de extinción. Particularmente, la cuantificación de la depresión endogámica, del tamaño efectivo de la población, de tamaño de la población mínima viable, de los niveles de variación genética y del flujo genético en poblaciones naturales; pueden proveer medidas específicas y comparables de cómo las poblaciones en riesgo están siendo afectadas (DeSalle & Amato, 2004). Se ha considerado a la demografía como el segundo pilar básico en el que se cimenta la biología de la conservación ya que se encarga de ponderar los procesos de natalidad, mortalidad, migración e inmigración que permiten conocer la distribución, estructura y dinámica poblacional en cada población para así comprender y explicar la situación actual de la especie amenazada y proyectar su situación previsible en el futuro. La caracterización estructural de una población toma como base la edad, el tamaño o los estadios de vida y proporciona los datos que permiten hacer aproximaciones matemáticas sobre cuyos resultados pueden apoyarse futuras actuaciones (García & Iriondo, 2002; Oostermeijer *et al.*, 2003).

Por lo tanto, los aportes para la conservación de las especies vegetales amenazadas no deben limitarse al descubrimiento de la diversidad genética existente en las poblaciones naturales, sino que también deben implementar la concatenación de esos resultados genéticos con la información generada en investigaciones demográficas y de biología reproductiva con el fin de poder ampliar el campo de visión sobre la situación específica de cada taxón. De esta manera se garantiza que la toma de decisiones y la planificación de estrategias de manejo en las especies vulnerables estén respaldadas de información fehaciente y actualizada (Bañares *et al.*, 2002).

Aunque se ha cuestionado la significancia de los factores genéticos para la conservación con base en que los factores demográficos, las fluctuaciones ambientales (estocasticidad) y las catástrofes pueden llevar a las poblaciones silvestres a la extinción antes que los factores genéticos tengan efecto; hay una clara base teórica y una creciente evidencia experimental de que los factores genéticos intervienen en la extinción porque pueden interactuar frecuentemente con las fluctuaciones demográficas, precipitando a las especies hacia la extinción (Frankham *et al.*, 2009).

En las últimas dos décadas la conservación genética ha progresado considerablemente de ser un campo meramente teórico en la biología de las poblaciones a convertirse en una disciplina empírica completamente desarrollada y esto ha sido gracias a los avances tecnológicos en genética molecular que han permitido el uso de marcadores moleculares neutrales en la biología de la conservación (Ouborg *et al.*, 2010). Las emergentes técnicas moleculares hacen que hoy sea posible el estudio de las diferencias en la secuencia del ADN en sí, en cualquier especie (Allendorf & Luikart, 2007). Los marcadores moleculares han sido utilizados para una variedad de aplicaciones que incluyen el análisis de las relaciones genéticas entre individuos, la construcción de mapas de linaje, la selección asistida y los retrocruces, la genética de poblaciones y los estudios filogenéticos (Kalia *et al.*, 2011); de hecho, su uso se ha extendido tan ampliamente a aspectos de conservación de especies amenazadas que algunos autores consideran que nos estamos acercando a la era de la conservación genómica (Allendorf *et al.*, 2010; Ouborg *et al.*, 2010).

1.1.2. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son fragmentos específicos del ADN que pueden ser identificados dentro del genoma cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable que, además, puede detectarse fácilmente. Sin embargo, se habla de marcadores genéticos cuando estos se transmiten según las leyes básicas de la herencia mendeliana; por lo que no todos los marcadores moleculares se consideran marcadores genéticos (Nuez y Carrillo, 2000). En otras palabras, los marcadores genéticos son regiones del ADN que presentan variación en su secuencia sin que, necesariamente, se aprecien cambios sustanciales en las funciones del organismo. Por ello, se consideran herramientas útiles que han servido de base para la identificación de especies, cepas, híbridos, análisis de diversidad, recursos genéticos, determinación de paternidad, mapeo genómico con aplicación a genética de poblaciones, biología evolutiva, ecología molecular, genética de la conservación, etc. (Avisé, 1994; Goldstein y Schlötterer, 1999; Chybicki y Burczyk, 2008).

Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados; pero cuando un marcador presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción se dice que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariables (Frankham *et al.*, 2009). Los marcadores moleculares pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo y se pueden aplicar usando a todo el individuo o solo parte de este. En términos generales existen dos tipos de marcadores moleculares: *Marcadores Bioquímicos* y *Marcadores de ADN* (Nuez y Carrillo, 2000).

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

La PCR, o reacción en cadena de la polimerasa, fue introducida por Mullis (Mullis *et al.*, 1986; Allendorf & Luikart, 2007) y es una tecnología utilizada para multiplicar (sintetizar) *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen conocido o desconocido en el genoma del individuo en estudio. Se basa en la amplificación de fragmentos de ADN a partir de secuencias de nucleótidos denominadas “cebadores”, que son capaces de reconocer una secuencia blanco para la cual el cebador es complementario.

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

1. Se separan las dos hebras (cadenas) de ADN; es decir, se promueve su desnaturalización a través de altas temperaturas (comúnmente 95 °C).
2. Se induce el alineamiento o reconocimiento del cebador con las secuencias complementarias o molde del ADN. Esto se conoce como hibridación y ocurre al bajar la temperatura (p.e. 55 °C).
3. Por medio de la enzima Taq polimerasa se lleva a cabo la extensión o alargamiento de la molécula iniciadora (cebador); o sea, la síntesis de la cadena complementaria. La temperatura de elongación suele ser de 72 °C.
4. Los ciclos se repiten la cantidad de veces que sea necesario hasta obtener el número de copias de ADN que se requiere (Awise, 1994).

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

Los microsatélites son secuencias repetitivas de nucleótidos con una amplia ocurrencia, particularmente en organismos multicelulares; también se les conoce como SSR (Simple Sequence Repeats). Los microsatélites fueron descritos por Tautz en 1989 y se basan en regiones hipervariables constituidas

por repeticiones en tándem de unos pocos pares de bases (1 – 6). El número de repeticiones puede variar, por lo que las diferencias o polimorfismos se detectan con una disparidad de tamaños y han ganado considerable importancia en la genética de la conservación de plantas debido a la gran cantidad de ventajas genéticas que poseen (Tautz, 1989; Engel *et al.*, 1996; Ramel, 1997; Hoelzen, 1998; Goldstein & Schötterer, 1999; Silvertown & Charlesworth, 2001; Kalia *et al.*, 2011).

Los microsatélites se heredan siguiendo las leyes de Mendel y presentan un alto polimorfismo por locus (multialelismo) superior al observado por otros marcadores; por esto, por ser codominantes y genoma-específicos se les considera los marcadores ideales para la identificación genética individualizada (Tautz, 1989; Engel *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2010). Otros atributos incluyen hipervariabilidad, reproducibilidad, relativa abundancia, cobertura extensiva del genoma, localización específica en los cromosomas, docilidad en la automatización y alto grado de rendimiento de genotipado (Kalia *et al.*, 2011). No obstante, una de las grandes desventajas de estos marcadores es que las regiones microsatelitales deben ser detectadas, secuenciadas y definidas para cada especie antes de ser utilizados por primera vez; lo que incrementa los tiempos y costes. Además, su implementación en un laboratorio requiere considerable infraestructura y presupuesto.

A pesar de ello, son muchos los estudios que han elegido a los microsatélites para la investigación en especies amenazadas y, de ellos, una gran cantidad se centra en el descubrimiento y comparación de genotipos de especies vegetales. En las Islas Canarias, el uso de microsatélites es reciente. Se han empleado para detectar los patrones de expresión fenotípica y la heredabilidad de los rasgos relacionados con la luz en *Olea europea* (García-Verdugo *et al.*, 2010a), así como los efectos de la estructura de la población en la edad y el aislamiento por distancia en *O. europea ssp. guanchica* (García-Verdugo *et al.*, 2010b). También han sido utilizados para detectar la diversidad genética y los patrones de estructuración entre adultos y reclutas de *Pinus canariensis* (López de Heredia *et al.*, 2010).

El empleo de microsatélites para la caracterización genética de plantas endémicas y/o peligro de extinción también incluye estudios proyectados hacia la conservación genética de especies vulnerables y el mejor aprovechamiento de los recursos económicos disponibles. En *Bencomia exstipulata* (González-Pérez *et al.*, 2009a) el uso de microsatélites fue imperante en el descubrimiento del bajo nivel de variabilidad y el alto grado de diferenciación genética existente entre las dos únicas poblaciones naturales de esta especie. Esto puso de manifiesto el riesgo de pérdida de diversidad por depresión endogámica en la especie y permitió la identificación de los genotipos que deberían ser elegidos de forma prioritaria en las posteriores acciones de restitución. Otro fue el caso de *Myrica rivas-martinezii* que al ser comparada con su congénere *M. faya* (González-Pérez *et al.*, 2009c) no reveló diferenciación genética, razón por la cual se estipuló que ambos taxones compartían un mismo acervo genético y que fueran, probablemente, la misma especie. En este caso se recomendó el cambio de enfoque y la reconsideración de la categoría de “en peligro de extinción” de *M. rivas-martinezii*. Por último, la identificación de los grados de diversidad y diferenciación genética a nivel interpoblacional en *Sambucus palmensis* (Sosa *et al.*, 2010b) han permitido descubrir que el concentrar los esfuerzos de conservación sólo en aquellas pocas poblaciones de gran tamaño se traducía en la posibilidad de la pérdida de la variabilidad genética de la especie.

1.2. Genética de Poblaciones

De acuerdo con Templeton (2006), la genética de poblaciones siempre ha desempeñado un papel central en la biología evolutiva ya que se ocupa de los mecanismos por los cuales la evolución ocurre dentro de las poblaciones y las especies y este, al fin y al cabo, es el fundamento de todo cambio evolutivo. La genética de poblaciones ofrece muchas herramientas básicas para la biología de la conservación no solo porque involucra el estudio del origen, cantidad y distribución de la variación genética en las poblaciones, sino que también se interesa en el destino de esta variación a través del tiempo y el espacio.

Cuando el énfasis de los estudios genéticos se trasladó de los individuos a las poblaciones, los cambios evolutivos se contemplaron como consecuencia de las variaciones genéticas en las poblaciones. Estos cambios también se vislumbraron como resultado del estudio formal predictivo de las alteraciones de las frecuencias alélicas y genotípicas basadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg. No obstante, debido a los cambios que ha sufrido la genética molecular hasta convertirse en genómica, la genética de poblaciones también ha pasado de ser una disciplina que recibe nuevas técnicas a una que proporciona los métodos básicos de análisis (Hartl & Clark, 1997; Fontdevila y Moya, 1999; Templeton, 2006).

Según Hartl & Clark (1997), en genética de poblaciones el término “población” viene referido a un grupo de organismos de la misma especie que viven en un área geográfica suficientemente restringida para que cada miembro tenga la oportunidad potencial de aparearse con algún otro miembro. No obstante, la definición precisa de esta unidad es difícil y varía de especie en especie debido a la presencia casi universal de algún tipo de estructuración geográfica en las poblaciones. Debido a que muchos fenómenos importantes surgen de las interpretaciones de dos o más factores dentro de una población, la genética de poblaciones incluye el estudio de varias fuerzas que dan como resultado los cambios evolutivos en las especies a través del tiempo. Como consecuencia, la evolución debe ser vista con una perspectiva multidimensional

y no basta con examinar cada fuerza evolutiva individualmente (Templeton, 2006).

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

1.2.1. Variabilidad Genética

Aunque la genética de poblaciones es una disciplina considerablemente reciente, en el estudio de la variabilidad genética de las poblaciones existen ya varios estadísticos que han sido propuestos a fin de cuantificar y comprender esta variable en términos más exactos. Como cada estadístico aprecia diferentes aspectos de la variabilidad genética, suelen utilizarse varios de manera complementaria. Los más empleados son la riqueza alélica (A), el polimorfismo (P), la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e).

1.2.1.1. Riqueza Alélica

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

Dependiendo de su historia, cada población pudo haber sufrido mayor o menor reducción en su variación genética original debido al “efecto fundador” o “cuello de botella”, fenómeno natural que afecta principalmente a aquellos alelos de más baja frecuencia (Sytsma & Schaal, 1985; Bouzat, 2010).

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

La expresión matemática para la riqueza alélica es:

$$\bar{A} = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L a_l \quad 1 \leq \bar{A} \leq \max a_l$$

donde L es el número total de loci analizados en la población considerada y a_l es el número de alelos detectados en el locus l (Caujapé-Castells, 2006).

1.2.1.2. Polimorfismo

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

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

$$P = \frac{N^{\circ} \text{ total de loci polimórfico}}{N^{\circ} \text{ total de loci}}$$

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

Los mayores inconvenientes de esta medida son – por un lado – la subjetividad al momento de fijar el criterio de polimorfismo, lo cual puede influir en los resultados; y – por el otro – que no se consideran las frecuencias alélicas, así que vale lo mismo que un locus sea ligeramente polimórfico y que

otro lo sea mucho. No obstante, esta medida nos da un importante aspecto de la variación génica dentro de las poblaciones (Nei, 1987).

1.2.1.3. Heterocigosidad Observada

La heterocigosidad observada (H_o) es simplemente el número de heterocigotos en un locus entre el número total de individuos muestreados. Estima la probabilidad, en organismos con cruzamiento al azar, de que dos alelos escogidos en una población sean diferentes; sin embargo, no refleja bien la cantidad de variación genética en las poblaciones de organismos que se reproducen asexualmente o por autofecundación (Ayala, 1982; Frankham *et al.*, 2009).

Para una población, H_o se calcula como la media inter-loci de la frecuencia genotípica de los individuos heterocigotos mediante la expresión:

$$H_o = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \frac{(N_{heterocigotos})_i}{N_i} \quad (0 \leq H_o \leq 1)$$

donde L es el número de loci analizado en población objeto de estudio, $(N_{heterocigotos})_i$ es el número absoluto de individuos heterocigotos para el locus i y N_i es el número total de individuos analizados para el locus i (Caujapé-Castells, 2006).

1.2.1.4. Heterocigosidad Esperada

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

La heterocigosidad esperada de una población (H_e) es la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población. Cuando las poblaciones están bajo equilibrio Hardy-Weinberg, la heterocigosidad puede ser calculada a partir de la frecuencia alélica. Por lo tanto, la heterocigosidad esperada cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en los loci (Hoelzel, 1998; Sosa *et al.*, 2002).

Según Frankham *et al.*, 2009 la heterocigosidad esperada (H_e) es reportada para especies exogámicas porque es menos sensible al tamaño muestral que la heterocigosidad observada (H_o). Además, la comparación entre la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e) permite evaluar la estructura genética de las poblaciones (Nei, 1987).

Este parámetro es una función de las frecuencias genéticas detectadas que, para poblaciones grandes (más de 50 individuos) se expresa como sigue:

$$H_e = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L (1 - \sum_{j=1}^n P_{il}^2) \quad (0 \leq H_o \leq 1)$$

donde P_{ij} es la frecuencia del alelo j en el locus l y L es el número total de loci analizados. En el caso de que el número de individuos en una población sea menos de 50, entonces el estimador no sesgado de la heterocigosidad esperada es:

$$\hat{H}_e = \frac{1}{L} \left[\frac{2N}{2N-1} \sum_{l=1}^L (1 - \sum_{j=1}^n P_{il}^2) \right] \quad (0 \leq H_o \leq 1)$$

donde N es el tamaño de la población (Hedrick, 2000).

1.2.2. Estructuración Genética de las Poblaciones

Los estudios realizados por Hamrick & Godt (1989) revelan que la diversidad genética puede verse afectada de forma diferente por distintos procesos evolutivos y ecológicos o reproductivos de acuerdo a la actuación que estos tengan al nivel de las poblaciones o de la especie. No obstante, la partición del total de la diversidad genética de una especie en sus componentes intra e interpoblacional nos permite conocer su organización en el espacio (Sosa *et al.*, 2002; Allendorf *et al.*, 2010).

Debido a la que la diversidad total de una especie consta de componentes intra e interpoblacional, se hace necesario analizar cómo se distribuye y se estructura la variabilidad genética global en y entre distintas poblaciones naturales (Sosa *et al.*, 2002). En este caso, podemos cuantificar y determinar el grado de diferenciación genética y la distribución de esta variación a nivel interpoblacional (Templeton, 2006).

La estructura genética intrapoblacional consiste en los diferentes tipos de alelos y sus frecuencias en dicha población. Existe una estructuración genética dentro de una población cuando las frecuencias alélicas no se distribuyen al azar, sino que siguen un determinado patrón o arquitectura que bien puede ser espacial o temporal. Por su parte, la estructura genética interpoblacional es el resultado de la distribución geográfica y en el espacio de subpoblaciones entre las cuales existen diferencias genéticas (Sosa *et al.*, 2002; Frankham *et al.*, 2009).

1.2.2.1. Equilibrio Hardy-Weinberg

El principio de Hardy-Weinberg debe su nombre al famoso matemático inglés Godfrey Harold Hardy y al físico alemán Wilhelm Weinberg que establecieron el teorema independientemente en 1908, aunque en realidad fue utilizado por primera vez por el genetista estadounidense William E. Castle en una descripción de los efectos de la selección natural contra los alelos recesivos en 1903 (Allendorf & Luikart, 2007). Este principio establece que en una población donde el cruzamiento es aleatorio, la composición genética permanece en equilibrio mientras no hayan mutaciones, migraciones o selección natural. El equilibrio Hardy-Weinberg es simple y sin embargo fundamental para la conservación y la genética evolutiva (Frankham *et al.*, 2009).

La utilidad práctica de este teorema reside en que podemos evaluar la magnitud del cambio evolutivo en las poblaciones analizadas comparando las frecuencias genotípicas estimadas en las poblaciones naturales que estudiamos con las que esperaríamos encontrar según el equilibrio Hardy-Weinberg. El teorema funciona como hipótesis nula y la genética de poblaciones consiste en gran medida en investigar qué factores provocan la desviación significativa de esta hipótesis nula en las poblaciones naturales. Si se detecta un exceso de heterocigotos, esto puede indicar selección sobredominante o eventos estocásticos. En cambio, un defecto de heterocigotos puede deberse a selección, a la presencia de alelos nulos que den la impresión falsa de exceso de homocigotos, a la consanguinidad o al efecto Wahlund por la existencia de estructura poblacional que no se ha

tomado en cuenta (Linhart *et al.*, 1981; Waser, 1987; Eguiarte *et al.*, 1992; Caujapé-Castells, 2006).

En este sentido, el coeficiente de endogamia o índice de fijación (F_{IS}) es una medida de la extensión de la endogamia en una población debido al apareamiento con individuos muy emparentados. F_{IS} puede variar de 1 a -1; siendo un valor positivo indicativo de un defecto en la heterocigosis y un valor negativo considerado como un exceso de heterocigóticos en la población con respecto a las proporciones esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg (Hartl & Clark, 1997; Caujapé-Castells, 2006).

F_{IT} es la medida de la desviación de la panmixia en el total de la población, es decir, la correlación entre los pares de genes homólogos en la unión de gametos con resto a la población en su globalidad (Wright, 1951). F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} se conocen como los F-estadísticos y se relacionan mediante la expresión matemática:

$$(1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) = 1 - F_{IT}$$

1.2.2.2. Análisis de Autocorrelación Espacial

La autocorrelación espacial puede definirse como la relación entre los valores de una variable en función de la distribución de los puntos del espacio donde esa variable adquiere un valor determinado (Griffiths, 1987). El grado de estructuración genética intrapoblacional puede evaluarse gracias a la existencia de la autocorrelación espacial (Sokal, 1979; Vilches *et al.*, 2004) que calcula la correlación a través del índice de Moran (Moran, 1948) existente entre las distancias genéticas detectada entre los individuos de una población y la distancia geográfica de los mismos.

Para ello se calcula la distancia genética existente entre cada par de individuos y se compara con su separación física. Autocorrelaciones positivas ($I > 0$) obtenidas entre cada par de observaciones realizadas indican que los individuos más próximos geográficamente son también los de mayor similitud genética, mientras que autocorrelaciones negativas ($I < 0$) indican lo contrario (Sosa *et al.*, 2002).

Smouse y Peakall (1999) desarrollaron un nuevo enfoque para el análisis de la estructura espacial aplicado a matrices multialélicas codominantes e introdujeron un coeficiente de correlación (r) que es equivalente al estadístico I de Moran y, aunque ambos tienen similar comportamiento cualitativo, hemos preferido el coeficiente r porque es a la vez completamente general (multivariante) y brinda una correlación adecuada.

1.2.3. Diferenciación Genética entre las Poblaciones

Para establecer la diferenciación genética entre las poblaciones es necesario calcular la distancia genética y el coeficiente de diferenciación genética entre las mismas.

1.2.3.1. Distancia Genética

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

Uno de los índices más utilizados es el de la distancia genética de Nei que puede estimar el número de genes o codones sustituidos por locus entre poblaciones (Nei, 1987). Nei (1972) definió el concepto de “identidad genética” entre dos poblaciones como la probabilidad de que dos alelos (uno de cada población) sean idénticos. Estos valores pueden variar entre cero (para poblaciones completamente distintas) hasta uno (si son genéticamente idénticas). Una vez calculado el valor para la identidad genética (I), la distancia genética (D) se obtiene mediante el logaritmo negativo de la primera:

$$D = -\ln I$$

De esta manera, la distancia genética toma valores que oscilan entre cero y el infinito. Existe el inconveniente de que la distancia de Nei no es métrica, lo que puede tener incidencia en la elaboración de dendrogramas en los que no

haga falta suponer que las tasas evolutivas sean homogéneas, como lo presupone Nei. Chakravorty & Jin (1995) desarrollaron un método para medir la distancia entre los alelos compartidos por los individuos de dos poblaciones, DAS (*Distance of Allele Shared*) que se obtiene según la expresión:

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

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

1.2.3.2. Coeficiente de Diferenciación Genética y AMOVA

Puesto que las especies raramente existen como sola unidad en la que cada individuo tiene la misma probabilidad de cruzarse con cualquier otro de la población (panmixia), la existencia de algún nivel de diferenciación genética entre las distintas poblaciones es la regla general para la mayoría de las especies. El coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) cuantifica este fenómeno natural y es también una medida indirecta del flujo genético a través del número de migrantes (N_m) entre las poblaciones (Sosa *et al.*, 2002; Caujapé-Castells, 2006).

Partiendo de un locus con dos alelos, F_{ST} es la varianza (σ^2) en las frecuencias alélicas entre dos poblaciones normalizada por la frecuencia alélica media (p), entonces:

$$F_{ST} = \sigma^2 / p(1 - p)$$

y varía de 0 a 1. Un valor de cero indica que las frecuencias alélicas son idénticas en las poblaciones estudiadas, mientras un valor de 1 representa frecuencias alélicas fijadas y, por lo tanto, completamente distintas entre las poblaciones analizadas (Neff & Fraser, 2010). En la práctica, valores 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 (Hartl & Clark, 1997; Sosa *et al.*, 2002). Curiosamente, el rango de distribución geográfica no se encuentra relacionado con la distribución de la variabilidad interpoblacional; así que otros factores como la capacidad de migración de la especie o la existencia de barreras geográficas y/o ecológicas deben ser considerados como responsables de esta variable (Hamrick & Godt, 1989; Frankham *et al.*, 2009).

También suele utilizarse la metodología desarrollada por Nei (1973) en donde la diversidad total (H_T) está subdividida en la diversidad genética para cada población (H_S) y la diversidad entre las subpoblaciones (D_{ST}), de manera que:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

y el coeficiente de diferenciación genética de la población total viene representado por:

$$G_{ST} = D_{ST}/H_T$$

que equivale al F_{ST} de Wright.

La diferenciación genética de las poblaciones (F_{ST}) se ve limitada por la tasa de migración (N_m), de modo que cuánto más flujo genético existe entre dos poblaciones, menor es la diferenciación genética existente entre ellas (Hartl y Clark, 1997). Así pues, la relación entre estos dos parámetros se consigue mediante la fórmula:

$$N_m = \frac{1 - F_{ST}}{4 \times F_{ST}},$$

donde valores superiores a 1 son considerados como suficientes para evitar la diferenciación entre poblaciones (Wright, 1931).

Otra medida de diferenciación que usa información sobre las relaciones genealógicas es el phi-st (Φ_{ST}) que se calcula en el marco del AMOVA

(Excoffier *et al.*, 1992) y utiliza el grado de diferenciación entre los alelos como un factor de ponderación que incrementa la métrica (por ejemplo F_{ST}) en proporción al número de diferencias mutacionales entre alelos (Allendorf & Luikart, 2007). El AMOVA puede probar la proporción de la variación genética en general atribuible a la variación dentro de las poblaciones, entre las poblaciones y entre los grupos de poblaciones en una región. Este análisis también puede usarse para determinar la distribución relativa a la variabilidad genética entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos o dentro de las poblaciones; así que la estructura jerárquica es frecuentemente cuantificada a través del AMOVA (Allendorf & Luikart, 2007; DeWoody *et al.*, 2010).

1.2.3.3. Dendrogramas UPGMA y NJ

Los diagramas tipo árboles o dendrogramas pueden ser inferidos a partir de diversos tipos de datos. En el caso de la filogenia molecular esos datos son normalmente secuencia de genes o proteínas en forma de un alineamiento múltiple. Las metodologías utilizadas para la estimación de árboles evolutivos se dividen en cuatro categorías: matriz de distancias, parsimonia, invariantes y máxima probabilidad (Swofford & Olsen, 1990; Salemi & Vandamme, 2003).

Los dendrogramas UPGMA y NJ son métodos de reconstrucción filogenética basados en distancias genéticas como la de Nei; es decir, resumen la información de un alineamiento múltiple en una matriz de distancias entre secuencias. Utilizan el alineamiento o diferenciación genética para calcular las distancias entre secuencias y posteriormente tratan de reconstruir un árbol evolutivo a partir de dichas distancias.

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

distancias entre cada individuo y el grupo previo (Avise, 1994; Allendorf & Luikart, 2007); de ahí su nombre.

El NJ (*Neighbor-Joining*) también es un algoritmo de agrupamiento *de abajo a arriba*, pero no asume la existencia de un reloj molecular. Fue desarrollado por Saitou y Nei en 1987, su base es el principio de la evolución mínima en el cual el mejor árbol es aquel que minimiza la suma de las longitudes de todas las ramas; ya que frecuentemente se logra minimizar la longitud global del árbol al minimizarla a cada paso del análisis, aunque no siempre (Swofford & Olsen, 1990; Avise, 1994; Allendorf & Luikart, 2007).

Esta técnica considera el concepto de vecinos en el cual para cada par debe existir una cercanía mutua y, a la vez, un alejamiento considerable hacia el resto. Los dendrogramas NJ no tienen raíz, así que para situar el ancestro común es necesario introducir un grupo externo como punto de referencia que bien puede ser un gen homólogo u otra familia o especie cercana, pero distinta a la que se analiza (Swofford & Olsen, 1990; Salemi & Vandamme, 2003).

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

1.2.3.4. Análisis de Coordenadas Principales

El análisis de coordenadas principales (PCoA) es una técnica multivariada que permite encontrar y trazar patrones dominantes en un conjunto de datos multivariados; estos datos pueden ser, por ejemplo, múltiples loci (variables) y múltiples muestras (observaciones) (Peakall & Smouse, 2006). En genética de poblaciones se utiliza para calcular una matriz de distancia y producir una configuración gráfica en un espacio Euclidiano de pocas dimensiones (dos o tres) de manera tal que, con la menor pérdida de información posible, puedan determinarse las relaciones genéticas entre los individuos, las poblaciones y/o las especies estudiadas.

El análisis de componentes principales (PCA) es un análisis estadístico multivariante que se utiliza como un método de disminución de las dimensiones

de los datos de un estudio (Hernández, 1992). El problema es que el PCA está basado en coeficientes de correlación o covarianza y estos pueden no ser siempre la medida más apropiada de asociación (Zuur *et al.*, 2007). El PCoA es un método que está basado en una ecuación de valor propio; pero puede usar cualquier medida de asociación. Como el PCA, los ejes se trazan uno contra el otro en un espacio Euclidiano, pero el PCoA no produce un biplot (la combinación gráfica de variables y observaciones) (Zuur *et al.*, 2007).

1.2.3.5. Análisis Bayesiano

Los algoritmos de agrupamientos bayesianos se han constituido en importantes herramientas computacionales para inferir la estructura genética en la ecología molecular (Frantz *et al.*, 2009), conservación genética y la genética de poblaciones (Corander y Marttinen, 2006; Patterson *et al.*, 2006; François & Durand, 2010). En su mayoría, estos métodos asignan probabilísticamente individuos a grupos en función de sus genotipos multilocus minimizando los desequilibrios Hardy-Weinberg y de ligamiento, sin asumir poblaciones predefinidas (Pearse & Crandall, 2004).

Métodos de cálculo intensivo con inferencia bayesiana a partir de simulaciones del proceso de coalescencia con migración, han sido desarrollados recientemente para estimar el tamaño de los grupos y las tasas de migración (en escala de tasa de mutación) a partir de los datos de secuencia de variabilidad de ADN para los conjuntos de poblaciones locales (Beerli, 2004; Hey & Nielsen, 2004). Cada población está caracterizada por un conjunto de frecuencias alélicas (P) para cada locus, donde P es un vector multidimensional con elementos p_{kij} que representan la frecuencia del alelo j para el locus l en la población k (Falush *et al.*, 2007).

Dado un número de grupos (K) y asumiendo tanto el equilibrio Hardy-Weinberg como el equilibrio de ligamiento, pueden estimarse las frecuencias alélicas en cada grupo y la proporción de pertenencia como miembros de la población para cada individuo. En el modelo más simple (sin mezcla) se asume que cada individuo pertenece a un único grupo, mientras que en el modelo más general (mezcla) se estiman las proporciones de mezcla para cada individuo.

Se hace uso de la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) para integrar los parámetros en el espacio y hacer la asignación de grupos. Aunque el valor de K debe ser proporcionado al algoritmo, un método heurístico para la selección de K es de uso frecuente y se basa en la comparación penalizada del logaritmo de las probabilidades sobre tandas independientes con diferentes números de grupos. Considerando un grupo de datos con un número N de individuos en un loci L , se asume que los individuos muestreados tienen un ancestro en grupos discretos K , donde los grupos corresponden a poblaciones observadas. K es determinado por el investigador. Cada clado es caracterizado por un grupo de frecuencias de los alelos para cada locus. El vector tridimensional P contiene las frecuencias alélicas en cada grupo para cada alelo de cada locus, las frecuencias alélicas son típicamente desconocidas de antemano. En el modelo sin mezcla, los algoritmos asignan cada individuo a un grupo K (Hubisz *et al.*, 2009).

El enfoque bayesiano incorpora la información previa y puede ser especialmente útil en la biología de la conservación ya que facilita la toma de decisiones cuando se cuenta con pocos datos y se quiere integrar todo el conocimiento disponible; y en la biología de la conservación a menudo se deben tomar decisiones basadas en datos limitados. La principal desventaja del enfoque bayesiano es que está fuertemente influenciado por la información previa y, por lo tanto, puede ser menos objetivo que el enfoque clásico (Allendorf & Luikart, 2007).

1.2.4. Sistemas de Cruzamiento

Las inferencias sobre los sistemas de cruzamiento en plantas utilizan cada vez más marcadores moleculares altamente informativos e investigan las más finas facetas de estos (Ritland *et al.*, 2002).

Los sistemas de apareamiento por endogamia en plantas han sido tradicionalmente descritos por modelos de apareamiento mixto donde se asume que las plantas se autofertilizan a una tasa s . La fracción restante de la progenie se deriva de cruzamiento, que es el caso más simple, y se considera que ocurre al azar en el resto de la población. Algunas desviaciones de estos

supuestos pueden ser modificados y ser tratados como aspectos adicionales del sistema de apareamiento. Si el apareamiento ocurre entre organismos emparentados (endogamia biparental), la tasa de autofecundación mono-locus (t_s) debe ser superior a la tasa de autofecundación multilocus (t_m) y la diferencia entre estas dos ($t_m - t_s$) es una estimación mínima de la autofecundación aparente debido a la endogamia biparental. Además, se supone que las matrices de progenie derivadas por cruzamiento están compuestas por medios hermanos y se asume que las tasas de autofecundación son constantes entre las matrices; pero en ambos casos el “modelo de apareamientos correlacionados” puede caracterizar la medida en que los hermanos comparten el mismo padre y la medida de la variación entre las matrices de tasa de fecundación. La variación en el sistema de apareamiento puede también examinarse con estimaciones a nivel individual (Ritland, 2002).

El modelo de probabilidad subyacente en la estimación multilocus del sistema de apareamiento asume n loci no ligados. En el modelo mixto de apareamiento, la progenie es tanto producto de autofecundación como debida al cruzamiento aleatorio. La fecundación cruzada también ocurre al azar para un acervo de polen en equilibrio de ligamiento. El efecto de estos supuestos ha sido examinado en el caso de la heterogeneidad del acervo de polen (Smyth & Hamrick, 1984) y de enlace (Hedrick y Ritland, 1990). Las estimaciones de la tasa de autofecundación se encuentran maximizando la probabilidad de los datos con respecto a la tasa de autofecundación (y las frecuencias de polen, si también se estima) utilizando métodos numéricos como Newton-Raphson o el método de máxima expectación (EM; Cheliak *et al.*, 1983).

La filiación materna se puede deducir mediante el cálculo de probabilidades de matrices de descendencia a través de los posibles genotipos maternos y se elige el genotipo paterno según la mayor probabilidad dada; sin embargo, esto requiere asumir tanto que las familias son de hermanos completos (Schoen & Clegg, 1984) como de medios hermanos (Brown & Allard, 1970). Los errores de estimación pueden encontrarse mediante repeticiones (bootstrap) donde las series totales de la progenie se vuelven a muestrear (Ritland, 1990).

Objetivos



2.1. Objetivo General

Determinar la variabilidad, el grado de diferenciación y el nivel de estructuración genética mediante el uso de microsatélites en las poblaciones de *Ilex perado* Aiton ssp. *lopezlilloi* (G. Kunkel) A. Hansen & Sunding, *Silene nocteolens* Webb & Berthel. y *Sorbus aria* (L.) Cratz del archipiélago Canario.

2.2. Objetivos Específicos

1. Desarrollar las técnicas de análisis de microsatélites que permitan identificar y diferenciar con rapidez, de forma objetiva y sin ambigüedades la variabilidad genética de los individuos de las especies seleccionadas.
 2. Analizar la relación genética entre varias especies y subespecies del género *Ilex* de la Región Macaronésica y verificar el grado de diferenciación existente entre *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* y sus congéneres más cercanos.
 3. Determinar la diversidad genética poblacional de *Silene nocteolens* y comparar los niveles de variación y diferenciación genética entre sus poblaciones naturales.
 4. Conocer la dinámica reproductiva de *Silene nocteolens* a través de la variación molecular, detectada por microsatélites, en diferentes estadios de vida.
 5. Conocer el grado de diversidad genética entre los individuos de *Sorbus aria* en Canarias y comparar su variabilidad genética con poblaciones de la Península Ibérica.
 6. Contribuir, desde la perspectiva genética, a la aplicación y desarrollo de los posibles planes de recuperación que se puedan establecer en estos taxones amenazados.
-

El Complejo *Ilex*



3.1. Descripción de las Especies Estudiadas

El género *Ilex* L. (Aquifoliaceae) es un grupo subcosmopolita que consta de aproximadamente 600 especies de árboles y arbustos dioicos, mayormente perennes, que se encuentran en amplias zonas templadas y tropicales del Mundo (Galle, 1997; Manen *et al.*, 2010). Existen registros fósiles de cerca de 250 especies procedentes de distintas regiones geográficas, excepto de la Antártica, que parecen indicar que los antecesores de este género debieron tener su origen en Gondwana con subsecuentes migraciones a Eurasia y Norte América y extensiones masivas en África y en Australia (Raven & Axelrod, 1974; Coelho y Mariath, 1996; Selbach-Schnadelbach *et al.*, 2009).

De manera general, los miembros de esta familia poseen hojas simples y alternas, venación reticulada y pequeñas estípulas libres. Las inflorescencias son tirso con cimas laterales. Comúnmente ocurre dimorfismo entre flores estaminadas y pistiladas; especialmente en el número de flores por dicasio, incluyendo flores laterales abortivas. Las flores son pequeñas, regularmente unisexuales con ovario súpero (ausente de nectario) que produce un óvulo por lóculo y frutos tipo drupa (Woodson *et al.*, 1967; Coelho y Mariath, 1996; Judd *et al.*, 1999). El número de cromosomas en la mayor parte de las especies de *Ilex* es $2n = 40$, pero existen especies con un número mayor (Selbach-Schnadelbach *et al.*, 2009).

En las islas de La Macaronesia, se han reportado varias especies y subespecies distribuidas en los distintos archipiélagos. Así, *Ilex perado* Aiton aparece en las Azores, Madeira e Islas Canarias; *Ilex canariensis* Poir. es un endemismo de las Islas Canarias y Madeira e *Ilex azorica* Gand. es propia de las Azores. Kunkel (1977b) distinguió a *Ilex platyphylla* Webb & Berth. como una forma muy parecida a *Ilex perado* en las Islas Canarias, aunque hoy se considera una subespecie de esta. *Ilex perado* ssp. *platyphylla*, (Webb & Berthel.) Tutin se distribuye en las Islas de La Gomera, La Palma y Tenerife e *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (G. Kunkel) A. Hansen & Sunding es un endemismo exclusivo de la isla de La Gomera (Izquierdo *et al.*, 2004). La principal diferencia entre estas subespecies estriba en la longitud de los pedúnculos de

las inflorescencias, que suelen ser extremadamente largos en *I. perado* ssp. *lopezlilloi* (Kunkel, 1977b; Andrews, 1983).

3.1.1. *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (G. Kunkel) A. Hansen & Sunding

El “Bojo” o “Naranja salvaje”, *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*, ha sido catalogado como un taxón fuertemente amenazado debido al bajo número de sus ejemplares. La causa de su escasez puede estar relacionada con su aprovechamiento maderero e interés forrajero. Se encuentra incluido en el Catálogo Canario de Especies Protegidas (CCEP, 2010) como “En Peligro de Extinción”, en la Lista Roja de la Flora Vasculare de España (Moreno *et al.*, 2008) como “En Peligro Crítico” y se propone su inclusión en la Directiva de Hábitats como especie prioritaria (VVAA, 2000; Bañares *et al.*, 2003).

Ilex perado ssp. *lopezlilloi* (Fig. 1) es una subespecie cuyos individuos pueden ser arbustos de gran tamaño o árboles de hasta 10 m de altura. Los troncos suelen ser cortos y muy ramificados desde la base. Las ramas son horizontales o ascendentes, de color verde brillante con lenticelas cuando son jóvenes.

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



Fig. 1 *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*

Florece de mayo a junio y fructifica de julio a septiembre. Las flores son de color blanco y crecen en racimos axilares. Son plantas dioicas y su reproducción sexual está limitada por el hecho de que los ejemplares naturales que se conocen produzcan flores pistiladas. Los frutos son subglobosos, rojos,

indehiscentes, de aproximadamente 9 – 10 mm de diámetro (Kunkel 1977b; Bañares *et al.*, 2004).

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

El área de ocupación real de *I. perado* ssp. *lopezilloi* es muy reducida, pues no alcanza los 1000 m². Hasta el momento se conocen solo pocos individuos naturales dentro del Parque Nacional de Garajonay en la isla de La Gomera (**Fig. 2**) donde es un endemismo exclusivo. No obstante, las actuaciones de conservación realizadas por el personal del Parque han logrado incrementar el número de efectivos mediante métodos de reproducción asexual hasta 21 individuos (Bañares *et al.*, 2004) en la poblaciones ubicadas en El Bailadero y Pajarito-Las Cancelas.

Esta subespecie parece optar por ambientes con precipitaciones anuales que rondan los 800 mm y consigue parte de la humedad requerida a partir de la

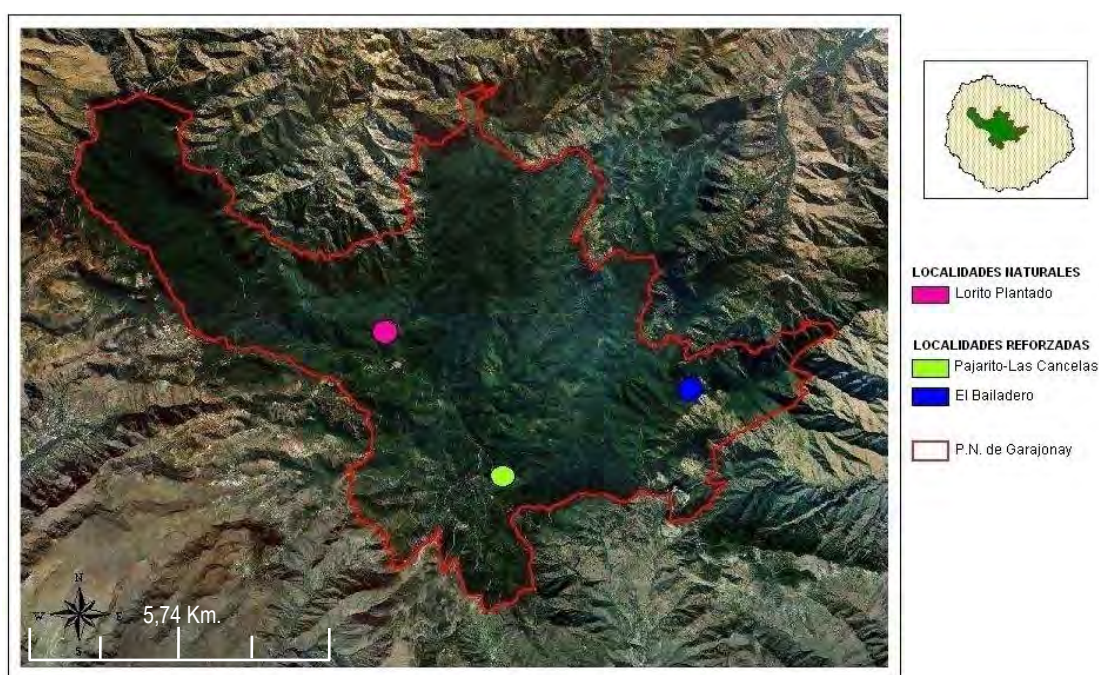


Fig. 2 Distribución de *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* en el Parque Nacional de Garajonay

lluvia horizontal propia del Monteverde mesofítico donde la humedad ambiental es elevada casi todo el año y las temperaturas son más bien bajas (15 °C en promedio anual). Requiere cierta luminosidad para progresar adecuadamente, por lo menos en los primeros estadios de vida.

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

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

3.1.2. *Ilex perado* ssp. *platyphylla* (Webb & Berthel.) Tutin

Esta subespecie es la mayor y mejor desarrollada dentro del grupo *perado*. Fue descrita como *Ilex platyphylla* por Webb y Berthelot en 1836; pero luego se unió a las especies de Madeira y se denominó como *Ilex perado* var. *platyphylla* por Loesener (Lems, 1968). En 1977 Kunkel vuelve a plantear la posibilidad de que la subespecie *platyphylla* regresara al rango de especie, aunque sin considerarla demasiado cercana a *I. perado*. De acuerdo a sus observaciones, el autor concluyó que la principal diferencia entre ambos taxones radica en el tamaño de la lámina foliar y en la aparición de algunos pecíolos alados en la primera (Andrews, 1983). Recientemente se le ha incluido en la Lista Roja de Flora Vascular Española en la categoría de "Vulnerable" (Moreno *et al.*, 2008).

Este acebo es un árbol de hasta 15 m de altura, de corteza grisácea y ramas horizontales. Hojas brillantes, láminas

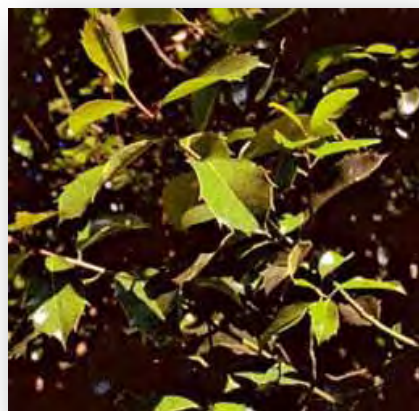


Fig. 3 *Ilex perado* ssp. *platyphylla*

maduras de 10 – 13,3 x 6 – 8,6 cm, de anchamente ovadas a orbiculares; bordes ondulados con espinas de entre 1,5 – 3,5 mm de longitud que apuntan hacia adelante o a veces más o menos enteros, pero con espina apical (**Fig. 3**).

Pecíolos de 0,8 – 1,6 cm, usualmente pubescentes y algunas veces alados (Lems, 1968; Kunkel, 1977b; Andrews, 1983). Flores entre blanco y rosado. Cáliz de 1,3 – 2 mm de largo; sépalos de entre 0,7 – 1,1 x 1,5 – 2,2 mm; corola de 4,3 – 5,7 mm de longitud con pétalos de 4 – 5 x 2,6 a 3,5 mm; estambres 4, filamentos de 2 – 4 mm, anteras de 1,3 – 1,8 mm, estaminoides de 1,9 – 4 mm; ovario de 3 – 4 mm de largo, estigma de 1,6 – 2,5 x 0,6 – 1,4 mm, pistiloides de 0,9 – 1,3 mm (Andrews, 1983; Cabrera García *et al.*, 2005). El fruto es entre rojo oscuro a negro cuando maduro, de 8 – 10 mm de diámetro, esféricos; pirenos 4, de 6,5 – 7,5 x 3 – 4 mm; pedicelos de 8 – 11 mm (Andrews, 1983; Cabrera García *et al.*, 2005).

Aunque la especie tiene una mayor distribución (Lems, 1968; Manen *et al.*, 2010); de acuerdo con Kunkel (1977b), esta subespecie está restringida a las Islas Canarias. Según su opinión, las citas para Madeira hechas por Loesener en 1901 necesitaban una revisión crítica. En las Islas Canarias ha sido reportado para Tenerife y La Gomera. En Tenerife, es bastante frecuente en los bosques de Laurisilva de las laderas del Norte en la región de Anaga, Las Mercedes y Agua García. Rara en La Gomera (El Cedro) (Andrews, 1983; Cabrera García *et al.*, 2005).

Según Kunkel (1981) *Ilex perado* ssp. *platyphylla* es un elemento de la Laurisilva con preferencia de elevación entre los 500 – 900 msnm y es bastante exigente en cuanto a la humedad disponible; también parece requerir un suelo profundo en amplia sombra, pero ocasionalmente crece cerca de cumbres expuestas y entonces las hojas son más pequeñas que lo usual (Andrews, 1983).

3.1.3. *Ilex canariensis* Poir.

Se le conoce como el Acebiño de Canarias (Canary Holly). Es un árbol de la Laurisilva macaronésica que ha sido catalogado como “De Bajo Riesgo/Poco

Amenazado” en la lista de especies amenazadas de la UICN (Lems, 1968; IUCN, 2011).

Puede llegar a alcanzar los 15 – 20 m de altura. Desarrolla fuertes troncos de hasta 50 cm de diámetro con una corteza lisa y a veces escamosa, de color gris pálido u oscuro (Kunkel, 1977b). El acebiño se distingue fácilmente de *Ilex perado* por sus pequeñas hojas ovales u oblongo-ovadas, ápice redondeado o un poco acuminado. Borde usualmente entero, aunque las hojas jóvenes a menudo presentan espinas (Lems, 1968; Kunkel, 1977b; IUCN, 2011).

Las flores se producen en racimos que brotan sobre la axila foliar (**Fig. 4**). Los frutos redondeados pasan de verde a amarillo a rojos y continúan oscureciendo hasta llegar a ser negros. Cada fruto contiene entre 4 – 6 semillas de aproximadamente 35 mg (Lems, 1968; Kunkel, 1977b; Salvade *et al.*, 2006).



Fig. 4 *Ilex canariensis*

Ilex canariensis ha sido reportado exclusivamente para Madeira y cinco de las siete Islas Canarias (Gran Canaria, Tenerife, La Gomera, La Palma y El Hierro) (Lems, 1968; Kunkel, 1977b). Esta especie está normalmente presente en las altitudes más bajas y entre los matorrales de los bosques de Laurisilva del tipo fayal/brezal y en la Laurisilva de ladera (Arboal *et al.*, 2005; IUCN, 2011); razón por la que se le considera una de las especies dominantes de la Laurisilva canaria junto a otras especies como *Laurus novocanariensis* (Laurel), *Erica arborea* (Brezol), *Erica scoparia* (Tejo), *Prunus lusitanica* (Laurel portugués), *Myrica faya* (Faya) y *Viburnum tinus* (Laurentilla) (Arévalo *et al.*, 2007).

Los frutos del acebiño son consumidos por varias especies de aves (*Turdus merula*, *Erithacus rebecula*, *Columba* spp.) que dispersan las semillas a través sus excrementos (Martín *et al.*, 2000). Por otro lado, Salvade *et al.* (2006) han concluido que la predación post dispersión de semillas por ratas (*Rattus rattus*) puede tener un efecto importante sobre el reclutamiento de *Ilex*

canariensis, especialmente en áreas de sucesión iluminadas donde estos árboles pueden establecerse naturalmente.

3.1.4. *Ilex azorica* Gand.

Endemismo del archipiélago de Azores conocido como Azevihno y considerado internacionalmente como una especie diferente de *Ilex perado* por el IPNI (International Plant Names Index, <http://www.ipni.org>). No obstante, es denominada como *Ilex perado* Aiton ssp. *azorica* (Loes.) en la Base de Datos de Biodiversidad de Azores (<http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt>) tal como fue reportado por Tutin (1933); por lo cual, algunos autores hacen referencia a esta última nomenclatura.

Se trata de árboles o arbustos perennifolios. Los troncos adultos suelen estar fuertemente desarrollados. Las hojas son pequeñas, de color verde-oscuro lustrosas; las láminas de forma oblongo-elíptica miden entre 3 – 6,6 x 2,5 – 5 cm; margen entero o con solo pocas espinas, cuando presentes de 0,5 – 1,8 mm. Los pecíolos miden entre 0,3 – 0,9 cm, usualmente glabros (**Fig. 5**) (Andrews, 1983; Sjögren, 2001).



Fig. 5 *Ilex azorica*

El cáliz de las flores mide aproximadamente 0,8 – 1,5 mm con sépalos de entre 0,3 – 0,8 x 1 – 1,5 mm; la corola tiene una longitud de 2,5 – 4,3 mm, con pétalos de 2,3 – 3,9 x 2 – 3 mm, ciliados a poco glabros en la mitad superior. Estambres de 4 a 5, de unos 1,5 – 2 mm, con anteras de 0,8 – 1,1 mm; estaminoides de 1,1 – 1,9 mm; ovario de 1,5 – 2,5 mm de longitud con estigma de 0,5 – 0,25 x 1,1 – 2,5 mm; pistiloides de 0,5 – 1,1 mm de longitud (Andrews, 1983). Los frutos son esféricos, ocasionalmente oblongos de 8 – 9 x 7 – 10 mm; pirenos 3 a 4, de 6,5 – 7,5 x 3 – 4 mm y pedicelos de 6 – 11 mm de largo (Andrews, 1983).

Según Sjögren (2001), *Ilex azorica* está presente en todas sus islas excepto en Graciosa; sin embargo, la Base de Datos de Biodiversidad de Azores (<http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt>) no considera esta excepción. Se encuentra amenazado en Santa María y especialmente en la isla de Corvo donde solo un espécimen ha sido reportado desde 1978.

Ilex azorica prefiere crecer sobre los 500 msnm, tanto en hábitats fuertemente sombreados como en aquellos con considerable exposición solar. Crece en barrancos, cráteres, lapiaces y como árbol solitario en amplios pastizales; pero es más frecuente en la Laurisilva donde los individuos presentan una dispersión gregaria con otras especies. En este ambiente, los troncos suelen tener una amplia cobertura de musgos y las hojas adultas logran amparar gran cantidad de hepáticas epífitas (Sjögren, 2001).

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Recogida de Muestras y Poblaciones

Se obtuvo un total de 393 individuos del género *Ilex*. Las muestras provinieron de 26 localidades de seis islas distintas e incluyeron las cuatro especies o subespecies de *Ilex* descritas hasta el momento para Canarias y Azores: *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* (32), *Ilex perado* ssp. *platyphylla* (93), *Ilex azorica* (39) e *Ilex canariensis* (229). El período de colecta osciló entre marzo de 2007 y marzo de 2009 (**Tabla 1**).

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

TAXÓN	LOCALIDAD	ISLA	Nº
<i>Ilex perado</i> ssp. <i>lopezilloi</i>	Ancule	La Gomera	12
	Ancón de Pajarito	La Gomera	8
	Las Cancelas	La Gomera	4
	Lorito Plantado	La Gomera	8
			32
<i>Ilex perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	Ancule	La Gomera	1
	Bailadero	La Gomera	2
	Zona de Parcelas	La Gomera	5
	Reventón Oscuro	La Gomera	1
	Apartacaminos	La Gomera	8
	El Moquinal	Tenerife	28
	Casa Forestal	Tenerife	17
	Cruz de Taganana	Tenerife	31
			93
<i>Ilex azorica</i>	Troqueira	São Miguel	10
	Lagoa do Fogo	São Miguel	10
	Estrada do Mato	Flores	10
	Descida para Ponta Delgada	Flores	9
			39
<i>Ilex canariensis</i>	Vallehermoso	La Gomera	7
	Lomo de la Jara	Tenerife	11
	El Moquinal	Tenerife	31
	Las Calderetas	Tenerife	23
	Los Tilos	La Palma	26
	Punta Llana	La Palma	31
	Breña Alta	La Palma	33
	La Galería del Barbusano	Gran Canaria	2
	Tamadaba	Gran Canaria	26
El Brezal	Gran Canaria	39	
			229
TOTAL			393

La totalidad de las muestras pertenecientes a *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* son de La Gomera debido a su carácter endémico. De esta subespecie se procuró tomar muestras de todos los árboles encontrados (a sabiendas de la existencia de clones producto de restituciones) con el fin de identificar la mayor cantidad de genotipos presentes. En algunos casos también se colectaron hojas de varios posibles chupones cercanos a los troncos principales por si se trataran de individuos diferentes. Los representantes de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* pertenecen a cinco localidades de la isla de La Gomera y tres de la isla de Tenerife.

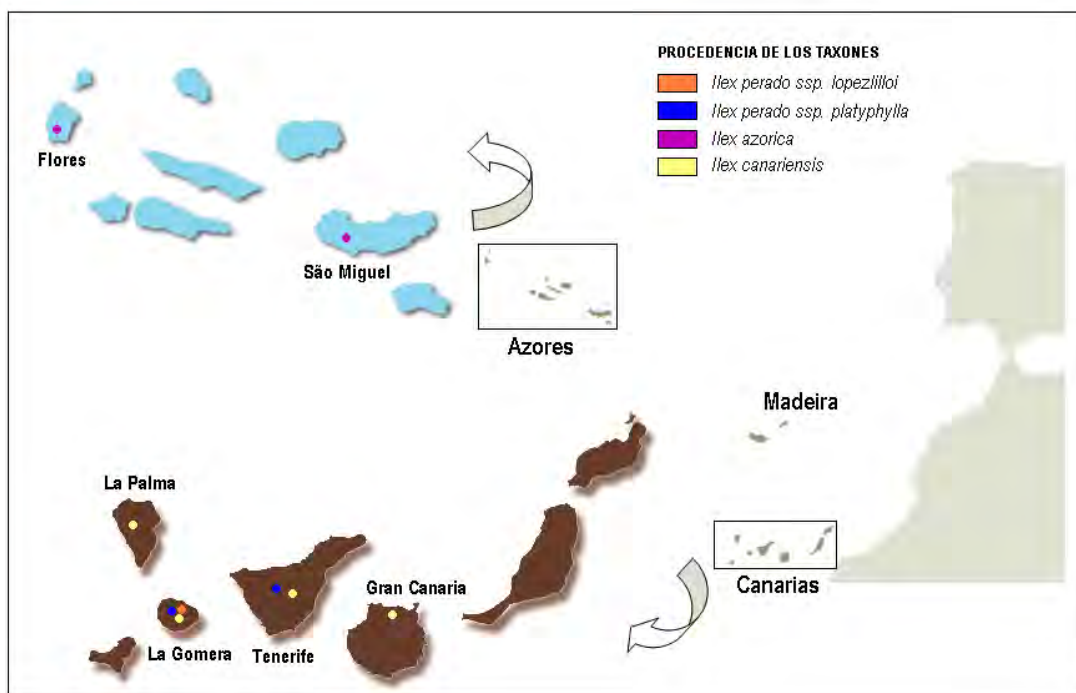


Fig. 6 Procedencia de las muestras recolectadas del género *Ilex*

Los individuos de *Ilex azorica* provinieron de dos localidades en la isla de São Miguel y dos localidades de la isla de Flores (Azores) y las muestras de *Ilex canariensis* proceden de una localidad de La Gomera, tres de Tenerife, tres de La Palma y dos de Gran Canaria (Islas Canarias) (**Fig. 6**).

Las poblaciones de *Ilex azorica* de Estrada do Mato y Descida para Ponta Delgada, así como los individuos de *Ilex canariensis* de las poblaciones de La Galería del Barbusano, Punta Llana, Breña Alta, Brezal y dos individuos de la población de Los Tilos no se consideraron en el análisis estadístico ya que

presentaban un alto porcentaje de microsatélites sin amplificar y alelos inciertos.

Por otro lado, las localidades de Ancule, Bailadero y Reventón Oscuro de la subespecie *I. perado ssp. platyphylla* de La Gomera fueron reunidas en una única población denominada SUGO-P. Análisis preliminares revelaron que entre las 32 muestras catalogadas como *I. perado ssp. lopezlilloi* examinadas, solo existían 5 genotipos distintos. Debido a esto, y dado que dichas muestras proceden en su mayoría de restituciones realizadas a través de esquejes y, por tanto, mediante reproducción asexual por parte del personal del Parque Nacional de Garajonay; no todas las muestras fueron consideradas en el análisis genético pues podrían constituir una distorsión en los resultados. Así, los cinco genotipos encontrados de *Ilex perado ssp. lopezlilloi* fueron reunidos en un mismo grupo de análisis que se denominó como la población ENGO-L. La reorganización establecida para efectos del análisis computacional se refleja en la **Tabla 2**.

Tabla 2 Poblaciones de *Ilex* sometidas al análisis estadístico

TAXÓN	LOCALIDAD	CÓDIGO	ISLA	Nº
<i>Ilex perado ssp. lopezlilloi</i>	La Gomera	ENGO-L	La Gomera	5
				5
<i>Ilex perado ssp. platyphylla</i>	Ancule, Bailadero y Reventón Oscuro	SUGO-P	La Gomera	4
	Zona de Parcelas	PARC-P	La Gomera	5
	Apartacaminos	APAT-P	La Gomera	8
	El Moquinal	MOQU-P	Tenerife	28
	Casa Forestal	CAFO-P	Tenerife	17
	Cruz de Taganana	CRTA-P	Tenerife	31
				93
<i>Ilex azorica</i>	Troqueira	TROQ-A	São Miguel	10
	Lagoa do Fogo	LAFO-A	São Miguel	10
				20
<i>Ilex canariensis</i>	Vallehermoso	VAHE-C	La Gomera	7
	Lomo de la Jara	LOJA-C	Tenerife	11
	El Moquinal	MOQU-C	Tenerife	31
	Las Calderetas	CALD-C	Tenerife	23
	Los Tilos	TILO-C	La Palma	24
	Tamadaba	TAMA-C	Gran Canaria	26
			122	
TOTAL				240

Nº: Número de individuos

3.2.2. Análisis Genéticos

Las muestras fueron transportadas y conservadas en bolsas plásticas de cierre hermético con gel de sílice hasta la extracción del ADN. Cada bolsa fue etiquetada con el código correspondiente a cada individuo y población de cada taxón.

El ADN de las muestras se extrajo mediante la maceración de aproximadamente 1 cm² de hoja deshidratada de cada individuo. En los primeros casos este procedimiento se hacía con la ayuda una pequeña cantidad de gel de sílice, un mortero y un pistilo. Posteriormente se realizó en un molinillo vibratorio (RETSCH MM 301), directamente en los tubos de ensayo de 1,5 ml de capacidad a los que también se les introducía un par de balines de acero inoxidable que contribuían a la trituración de la muestra. En ambos casos el resultado fue un polvo de coloración verde que se sometió al protocolo de extracción de Doyle & Doyle (1987) y en el caso de *Ilex canariensis* al de Dellaporta *et al.* (1983) modificado por Corniquel & Mercier (1994).

Una vez extraído el ADN se procedió a su purificación, esto se hizo mediante kits de purificación comerciales (SIGMA Gene Elute PCR Clean-Up Kit) y utilizándose 150 µl del ADN total de cada muestra.

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

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

Se probaron 18 cebadores en el género *Ilex* (**Tabla 3**). Doce fueron descritos por Torimaru *et al.* (2004) para *Ilex leucoclada* y los seis restantes fueron cedidos amablemente por el Dr. Torimaru para este estudio.

Tabla 3 Microsatélites ensayados en el género *Ilex*.

LOCUS	REFERENCIA	ESPECIE	MOTIVO
ILE03-01-76	Torimaru (com pers.)	<i>Ilex leuococlada</i>	-
ILE03-01-30	Torimaru (com pers.)	<i>Ilex leuococlada</i>	-
ILE03-01-47	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(CT) ₉
ILE03-01	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(CT) ₁₅
ILE03-38	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(AG) ₂₂
ILE03-53	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(GA) ₁₂
ILE03-65	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(TC) ₁₅
ILE03-86b	Torimaru (com pers.)	<i>Ilex leuococlada</i>	(GA) ₈
ILE04-02	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(TA) ₁₁ A(CA) ₁₀
ILE04-04	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(GA) ₇
ILE04-06	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(CT) ₂₄
ILE04-10	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(GA) ₂₂
ILE04-17	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(CA) ₁₇
ILE04-18	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(GA) ₆ GG(GA) ₁₁
ILE04-59	Torimaru (com pers.)	<i>Ilex leuococlada</i>	-
ILE05-81	Torimaru (com pers.)	<i>Ilex leuococlada</i>	(AG) ₂₂
ILE05-83	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leuococlada</i>	(AG) ₁₆
ILE24	Torimaru (com pers.)	<i>Ilex leuococlada</i>	-

Las amplificaciones de ADN se hicieron en placas de PCR de 96 pocillos de 200 µl. En cada pocillo se depositó aproximadamente 20 ng de ADN, 10 pmol de cada cebador y 24 µl de mezcla maestra para PCR (Reddy-Mix, ABgene, Surrey, UK) que incluye 0,625 unidades de la enzima ADN Taq polimerasa, Tris-HCl 75 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, Tween 20 0,01%, 1,5 mM (o 2mM) de MgCl₂ y 0,2 mM de cada dNTP.

3.2.3. Análisis de Datos

El análisis de los datos se circunscribe al genotipado de los productos de amplificación y al procesamiento estadístico de la matriz de datos obtenida a partir mismo.

3.2.3.1. Genotipado

Los productos de la amplificación fueron analizados usando un Secuenciador Capilar ABI 3130XL y el genotipado; es decir, los alelos de cada locus y su tamaño respectivo fueron identificados por los picos obtenidos a través de los programas GENSCAN 2.02 y GENOTYPER 1.1 (Applied Biosystems, Inc.). Los datos obtenidos para cada individuo y locus amplificado se incluyeron en una matriz de doble entrada (hoja de cálculo EXCEL). Se elaboró entonces

una base de datos en la que se incluían los individuos analizados y los alelos identificados por población y locus respectivos. Una vez completada la matriz de datos se empleó el programa TRANSFORMER 3B.01 (Caujapé-Castells y Baccari-Rosas, 2005), el cual permitió exportar los valores a otros programas de análisis genético.

3.2.3.2. Análisis Estadísticos

En el Anexo I se muestra un resumen de los programas informáticos utilizados en la caracterización genética de las poblaciones vegetales estudiadas.

La estadística elemental de variabilidad genética de *Ilex* sp. corresponde al número medio de alelos por locus (A), la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e ; Nei, 1973). Para todos los casos se consideró también el porcentaje de loci polimórficos (P). Estos análisis fueron calculados entre poblaciones y taxones utilizando POPGENE 3.2 (Yeh *et al.*, 1999); programa que también sirvió para obtener los valores de identidad y distancia genética de Nei (Nei, 1972).

Para determinar si las poblaciones analizadas se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg se calculó el índice de endogamia (F_{IS}) y se realizó un test de probabilidad de Fisher implementado en GENEPOP V4 (Rousset, 2008) en el que la hipótesis nula (H_0) señala la existencia de unión al azar de los gametos para ese locus.

Las distancias entre poblaciones para la construcción de un dendrograma UPGMA con fortaleza en los agrupamientos (1000 repeticiones) para *Ilex* sp. así como la distancia DAS (Chakravorty & Jin, 1995) entre individuos para la construcción de un árbol Neighbor-Joining (NJ) fueron calculadas utilizando POPULATION 1.2.30BETA (Langella, 2005). Todos los árboles fueron visualizados y editados en MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) y TREEVIEW 1.1.6 (Roderic, 2001).

La obtención de los coeficientes de diferenciación (F_{ST}) fue hecha con GENALEX 6.4 (Peakall & Smouse, 2006), programa con el que también se

generaron el análisis de coordenadas principales (PCoA) y el análisis molecular de varianza (AMOVA).

La estructura de las poblaciones fue inferida mediante un análisis Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.2 (Falush *et al.*, 2007). Se asumió un modelo de mezcla y frecuencias alélicas independientes obteniéndose una serie de carreras independientes para cada valor de K (el número de grupos) entre 1 y 10. El análisis consistió en 10^5 períodos de prueba y una longitud de carrera 10^6 réplicas. En total se corrieron 5 análisis con estas especificaciones a fin de corroborar los resultados obtenidos. Los individuos fueron asignados a un “grupo” si su proporción de pertenencia (q_i) a ese grupo era igual o mayor que el umbral de 0,05.

3.3. Resultados

3.3.1. Cebadores y Protocolos Funcionales

Tras las pruebas de los 18 cebadores en el género *Ilex* (**Tabla 3**), ocho (ILE04-02, ILE04-10, ILE03-38, ILE03-53, ILE03-01, ILE04-06, ILE05-81 e ILE03-86b) dieron resultados positivos y mostraron polimorfismo, por lo que fueron seleccionados para analizar las muestras en su totalidad (**Tabla 4**).

Tabla 4 Microsatélites con amplificación positiva y polimorfismo para el género *Ilex*.

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

Con excepción de los cebadores ILE04-02 e ILE04-06 que requirieron MgCl₂ 2,5 mM, las cargas fueron hechas con MgCl₂ 1,5 mM.

El protocolo de amplificación (**Fig. 7**) fue el mismo para todos los cebadores: 3 min de desnaturalización a 94 °C; 30 ciclos de 45 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s de hibridación a 56 °C y 45 s de elongación a 72 °C; seguidos de 5 min de elongación a 72 °C y un período de espera indefinido a 4 °C.

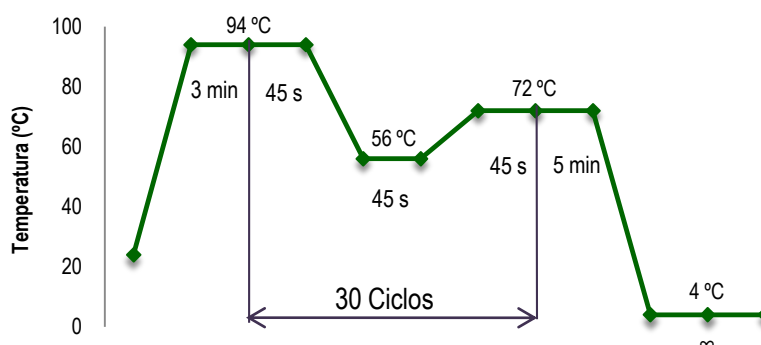


Fig. 7 Perfil de amplificación utilizado para el género *Ilex*

3.3.2. Niveles de Diversidad Genética

3.3.2.1. Frecuencias Alélicas

En las muestras analizadas del género *Ilex* sp. se detectaron 94 alelos, correspondientes a 8 loci, todos polimórficos. El número de alelos varió de 6 para el locus ILE03-86b, 7 alelos para el locus ILE03-53, 10 alelos para el locus ILE05-81, 11 alelos para los loci ILE04-10 e ILE03-38, 12 para el locus ILE04-01, 14 para el ILE04-06 y hasta 23 alelos para el locus ILE04-02 (Anexo II).

El mayor porcentaje de alelos exclusivos fue detectado en las poblaciones TROQ-A y LAFO-A (10,64%), seguidas de VAHE-C, TILO-C y TAMA-C (3,19%), CALD-C (2,08%) y finalmente MOQU-P, CRTA-P y MOQU-C (1,04%). No se encontró ningún alelo presente en todas las poblaciones; siendo ILE04-10-231 el más común, pues solamente no se detectó en la población APAT-P. En cuanto a los alelos fijados, se encontró uno en PARC-P (ILE03-86b-219), CAFO-P (ILE04-02-94) y TAMA-C (ILE04-06-194); dos en LAFO-A (ILE03-38-261 e ILE03-53-156) y VAHE-C (ILE04-02-71 e ILE03-86b-213) y tres en APAT-P (ILE04-10-243, ILE03-38-271, ILE04-06-199). LOJA-C, MOQU-C y CALD-C compartieron con VAHE-C la fijación del alelo ILE03-86b-213.

Tabla 5 Proporción de alelos exclusivos detectados en el género *Ilex*

TAXÓN	Nº	N _A	N _{EX}	% E _{TAXÓN}	%E _{TOTAL}
<i>Ilex perado</i> ssp. <i>lopezlilloi</i>	5	17	0	0,00	0,00
<i>Ilex perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	86	31	8	25,81	8,51
<i>Ilex azorica</i>	20	45	30	66,67	31,91
<i>Ilex canariensis</i>	122	48	25	52,03	26,59
Total <i>Ilex</i> sp.	233	94	63	67,02	

Nº: es el número de individuos analizados por taxón, N_A: Número de alelos por taxón, N_{EX}: Número de alelos exclusivos, %E_{TAXÓN}: Porcentaje de alelos exclusivos en proporción al taxón y %E_{TOTAL}: Porcentaje de alelos exclusivos en proporción al total.

Por taxones, la mayor proporción de alelos exclusivos se encontró en *Ilex azorica* (31,91%), seguida de *I. canariensis* (26,59%) e *I. perado* ssp. *platyphylla* (8,51%). No se encontraron alelos propios para *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (Tabla 5, Anexo III). Cuatro alelos (ILE04-02-94, ILE04-10-231, ILE03-38-261 e ILE03-53-156) fueron detectados en todas las especies y subespecies analizadas.

3.3.2.2. Variabilidad Genética

Las **Tabla 6** y **Tabla 7** muestran los diferentes índices de diversidad genética obtenidos para las poblaciones, especies y subespecies del género *Ilex* analizadas. En estos análisis no se tomaron en cuenta 7 individuos con resultados inciertos de la Casa Forestal de Tenerife (muestras que sí fueron consideradas para la construcción del Neighbor-Joining y en el análisis de coordenadas principales, ver **Fig. 10** y **Fig. 11**).

Tabla 6 Parámetros de diversidad genética para las poblaciones del género *Ilex*

POBLACIÓN	Nº	TAXÓN	ISLA	A	H _o	H _e	P
ENGO-L	5	<i>I. perado</i> ssp. <i>lopezlilloi</i>	La Gomera	2,13	0,500	0,435	100,00%
SUGO-P	4	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	La Gomera	2,25	0,344	0,367	100,00%
PARC-P	5	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	La Gomera	2,50	0,375	0,388	87,50%
APAT-P	8	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	La Gomera	1,63	0,467	0,261	62,50%
MOQU-P	28	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	Tenerife	3,25	0,419	0,491	100,00%
CAFO-P	10	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	Tenerife	2,50	0,425	0,443	87,50%
CRTA-P	31	<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	Tenerife	3,00	0,436	0,473	100,00%
TROQ-A	10	<i>I. azorica</i>	São Miguel	3,75	0,247	0,314	62,50%
LAFO-A	10	<i>I. azorica</i>	São Miguel	4,13	0,275	0,344	75,00%
VAHE-C	7	<i>I. canariensis</i>	La Gomera	2,38	0,491	0,375	75,00%
LOJA-C	11	<i>I. canariensis</i>	Tenerife	3,43	0,570	0,556	75,00%
MOQU-C	31	<i>I. canariensis</i>	Tenerife	3,57	0,668	0,526	75,00%
CALD-C	23	<i>I. canariensis</i>	Tenerife	3,86	0,596	0,476	75,00%
TILO-C	24	<i>I. canariensis</i>	La Palma	3,25	0,584	0,483	100,00%
TAMA-C	26	<i>I. canariensis</i>	Gran Canaria	3,13	0,484	0,407	87,50%
<i>Ilex</i> sp.	233			11,63	0,459	0,725	100,00%

Nº: es el número de individuos analizados por localidad, A: Número medio de alelos por locus, H_o: Heterocigosidad observada, H_e: Heterocigosidad esperada y P: Porcentaje de loci polimórficos.

Tabla 7 Índices de diversidad genética por especie o subespecie del género *Ilex*

TAXÓN	Nº	A	H _o	H _e	P
<i>I. perado</i> ssp. <i>lopezlilloi</i>	5	2,13	0,500	0,435	100,00%
<i>I. perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	86	3,88	0,424	0,560	100,00%
<i>I. azorica</i>	20	5,63	0,261	0,339	75,00%
<i>I. canariensis</i>	122	5,88	0,598	0,551	100,00%

Nº: es el número de individuos analizados por taxón, A: Número medio de alelos por locus, H_o: Heterocigosidad observada, H_e: Heterocigosidad esperada y P: Porcentaje de loci polimórficos.

El número medio de alelos por locus varía considerablemente entre las poblaciones estudiadas. Los valores oscilaron entre 1,63 para la población de

Apartacaminos (APAT-P) y 4,13 para la población de Lagoa de Fogo (LAFO-A); poblaciones de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* e *Ilex azorica*, respectivamente.

En general las poblaciones de *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* e *Ilex perado* ssp. *platyphylla* procedentes de la isla de La Gomera (ENGO-L, SUGO-P, PARC-P y APAT-P) presentaron valores de diversidad inferiores a las poblaciones de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* de Tenerife (MOQU-P, CAFO-P y CRTA-P), *Ilex azorica* (TROQ-A, LAFO-A) e *Ilex canariensis* (LOJA-C, MOQU-C, CALD-C, TILO-C y TAMA-C); solo la población de VAHE-C presentó un valor similar. Esto es debido, probablemente, al bajo número de ejemplares estudiados en las poblaciones gomeras, las cuales no llegan a la decena por población. Por taxón, *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* e *Ilex canariensis* presentaron la menor y mayor riqueza alélica, respectivamente (**Tabla 7**).

La variabilidad genética detectada por polimorfismo difiere un poco de los resultados obtenidos con el número medio de alelos por locus. En la determinación del porcentaje de loci polimórficos de las poblaciones analizadas se ha escogido el criterio del 99%. Según este parámetro, el mayor porcentaje de loci polimórficos (100%) fue encontrado en cinco de las poblaciones analizadas (**Tabla 6**): La población de *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* (ENGO-L), una de *I. perado* ssp. *platyphylla* en la isla de la Gomera (SUGO-P), dos de las poblaciones de *I. perado* ssp. *platyphylla* de Tenerife (El Moquinal, MOQU-P y Cruz de Taganana, CRTA-P) y la población de Los Tilos (TILO-C) de *I. canariensis*. El menor valor de polimorfismo se presentó en la población de *I. azorica* nativa de Troqueira (TROQ-A = 62,50%) y la población de *I. perado* ssp. *platyphylla* proveniente de Apartacaminos (APAT-P = 62,50%). Este último dato coincide con los resultados para la riqueza alélica expuestos con anterioridad.

Observando los resultados del análisis por especie en la **Tabla 7**, es notorio que *Ilex perado* ssp. *lopezilloi*, *I. perado* ssp. *platyphylla* e *I. canariensis* muestran mayor polimorfismo (100%) que *I. azorica* (75%).

Los valores obtenidos para la heterocigosidad esperada (H_e) varían desde 0,261 para la población de APAT-P hasta 0,556 para LOJA-C. En general, la

heterocigosidad esperada para el género es alta (0,725) y en todas las poblaciones los valores fueron superiores a 0,314 con excepción de APAT-P.

En cuanto al taxón, pueden apreciarse valores de 0,339; 0,435; 0,551 y 0,560 para *Ilex azorica*, *I. perado* ssp. *lopezilloi*, *I. canariensis* e *I. perado* ssp. *platyphylla*; respectivamente. *Ilex azorica* presenta los niveles más bajos de heterocigosidad (**Tabla 7**).

3.3.3. Estructura Genética en las Poblaciones

3.3.3.1. Equilibrio Hardy-Weinberg

En la **Tabla 8** se señalan los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}) y el grado de significación de los mismos para las diferentes poblaciones analizadas en el género *Ilex*.

Tres loci (ILE03-38, ILE05-81 e ILE03-86b) se mostraron en equilibrio Hardy-Weinberg para todas las poblaciones; el resto de los loci mostró desviación del equilibrio Hardy-Weinberg con valores predominantemente positivos, aunque en la mayor parte de los casos son valores no estadísticamente significativos.

Aunque globalmente *Ilex azorica* presenta un defecto de heterocigóticos significativo, esto es sobretodo debido a las desviaciones encontrados en un solo locus (ILE04-06). De manera similar, la desviación global encontrada en las poblaciones de MOQU-P y CRTA-P en *Ilex perado* ssp. *platyphylla* se deben al locus ILE04-02, pero en general todas las poblaciones analizadas están en equilibrio. Finalmente, y para el caso de *Ilex canariensis*, nos encontramos en una situación muy similar ya que la mayor parte de los loci se encuentran en equilibrio y aquellas poblaciones con exceso de heterocigóticos (LOJA-C, MOQU-C y TAMA-C) este se debe al desvío encontrado en un solo locus.

Al aplicar la corrección de Bonferroni ($p < 0,00625$) el 90% de las pruebas y la mayor parte de las poblaciones (9 de 15) no mostraron desviación de las proporciones esperadas en equilibrio Hardy Weinberg.

Tabla 8 Análisis de probabilidad de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en poblaciones del género *Ilex*

TAXÓN	POBLACIÓN	ILE04-02	ILE04-10	ILE03-38	ILE03-53	ILE03-01	ILE04-06	ILE05-81	ILE03-86b	FISHER
<i>I. perado ssp. lopezilloi</i>	ENGO-L	1,000*	-0,143 ^{ns}	-0,143 ^{ns}	-0,143 ^{ns}	-1,000 ^{ns}	0,600 ^{ns}	-0,600 ^{ns}	-0,143 ^{ns}	-0,039 ^{ns}
	SUGO-P	1,000 ^{ns}	-	0,571 ^{ns}	0,333 ^{ns}	-	-0,600 ^{ns}	-	-	0,205 ^{ns}
	PARC-P	1,000**	0,172 ^{ns}	-	-0,280 ^{ns}	-0,067 ^{ns}	-0,391 ^{ns}	-	-	0,143 ^{ns}
<i>I. perado ssp. platyphylla</i>	APAT-P	-	-	-	-0,714 ^{ns}	-1,000*	-	-0,750 ^{ns}	-0,750 ^{ns}	-0,758*
	MOQU-P	0,725***	0,223*	-0,040 ^{ns}	0,249*	-0,053 ^{ns}	0,168 ^{ns}	-0,180 ^{ns}	-0,071 ^{ns}	0,158***
	CAFO-P	-	0,163*	-0,059 ^{ns}	0,686**	-0,385 ^{ns}	-0,192 ^{ns}	0,250 ^{ns}	0,149 ^{ns}	0,088 ^{ns}
	CRTA-P	0,744***	-0,060 ^{ns}	-0,250 ^{ns}	0,292*	-0,209 ^{ns}	0,318 ^{ns}	0,112 ^{ns}	0,130 ^{ns}	0,095**
<i>I. azorica</i>	TROQ-A	0,152 ^{ns}	-	-	-	0,182 ^{ns}	0,333**	-	0,460 ^{ns}	0,268**
	LAFO-A	0,276***	-0,143 ^{ns}	-	-	-	0,412**	-	0,301 ^{ns}	0,251**
<i>I. canariensis</i>	VAHE-C	-	-0,171 ^{ns}	-1,000 ^{ns}	-	-0,395 ^{ns}	1,000 ^{ns}	-0,532 ^{ns}	-	-0,240 ^{ns}
	LOJA-C	-	0,068**	-0,071 ^{ns}	-0,191 ^{ns}	0,200 ^{ns}	0,568*	-0,302 ^{ns}	-	0,070*
	MOQU-C	-	-0,714**	-0,463 ^{ns}	-0,195 ^{ns}	-0,330*	0,118 ^{ns}	-0,002 ^{ns}	-	-0,210**
	CALD-C	-	-0,540*	-0,244 ^{ns}	-0,194 ^{ns}	-0,062 ^{ns}	0,106 ^{ns}	-0,262 ^{ns}	-	-0,221 ^{ns}
	TILO-C	1,000 ^{ns}	-0,538 ^{ns}	-0,177 ^{ns}	-0,267 ^{ns}	-0,441 ^{ns}	-0,171 ^{ns}	-0,189 ^{ns}	-0,001 ^{ns}	-0,238 ^{ns}
	TAMA-C	-1,000***	-0,143 ^{ns}	0,188 ^{ns}	0,847***	-0,081 ^{ns}	-	-0,375 ^{ns}	-0,113 ^{ns}	-0,196***

ns: no significativo; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; -: locus monomórfico.

3.3.4. Diferenciación Genética entre las Poblaciones

3.3.4.1. Identidad y Distancia Genética

En la **Tabla 9** se muestran los valores de identidad y distancia genética (Nei, 1972) obtenidos para las diferentes poblaciones analizadas del género *Ilex*. El rango de la identidad varía ampliamente entre las poblaciones desde 0,972 entre las poblaciones de *I. azorica* (TROQ-A y LAFO-A) hasta 0,008 para la relación VAHE-C / TROQ-A (*Ilex canariensis* – *Ilex azorica*). Si solo se consideran las poblaciones de *Ilex perado ssp. platyphylla*, los valores de identidad genética varían desde $I = 0,446$ para CAFO-P / APAT-P (Casa Forestal – Apartacamino) hasta $I = 0,916$ para CRTA-P / CAFO-P (Cruz de Taganana – Casa Forestal). Llama la atención que el 93,33% de los valores de identidad genética entre las poblaciones de *I. perado ssp. platyphylla* sean inferiores a 0,900 ya que se tratan de medidas intraespecíficas; el valor de identidad media en este taxón fue de 0,648 (**Tabla 10**).

En el caso de *I. azorica* la identidad genética entre las dos poblaciones estudiadas es de $I = 0,972$; que como ya se mencionó es la más elevada de todas las comparaciones realizadas. Para *I. canariensis* la identidad genética con mayor valor es la presentada entre la población del Moquinal y Las

Calderetas (MOQU-C / CALD-C), ambas de Tenerife, con $I = 0,949$; mientras que el valor más pequeño es el de Tamadaba (Gran Canaria) al compararse con Vallehermoso (La Gomera) (TAMA-C / VAHE-C) donde $I = 0,637$ (Tabla 9). En esta especie la $\bar{I} = 0,787$ (Tabla 10) y el 86,67% de los valores fueron menores que 0,900. *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* consta de una sola población, por lo que no son factibles comparaciones a nivel de taxón.

Tabla 9 Identidad y distancias genéticas de Nei (1972) entre las poblaciones analizadas del género *Ilex*

	ENGO -L	SUGO -P	PARC -P	APAT- P	MOQU -P	CAFO -P	CRTA- P	TROQ -A	LAFO- A	VAHE- C	LOFA- C	MOQU -C	CALD- C	TILO- C	TAMA -C
ENGO-L		0,805	0,863	0,783	0,662	0,661	0,724	0,297	0,282	0,080	0,124	0,156	0,149	0,125	0,190
SUGO-P	0,217		0,899	0,726	0,491	0,479	0,581	0,196	0,187	0,082	0,143	0,110	0,104	0,112	0,116
PARC-P	0,148	0,107		0,670	0,507	0,517	0,642	0,177	0,167	0,075	0,121	0,104	0,105	0,121	0,154
APAT-P	0,244	0,320	0,400		0,516	0,446	0,537	0,233	0,229	0,046	0,095	0,085	0,095	0,084	0,166
MOQU-P	0,413	0,711	0,680	0,662		0,894	0,899	0,489	0,479	0,148	0,231	0,255	0,226	0,153	0,249
CAFO-P	0,414	0,737	0,661	0,807	0,113		0,916	0,376	0,379	0,137	0,250	0,271	0,254	0,161	0,235
CRTA-P	0,324	0,543	0,444	0,623	0,106	0,088		0,462	0,457	0,138	0,231	0,229	0,215	0,166	0,256
TROQ-A	1,213	1,631	1,729	1,455	0,716	0,979	0,772		0,972	0,008	0,078	0,031	0,021	0,010	0,025
LAFO-A	1,264	1,678	1,792	1,474	0,736	0,970	0,784	0,029		0,018	0,089	0,044	0,033	0,038	0,040
VAHE-C	2,530	2,498	2,593	3,079	1,910	1,985	1,984	4,863	4,036		0,737	0,791	0,676	0,782	0,637
LOFA-C	2,092	1,948	2,110	2,360	1,468	1,386	1,464	2,552	2,423	0,305		0,918	0,868	0,764	0,714
MOQU-C	1,860	2,204	2,266	2,467	1,365	1,305	1,476	3,482	3,131	0,234	0,086		0,949	0,843	0,783
CALD-C	1,902	2,268	2,253	2,356	1,486	1,373	1,536	3,843	3,402	0,392	0,141	0,053		0,780	0,813
TILO-C	2,078	2,186	2,113	2,475	1,878	1,830	1,794	4,636	3,266	0,246	0,269	0,171	0,248		0,755
TAMA-C	1,662	2,158	1,873	1,798	1,392	1,450	1,362	3,696	3,209	0,451	0,336	0,245	0,207	0,281	

Identidad genética (arriba) y distancia genética (abajo). En rojo los menores valores y en verde los valores más altos.

Al analizar los resultados de la identidad genética entre poblaciones de distintas especies y subespecies se puede observar que el 100% de los valores son inferiores a 0,900. Entre las poblaciones de *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* y las de su símil *I. perado* ssp. *platyphylla* se encontró una identidad media de 0,750 ($\bar{I} = 0,750$); en la relación entre *I. perado* ssp. *lopezilloi* y su congénere *I. azorica* existe una mayor separación ($\bar{I} = 0,290$), mientras que entre *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* e *Ilex canariensis* los resultados muestran una media (\bar{I}) de 0,137. Al comparar las poblaciones de *I. perado* ssp. *platyphylla* e *I. azorica* encontramos una media de la identidad genética de 0,319 y entre *Ilex perado* ssp. *platyphylla* e *Ilex canariensis*, la media fue de 0,159. Finalmente, entre *Ilex azorica* e *Ilex canariensis* $\bar{I} = 0,036$ (Tabla 10).

Tabla 10 Valores de identidad genética media entre taxones

TAXÓN	<i>I. p. ssp. lopezilloi</i>	<i>I. p. ssp. platyphylla</i>	<i>I. azorica</i>	<i>I. canariensis</i>
<i>I. p. ssp. lopezilloi</i>	-	0,750	0,290	0,137
<i>I. p. ssp. platyphylla</i>		0,648	0,319	0,159
<i>I. azorica</i>			0,972	0,036
<i>I. canariensis</i>				0,787

3.3.4.2. Coeficiente de Diferenciación Genética y AMOVA

Los análisis de la estructura genética interpoblacional de *Ilex* sp. se establecieron a través del coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) y el cómputo de las proporciones inferidas mediante el análisis de agrupamiento bayesiano. La **Tabla 11** muestra los valores del coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) y el número de migrantes (N_m) estimado para las poblaciones de *Ilex* sp. analizadas. En la **Tabla 12** se muestran los resultados del AMOVA para la diferenciación genética del complejo *Ilex*.

El valor de F_{ST} varió considerablemente entre las diferentes comparaciones establecidas. El mínimo valor se encontró entre las poblaciones de *I. azorica* ($F_{ST} = 0,030$), mientras que la mayor diferenciación genética se encontró entre las poblaciones de *I. perado* ssp. *platyphylla* de Apartacaminos y la de *I. canariensis* de Vallehermoso (APAT-P / VAHE-C) ambas de La Gomera, que revelaron un $F_{ST} = 0,524$.

Si comparamos la diferenciación genética media por especie y subespecie, se obtienen valores de $\bar{F}_{ST} = 0,203$; $0,173$ y $0,030$ para *I. perado* ssp. *platyphylla*, *I. canariensis* e *I. azorica*; respectivamente. Los valores indican que *I. perado* ssp. *lopezilloi* está muy diferenciada de *I. azorica* e *I. canariensis* ($\bar{F}_{ST} = 0,382$ y $0,371$; respectivamente); sin embargo, existe una menor diferenciación genética con *I. perado* ssp. *platyphylla* ($\bar{F}_{ST} = 0,134$). Los rangos de diferenciación de *I. perado* ssp. *platyphylla* son similares con respecto a sus congéneres; esto es, $\bar{F}_{ST} = 0,371$ comparada con *I. azorica* y $\bar{F}_{ST} = 0,384$ en relación a *I. canariensis*. Finalmente, la diferenciación genética entre estas dos últimas especies es considerable ($\bar{F}_{ST} = 0,461$).

La representación gráfica de los valores medios de F_{ST} encontrados en y entre los diferentes taxones analizados del género *Ilex* se muestra en la **Fig. 8**. Como puede observarse, la diferenciación genética entre las subespecies de *I. perado* de Canarias es bastante escasa y presentan cifras que son más propias para poblaciones de una misma especie (tal como queda reflejado); mientras que los valores superiores a 0,25 se reservan predominantemente para las relaciones interespecíficas donde la diferenciación genética es más fuerte.

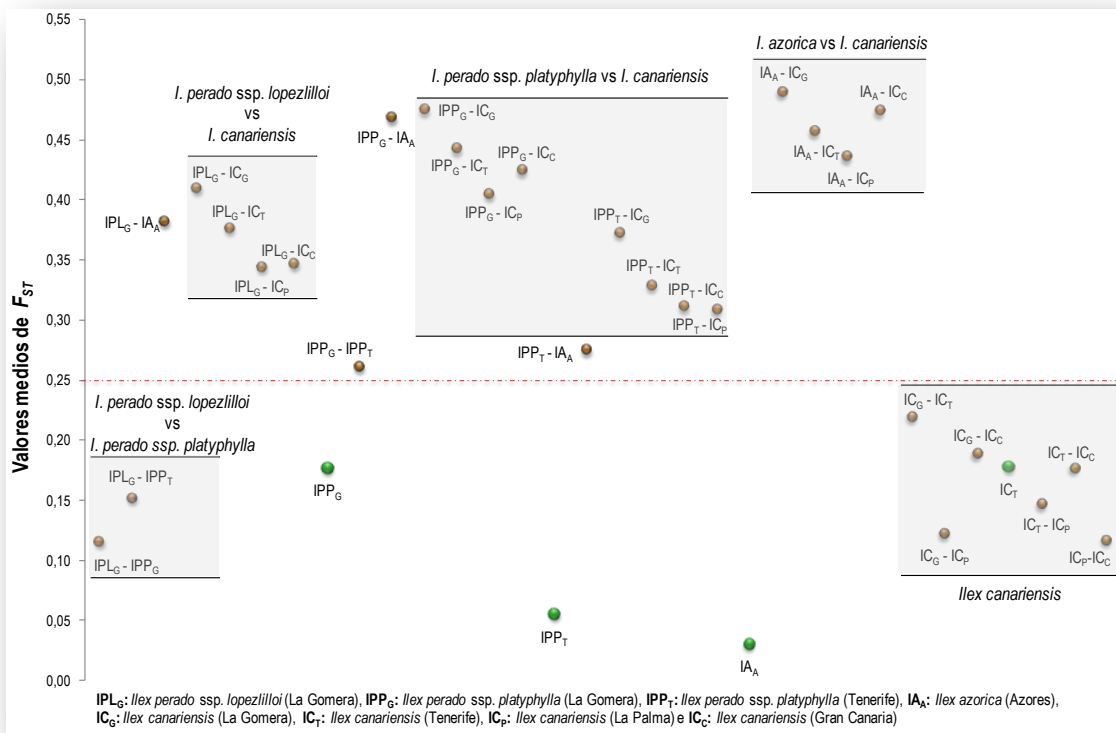


Fig. 8 Representación gráfica de los valores medios de F_{ST} obtenidos entre las poblaciones y taxones estudiados. En verde comparaciones intraespecíficas de la misma isla.

Tabla 11 Coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) y número de migrantes (N_m) para las poblaciones de *Ilex*

	ENGO-L	SUGO-P	PARC-P	APAT-P	MOQU-P	CAFO-P	CRTA-P	TROQ-A	LAFO-A	VAHE-C	LOJA-C	MOQU-C	CALD-C	TILO-C	TAMA-C
ENGO-L		2,198	2,596	1,338	1,341	1,286	1,582	0,395	0,415	0,361	0,428	0,426	0,393	0,477	0,472
SUGO-P	0,102 ^{ns}		3,369	0,891	0,722	0,71	0,905	0,290	0,305	0,306	0,372	0,341	0,317	0,400	0,359
PARC-P	0,088 ^{ns}	0,069 ^{ns}		0,789	0,695	0,753	0,954	0,288	0,296	0,307	0,358	0,338	0,315	0,405	0,383
APAT-P	0,157 ^{***}	0,219 ^{***}	0,241 ^{***}		0,632	0,523	0,623	0,255	0,279	0,227	0,297	0,278	0,251	0,311	0,287
MOQU-P	0,157 ^{***}	0,257 ^{***}	0,264 ^{***}	0,283 ^{***}		3,670	4,440	0,757	0,780	0,440	0,525	0,531	0,477	0,553	0,565
CAFO-P	0,163 ^{***}	0,260 ^{***}	0,249 ^{***}	0,324 ^{***}	0,064 ^{***}		5,091	0,552	0,581	0,429	0,563	0,569	0,519	0,58	0,579
CRTA-P	0,136 ^{***}	0,216 ^{***}	0,208 ^{***}	0,286 ^{***}	0,053 ^{***}	0,047 ^{***}		0,655	0,676	0,397	0,501	0,488	0,446	0,533	0,539
TROQ-A	0,387 ^{***}	0,463 ^{***}	0,465 ^{***}	0,495 ^{***}	0,248 ^{***}	0,312 ^{***}	0,276 ^{***}		8,076	0,251	0,316	0,285	0,265	0,310	0,266
LAFO-A	0,376 ^{***}	0,451 ^{***}	0,458 ^{***}	0,473 ^{***}	0,243 ^{***}	0,301 ^{***}	0,270 ^{***}	0,030^{ns}		0,272	0,337	0,307	0,286	0,341	0,292
VAHE-C	0,409 ^{***}	0,449 ^{***}	0,449 ^{***}	0,524^{***}	0,362 ^{***}	0,368 ^{***}	0,387 ^{***}	0,499 ^{***}	0,479 ^{***}		0,910	1,043	0,753	1,795	1,075
LOJA-C	0,369 ^{***}	0,402 ^{***}	0,411 ^{***}	0,457 ^{***}	0,323 ^{***}	0,307 ^{***}	0,333 ^{***}	0,442 ^{***}	0,426 ^{***}	0,215 ^{ns}		1,208	1,033	1,359	1,027
MOQU-C	0,370 ^{***}	0,423 ^{***}	0,425 ^{***}	0,473 ^{***}	0,320 ^{***}	0,305 ^{***}	0,339 ^{***}	0,467 ^{***}	0,449 ^{***}	0,193*	0,171 ^{ns}		1,255	1,680	1,173
CALD-C	0,389 ^{***}	0,441 ^{***}	0,442 ^{***}	0,499 ^{***}	0,344 ^{***}	0,325 ^{***}	0,359 ^{***}	0,486 ^{***}	0,467 ^{***}	0,249 ^{***}	0,195 ^{**}	0,166 ^{**}		1,361	1,321
TILO-C	0,344 ^{***}	0,385 ^{***}	0,382 ^{***}	0,446 ^{***}	0,311 ^{***}	0,301 ^{***}	0,319 ^{***}	0,446 ^{***}	0,423 ^{***}	0,122 ^{ns}	0,155 ^{***}	0,130 ^{***}	0,155 ^{***}		1,884
TAMA-C	0,346 ^{***}	0,411 ^{***}	0,395 ^{***}	0,465 ^{***}	0,307 ^{***}	0,302 ^{***}	0,317 ^{***}	0,485 ^{***}	0,461 ^{***}	0,189 ^{***}	0,196 ^{***}	0,176 ^{***}	0,159 ^{***}	0,117 ^{***}	

Número de migrantes (sobre la diagonal) y coeficiente de diferenciación genética (bajo la diagonal). En rojo los menores valores y en verde los valores más altos. ns: no significativo; *: $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Los resultados del AMOVA (**Tabla 12**) revelaron que todas las pruebas de diferenciación para los distintos niveles jerárquicos considerados fueron altamente significativas. La mayor parte de la varianza se encontró entre los taxones (44,83%), seguidos muy de cerca por la diferenciación en las poblaciones (42,12%) y por último entre las poblaciones de los distintos taxones (13,05%).

Tabla 12 Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) de la diversidad genética de *Ilex* sp.

FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SUMA DE CUADRADOS	VARIANZA EN LOS COMPONENTES	PORCENTAJE DE VARIACIÓN	
Entre taxones	3	788,578	5,232	44,83	$F_{CT} = 0,448^{***}$
Entre las poblaciones en los taxones	11	317,634	1,523	13,05	$F_{SC} = 0,237^{***}$
Dentro de las poblaciones	220	1081,542	4,916	42,12	
Total	234	2187,753	11,671	100,00	$F_{ST} = 0,579^{***}$

GL: grados de libertad, F_{CT} : coeficiente de diferenciación genética entre regiones, F_{SC} : coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones en las regiones, F_{ST} : coeficiente de diferenciación genética entre todas las poblaciones, ***: $p < 0,001$.

3.3.4.3. UPGMA y NJ

Los valores de la distancia genética de Nei (1972) sirvieron de base para la construcción del dendrograma UPGMA establecido sobre las poblaciones (**Fig. 9**) y en el cual se observa claramente la disgregación de las mismas en tres grupos bien definidos.

En primera instancia se separa *I. canariensis* del resto de las especies del género con una fortaleza del 86%; la siguiente rama distingue las poblaciones de *I. perado* e *I. azorica* con un 84% de fortaleza. Sin embargo, el distanciamiento a nivel de las subespecies (*I. perado* ssp. *platyphylla* e *I. perado* ssp. *lopezlilloi*) no está lo suficientemente marcado.

Según este dendrograma, las poblaciones de ambas subespecies se agrupan de acuerdo a su localidad de procedencia y, por tanto, la población de *I. perado* ssp. *lopezlilloi* está más relacionada con las poblaciones de *I. perado* ssp. *platyphylla* de La Gomera (de donde la primera subespecie es endémica).

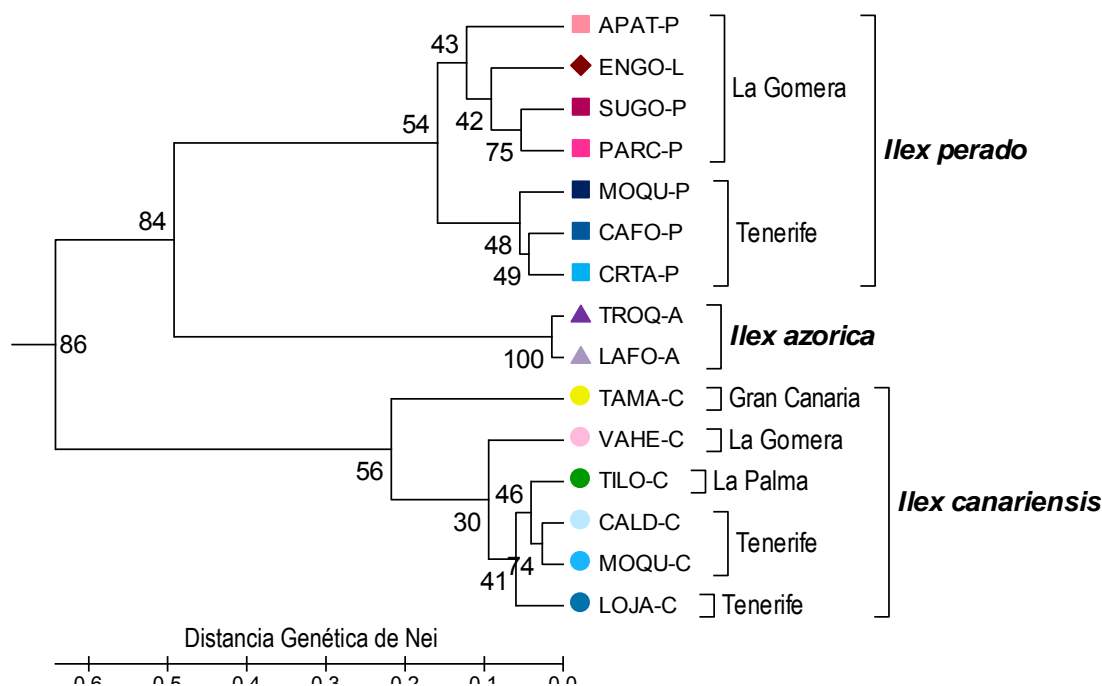


Fig. 9 Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) para las poblaciones del género *Ilex* analizadas. Los códigos de las poblaciones provienen de la **Tabla 2**.

Un segundo árbol (Neighbor-Joining; **Fig. 10**) basado en las distancias individuales DAS (Chakravorty & Jin, 1995) muestra otra vez la evidente separación de los individuos de *I. azorica* (triángulos violáceos) e *I. canariensis* (círculos). También es visible la mayor afinidad de los ejemplares de *I. perado* ssp. *platyphylla* de acuerdo a su isla de procedencia. No obstante, existen siete individuos pertenecientes a *I. perado* ssp. *platyphylla* de la población de Casa Forestal de Tenerife que aparecen incluidos entre los ejemplares de *I. canariensis*.

Esta aproximación genética de los individuos de *I. perado* ssp. *platyphylla* con *I. canariensis* constituye un resultado inesperado considerando que son especies completamente distintas, a priori bien diferenciadas tanto morfológicamente como genéticamente según el dendrograma UPGMA previamente descrito. En cuanto a *I. perado* ssp. *lopezlilloi* (rombos rojos), este diagrama coincide con el anterior situando a los individuos de esta subespecie más próximos a algunos de *I. perado* ssp. *platyphylla* de su propia isla.

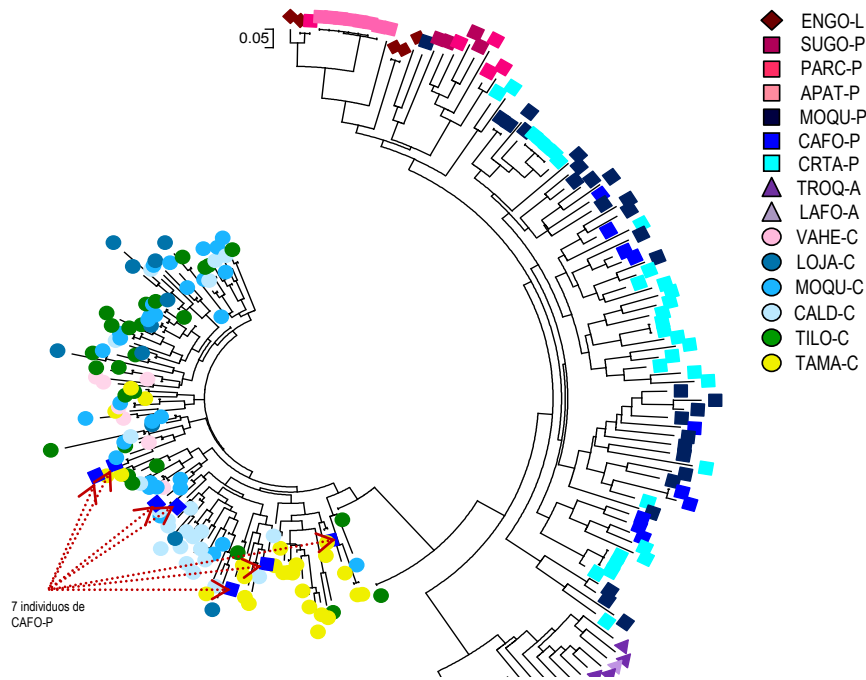


Fig. 10 Neighbor-Joining individual para las poblaciones del género *Ilex* analizadas. Los códigos de las poblaciones provienen de la **Tabla 2**

3.3.4.4. Análisis de Coordenadas Principales

El análisis de coordenadas principales (PCoA) separa claramente las poblaciones de *Ilex azorica* (TROQ-A y LAFO-A) e *I. canariensis* (VAHE-C, LOJA-C, MOQU-C, CALD-C, TILO-C y TAMA-C) de las demás poblaciones analizadas. Las diferencias entre los individuos de *I. perado* ssp. *lopezlilloi* e *I. perado* ssp. *platyphylla* son prácticamente imperceptibles; mientras que los mismos siete individuos de la población de Casa Forestal de Tenerife vuelven a mezclarse con la población de *I. canariensis* (**Fig. 11**). Este agrupamiento puede deberse a un error en la identificación de las muestras o a un proceso de hibridación (ver discusión). Dos aspectos son destacables en este análisis; por un lado, la separación a nivel de especie dentro del género (con la excepción de los individuos de CAFO-P) y la similitud entre las subespecies *I. perado* ssp. *platyphylla* e *I. perado* ssp. *lopezlilloi* que se integran en el mismo espacio. Las dos coordenadas principales de este análisis explican el 70,84% de la variación encontrada.

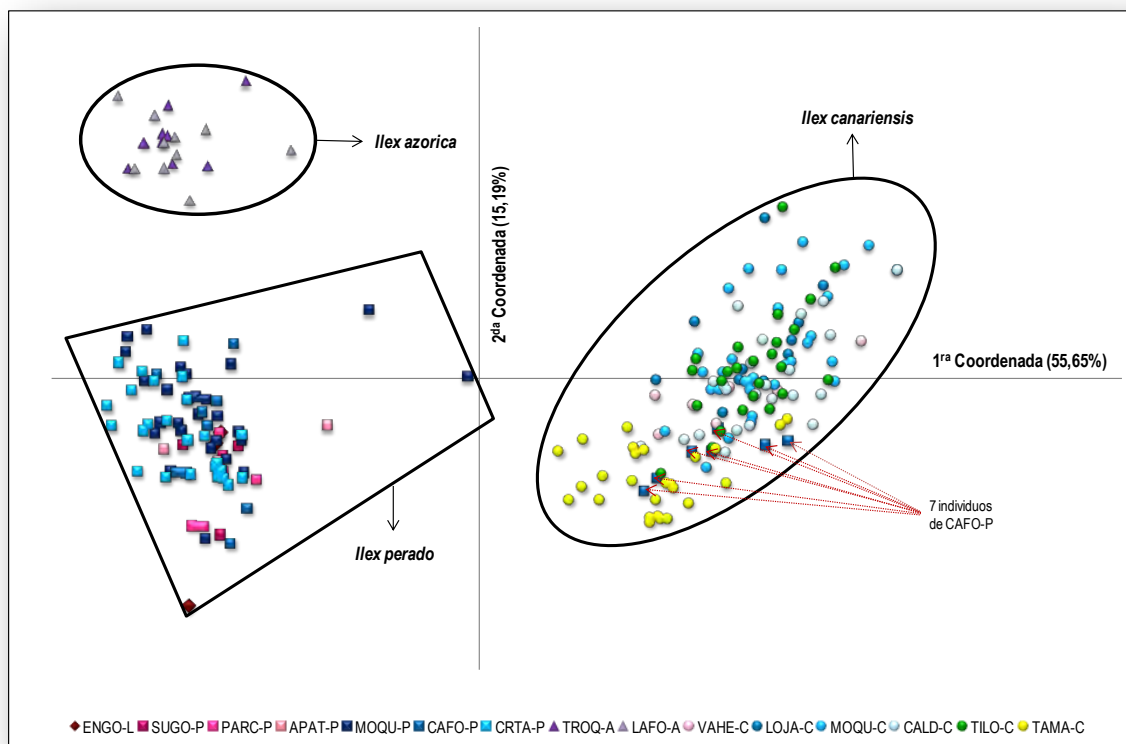


Fig. 11 Análisis de coordenadas principales para los individuos de las poblaciones analizadas del género *Ilex*. Los códigos de las poblaciones corresponden a los presentados en la **Tabla 2**

3.3.4.5. Análisis Bayesiano

La base de datos para el análisis bayesiano del género *Ilex* incluyó 240 individuos, 8 loci y 15 poblaciones. Las pruebas se hicieron para valores de $K = 1 - 10$ obteniéndose la máxima probabilidad de los datos en $K = 5$, lo que sugiere niveles en estructuración adicionales al número de taxones (4) en la muestra total. La asignación de cada población a uno de los grupos definidos anteriormente se ilustra en un histograma para las proporciones inferidas a partir del análisis bayesiano (**Fig. 12**) en el cual cada línea vertical representa un organismo que tiene tantos segmentos coloreados como fracciones de pertenencia tenga en los grupos K . Las líneas negras separan las distintas poblaciones.

En el gráfico puede observarse que el primer grupo incluye a los individuos de *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* e *Ilex perado* ssp. *platyphylla* de La Gomera, mientras el segundo grupo inferido concentra las muestras de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* de Tenerife. Todos los individuos de *Ilex azorica* analizados fueron

asignados al grupo III, mientras parece existir una estructuración intraespecífica en los individuos de *Ilex canariensis* ya que mostraron signos de mezcla entre los grupos inferidos IV y V que llega a involucrar también a los siete individuos de Casa Forestal (Tenerife) a los que se hizo referencia en secciones anteriores. Pese a ello, es interesante ver que esta bipolaridad casi no afecte a la población de Tamadaba (TAMA-C, Gran Canaria) que se muestra mucho más definida hacia un grupo, lo cual se traduce como una diferenciación genética más elevada.

Esta diferenciación utilizando los algoritmos bayesianos coincide con los resultados anteriores, demostrando el considerable aislamiento (y diferenciación genética) presente entre las islas.

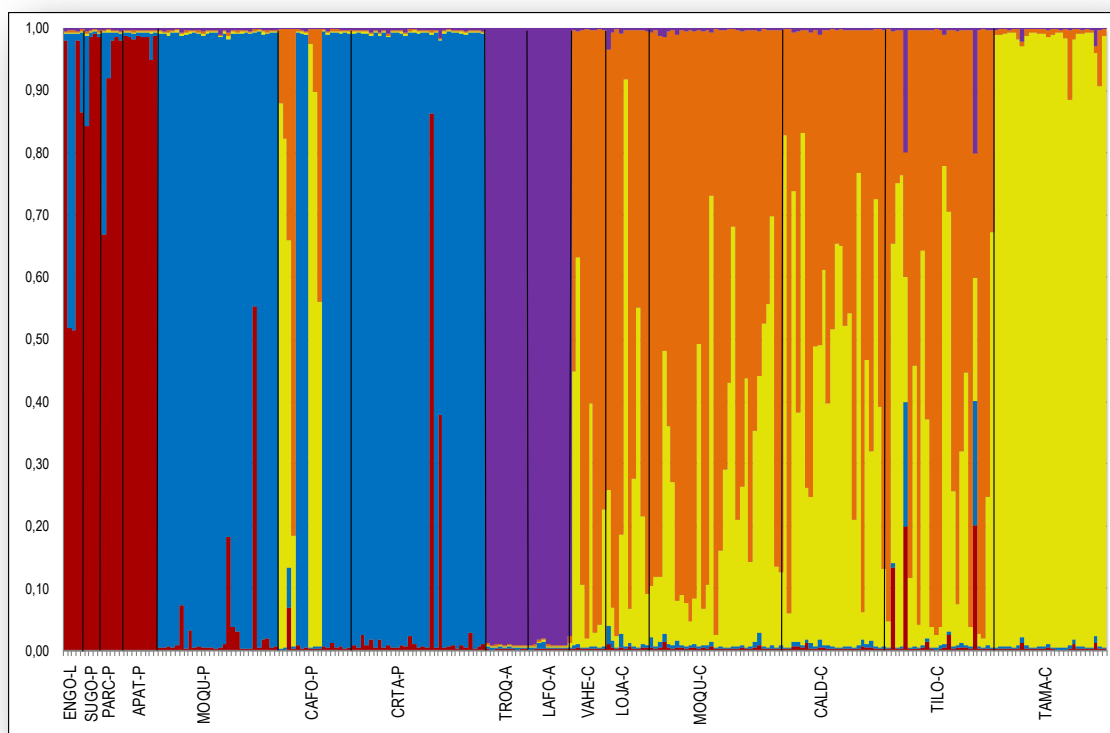


Fig. 12 Diagrama de barras para las proporciones inferidas con el análisis bayesiano en las poblaciones de *Ilex*. Los códigos de las poblaciones corresponden a la **Tabla 2**.

3.4. Discusión

3.4.1. Naturaleza Clónica de *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*

Tal como se ha descrito en la sección anterior, en este estudio fueron examinadas 32 muestras de la subespecie *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* a través de microsatélites, encontrándose únicamente 5 genotipos distintos; por lo tanto, ha podido comprobarse la naturaleza clónica de la mayor parte de los individuos estudiados. Es muy probable que algunos de los individuos analizados de este taxón sean el resultado de las labores de repoblación por propagación asexual efectuadas entre 1989 y 1993 por los miembros del Parque Nacional de Garajonay (Bañares *et al.*, 2003). Además, en la población natural de Ancule se procedió a recoger diferentes muestras (hojas) de un ejemplar gigantesco que entremezcla sus ramas entre numerosas especies de la Laurisilva. La posición de las ramas y el enorme tamaño del ejemplar impedían determinar dónde acababa el individuo. El análisis de las 8 submuestras demostró que todas eran idénticas genéticamente. Nuestros resultados mostraron que factiblemente se trataba del mismo árbol; sin embargo, no descartamos la posibilidad de que también la subespecie esté recurriendo a la reproducción asexual como respuesta natural a su restricción sexual reproductiva.

La producción de clones es un fenómeno ya reportado para su congénere *I. leucoclada* que también es dioica y compensa la presión a la que se ve sometida cuando es confinada a terrenos con fuertes nevadas con la formación de agregados por estratificación de tallos (Torimaru *et al.*, 2003; Torimaru y Tomaru, 2005; Torimaru *et al.*, 2007). Según Torimaru y Tomaru (2005), la estratificación puede ser una manifestación de plasticidad fenotípica que facilita la ocupación bidimensional del terreno e incrementa la captura de recursos. Estos autores sugieren que el crecimiento clonal contribuye más que el reclutamiento de juveniles al desarrollo de las poblaciones por ellos estudiadas, un fenómeno que puede estar sucediendo también en la especie canaria; aunque con otros condicionantes ambientales.

En otro de sus estudios enfocado en la fenología de *Ilex leuococlada*, Torimaru y Tomaru (2006) revelan que las gotas de lluvia pueden remover las flores estaminadas (ya de por sí escasas en *I. perado* ssp. *lopezilloi*) y que las limitaciones de polen afectan al rendimiento reproductivo de las plantas pistiladas, más que las limitaciones de recursos. Si extrapolamos esta circunstancia a *I. perado* ssp. *lopezilloi*, es posible que la incapacidad de este taxón para producir juveniles por recombinación sexual sea debida a la escasez de patrones estaminados. La distancia entre estos y los pistilados, así como la dificultad tanto en la producción de polen como en su distribución en un hábitat con precipitaciones anuales de hasta 800 mm, son razones que pueden estar empujando a este taxón a regenerar sus poblaciones por métodos vegetativos.

3.4.2. Diversidad Genética

De acuerdo con Conner & Hartl (2004), la heterocigosidad es la medida más consistente de diversidad genética porque incorpora tanto la diversidad alélica como la distribución de los alelos entre individuos. En general, y atendiendo a la clasificación taxonómica, *Ilex perado* ssp. *platyphylla* alberga los mayores niveles de variación genética ($H_e = 0,560$), mientras que *I. azorica* muestra los niveles más bajos ($H_e = 0,339$); por debajo de los obtenidos para *I. perado* ssp. *lopezilloi* ($H_e = 0,435$) e *I. canariensis* ($H_e = 0,551$). Es probable que los menores niveles de diversidad genética en ambas poblaciones de *I. azorica* sea consecuencia del relativamente bajo tamaño muestral (10 individuos por población).

La mayoría de las poblaciones de *Ilex* analizadas se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg; de hecho el 90% de las pruebas realizadas después de aplicar la corrección de Bonferroni no mostró desviación de las proporciones esperadas en equilibrio (**Tabla 8**). En general; las especies perennes, diocas y alógamas (como es el caso de las diferentes especies de *Ilex* analizadas) suelen presentar un porcentaje de individuos heterocigóticos acorde con la Ley o el equilibrio de Hardy-Weinberg.

A pesar de que el género ha sido ampliamente estudiado, son pocas las aportaciones hechas a partir del uso de microsatélites; razón por la cual hasta el momento solamente *I. leucoclada* nos brinda parámetros estrictamente comparables con los obtenidos en este estudio. *Ilex leucoclada* es una especie asiática ampliamente distribuida y relativamente común en bosques caducifolios de zonas frías para la cual Torimaru *et al.* (2004 y 2007) han reportado elevados valores promedios de heterocigosidad esperada ($H_e = 0,822$ y $H_e = 0,804$; respectivamente); así mismo, la riqueza alélica promedio obtenida por estos autores ($A = 15,53$ y $14,00$; respectivamente) ha sido muy superior a la encontrada en las diferentes especies analizadas en este estudio (**Tabla 7**).

Es bien sabido que las especies con una amplia distribución exhiben una elevada diversidad genética con respecto a especies con distribución reducida, debido posiblemente al escaso número de individuos que colonizaron y formaron dichas poblaciones (Sosa, 2001). Desde este punto de vista es comprensible que *Ilex leucoclada* presente mayor diversidad genética que las especies analizadas en este estudio, ya que todas ellas proceden de regiones insulares y, por lo tanto, con distribución más restringida que una especie continental.

Según nuestros resultados, *Ilex canariensis* presenta una mayor diferenciación genética; separándose considerablemente de *I. azorica* e *I. perado*, las cuales están más relacionadas entre sí (**Fig. 9** y **Fig. 11**). Este distanciamiento de *I. canariensis* con respecto a sus congéneres geográficamente más cercanos ha sido reportado reiteradamente en estudios filogenéticos (Cuénoud *et al.*, 2000; Manen *et al.*, 2002; Manen, 2004; Selbach-Schnadelbach *et al.*, 2009; Manen *et al.*, 2010). La especiación de *Ilex perado* e *Ilex azorica* en la Macaronesia pudo haber partido de *I. perado* del Norte de África. De hecho, desde el punto de vista morfológico *Ilex azorica* ha sido considerada como *I. perado* ssp. *azorica* (Kunkel, 1977b; Andrews, 1983) y así es presentada en la Base de Datos de Biodiversidad de Azores (<http://www.azoresbioportal.angra.uac.pt>); sin embargo, la evolución divergente de *I. perado* entre Canarias y Azores ha sido lo suficientemente importante como para reflejar diferenciación genética a nivel de especie. Por su parte *I.*

canariensis parece estar más relacionada con especies de América del Norte como *I. opaca* e *I. glabra* (Lems, 1968; Manen *et al.*, 2010) y esto advierte la posibilidad de que las especies canarias (*I. perado* e *I. canariensis*) tengan diferentes orígenes, estando relacionadas con distintos linajes asiáticos tal como Selbach-Schnadelbach *et al.* (2009) lo han considerado.

Desde la perspectiva genética, los diferentes análisis estadísticos practicados (UPGMA y NJ) reflejan una estrecha relación entre *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* e *I. perado* ssp. *platyphylla*. De la misma manera, los resultados obtenidos a partir del análisis bayesiano y el PCoA para estas muestras tampoco separan a las subespecies y, además, establecen que la estructuración genética de *I. perado* está vinculada a la procedencia geográfica de las muestras; fenómeno que se ha sido reportado en otras especies del archipiélago canario (*Chamaecytisus proliferus*, Francisco-Ortega *et al.*, 1992; *Dactylis glomerata*, Sahuquillo & Lumaret, 1995; *Lobularia canariensis*, Borgen, 1996). De esta forma, parece que es el origen insular de los individuos lo que condiciona las diferencias genéticas entre las poblaciones analizadas más que el rango taxonómico. Además, considerando los resultados de este estudio y basados en la escasa diferenciación genética hallada entre las subespecies canarias de *I. perado* las cuales presentan valores de \bar{F}_{ST} por debajo incluso de los encontrados intraespecíficamente para *I. perado* ssp. *platyphylla* en la misma isla y entre La Gomera y Tenerife (**Fig. 8**), se sugiere la revisión taxonómica en estas poblaciones a fin de corroborar los datos genéticos aquí encontrados y poder actuar de manera eficiente en su manejo.

Por otro lado, la escasa diferenciación genética que hemos encontrado entre las dos subespecies de *Ilex perado* presentes en Canarias se corresponde con los resultados obtenidos por Werner *et al.* (2007) que mediante la secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2, así como con marcadores ISSR, concluyen que la subespecie *lopezilloi* es de un valor taxonómico bastante dudoso. Por el contrario, Jaén Molina *et al.* (2010) han encontrado diferenciación genética entre estos taxones al utilizar secuencias de *rbcL* y *matK* en el análisis molecular. Es posible que las conclusiones contrastantes de estos estudios tenga mucho que ver con el tipo de marcador

utilizado y con diferencias en la cantidad y/o procedencia de muestras de *I. perado* ssp. *platyphylla* tomadas en consideración. También será necesario determinar si las diferencias genéticas detectadas en las secuencias *rbcL* y *matK* por Jaén Molina *et al.* (2010) se encuentran dentro del rango de la propia especie y sean, por tanto, parte de la variación intraespecífica.

De acuerdo a nuestros resultados *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* e *I. perado* ssp. *platyphylla* comparten un mismo acervo genético y es posible que se trate de un mismo taxón. Desde el punto de vista molecular se esperaría que el pequeño tamaño poblacional y la restringida distribución geográfica de un taxón endémico se reflejara en bajos valores de diversidad genética; no obstante, *I. perado* ssp. *lopezlilloi* muestra niveles de diversidad genética considerablemente altos y muy similares a los encontrados en sus congéneres macaronésicos aquí estudiados. *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* no alberga alelos exclusivos y todos los alelos detectados en este taxón se presentan con frecuencias similares a los encontrados en *I. perado* ssp. *platyphylla* (Anexo II). Resultados similares se han obtenido al analizar las diferencias genéticas entre *Myrica faya* y *M. rivas-martinezii* mediante microsatélites (González-Pérez *et al.*, 2009c). Los autores llegaron a la misma conclusión y consideraron que ambos taxones comparten un mismo acervo genético y posiblemente pertenecen a un mismo rango taxonómico, siendo morfotipos de la misma especie.

Siguiendo con la misma argumentación, se entiende que la importante diferenciación genética encontrada entre *I. azorica* e *I. perado* con agrupación diferenciada en todos los análisis establecidos y con valores del coeficiente de diferenciación genética superiores a 0,25 (**Fig. 8**) hagan pensar que ambos taxones constituyen especies diferentes y no subespecies de *I. perado* como se contempla en la Base de Datos de la Biodiversidad de Azores. Un aspecto que debe estudiarse con más profundidad y que no constituía un objetivo de este estudio.

A pesar de que la separación de los taxones es bastante clara, la persistente agrupación de 7 individuos de *Ilex perado* ssp. *platyphylla* procedentes de la Casa Forestal de Tenerife (CAFO-P) junto a las poblaciones

de *I. canariensis* en los dendrogramas y el PCoA, el alto grado de pertenencia que los identifica con las poblaciones de *I. canariensis* y la estructuración intraespecífica de esta última especie encontrada en el análisis bayesiano para las poblaciones gomeras y tinerfeñas (no así en la de Gran Canaria); nos conducen a deducir la posibilidad de que se estén llevando a cabo eventos de hibridación e introgresión entre estos dos taxones en La Gomera y Tenerife donde ambas especies coexisten (Lems, 1968; Kunkel, 1977b; Andrews, 1983; Manen, 2004; Cabrera García *et al.*, 2005), lo cual no sucede en Gran Canaria. Inicialmente, no creemos que haya sido un error de muestreo o una equivocación en la identificación o catalogación de estos 7 ejemplares como *I. perado* siendo *I. canariensis*, ya que las hojas recogidas presentan las características morfológicas propias de *I. perado* ssp. *platyphylla* tales como la presencia de espinas en el borde de las mismas. La revisión morfológica de las muestras (conservadas en gel de sílice) así lo vuelve a confirmar.

Cuando en 1942 Loesener establecía la separación entre *I. perado* e *I. canariensis* basado en características anatómicas y morfológicas relacionó a *I. canariensis* con la especie americana *I. opaca*. Basado en estas deducciones Lems (1968) consideró a *I. canariensis* como una especie de conexión trasatlántica, al mismo tiempo que citaba la capacidad de *I. perado* para formar híbridos con *I. aquifolium*; también Baas (1978) asociaba la variación anatómica del género *Ilex* con la existencia de importantes procesos de hibridación en su evolución. Así pues, ni la disgregación de *I. perado* e *I. canariensis* ni la capacidad de hibridación entre las especies del género son conceptos novedosos.

En este sentido, recientes investigaciones realizadas con distintos marcadores moleculares han demostrado la diferenciación genética entre *I. perado* e *I. canariensis* y, como resultado, son varios los estudios filogenéticos que sitúan a estos taxones en grupos biogeográficos disímiles. Las publicaciones coinciden en la dificultad de definir una posición filogenética determinada para *I. canariensis* y sugieren que las débiles barreras reproductivas han podido permitir eventos de hibridación e introgresión nuclear y/o plástica interespecífica unilateral con *I. perado* como donador masculino

(Cuénoud *et al.*, 2000; Manen *et al.*, 2002; Manen, 2004). La hibridación e introgresión entre varias especies ocurre frecuentemente en regiones de simpatria o en los límites de las zonas donde las especies se distribuyen y se ponen en contacto unas con otras; por esto, su ocurrencia en islas oceánicas provee buenos ejemplos de especiación y diferenciación vegetal, razón de más para considerar el importante papel que ha jugado en los procesos de evolución en *Ilex* (Setoguchi & Watanabe, 2000; Selbach-Schnadelbach *et al.*, 2009; Manen *et al.*, 2010).

Sería importante abrir una línea de investigación en Canarias en este sentido, intentando averiguar y confirmar la existencia de elementos híbridos en el archipiélago, la extensión del fenómeno y el grado de recuperación que puede alcanzar en los ecosistemas a fin de determinar si es un proceso reciente o por el contrario un fenómeno que se remonta en el pasado evolutivo del género.

3.4.3. Implicaciones para la Conservación Genética

Con base en los resultados obtenidos en el análisis de *Ilex perado* spp. *lopezlilloi* e *I. perado* ssp. *platyphylla* mediante de microsatélites puede sostenerse que ambas subespecies comparten el mismo acervo genético y que son probablemente el mismo taxón. Teniendo en cuenta que *Ilex perado* spp. *lopezlilloi* está clasificada como “en peligro de extinción”, se recomienda la revisión taxonómica de estas poblaciones y un posible cambio de enfoque en las acciones actuales de gestión para la conservación de estos efectivos.

No obstante, es probable que esto no ocurra ya que resultados similares se encontraron entre los acervos genéticos de *Myrica rivas-martinezii* y *M. faya* (González-Pérez *et al.*, 2009c) y a pesar de los mismos, *M. rivas-martinezii* sigue considerándose una especie fuertemente amenazada e incluida en el Catálogo Canario de Especies Protegidas (CCEP, 2010).

Al parecer, en Tenerife (y posiblemente también La Gomera) se está llevando a cabo la hibridación e introgresión entre *Ilex perado* e *I. canariensis*. El monitoreo de las consecuencias de este fenómeno en lo referente a la

evolución del genoma de ambas líneas genéticas a lo largo de las sucesivas generaciones debería ser considerado en futuros planes de manejo en la conservación genética de ambas especies.

Será necesario también confirmar el grado de diversidad genética de *Ilex azorica*, a la vez que el importante número de alelos exclusivos detectados en las poblaciones analizadas. Los resultados encontrados en este estudio parecen mostrar que *I. azorica* es una especie diferenciada de *I. perado* por lo que, desde el punto de vista de la conservación, adquiriría una mayor relevancia este rango taxonómico. *I. perado* ssp. *azorica* se encuentra entre los 37 taxones incluidos en el Top100 de Azores siendo prioritaria en términos de futuras acciones de conservación en Azores (Cardoso *et al.*, 2008).

Silene nocteolens



4.1. *Silene nocteolens* Webb & Berthel

El género *Silene* L. (Caryophyllaceae) contiene cerca de 700 especies alrededor del mundo, distribuidas en las regiones templadas del hemisferio norte. El principal centro de su diversidad es el Mediterráneo (donde crece cerca de la mitad de las especies) y también el suroeste de Asia; especialmente Turquía, que cuenta con 135 especies (Melzheimer, 1988; Oxelman & Lidén, 1995; Duran & Menemen, 2003).

En el género (incluyendo *Lychnis* y *Melandrium*) se exhibe una gran variedad de caracteres ecológicos y morfológicos (Chater & Walters, 1964), pudiéndose encontrar una amplia diversidad de sistemas reproductivos: dioecia (machos y hembras), ginodioecia (coexistencia de hembras y hermafroditas), trioecia (coexistencia de machos, hembras y hermafroditas) y hermafroditismo (Desfeux *et al.*, 1996); por hablar en términos generales.

Desfeux *et al.* (1996) compararon los resultados filogenéticos con la información compilada sobre los sistemas reproductivos y los ciclos de vida de las especies de *Silene* estudiadas hasta ese entonces y algunos géneros más cercanos (**Tabla 13**). Concluyeron que es poco probable que el hermafroditismo fuera el sistema de cruzamiento ancestral, aunque este parece haber derivado al menos dos veces de un estado de ginodioecia y estar asociado con la evolución hacia la autogamia. Opinan que la dioecia también pudo haber surgido dos veces (o quizá tres), bajo muy diferentes condiciones ecológicas.

Aluden a la existencia de evidencias que sugieren que la determinación del sexo en varias especies de *Silene* está relacionada con genes tanto del núcleo como del citoplasma y esto, a su vez, apunta fuertemente a que la dioecia en *Silene* pueda provenir de una ginodioecia núcleo-citoplásmica original. No obstante, confirman que es ampliamente posible que los sistemas reproductivos (tipos sexuales) y de cruzamiento (nivel de autogamia) sean variables no solo dentro del género sino también dentro de algunas especies, a nivel intra e interpoblacional.

Tabla 13 Sistemas reproductivos y ciclos de vida en el género *Silene* y similares

ESPECIE	SECCIÓN	SISTEMA REPRODUCTIVO	SISTEMA DE CRUZAMIENTO	REFERENCIAS	
<i>Silene coronaria</i>	(P)	Lychniformes	GD ^{1,17}	S ¹	1. Knuth, 1908
<i>S. flos-cuculi</i>	(P)	Lychniformes	GD-GM ^{1,2}	O ¹⁵	2. Blaringhem, 1924
<i>S. viscaria</i>	(P)	Lychniformes	H ^{2,13,15}		3. Correns, 1928
<i>S. italica</i>	(P)	Siphonomorpha	GD-GM ¹		4. Marsden-Jones & Turill, 1957
<i>S. nutans</i>	(P)	Siphonomorpha	GD-AM ¹¹		5. Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1958
<i>S. fruticosa</i>	(P)	Siphonomorpha	GD-GM ^{17,21(*)}		6. Chater & Walters, 1964
<i>S. otites</i>	(B, P)	Otites	GD-GM ^{1,7,9,17}	O	7. Pomonarev & Demyanova, 1975
<i>S. pseudotites</i> = <i>Silene otites</i>	(B, P)	Otites	D ²⁰ , SD ⁶	O	8. Bock, 1976
<i>S. roemerii</i>	(B, P)	Otites	D, SD ⁶	O	9. De Bilde, 1984
<i>S. vulgaris</i>	(P)	Inflatae	GD-AM ^{3,6}	O	10. Dulberger & Horovitz, 1984
<i>S. uniflora</i>	(*)	Inflatae	GD ^{4,10,14,23(*)}		11. Jennersten <i>et al.</i> 1988
<i>S. saxifraga</i>	(P)	Suffruticosae	GD-GM ²¹		12. Shykoff, 1988
<i>S. acaulis</i> ssp. <i>longiscapa</i>	(P)	Nanosilene	AM-GM ¹	O	13. Biere, 1991
<i>S. acaulis</i> ssp. <i>bryoides</i>	(P)	Nanosilene	GM ¹⁷	O	14. Pettersson, 1992
<i>S. acaulis</i>	(P)	Nanosilene	T ⁸	O	15. Hauser & Loeschke, 1994
<i>S. acaulis</i> ssp. <i>exscapa</i>	(*)	Nanosilene	D ⁸	O	16. Harmanutz & Innes, 1994
<i>S. acaulis</i> ssp. <i>longiscapa</i>	(*)	Nanosilene	GD-T ^{12,16}	O	17. Maurice & Desfeux (Obs. Per.)
<i>S. armeria</i>	(A, B)	Compactae	SD ²²	O	18. Menges, 1995
<i>S. noctiflora</i>	(A)	Elisanthe	SD ²²	O	19. Talavera <i>et al.</i> , 1996
<i>S. latifolia</i>	[(A)-P]	Elisanthe	GD ^{1,17}	S	20. Soldaat <i>et al.</i> , 1997
<i>S. dioica</i>	(P)	Cordifolia	H ¹	O	21. Pettersson, 1997
<i>S. declinis</i>	(P)	Elisante	GM-GD ^{1,7}	O	22. Maurice <i>et al.</i> , 1998
<i>S. inaperta</i>	(A)	Rigidulae	D ^{6,24(*)}	O	23. Andersson, 1999
<i>S. coeli-rosa</i>	(A)	Eudianthe	D ^{6,25(*)}	O	24. Lardon <i>et al.</i> , 1999
<i>S. pendula</i>	(A)	Erectorefractae	D ⁶	O	25. Hemborg & Karlsson, 1999
<i>S. stockenni</i>	(*)	Erectorefractae	H	O	26. Kephart <i>et al.</i> , 1999
<i>S. dichotoma</i>	(A)	Dichotomae	GD ^{5,17}	CI ¹	27. Buide & Guitián, 2002
<i>S. nocturna</i>	(A)	Scorpioideae	GD-GM ¹⁹		
<i>S. gallica</i>	(A)	Silene	GD ³		
<i>S. cerastioides</i> = <i>S. sclerocarpa</i>	(A)	Silene	H	S, CI ⁶	
<i>S. apetala</i> = <i>S. decipiens</i>	(A)	Dipterosperma	GD ¹⁷	S, CI ¹	
<i>S. conica</i>	(A)	Conoimorpha	GD ^{5,17}	CI ^{1,17}	
<i>S. conoidea</i>	(A)	Conoimorpha	GD ^{5,17}	CI ^{1,17}	
<i>S. acutifolia</i>	(*)	Cordifolia	GD ³		
<i>S. regia</i>	(*)		H		
<i>S. douglassii</i>	(*)		H ¹⁸		
<i>Dianthus seguieri</i>	(P)		H ²⁶		
<i>Saponaria ocymoides</i>	(P)		GD ¹		
<i>Agrostemma githago</i>	(A)		GD ¹	S ¹	
<i>Cucubalus baccifer</i>	(P)		GD ¹		

Adaptado de Desfeux *et al.* 1996 con anotaciones del Dr. Santos-Guerra.

Shykoff (1988), que probó la ginodioecia de *S. acaulis*, encontró que las plántulas que habían sido el resultado de una autopolinización pura exhibían depresión endogámica en las primeras etapas del cultivo. Las plantas hermafroditas fueron autocompatibles con flores protándricas. Según Eguiarte *et al.* (2007) en las especies hermafroditas autocompatibles una elevada tasa

de entrecruzamiento podría estar determinada, en parte, por la depresión endogámica. De hecho, los autofecundantes tienden a expresar más depresión endogámica tardía en sus ciclos de vida, mientras las especies con fecundación cruzada tienden a expresar la depresión por consanguinidad de manera substancial a lo largo del ciclo de vida. No obstante, las especies definidas como hermafroditas y aquellas especies en las que no se han descrito flores femeninas, como *S. gallica* y *S. conica*, han sido reportadas como autógamas e incluso cleitógamas (**Tabla 13**; Desfeux *et al.*, 1996).

En la especie hermafrodita *Silene douglasii*, Kephart *et al.* (1999) encontraron altos niveles de depresión endogámica por familias maternas; al hacer uso de medias poblacionales, encontraron altos niveles en las primeras y postreras etapas del ciclo de vida y bajos niveles de supervivencia. Otros autores también han detectado depresión por consanguinidad en la producción de semillas (Husband & Schemske 1995, Kittelson & Maron 2000). Según Buide & Guitián (2002) el hermafroditismo no debe ser tan frecuente en el género *Silene* como se sugiere por muchas floras en las cuales no se hace referencia a la ginodioecia. *Silene acutifolia* es autocompatible y se ha comprobado que la dicogamia no constituye una barrera a la autofecundación; por esto, los autores sugieren que *S. acutifolia* ha surgido hace relativamente poco dentro del género.

En Canarias se han reportado 26 especies del género *Silene*, 8 de las cuales son endémicas; a saber: *S. berthelotina* Webb (Tenerife y el Hierro), *S. bourgeaui* Webb *ex* Christ (La Gomera), *S. canariensis* Willd. (Gran Canaria), *S. lagunensis* C. Sm *ex* Christ (Tenerife), *S. nocteolens* Webb & Berthel (Tenerife), *S. pogonocalyx* (Svent.) Bramwell, *S. sabinosae* Pit. (El Hierro) y *S. tamaranae* Bramwell (Gran Canaria) (Izquierdo *et al.*, 2004; Arechavaleta *et al.*, 2010).

La “Conejera de risco”, *Silene nocteolens*, es un endemismo exclusivamente tinerfeño y se encuentra catalogada como “En Peligro Crítico” por la UICN. Dispone, además, de otras figuras de protección en el Convenio de Berna y en el Catálogo Canario de Especies Protegidas donde aparece como “Vulnerable” en el Anexo II de la Ley 4/2010 (Moreno *et al.*, 2008; CCEP,

2010). Se cree que las poblaciones se han visto mermadas debido a la depredación por los herbívoros (muflón y conejos) que destruyen las plantas en busca de sus raíces rizomatosas (Informe técnico, Parque Nacional El Teide; sin publicar).

Silene nocteolens es una planta herbácea con base leñosa (**Fig. 13**); hemicriptófita de raíz perenne y tallos floríferos de unos 50 cm de largo, vellosos hacia sus extremos y pegajosos. Caducifolia o con follaje subpersistente. Hojas de estrechamente lanceoladas a linear-lanceoladas, de hasta de 10 cm de largo, agudas, tomentosas, agrupadas o subverticiladas, formando rosetas en la base.



Fig. 13 *Silene nocteolens*

Florece de mayo a junio y fructifica en agosto. Las inflorescencias son largas, con 2 a 12 flores blancas o ligeramente rosáceas, hermafroditas, que exhalan durante la noche un suave perfume propio de un sistema de polinización por insectos nocturnos (el epíteto de la especie hace referencia a esta particularidad). Los frutos son cápsulas ovadas, de 8 – 10 mm, dehiscentes por 6 dientes y contiene una media de 35 semillas.

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

La distribución de *Silene nocteolens* se circunscribe a dos localidades de alta montaña dentro del Parque Nacional del Teide. Según el censo realizado en 2008, el número de efectivos en Montaña Blanca asciende a 1100 individuos en tanto en Pico Viejo se han detectado unos 1713 ejemplares

aproximadamente (Eduardo Carqué, comunicación personal). Entre una y otra población existe una distancia de 6,2 km en línea recta (**Fig. 14**).

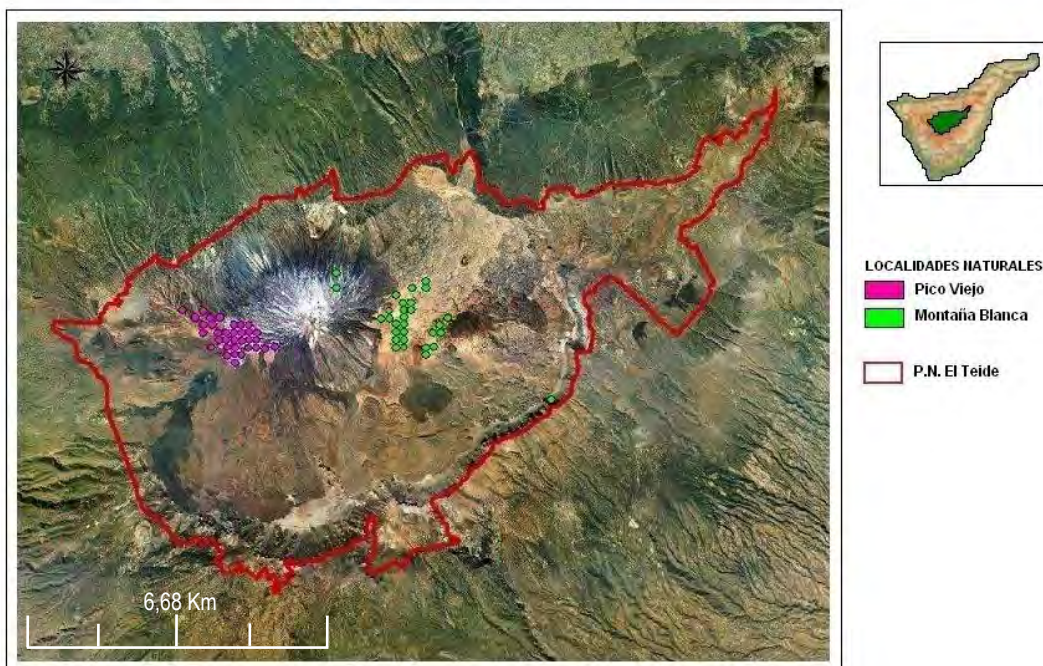


Fig. 14 Distribución de *Silene nocteolens* en el Parque Nacional del Teide

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

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

Silene nocteolens está descrita como una especie hermafrodita (Bañares *et al.*, 2004); pero sus hábitos reproductivos no han sido objeto de un análisis profundo. Siguiendo la directriz demostrada en sus congéneres (*S. inaperta*, *S. nocturna*, *S. gallica*, *S. cerastioides*, *S. apelata*, *S. conica* y *S. conoidea*) se

esperaría que *S. nocteolens* fuera también autopolinizante y/o cleistógama, incluso puede que presente ginomonodioecia-ginodioecia como *S. noctiflora* (Desfeux *et al.*, 1996). Pero si el hermafroditismo estricto fuera el caso, el régimen de polinización estaría afectando los patrones demográficos de las poblaciones ya que la progenie de los cruzamientos entre individuos hermafroditas se establece significativamente mejor que la de los individuos producidos por autofecundación (Schaal, 1984).

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Recogida de Muestras y Poblaciones

La recogida de muestras de *S. nocteolens* se estableció en tres fases distintas. En la primera fase, que tuvo lugar entre junio y julio de 2007, se tomaron muestras al azar en la localidad de Montaña Blanca para ponderar la efectividad de los microsatélites a utilizar. La segunda fase se llevó a cabo entre agosto y octubre del 2007 estableciéndose las colectas en dependencia de los estadios de vida mostrados en la **Tabla 14** y procurando obtener en cada población unos 25 individuos para cada uno de los estadios descritos (excepto el de “plántula”) con el fin de analizar la diversidad genética en las poblaciones a través del ciclo de vida de las plantas.

De esta primera etapa se obtuvo un total de 420 muestras pertenecientes a las dos únicas poblaciones conocidas: Montaña Blanca (287) y Pico Viejo (133) (Anexo IV).

Tabla 14 Estadios del ciclo de vida considerados en *Silene nocteolens*

ESTADIO	ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
Plántula	PL	Individuos germinados a partir de semillas colectadas
Juvenil	JU	Individuos inmaduros, pequeños
Virginal	VI	Individuos sin flores ni reminiscencia de previa floración
Vegetativo	VE	Individuos sin flores, pero con rastros de floraciones pasadas
Reproductor Joven	RJ	Individuos con flores, pero sin vestigios de floraciones previas
Reproductor Adulto	RA	Individuos con flores y evidencia de floraciones anteriores

La tercera fase de muestreo correspondió a la obtención de las plántulas que fueron cultivadas en el invernadero del Parque Nacional del Teide a partir de las semillas colectadas en la fase anterior (**Fig. 15**). El muestreo de estas plántulas (F1) se hizo entre junio del 2008 y diciembre del 2009, consiguiéndose un total de 302 individuos.



Fig. 15 Plántulas de *Silene nocteolens* (F1) germinadas a partir de semillas procedentes de Montaña Blanca (izquierda) y Pico Viejo (derecha)

En resumen, se obtuvo un total de 747 muestras de *Silene nocteolens* (Tabla 15), aunque no todas fueron objeto de análisis genético.

Tabla 15 Número de muestras recogidas de *Silene nocteolens* por fecha, estadio y población

COLECTA	FECHA	ORIGEN	INDIVIDUOS	ESTADIO							TOTAL
				PI	Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	S/D	
1	05-jun-07	Montaña Blanca	1→126	0	0	0	0	0	0	124	124
2	12-jul-07	Montaña Blanca	127→204	0	26	25	26	1	0	0	78
3	16-jul-07	Pico Viejo	205→334	0	27	30	23	25	25	0	130
4	22-ago-07	Montaña Blanca	335→384	0	0	0	0	25	25	0	50
5	18-oct-07	Montaña Blanca	384→419	0	0	0	0	0	35	0	35
		Pico Viejo	420→422	0	0	0	0	0	3	0	3
6	11-jun-08	Montaña Blanca	423→486	63	0	0	0	0	0	0	63
		Pico Viejo	425	1	0	0	0	0	0	0	1
7	05-ago-08	Montaña Blanca	487→578	92	0	0	0	0	0	0	92
		Pico Viejo	579→580	2	0	0	0	0	0	0	2
8	01-oct-08	Pico Viejo	581→605	0	0	0	0	0	25	0	25
9	03-dic-08	Montaña Blanca	606→625	20	0	0	0	0	0	0	20
10	06-jun-09	Pico Viejo	626→649	24	0	0	0	0	0	0	24
		Montaña Blanca	650→672	23	0	0	0	0	0	0	23
11	17-dic-09	Pico Viejo	673→720	48	0	0	0	0	0	0	48
		Pico Viejo	721→749	29	0	0	0	0	0	0	29
Total				302	53	55	49	51	113	124	747

Muestras recogidas según estadio de vida (PI: Plántulas; Ju: Juvenil; Vi: Virginal; Ve: Vegetativo; Rj: Reproductor joven; Ra: Reproductor adulto; S/N: sin determinar). Plantas madres sombreadas.

En el caso de las plántulas, se le dio mayor énfasis al análisis de aquellas que en su conjunto alcanzaran o superaran las cinco (5) muestras por progenitor. De esta manera, se definió un total de 17 plantas madres (12 de Montaña Blanca y 5 de Pico Viejo) las que junto a sus respectivos descendientes (195) se detallan en la Tabla 16.

4.2.2. Análisis Genéticos

Las muestras fueron transportadas y conservadas en bolsas plásticas de cierre hermético con gel de sílice hasta la extracción del ADN. Cada bolsa fue etiquetada con el código correspondiente a cada individuo.

Para la extracción de ADN se maceró aproximadamente 1 cm² de hoja deshidratada de cada individuo con la ayuda de un molinillo vibratorio (RETSCH MM 301); esto se hizo directamente en los tubos de ensayo de 1,5 ml de capacidad y con la ayuda de un par de balines de acero inoxidable que contribuían a la trituración de la muestra.

El material triturado se sometió al protocolo de extracción de Doyle & Doyle (1987). Para asegurar la consecución de ADN a partir de la poca cantidad de tejido recuperado de las plántulas, la extracción en estas se hizo mediante el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) modificado por Corniquel & Mercier (1994).

Una vez extraído el ADN se procedió a su purificación, esto se hizo mediante kits de purificación comerciales (SIGMA Gene Elute PCR Clean-Up Kit), utilizándose 150 µl del ADN total de cada muestra.

Las concentraciones y calidad del ADN fueron determinadas por absorbancia. La concentración de ADN fue medida espectrofotométricamente a 260 nm (BECKMAN Coulter DU 530), debido a que esta molécula presenta la mayor absorción a esta longitud de onda. Para verificar la pureza del ADN se hicieron lecturas a 230 nm, donde se estima que se encuentran las impurezas (fenol y urea). Por último, se calculó la tasa de absorción a 260/280 nm para determinar la proporción ADN/ARN. La concentración del ADN purificado de las muestras osciló en el rango de 20 a 64 ng/µl.

Los ensayos de prueba para *Silene nocteolens* se realizaron con cebadores desarrollados para *S. latifolia* (Teixeira & Bernasconi, 2007) y *S. vulgaris* (Juillet *et al.*, 2003). Pese a que se ensayaron diferentes condiciones de laboratorio (concentración de MgCl₂, temperaturas, tiempos de PCR y

diluciones de trabajo), ninguno de estos cebadores dio resultados satisfactorios (Tabla 18).

Tabla 18 Microsatélites ensayados en *Silene nocteolens* (ninguno positivo).

LOCUS	REFERENCIA	ESPECIE	MOTIVO
A 2	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(CA) ₄ TA(CA) ₃
A 5	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(CA) ₂₁ CT(CA) ₂
A 11	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(CA) ₂ A(CA) ₂₄
B 12	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(CTT) ₂ C(CTT) ₂ T(CTT) ₂ (CATT) ₅
B 17	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(GA) ₂₂ AA(GA) ₂ AA(GA) ₉
B 29	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(GA) ₁₆
G 3	Julliet <i>et al.</i> , 2003	<i>Silene vulgaris</i>	(GA) ₂₀
SI 1	Teixeira & Bernasconi, 2007	<i>Silene latifolia</i>	(CA) ₃₁
SI 14	Teixeira & Bernasconi, 2007	<i>Silene latifolia</i>	(GT) ₄₁
SI 15	Teixeira & Bernasconi, 2007	<i>Silene latifolia</i>	(GT) ₄₆
SI 8	Teixeira & Bernasconi, 2007	<i>Silene latifolia</i>	(GA) ₃₇

Tabla 19 Descripción de los microsatélites desarrollados para *Silene nocteolens*

LOCUS	CEBADOR/SECUENCIAS (5'→3')	TAMAÑO (PB)	MOTIVO	Tm (°C)
SN01a	R: GGAGATGCGCGTGGTTTCT	190	(AG) ₁₅	68
	F: CTAAGGACCACTAGATCATACT			53
SN01b	R: AGTATGATCTAGTGGTCCTTAG	199	(AC) ₃₅	66
	F: CCTCGGAATACACGATGTGCT			53
SN02	R: AACTGTTTGTACTCATCTTGTC	143	(CA) ₄₅	55
	F: GAATTCAAATAACAAAAAGAAGT			56
SN04	R: CATTTCACCACCCAAATTAG	215	(GA) ₁₀ (AG) ₂₄	63
	F: TGGGTCAAGGTCGAGACGG			69
SN05	R: TCGTGCTCGCCTTCCAATC	241	(TC) ₁₇	69
	F: CCGAGTGCAACATTATCGTC			63
SN06	R: CCTTACAATTTGGTGTAATC	194	(AG) ₃₇	55
	F: GCCTTAGTATATAAGTTTCC			49
SN07	R: CCGGGGTGTTACATAGATAG	221	(AG) ₅₃	58
	F: CTGGAGGGAGACTGTTATATG			58
SN08	R: CGTGTGCAACATAAGTGACC	221	(GA) ₁₀	62
	F: GAATTCTCTTCGTTCTCCTC			57
SN11	R: GGCCGTGTGGTGGTTGTGT	110	(TA) ₈	70
	F: AGACTCGACCCACGCACTC			66
SN12	R: CAAACTACTCGACTCGCGAC	117	(AC) ₁₀	63
	F: GTGCTCACGGCTGCATGCC			73
SN14	R: GCCCTAAAACCTCTGTTGCAC	95	(GA) ₂₂	61
	F: GAATTCCCTGCTTACCGCC			66
SN18	R: GGATGGCTAAGATTAATCTG	207	(CT) _{6... (CT)₉}	57
	F: CCGTTCTTGTTGTGCGTTGATG			65
SN20	R: GGTGTTGATGCAAATGAAG	166	(GT) ₉	59
	F: GTGCCTACAACATATGAAGA			55
SN21	R: GTCTCCGGTTAAGCTCAATC	156	(CT) ₁₄	62
	F: TTGCAAAGTTTGGGTCCTTATC			64
SN24	R: AACTCCAGTCATAACTCCTT	166	(CA) ₁₇ (CT) ₁₄	54
	F: AGGAGAGAATGGATGAGGG			61

F: Forward, R: Reverse, pb: pares de bases, Tm: Temperatura de hibridación

Como consecuencia de la carencia de resultados positivos obtenidos con los microsatélites descritos en *S. vulgaris* y *S. latifolia*, se procedió a desarrollarlos de manera específica para *S. nocteolens*. La caracterización y aislamiento de estos microsatélites fue encargada a la empresa ATG-GENETICS (Canadá) cuyas especificaciones originales se detallan en la **Tabla 19**.

Las amplificaciones de ADN se hicieron en placas de PCR de 96 pocillos. En cada pocillo se depositó aproximadamente 20 ng de ADN, 10 pmol de cada cebador y 24 μ l de mezcla maestra para PCR (Reddy-Mix, ABgene, Surrey, UK) que incluye 0,625 unidades de la enzima ADN Taq polimerasa, Tris-HCl 75 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM, Tween 20 0,01%, 1,5 mM (o 2mM) de MgCl_2 y 0,2 mM de cada dNTP. Los diversos protocolos de amplificación del ADN obedecen a ciertas particularidades que se ajustan en dependencia del cebador utilizado.

4.2.2. Análisis de Datos

4.2.2.1. Genotipado

Los productos de la amplificación fueron analizados usando un Secuenciador Capilar ABI 3130XL y el genotipado; es decir, los alelos de cada locus y su tamaño respectivo fueron identificados por los picos obtenidos a través de los programas GENESCAN 2.02 y GENOTYPER 1.1 (Applied Biosystems, Inc.). Los datos obtenidos para cada individuo y locus amplificado se incluyeron en una matriz de doble entrada (hoja de cálculo Microsoft EXCEL). Se elaboró entonces una base de datos en la que se incluían los individuos analizados y los alelos identificados por población y locus respectivos. Una vez completada la matriz de datos se empleó el programa TRANSFORMER 3B.01 (Caujapé-Castells y Baccari-Rosas, 2005), el cual permite exportar los valores a otros programas de análisis genético.

4.2.2.2. Dinámica Reproductiva

Para el análisis de la dinámica reproductiva de *Silene nocteolens* se calculó el coeficiente de endogamia (F_{IS}) según la ecuación:

$$F_{IS}(T) = 1 - \frac{H_{o(estadios)}}{H_{e(total)}}$$

La tasa de mortalidad de los diferentes estadios vitales de *Silene nocteolens* se estimó mediante visitas anuales a la población de Montaña Blanca realizadas por el personal del Parque Natural del Teide. En las primeras visitas se censó a los individuos en dependencia a su estadio de vida y en años sucesivos se realizó el recuento para determinar tanto el número de individuos que habían pasado al siguiente estadio vital como la cantidad de especímenes muertos desde la visita inmediatamente anterior. No se tienen datos semejantes para Pico Viejo.

De esta manera puede decirse que la tasa de mortalidad por estadio (m_E) para la población de *Silene nocteolens* de Montaña Blanca obedece a la siguiente igualdad:

$$m_E = \frac{F_E}{P_E} \times 100$$

en donde F_E es el número de defunciones por estadio de vida y P_E el número total de individuos para ese determinado estadio.

4.2.2.3. Análisis Estadístico

El Anexo I muestra un resumen de los programas informáticos utilizados en la caracterización genética de las poblaciones vegetales estudiadas.

La estadística elemental de variabilidad genética de *Silene nocteolens* corresponde al número medio de alelos por locus (A), la heterocigosidad observada (H_o), la heterocigosidad esperada (H_e ; Nei, 1973) y se consideró también el porcentaje de loci polimórficos (P). Estos análisis fueron calculados entre poblaciones y estadios de vida utilizando POPGENE 3.2 (Yeh *et al.*, 1999), programa que también sirvió para obtener los valores de identidad y distancia genética de Nei (Nei, 1972).

Para determinar si las poblaciones analizadas se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg se calculó el índice de fijación (F_{IS}) y se realizó un

test de probabilidad de Fisher implementado en el GENEPOP V4 (Rousset, 2008) en el que la hipótesis nula (H_0) señala la existencia de unión al azar de los gametos para ese locus. La prueba de alelos nulos se hizo a través de MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

En el análisis de la dinámica reproductiva en *Silene nocteolens*, el coeficiente de endogamia [$F_{IS}(T)$] se calculó adicionando los datos de las plantas madres y las plántulas de modo que se generaron nuevos valores de H_o y H_e . Los análisis de correlación entre el coeficiente de endogamia y la tasa de mortalidad (m_E) se calcularon según el método de Pearson para un intervalo de confianza del 95% mediante PASW STATISTICS 18 (anteriormente SPSS STATISTICS, IBM Company, Chicago, IL).

Se ha utilizado el método de autocorrelación espacial de Smouse y Peakall (1999) implementado en GENALEX 6.4 (Peakall & Smouse, 2006) para generar los autocorrelogramas. Se probó la significancia de los coeficientes de correlación sobre la hipótesis nula de una estructura al azar utilizando 1000 permutaciones, 1000 repeticiones y un intervalo de confianza del 95%.

Las distancias entre poblaciones para la construcción de un dendrograma UPGMA con fortaleza en los agrupamientos (1000 repeticiones) para *Silene nocteolens* fueron calculadas utilizando POPULATION 1.2.30BETA (Langella, 2005). Todos los árboles fueron visualizados y editados en MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) y TREEVIEW 1.1.6 (Roderic, 2001).

La obtención de los coeficientes de diferenciación (F_{ST}) se realizó con GENALEX 6.4 (Peakall & Smouse, 2006). Este programa fue utilizado también para generar el análisis de coordenadas principales (PCoA) y el análisis molecular de varianza (AMOVA).

La estructura de las poblaciones fue inferida mediante un análisis Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.2 (Falush *et al.*, 2007). Se asumió un modelo de mezcla y frecuencias alélicas independientes. Se obtuvo una serie de carreras independientes para cada valor de K (el número de grupos) entre 1 y 10. El análisis consistió en 10^5 períodos de prueba y una longitud de carrera 10^6 réplicas. En total se corrieron 5 análisis con estas

especificaciones a fin de corroborar los resultados obtenidos. Los individuos fueron asignados a un “grupo” si su proporción de pertenencia (q_i) a ese grupo era igual o mayor que el umbral de 0,05.

El sistema de cruzamiento de *Silene nocteolens* se evaluó mediante el modelo de apareamiento mixto descrito por Ritland & Jain (1981) utilizando el programa MLTR (Ritland, 2002). Este procedimiento estima el coeficiente de endogamia materno por locus (F_m), la tasa de cruzamiento (t_m), la tasa media de cruzamiento en un locus (t_s), la tasa de cruzamiento entre individuos emparentados [$(t_m - t_s) \neq 0$] y la correlación del cruzamiento paterno dentro de la progenie (es decir, la probabilidad de que al escoger aleatoriamente un par de descendientes compartan ambos progenitores, r_p). A partir de este último parámetro puede obtenerse la paternidad efectiva ($N_{ep} = 1/r_p$). De esta manera, la información de los loci detectados con microsatélites ha servido para estimar los patrones de transmisión genética entre progenitores y descendientes; a la vez que confirma la identidad genética de las plantas madres y su progenie. Se utilizó el método numérico de Expectación-Maximización (EM) y el error estándar (SE) fue estimado por repeticiones (10^4) sobre las familias.

4.3. Resultados

4.3.1. Cebadores y Protocolos Funcionales

Aún cuando se desarrollaron 15 cebadores específicos para *Silene nocteolens* (**Tabla 19**), únicamente seis de estos (SN01, SN02, SN06, SN14, SN20 y SN21) mostraron un carácter polimórfico aceptable y fueron utilizados en el resto de las muestras (**Tabla 20**).

Tabla 20 Secuencia de los seis cebadores funcionales en *Silene nocteolens*

LOCUS	CEBADOR/SECUENCIAS (5'→3')	RANGO (pb)	MOTIVO	T _m (°C)	EMBL
SN01	R: GGAGATGCGCGTGGTTTCT F: CTAAGGACCACTAGATCATACT	176-213	(AG) ₁₅	60	FN563106
SN02	R: AACTGTTTGTACTCATCTTGTC F: GAATTCAAATAACAAAAGAAGT	114-221	(CA) ₄₅	55	FN563107
SN06	R: CCTTACAATTTGGTGTAATC F: GCCTTAGTATATAAGTTTCC	171-231	(AG) ₃₇	55	FN563108
SN14	R: GCCCTAAAACCTCTGTTGCAC F: GAATCCCTGCTTACCGCC	66-100	(GA) ₂₂	60	FN563110
SN20	R: GGTGTTGATGCAAATGAAG F: GTGCCTACAACATATGAAGA	162-234	(GT) ₉	60	FN563112
SN21	R: GTCTCCGGTTAAGCTCAATC F: TTGCAAAGTTTGGGTCCTTATC	143-206	(CT) ₁₄	60	FN563113

F: Forward, R: Reverse, pb: pares de bases, T_m: Temperatura de hibridación, EMBL: código correspondiente a cada locus en el Banco Europeo de Secuencias Nucleotídicas

Los cebadores SN01, SN14, SN20 y SN21 presentaron mejores resultados en las condiciones básicas de amplificación (**Fig. 16**): 3 min de desnaturalización a 95 °C; seguidos de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s de hibridación a 60 °C y 1 min 30 s de elongación a 72 °C; luego, otros 5 min de elongación a 72 °C y culmina a 4 °C por tiempo indefinido; estas condiciones de amplificación se abreviaron como el perfil SASN60 (el número hace referencia a la temperatura de hibridación).

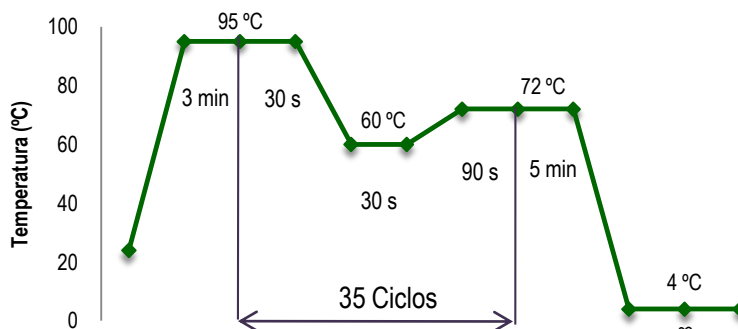


Fig. 16 Perfil de amplificación SASN60

Por su parte; SN02 y SN06 difirieron de los primeros en la temperatura de hibridación, mostraron mejores resultados a 55 °C (Perfil SASN55, **Fig. 17**). SN02 necesitó otros requerimientos en la mezcla de amplificación (3 mM MgCl₂, BSA y DMSO) y SN06 requirió MgCl₂ 2,5 mM.

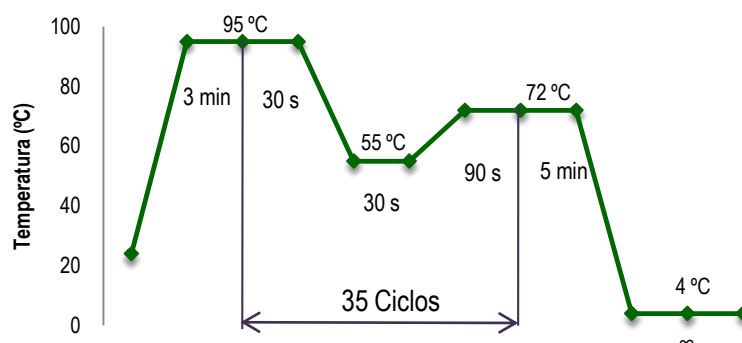


Fig. 17 Perfil de amplificación SASN55

Los requerimientos específicos para cada uno de estos cebadores se resumen en la **Tabla 21**.

Tabla 21 Condiciones específicas ensayadas para los cebadores de *Silene nocteolens*

NOMBRE	T _m	MgCl ₂	BSA	DMSO
SN 01	60°C	1,5 mM	-	-
SN 02	55°C	3,0 mM	+	+
SN 06	55°C	2,5 mM	-	-
SN 14	60°C	1,5 mM	-	-
SN 20	60°C	1,5 mM	-	-
SN 21	60°C	1,5 mM	-	-

T_m: Temperatura de hibridación; +: requiere adición.

4.3.2. Niveles de Diversidad Genética

4.3.2.1. Frecuencias Alélicas

En las poblaciones naturales de *Silene nocteolens* (sin considerar las muestras para los análisis parentales) se detectaron 96 alelos, correspondientes a 6 loci, todos polimórficos. El número de alelos varió entre 27 para el locus SN02 y 5 alelos para el locus SN20. Existe una mayor proporción de alelos exclusivos en la población de Pico Viejo (40,63%) que los hallados en Montaña Blanca (13,54%), aunque la mayor parte de los alelos (45,83%) estaban presentes en ambas poblaciones (Anexo V).

Por otro lado, al considerar las frecuencias alélicas de acuerdo al estadio de vida de los individuos y a su población de procedencia (Anexo VI), el mayor número de alelos exclusivos se encontró en los virginales de Pico Viejo (PV-VI) que presentaron 5 alelos exclusivos (5,21%); en los vegetativos y reproductores jóvenes de Pico Viejo (PV-VE y PV-RJ) se encontraron 3 alelos exclusivos (3,13%); en los virginales de Montaña Blanca y en los reproductores adultos de Pico Viejo (MB-VI y PV-RA), 2 alelos exclusivos (2,08%) y para los vegetativos y reproductores de Montaña Blanca (MB-VE, MB-RJ y MB-RA) solo se reportó un alelo exclusivo (1,04%). En total, 18 alelos exclusivos; 5 para Montaña Blanca y 13 en Pico Viejo. No se encontraron alelos exclusivos en los estadios juveniles de ninguna de las poblaciones.

Dieciséis alelos (SN01-184, SN01-186, SN01-188, SN02-154, SN02-156, SN06-187, SN06-189, SN14-66, SN14-68, SN14-78, SN14-90, SN20-228, SN20-230, SN20-232, SN21-170 y SN21-194) fueron detectados en todos los estadios de vida para ambas poblaciones analizadas. Sin embargo, no se reportaron alelos fijados ni en las poblaciones ni por estadio de vida.

4.3.2.2. Variabilidad Genética

Las **Tabla 22** y **Tabla 23** detallan los niveles de diversidad genética en *Silene nocteolens* según los estadios de vida por población y considerando solo los diferentes estadios, respectivamente.

En general, la población de Pico Viejo mostró una mayor riqueza alélica ($A = 13,67$) que la encontrada para la población de Montaña Blanca ($A = 9,50$); siendo la media entre las poblaciones $A = 11,83$. Al tomarse en cuenta la población de procedencia y el estadio de vida, el rango oscila de 6,17 para los reproductores adultos de Montaña Blanca (MB-RA) a 10,67 para las plantas virginales de Pico Viejo (PV-VI).

Cuando se analizaron todos los individuos de *S. nocteolens* agrupándolos según su estadio de vida sin tener en cuenta la población de procedencia (**Tabla 23**), el valor más pequeño del número medio de alelos por locus correspondió a las plantas del estado vegetativo (10,83) mientras que los virginales presentaron el valor más alto (12,83).

Tabla 22 Parámetros de diversidad genética de *Silene nocteolens* según el estadio de vida y población

POBLACIÓN	ESTADIO	Nº	A	H _o	H _e	P
Montaña Blanca	MB-JU	26	7,00	0,546	0,667	100%
	MB-VI	24	7,50	0,574	0,686	100%
	MB-VE	26	7,33	0,616	0,701	100%
	MB-RJ	26	6,33	0,615	0,667	100%
	MB-RA	25	6,17	0,582	0,705	100%
Media MB		127	9,50	0,590	0,707	100%
Pico Viejo	PV-JU	26	9,50	0,680	0,782	100%
	PV-VI	30	10,67	0,719	0,771	100%
	PV-VE	23	8,33	0,636	0,756	100%
	PV-RJ	25	9,50	0,693	0,768	100%
	PV-RA	25	9,83	0,652	0,754	100%
Media PV		129	13,67	0,679	0,778	100%
Total		256	15,83	0,636	0,784	100%

Nº: es el número de individuos analizados por población y estadio de vida, A: Número medio de alelos por locus, H_o: Heterocigosidad observada, H_e: Heterocigosidad esperada y P: Porcentaje de loci polimórficos. Estadios de vida según **Tabla 14**.

Tabla 23 Índices de diversidad genética por estadios en *Silene nocteolens*

ESTADIO	Nº	A	H _o	H _e	P
JU	52	11,83	0,613	0,774	100%
VI	54	12,83	0,656	0,781	100%
VE	49	10,83	0,626	0,776	100%
RJ	51	11,67	0,663	0,774	100%
RA	50	12,17	0,617	0,779	100%
Total	256	15,83	0,636	0,784	100%

Nº: es el número de individuos analizados por estadio de vida, A: Número medio de alelos por locus, H_o: Heterocigosidad observada, H_e: Heterocigosidad esperada y P: Porcentaje de loci polimórficos. Estadios de vida según **Tabla 14**.

Desde cualquier punto de vista (bien sea por estadios de vida, en cada población o en el total de ambas poblaciones analizadas) se obtuvo un 100% de polimorfismo en esta especie.

De manera general, la especie muestra una alta heterocigosidad esperada ya que revela valores en torno a 0,784. En concordancia con los resultados para la riqueza alélica, la población de Pico Viejo presentó mayor heterocigosidad esperada ($H_e = 0,778$) que la de Montaña Blanca ($H_e = 0,707$).

Si tenemos en cuenta los resultados al analizar solamente los estadios de vida, independientemente de la población de procedencia, la heterocigosidad esperada varía desde $H_e = 0,774$ en los juveniles y reproductores jóvenes hasta $H_e = 0,779$ en los reproductores adultos (**Tabla 23**). Pero al separar los

estadios por población (**Tabla 22**), los juveniles y reproductores jóvenes de Montaña Blanca registran una $H_e = 0,667$ mientras que los juveniles de Pico Viejo alcanzan una $H_e = 0,782$; siendo estos los valores extremos.

4.3.3. Estructura Genética en las Poblaciones

4.3.3.1. Equilibrio Hardy-Weinberg

En la **Tabla 24** se muestran los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}) y sus respectivos grados de significación para los estadios de vida de ambas poblaciones analizadas de *Silene nocteolens*.

En ambas poblaciones tres loci (SN02, SN06 y SN14) mostraron desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg, siendo además valores positivos en su mayor parte. Por el contrario, dos de los loci (SN20 y SN21) se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg en las dos poblaciones estudiadas; mientras que SN01 se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg en la población de Pico Viejo, pero con un defecto de heterocigotos ($F_{IS} > 0$) en Montaña Blanca. De manera global el valor de F_{IS} fue positivo y altamente significativo en todos los estadios y poblaciones al considerar conjuntamente todos los loci (**Tabla 24**).

Tabla 24 Análisis de probabilidad de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg según estadios de vida y poblaciones de *Silene nocteolens*

ESTADIO	SN01	SN02	SN06	SN14	SN20	SN21	FISHER
MB-JU	0,265 ^{ns}	0,257*	0,271***	0,168***	0,205 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0,200***
MB-VI	0,372 ^{ns}	0,174 ^{ns}	0,134*	0,401***	-0,064 ^{ns}	-0,037 ^{ns}	0,183***
MB-VE	0,459**	-0,012 ^{ns}	0,019 ^{ns}	0,130***	0,452 ^{ns}	-0,011 ^{ns}	0,136***
MB-RJ	0,190 ^{ns}	0,061 ^{ns}	0,034 ^{ns}	0,381***	-0,124 ^{ns}	0,176 ^{ns}	0,077***
MB-RA	0,451***	0,240**	0,261**	0,163***	-0,112 ^{ns}	0,130 ^{ns}	0,199***
MB	0,351***	0,150***	0,145***	0,388***	-0,006^{ns}	0,027^{ns}	0,163***
PV-JU	0,039 ^{ns}	0,213***	0,062 ^{ns}	0,324***	0,037 ^{ns}	0,062**	0,151***
PV-VI	0,094 ^{ns}	0,063 ^{ns}	0,205**	0,337***	-0,007 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,088***
PV-VE	0,276 ^{ns}	0,321*	0,283**	0,326***	-0,276 ^{ns}	0,062*	0,178***
PV-RJ	0,076 ^{ns}	0,111*	0,023 ^{ns}	0,158***	0,373 ^{ns}	-0,004 ^{ns}	0,118***
PV-RA	0,042 ^{ns}	0,075 ^{ns}	0,250**	0,310***	0,358 ^{ns}	0,005 ^{ns}	0,158***
PV	0,095*	0,140***	0,165***	0,275***	0,045^{ns}	0,052*	0,132***

ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Ahora bien, en la población de Montaña Blanca existen parcelas de seguimiento definidas por el personal del Parque Nacional del Teide, las cuales están constituidas en dos grupos separados geográficamente. En el primer

grupo se encuentran 6 parcelas muy próximas la una de la otra (menos de 5 m de separación entre ellas) y en el segundo grupo se encuentran otras tres; separados ambos grupos por aproximadamente 50 m (**Fig. 18**).

Un segundo análisis de probabilidad de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg fue realizado para las muestras naturales de *Silene nocteolens* de acuerdo a su agrupación por parcelas. La **Tabla 25** muestra los valores de F_{IS} y sus respectivos grados de significación para estas muestras en los distintos loci estudiados. El locus 14 presentó desviación para el equilibrio Hardy-Weinberg con valores de $F_{IS} > 0$, lo que indica un defecto de heterocigotos. El resto de los loci estuvo predominantemente en equilibrio Hardy-Weinberg a nivel de parcelas (40 de los 54 casos, 74,07%); pero a nivel de grupo al juntar las parcelas los loci SN01, SN02, SN06 y SN14 se desviaron significativamente del equilibrio, debido probablemente al efecto Wahlund en esta población.

Tabla 25 Análisis de probabilidad de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg según parcelas en la población de *Silene nocteolens* de Montaña Blanca

PARCELA	SN01	SN02	SN06	SN14	SN20	SN21	FISHER
1	0,118 ^{ns}	-0,021 ^{ns}	0,125 ^{ns}	-	-0,195 ^{ns}	-0,195 ^{ns}	-0,045 ^{ns}
2	0,414 ^{ns}	0,358 ^{**}	0,200 ^{ns}	-0,037 ^{***}	0,125 ^{ns}	0,125 ^{ns}	0,161 ^{***}
3	0,394 [*]	0,217 [*]	0,143 ^{ns}	0,357 ^{***}	0,274 ^{ns}	0,274 ^{ns}	0,269 ^{***}
4	0,190 ^{ns}	-0,042 ^{ns}	0,881 ^{ns}	0,333 ^{**}	-0,154 ^{ns}	-0,154 ^{ns}	0,058 ^{ns}
5	0,472 ^{**}	0,127 ^{ns}	0,310 ^{***}	0,514 ^{***}	-0,055 ^{ns}	-0,055 ^{ns}	0,213 ^{***}
6	0,500 ^{ns}	-0,111 ^{ns}	0,000 ^{ns}	0,333 ^{ns}	-0,103 ^{ns}	-0,103 ^{ns}	0,000 ^{ns}
1 A 6	0,355^{***}	0,133^{**}	0,196^{***}	0,359^{***}	0,004^{ns}	0,005^{ns}	0,177^{***}
7	-0,105 ^{ns}	0,082 ^{ns}	-0,091 ^{ns}	0,059 ^{ns}	-0,217 ^{ns}	-0,217 ^{ns}	-0,049 ^{ns}
8	0,525 ^{**}	0,152 ^{ns}	-0,112 ^{ns}	0,342 ^{***}	0,087 ^{ns}	0,087 [*]	0,171 ^{***}
9	0,271 ^{ns}	0,166 ^{ns}	0,197 ^{ns}	0,487 ^{***}	-0,302 ^{ns}	-0,302 ^{ns}	0,115 ^{***}
7 A 9	0,340^{**}	0,162^{**}	0,050^{**}	0,406^{***}	-0,072^{ns}	0,034^{ns}	0,131^{***}

ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Análisis posteriores con el software MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004) manifestaron que los loci SN02, SN06 y SN14 mostraban evidencia de alelos nulos en ambas poblaciones, mientras que el locus SN01 los mostró sólo para Montaña Blanca; sugiriendo la posibilidad de que estos loci también estén en el equilibrio Hardy-Weinberg.

4.3.3.2. Análisis de Autocorrelación Espacial

El análisis de autocorrelación espacial fue aplicado únicamente a los individuos naturales de la población de Montaña Blanca, excluyendo a las

plantas “madre”. Las muestras analizadas corresponden a los individuos situados dentro y alrededor de las parcelas de seguimiento de *Silene nocteolens* definidas por el personal del Parque Nacional del Teide (**Fig. 18**).

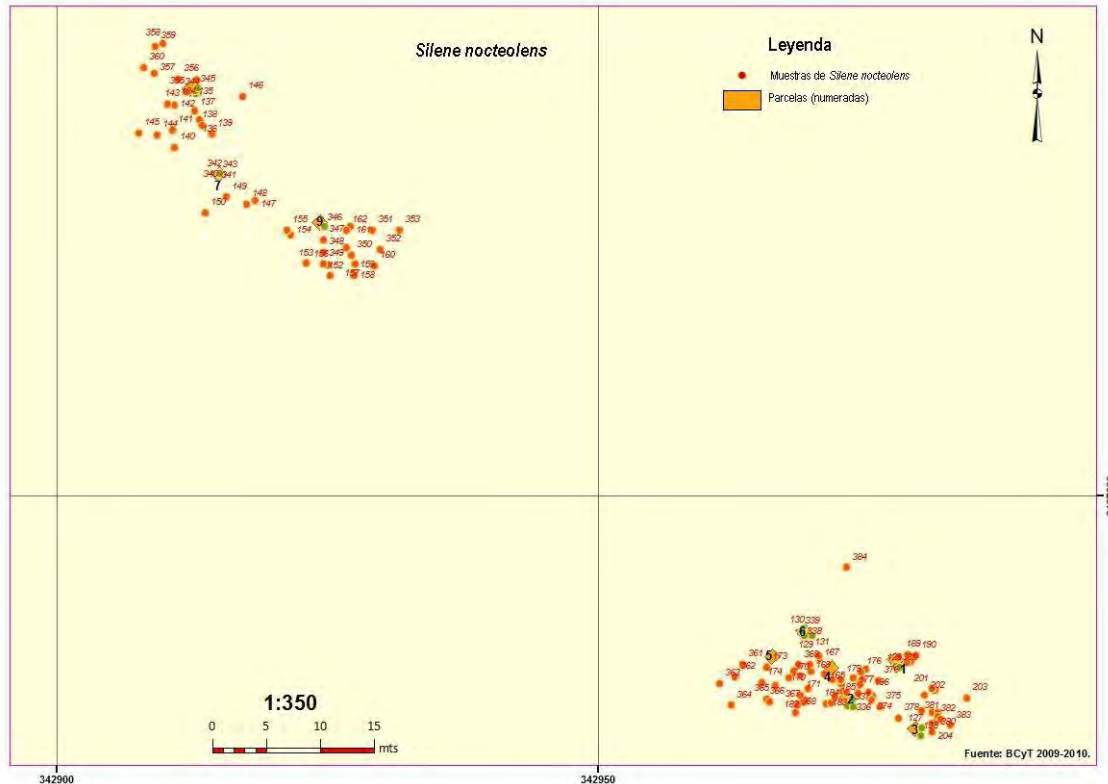


Fig. 18 Distribución geográfica de los individuos de *Silene nocteolens* según parcelas

Los cálculos de autocorrelación espacial se establecieron en ambos grupos por separado. En cada correlograma (**Fig. 19** y **Fig. 20**) la línea azul es el coeficiente de autocorrelación (r), las líneas punteadas rojas representan los límites superior e inferior para intervalos de confianza del 95% (999 permutaciones) sobre la distribución aleatoria de los genotipos y las barras representan el error estándar a intervalos de confianza de 95% calculado a partir de 1000 repeticiones.

En ambos casos el resultado fue la existencia de una importante correlación positiva entre las distancias genéticas y geográficas de los individuos analizados para la primera clase de distancia (0 – 5 m). Para el resto de las clases los valores no se alejaron significativamente de la distribución aleatoria esperada para los genotipos en cada grupo. Los interceptos con el eje de las abscisas fueron de 7,7 m y 8,1 m para cada grupo, respectivamente;

estos valores pueden interpretarse como la delimitación espacial en la cual los individuos de cada grupo mantienen una relación genética.

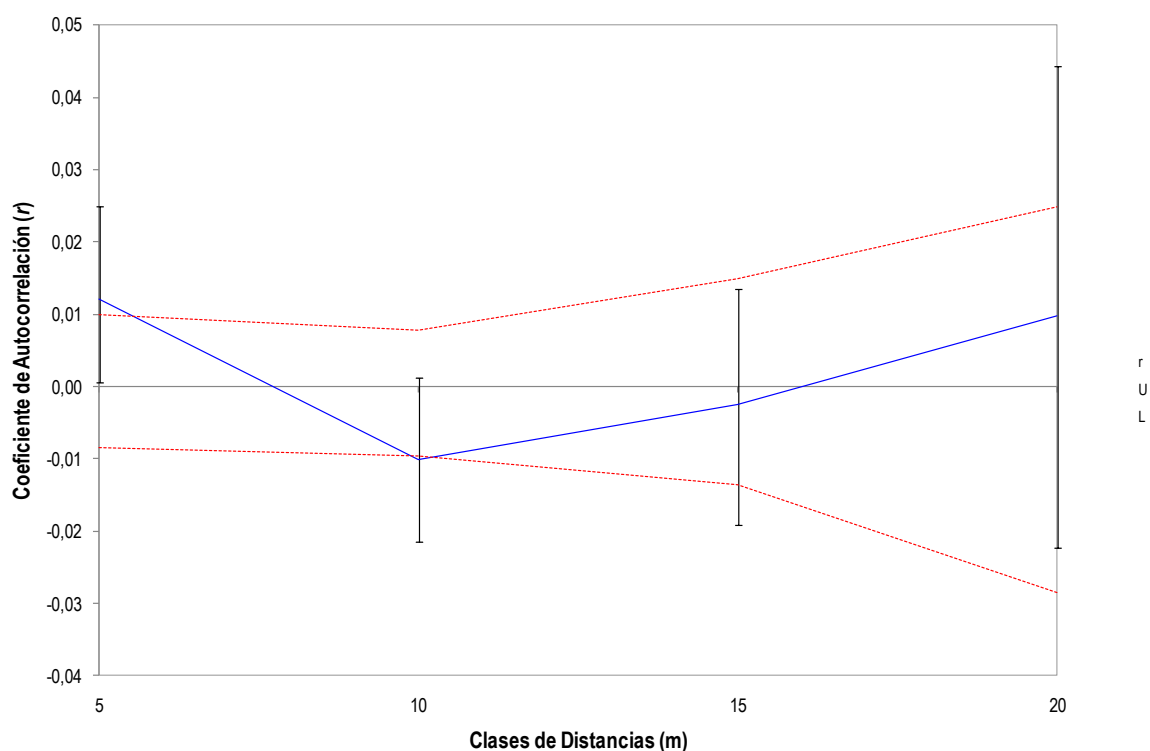


Fig. 19 Correlograma para las muestras de *Silene nocteolens* del grupo uno (parcelas 1-6) de Montaña Blanca

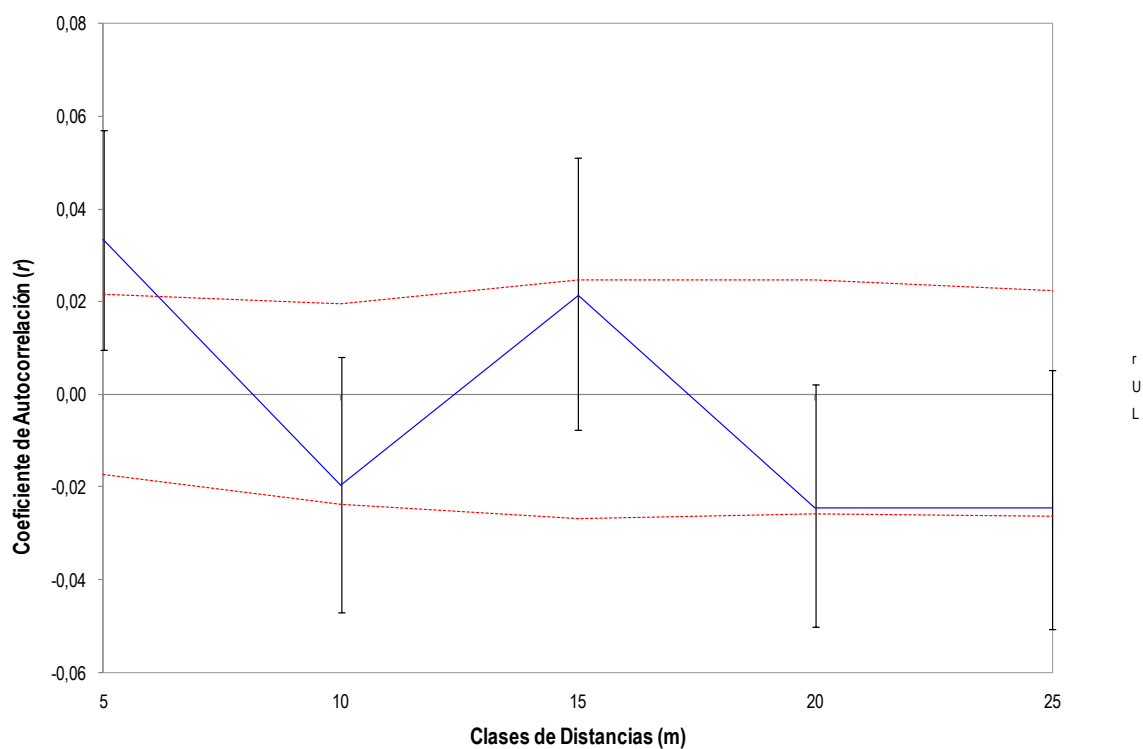


Fig. 20 Correlograma para las muestras de *Silene nocteolens* del grupo dos (parcelas 7-9) de Montaña Blanca

4.3.4. Diferenciación Genética entre las Poblaciones

4.3.4.1. Identidad y Distancia Genética

El rango de la identidad genética entre los diferentes estadios de vida en ambas poblaciones osciló entre 0,964 entre los virginales y vegetativos de Montaña Blanca (MB-VI / MB-VE) y 0,587 entre los reproductores jóvenes de Montaña Blanca y los vegetativos de Pico Viejo (MB-RJ / PV-VE) (**Tabla 26**).

Tabla 26 Identidad y distancias genéticas de Nei (1972) entre estadios por población de *Silene nocteolens*

	MB-JU	MB-VI	MB-VE	MB-RJ	MB-RA	PV-JU	PV-VI	PV-VE	PV-RJ	PV-RA
MB-JU		0,910	0,933	0,885	0,943	0,656	0,643	0,604	0,697	0,657
MB-VI	0,094		0,964	0,911	0,924	0,680	0,656	0,633	0,712	0,682
MB-VE	0,070	0,037		0,932	0,944	0,654	0,646	0,621	0,711	0,695
MB-RJ	0,122	0,093	0,071		0,922	0,605	0,594	0,587	0,660	0,668
MB-RA	0,058	0,079	0,058	0,081		0,653	0,628	0,605	0,680	0,651
PV-JU	0,422	0,386	0,425	0,503	0,426		0,957	0,932	0,938	0,923
PV-VI	0,442	0,421	0,436	0,521	0,465	0,044		0,936	0,939	0,938
PV-VE	0,504	0,457	0,476	0,533	0,502	0,070	0,066		0,939	0,940
PV-RJ	0,361	0,339	0,342	0,416	0,385	0,064	0,062	0,062		0,944
PV-RA	0,421	0,382	0,364	0,404	0,429	0,081	0,064	0,061	0,058	

Identidad genética (encima de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal). En rojo los menores valores y en verde los valores más altos.

Al analizar cada población por separado, el mayor valor se encontró entre los virginales y vegetativos de Montaña Blanca (MB-VI / MB-VE) como ya se mencionó anteriormente ($I = 0,964$), siendo el más bajo el correspondiente a la relación entre juveniles y reproductores jóvenes (MB-JU / MB-RJ = 0,885). En esta población el 90% de los valores fueron superiores a 0,900 con una media de 0,927. En el caso de Pico Viejo los valores variaron desde 0,923 entre los juveniles y los reproductores adultos (PV-JU / PV-RA) hasta 0,957 entre el estadio virginal y los juveniles (PV-VI / PV-JU), estando todos los valores por encima de 0,920 y siendo la media para la población $\bar{I} = 0,939$ (**Tabla 26**).

Cuando se revisan los resultados entre las poblaciones, se encuentra que la identidad genética desciende considerablemente, variando de 0,587 entre los reproductores jóvenes de Montaña Blanca y los vegetativos de Pico Viejo (MB-RJ / PV-VE) a 0,712 entre las plantas virginales de Montaña Blanca y los

reproductores jóvenes de Pico Viejo (MB-VI / PV-RJ). En esta ocasión ningún valor superó el 0,720 y la media (\bar{I}) fue de 0,651.

4.3.4.2. Coeficiente de Diferenciación Genética y AMOVA

En la **Tabla 27** se muestran los valores del coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) y el número de migrantes (N_m) para las poblaciones naturales de *Silene nocteolens* según estadios de vida y población.

Tabla 27 Coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) y número de migrantes (N_m) para las poblaciones de *Silene nocteolens* según estadio de vida

	MB-JU	MB-VI	MB-VE	MB-RJ	MB-RA	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 ^{ns}		30,601	11,588	15,982	4,013	3,685	3,356	4,396	3,857
MB-VE	0,016 ^{ns}	0,008 ^{ns}		15,009	21,477	4,026	3,876	3,485	4,745	4,360
MB-RJ	0,029 ^{ns}	0,021 ^{ns}	0,016 ^{ns}		13,339	3,172	3,013	2,877	3,575	3,575
MB-RA	0,013 ^{ns}	0,015 ^{ns}	0,012 ^{ns}	0,018 ^{ns}		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^{ns}		26,071	28,615	26,625
PV-VE	0,077 ^{***}	0,069 ^{***}	0,067 ^{***}	0,080^{***}	0,069 ^{***}	0,010 ^{ns}	0,009 ^{ns}		26,447	26,104
PV-RJ	0,059 ^{***}	0,054 ^{***}	0,050 ^{***}	0,065 ^{***}	0,055 ^{***}	0,009 ^{ns}	0,009 ^{ns}	0,009 ^{ns}		28,212
PV-RA	0,068 ^{***}	0,061 ^{***}	0,054 ^{***}	0,065 ^{***}	0,061 ^{***}	0,012 ^{ns}	0,009 ^{ns}	0,009 ^{ns}	0,009 ^{ns}	

Número de migrantes (encima de la diagonal) y coeficiente de diferenciación genética (debajo de la diagonal). En rojo los menores valores y en verde los valores más altos. ns: no significativo, ***: $p < 0,001$.

En general, la diferenciación genética media entre las dos poblaciones de *Silene nocteolens* fue bastante baja (0,053). El valor de F_{ST} varió desde 0,006 entre los juveniles y los virginales de Pico Viejo (MB-JU / MB-VI) hasta 0,080 entre reproductores jóvenes de Montaña Blanca y vegetativos de Pico Viejo (MB-RJ / PV-VE). Los datos medios obtenidos confiere a los ejemplares de Montaña Blanca un mayor coeficiente de diferenciación genética ($\bar{F}_{ST} = 0,017$) que el encontrado entre los de Pico Viejo ($\bar{F}_{ST} = 0,009$). En todos los casos las diferencias entre los estadios dentro de cada población no fueron significativas, mientras que sí lo fueron interpopulacionalmente.

Según el AMOVA (**Tabla 28**), todas las pruebas de diferenciación para los distintos niveles jerárquicos fueron significativas. La mayor parte de la varianza fue encontrada dentro de los estadios de vida (85,47%), luego entre poblaciones (13,45%) y finalmente entre los estadios de vida dentro de las poblaciones (1,08%).

Tabla 28 Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) de la variación genética de *Silene nocteolens*

FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SUMA DE CUADRADOS	VARIANZA EN LOS COMPONENTES	PORCENTAJE DE VARIACIÓN	
Entre poblaciones	1	116,187	0,852	13,45	$F_{CT} = 0,134$ ***
Entre las estadios de vida en las poblaciones	8	57,352	0,069	1,08	$F_{SC} = 0,013$ **
Dentro de los estadios de vida	246	1331,186	5,414	85,47	
Total	255	1505,355	6,334	100,00	$F_{ST} = 0,145$ ***

GL: grados de libertad, F_{CT} : coeficiente de diferenciación genética entre regiones, F_{SC} : coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones en las regiones, F_{ST} : coeficiente de diferenciación genética entre todas poblaciones, **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.3.4.3. UPGMA

El dendrograma UPGMA construido a partir de las distancias genéticas entre individuos de todos los estadios y poblaciones separó claramente (97%) los ejemplares (y estadios) de las mismas (**Fig. 21**).

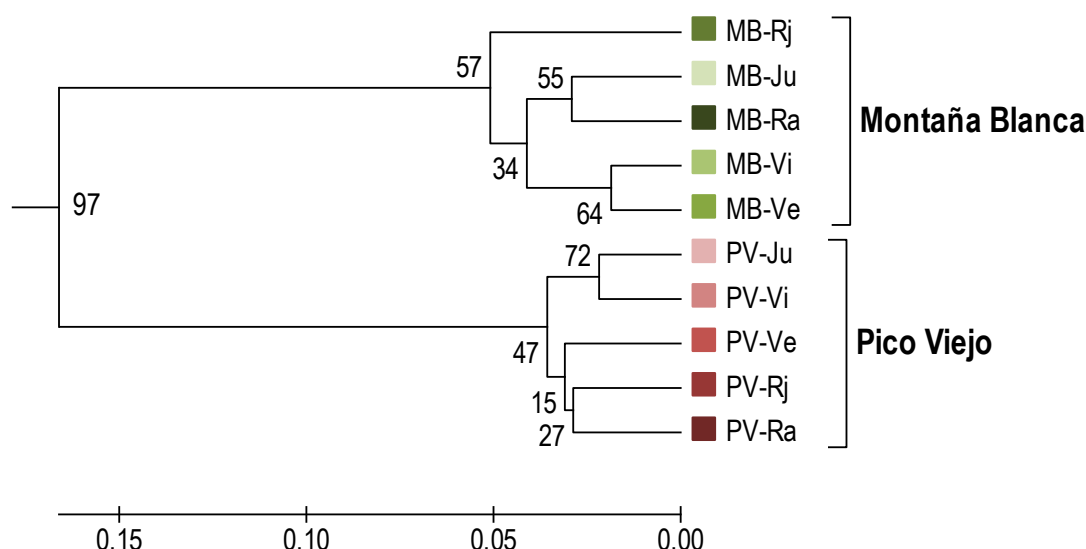


Fig. 21 Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) entre estadios por población de *Silene nocteolens*

En Montaña Blanca los reproductores jóvenes se separan del resto de los estadios (con 57% de fortaleza), los juveniles se agrupan con los reproductores adultos (55%); mientras los virginales y vegetativos se acercan más entre ellos (64%). En Pico Viejo los juveniles y virginales son los que se disgregan del resto de los individuos y con mayor fuerza (72%), también se observa un mayor acercamiento entre los vegetativos y los reproductores (47%) en esta población.

En cualquier caso, las diferencias entre los diversos estadios de vida no fueron consideradamente elevadas, existiendo mayor diferencia genética entre las poblaciones que entre los estadios.

4.3.4.4. Análisis de Coordenadas Principales

El análisis de coordenadas principales ejecutado para los ejemplares de *Silene nocteolens* a partir de las distancias de Nei (Nei, 1972) explica el 45,41% de la variación detectada en sus dos primeras coordenadas (**Fig. 22**).

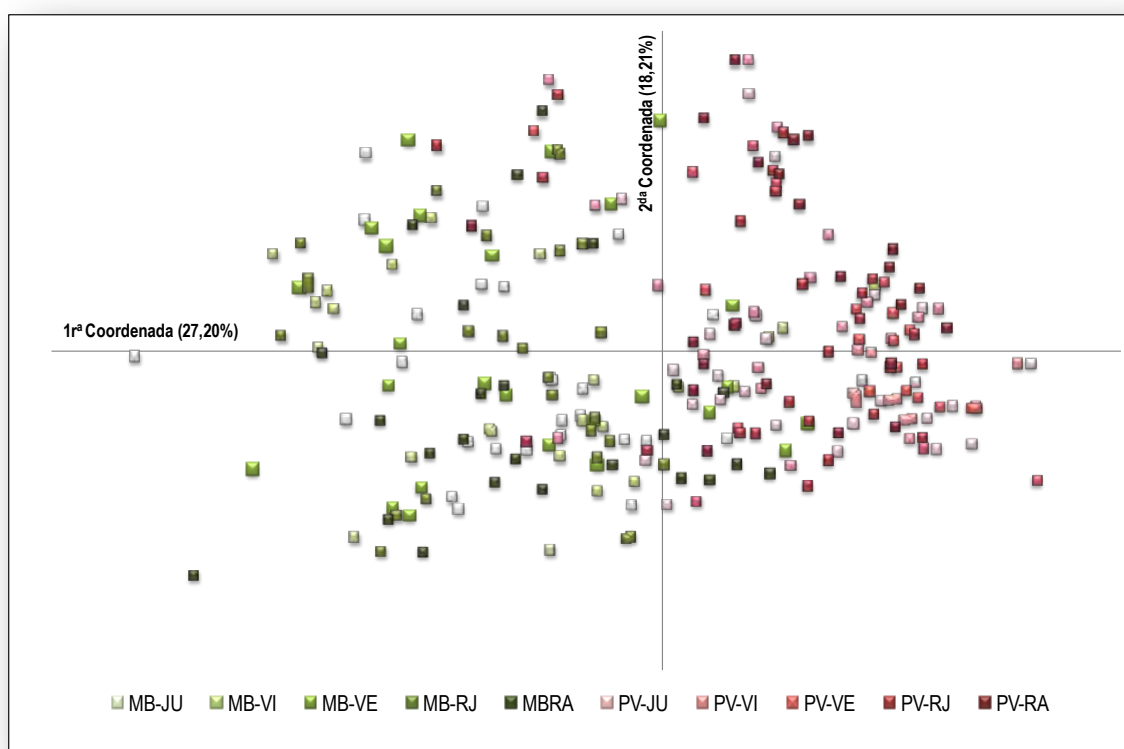


Fig. 22 Análisis de coordenadas principales para los individuos naturales de *Silene nocteolens* a partir de las distancias genéticas de Nei (1972) por estadios y población. Códigos de las poblaciones según **Tabla 17**.

El PCoA individual muestra áreas exclusivas para ejemplares de Montaña Blanca y Pico Viejo, a la vez que existen zonas de solapamiento de determinadas muestras de ambas poblaciones; sin embargo, la mezcla entre los individuos de las dos poblaciones no parece estar relacionada con ningún estadio de vida en especial ya que en esa franja común se aprecian ejemplares de todos los estadios. Por otro lado, el PCoA establecido entre las poblaciones a partir del coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) logra disgregar

completamente las muestras pertenecientes a cada población con un 84,77% de relación con los dos primeros ejes (**Fig. 23**).

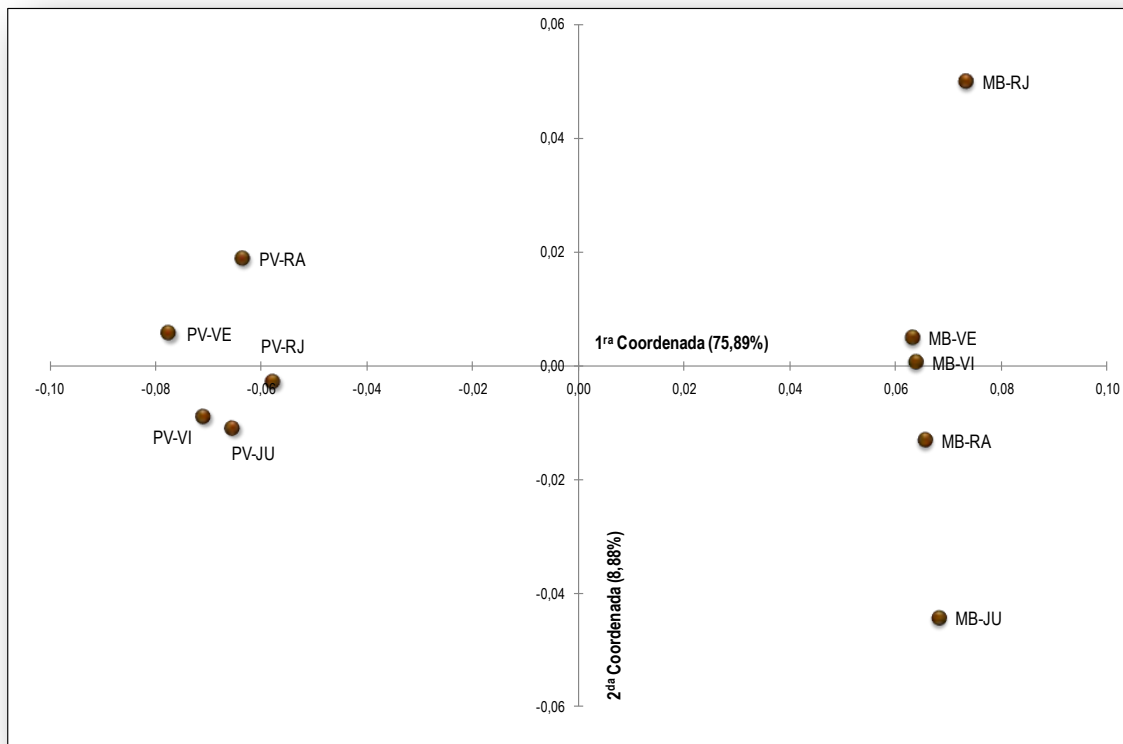


Fig. 23 Análisis de coordenadas principales basado en los valores de F_{ST} para los distintos estadios de vida de las poblaciones naturales de *Silene nocteolens*. Códigos de las poblaciones según **Tabla 17**.

4.3.4.5. Análisis Bayesiano

En el caso de *Silene nocteolens*, la base de datos para el análisis bayesiano incluyó 256 individuos, 6 loci y 2 poblaciones. También se hizo el análisis a nivel de estadio de vida por población considerando cada uno de estos grupos como una población independiente (10 en total). Las pruebas se hicieron para valores de $K = 1 - 10$ y se obtuvo la máxima probabilidad de los datos en $K = 4$ para ambos casos. Esto sugiere niveles de estructuración adicionales al número de poblaciones (2), pero inferiores al número de estadios de vida (5).

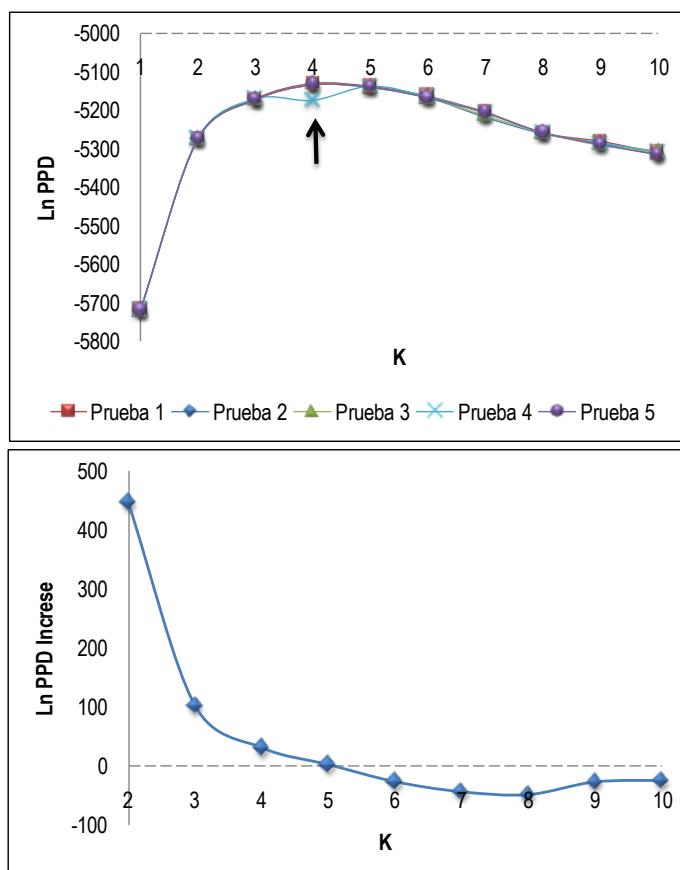


Fig. 24 Gráficos para la determinación del valor más probable de K siguiendo el análisis bayesiano. $\ln PPD$ vs K (arriba) e Incremento de $\ln PPD$ vs K (abajo)

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

Al considerar las poblaciones naturales el PPD incrementó de $K = 1$ a $K = 4$ (**Fig. 24**) siendo este último su máximo valor promedio, notándose un decrecimiento posteriormente. No obstante, al evaluar el incremento de PPD se observó un alto valor para $K = 2$, mientras que para $K > 2$ el incremento en información se hace menor y va decreciendo progresivamente. Esto significa

que la información obtenida a partir del tercer grupo no es tan importante como la de los dos primeros; así que se ha determinado que $K = 2$ y cada individuo de las distintas poblaciones será asignado de manera asimétrica a uno de estos dos grupos.

La asignación de los miembros de cada población a uno de los grupos definidos anteriormente se ilustra en un histograma para las proporciones inferidas a partir del análisis bayesiano (**Fig. 25**). Cada línea vertical representa a un individuo, cada color ilustra la fracción de pertenencia a uno u otro grupo K y la línea negra es el límite entre las poblaciones.

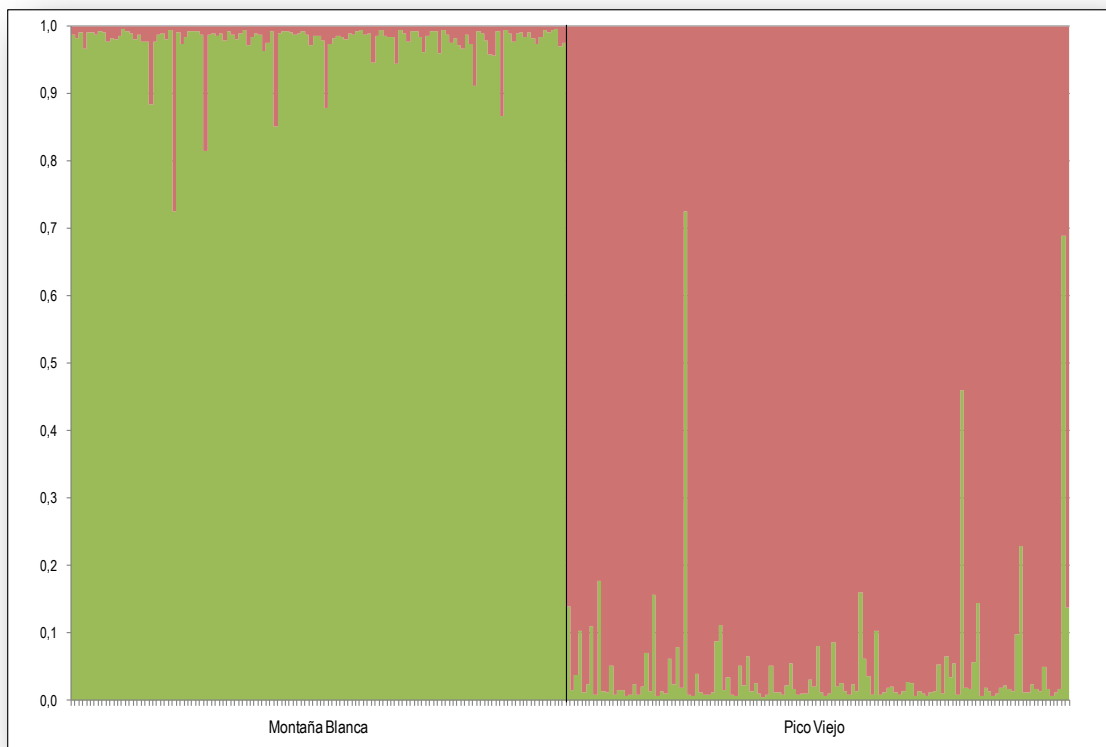


Fig. 25 Diagrama de barras para las proporciones inferidas ($K = 2$) con el análisis bayesiano en las poblaciones de *Silene nocteolens*

Se observa claramente que las poblaciones naturales de *Silene nocteolens* están bien definidas. De la misma manera que se observó en el PCoA y el UPGMA, algunos individuos parecen mantener una relación muy estrecha con la población adyacente; lo cual no es de extrañar al tratarse de una misma especie.

4.3.5. Dinámica Reproductiva

Los valores obtenidos para los coeficientes de endogamia según estadios para la población de *Silene nocteolens* en Montaña Blanca se muestran en la **Tabla 29**. El número de individuos utilizados para estos análisis varía con respecto a los realizados en apartados anteriores (**Tabla 22**) debido, por un lado, a la incorporación de la categoría “Plántulas” y, por otro, a la adición de las plantas “madre” en la categoría de “Reproductores Adultos”.

Tabla 29 Número de individuos, índices de variación genética, coeficiente de endogamia y tasa de mortalidad para la población natural de *Silene nocteolens* de Montaña Blanca

POBLACIÓN	ESTADIO	CÓDIGO	Nº	H _o	H _e	F _{IS} (T)	m _e
Montaña Blanca	Plántulas	MB-PL	152	0,555	0,653	0,186	0,503
	Juveniles	MB-JU	26	0,546	0,667	0,200	0,313
	Virginales	MB-VI	24	0,574	0,686	0,159	0,308
	Vegetativos	MB-VE	26	0,616	0,701	0,098	0,237
	Reproductores Jóvenes	MB-RJ	26	0,615	0,667	0,100	0,129
	Reproductores Adultos	MB-RA	37	0,630	0,699	0,078	0,129
Total			291	0,578	0,683	0,154	

Nº: es el número de individuos por estadio de vida, H_o: Heterocigosidad observada, H_e: Heterocigosidad esperada, F_{IS}(T): Coeficiente de endogamia considerando H_e total y m_e: tasa de mortalidad por estadio de vida

Pudo observarse un defecto de heterocigotos en todos los estadios de vida con un valor promedio de $F_{IS}(T) = 0,154$ (**Tabla 29**). El valor más alto del coeficiente de endogamia se encontró en los juveniles [$F_{IS}(T) = 0,200$], en tanto que el menor valor fue para los reproductores adultos [$F_{IS}(T) = 0,078$]. Los datos de mortalidad por estadio (m_e) proporcionados por el personal del Parque Nacional del Teide para Montaña Blanca mostraron un decrecimiento a lo largo de los sucesivos estadios de vida de la especie.

La **Fig. 26** muestra como la homocigosis relativa al cruzamiento aleatorio para la población de *Silene nocteolens* en Montaña Blanca presenta una tendencia a disminuir a través de los estadios de vida (MB-VI, MB-VE y MB-RA). Además, se observó una relación entre estos resultados y los índices de mortalidad registrados en la población, ya que al cruzar los valores de endogamia con la tasa de mortalidad puede notarse una importante y significativa correlación (Pearson = 0,826; $R^2 = 0,681$; $p < 0,05$) entre estas variables.

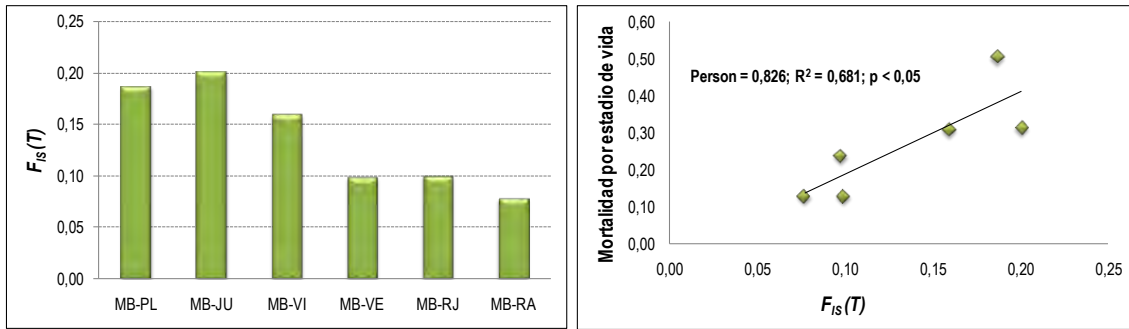


Fig. 26 Coeficiente de endogamia por estadio de vida (izquierda) y correlación entre la mortandad y el coeficiente de endogamia (derecha) en la población de *Silene nocteolens* de Montaña Blanca

Los parámetros del sistema de cruzamiento que fueron estimados utilizando el programa MLTR (Ritland, 2002) tomaron en consideración solamente los datos genéticos de las 12 familias de Montaña Blanca (Tabla 16), ya que los datos de Pico Viejo se consideraron insuficientes.

Tabla 30 Parámetros del sistema de cruzamiento para *Silene nocteolens*

PARÁMETRO	VALORES
Número de familias	12
Número de individuos	164
F_m	0,000 (0,024)
t_m	0,678 (0,074)
t_s	0,596 (0,066)
$t_m - t_s$	0,082 (0,025)
r_p	0,152 (0,034)
$N_{ep} (1/r_p)$	6,579

F_m : coeficiente de endogamia materno por locus, t_m : tasa de cruzamiento multilocus, t_s : tasa media de cruzamiento por locus, $t_m - t_s$: tasa de cruzamiento entre individuos emparentados, r_p : correlación de paternidad y N_{ep} : número de paternidad efectiva. Valores de la desviación estándar (SE) basados en 10 000 repeticiones, entre paréntesis.

De acuerdo a estos resultados (Tabla 30), no se registra endogamia inherente a las plantas madres en la población de Montaña Blanca ($F_m = 0,000$). La tasa media de cruzamiento por locus (t_s) fue menor que la tasa de cruzamiento multilocus (t_m) y muestra la presencia de endogamia biparental. La estimación de la tasa de cruzamiento multilocus ($t_m = 0,678$) indica que *S. nocteolens* se reproduce predominantemente por cruzamiento alógamo y, por lo tanto, que la proporción de autofecundación ($1 - t_m$) es de aproximadamente 32,2%.

La paternidad efectiva ($N_{ep} = 1/r_p$) fue de 6,579; lo cual sugiere que para cada planta madre de esta población existen aproximadamente 6 padres

distintos que logran una fecundación efectiva, ya que r_p es la probabilidad de que dos plántulas compartan ambos progenitores (es decir, que dos óvulos de un mismo ovario sean fecundados por polen del mismo donante). Por lo tanto, cuanto más alto es el valor de N_{ep} mayor es la probabilidad de un número superior de donantes y menor la contribución de cada uno de ellos en la fecundación de los óvulos de la planta madre.

Finalmente, se registró una baja probabilidad de correlación en el parentesco paternal entre los descendientes de las familias analizadas (hermandad completa; $r_p = 0,152$). Consecuentemente, los resultados para la endogamia biparental (apareamiento entre parientes) fue bajo ($t_m - t_s = 0,082$); por lo cual, parece existir una mayor proporción de eventos de fertilización cruzada. Para todos los parámetros de cruzamiento obtenidos se han obtenido bajos valores de error estándar ($SE < 0,080$).

4.4. Discusión

4.4.1. Diversidad Genética

Gracias al desarrollo, optimización y amplificación de seis pares de cebadores específicos para este endemismo tinerfeño, se han detectado niveles de variabilidad genética considerablemente altos en las dos únicas poblaciones naturales descritas de *Silene nocteolens*. Los resultados han mostrado una mayor diversidad genética en la población de Pico Viejo ($A = 13,67$ y $H_e = 0,778$) que en la de Montaña Blanca ($A = 9,50$ y $H_e = 0,707$) (**Tabla 22**); así como un mayor porcentaje de alelos exclusivos (40,63%) en la primera (Anexo V).

En comparación con otras especies del género analizadas con el mismo tipo de marcador, la diversidad genética encontrada en *Silene nocteolens* ($A = 15,83$ y $H_e = 0,784$; **Tabla 22**) es mayor que la reportada para su congénere amenazado *S. tatarica* ($A = 5,00$ y $H_e = 0,455$; Tero & Schlötterer, 2005) y se acerca a los niveles descritos en otras especies de *Silene* continentales de amplia distribución como *S. flos-cuculi* ($A = 8,71$ y $H_e = 0,825$; Galeuchet *et al.*, 2002), *S. vulgaris* ($A = 22,10$ y $H_e = 0,816$; Teixeira & Bernasconi, 2007) y *S. latifolia* ($A = 35,17$ y $H_e = 0,912$; Juillet *et al.*, 2003). De hecho, las poblaciones naturales de *S. nocteolens* ostentan una diversidad genética incluso mayor que la reportada para otras especies endémicas amenazadas del archipiélago canario analizadas mediante microsatélites entre las que se pueden citar a *Bencomia exstipulata* ($H_e = 0,440$; González-Pérez *et al.*, 2009a), *Sambucus palmensis* ($H_e = 0,500$; Sosa *et al.*, 2010b) y *Myrica rivas-martinezii* ($H_e = 0,560$; González-Pérez *et al.*, 2009c); las cuales ya se consideraban con niveles de variación genética superiores al de otros endemismos en islas oceánicas (Sosa *et al.*, 2010a).

Estos niveles de diversidad genética tan elevados son sorprendentes dado que la especie tiene un área de ocupación real de apenas 10 000 m² (Bañares *et al.*, 2004) y está situada en un hábitat tan específico como lo es la

alta montaña (Pico Viejo: 3000 – 3100 msnm y Montaña Blanca: 2400 msnm; Eduardo Carqué, comunicación personal).

Generalmente, los niveles de variación genética están correlacionados con el tamaño poblacional, el sistema de cruzamiento y las relaciones filogenéticas de las especies (Weller *et al.*, 1996; Sosa, 2001). De hecho, las especies de reducida distribución tienden a mantener menores niveles de diversidad genética que las especies de amplia distribución geográfica (Hamrick & Godt, 1989); no obstante, se conocen numerosas excepciones tanto en Canarias (González-Pérez *et al.*, 2008; González-Pérez *et al.*, 2009c; Rigueiro *et al.*, 2009; García-Verdugo *et al.*, 2010b; López de Heredia *et al.*, 2010; Sosa *et al.*, 2010) como en la Península Ibérica (Palop-Esteban & González-Candelas, 2002; Ruas *et al.*, 2009; Segarra-Moragues & Catalán, 2010).

Una posible explicación de los mayores niveles de diversidad genética en los endemismos canarios, comparados por ejemplo con los de las islas del Pacífico, es que algunos de ellos representen antiguos linajes que se refugiaron en la Macaronesia durante la glaciación y desertificación en Europa y el norte de África después del Mioceno; sin embargo, estudios filogenéticos de varios grupos no son compatibles con grandes edades en estos endemismos (Kim *et al.*, 1996; Francisco-Ortega *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 2000). Por otro lado, dado que la distancia entre Fuerteventura y la costa africana en ciertos períodos del Cuaternario se estima que llegó a ser de tan solo 60 km; otra posibilidad es que los endemismos canarios hayan sido originados de múltiples introducciones a partir de taxones continentales y que los fenómenos de deriva génica asociados con la colonización en las islas Canarias fueran menos extremos que el experimentado en archipiélagos más alejados de tierras continentales como Hawaii (Francisco-Ortega *et al.*, 2000).

La revisión de los datos referentes a las especies de Canarias realizada por Francisco-Ortega *et al.* (2000) no encontró una tendencia consistente de alta diversidad en especies endémicas de reproducción cruzada en comparación con aquellas que se reproducen por autofecundación; parece ser que otros factores distintos al sistema de cruzamiento y el tamaño poblacional

son responsables de los altos valores de diversidad genética en las islas Canarias. Es difícil, por tanto, concretar las razones que han hecho que *Silene nocteolens* disponga de tan elevados niveles de diversidad genética ya que su ubicación geográfica en una isla oceánica, ser una especie endémica con poblaciones reducidas aisladas en la alta montaña y con bajo número de sus efectivos; son condiciones en las cuales se esperaría que una especie dispusiera de niveles inferiores a los detectados. Es posible, no obstante, que su sistema reproductivo (ver más adelante) y su hábitos perennes (las plantas resisten de manera latente las nevadas bajo el suelo y vuelven a brotar tras el cambio estacional) contribuyan a mantener estos elevados índices de variación genética.

Tanto el análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en el coeficiente diferenciación genética (**Fig. 23**) como el dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (**Fig. 21**) y el diagrama de proporciones inferidas con el análisis bayesiano (**Fig. 25**) son categóricos en la separación de ambas poblaciones. Sin embargo, la diferenciación genética encontrada entre ambas poblaciones de *Silene nocteolens* fue baja ($F_{ST} = 0,053$) y, en consecuencia, se calcula que el número de migrantes sea considerablemente alto ($N_m = 4,5$); lo que significa que las poblaciones comparten información genética a pesar de su distanciamiento geográfico. Cabe destacar que aunque la distancia de separación entre ambas poblaciones sea tan sólo de aproximadamente 6 km en línea recta; entre ellas se alza el volcán del Teide en toda su plenitud, lo cual constituye una relevante barrera geográfica que disminuiría el flujo genético interpoblacional. No obstante, se sabe de plantas que crecen de manera esporádica entre ambos núcleos (Eduardo Carqué, comunicación personal) que pudieran estar actuando como peldaños y piedras de paso (stepping stones) en el intercambio genético entre las poblaciones y/o que ambas poblaciones estén más comunicadas entre ellas de lo que parece, geográficamente hablando.

Otras especies congéneres endémicas con flores hermafroditas y polinización a través de insectos como *S. tatarica* ($F_{ST} = 0,369$; Tero *et al.*, 2003) o polinizadas por colibríes como *S. rotundifolia* ($F_{ST} = 0,831$; Moyle, 2006) que fueron analizadas con marcadores nucleares y citoplásmicos,

respectivamente; han mostrado mayor diferenciación genética que *S. nocteolens*. También *S. latifolia* (especie dioica, polinizada por polillas y de amplia distribución) ha mostrado valores superiores ($F_{ST} = 0,110$; Barluenga *et al.*, 2011) mediante análisis realizado con microsatélites. Aunque *S. diclinis*, especie endémica dioica también poliniza por insectos, presentó valores inferiores a los de *S. nocteolens* ($F_{ST} = 0,006$; Prentice, 1984) en análisis con aloenzimas; esto puede deberse al tipo de marcador utilizado.

Es bien sabido que el flujo genético en las plantas superiores ocurre vía dispersión de semillas y/o dispersión del polen (McCauley *et al.*, 1996; Gehring & Delph, 1999; Ingvarsson & Giles 1999; Barluenga *et al.*, 2011). De acuerdo con McCauley *et al.* (1996) e Ingvarsson & Giles, (1999), la baja dispersión de las semillas implica que los miembros de una misma cohorte pueden crecer muy cerca unos de los otros y este mecanismo no solamente crea una estructura familiar sino que, además, puede mantenerla pese al flujo genético. Adicionalmente, la dispersión de semillas determina la ubicación final de los genotipos; lo cual tiene un fuerte impacto sobre la estructura genética local, algunas veces a pesar del potencial de la dispersión del polen a grandes distancias (Grivet *et al.*, 2009). Por su parte, la dispersión de polen a grandes distancias permite que la reproducción ocurra de manera aleatoria y esto se refleja en un bajo nivel de endogamia (como se verá más adelante en lo referente a la dinámica reproductiva). Hanson *et al.* (2008) concluyeron que la dispersión de polen a grandes distancias ayudaba a mantener el flujo genético en *Dipterix panamensis* incluso en paisajes fragmentados del neotrópico, mientras que Lowe *et al.* (2005) afirman que puede aumentar la cercanía genética de árboles en áreas fragmentadas y contrarrestar algunos efectos negativos de la degradación del hábitat.

Silene nocteolens ha mostrado un leve patrón espacial en sus genotipos ya que los correlogramas (**Fig. 19** y **Fig. 20**) muestran una distribución aleatoria de estos con la excepción de la primera clase de distancias. En este sentido, Williams (1994) comprobó que plantas herbáceas con dispersión de semillas por gravedad (caso del género *Silene*) presentan mayor estructuración genética a pequeñas escalas espaciales que aquellas especies con zoocoria. Esta deducción coincide perfectamente con los reportes biológicos hechos para *S.*

nocteoletens en los cuales se ha definido que las semillas no son dispersadas más allá de los 10 m de la planta madre (Bañares *et al.*, 2004) y está apoyado, además, por los resultados obtenidos en la población de Montaña Blanca a través del análisis de autocorrelación que fue positivo para la primera clase de distancias (0 – 5 m), cortando el eje de las abscisas a los 8 m; así que puede verse claramente que existe una relación genética entre las plantas que coexisten a una distancia menor de 10 m. Lo anterior, sumado al elevado flujo genético, puede ser interpretado como un patrón espacial que se limita a la reorganización de los genotipos en cada generación debido al movimiento de polen entre las poblaciones. De esta manera, la estructura familiar puede mantenerse por varias generaciones (Ingvarsson & Giles, 1999).

Patrones de estructura genética similares a los encontrados en *S. nocteoletens* han sido reportados también para poblaciones de *S. dioica* del archipiélago Skeppsvik al norte de Suecia (Giles *et al.*, 1998) y *S. acaulis* (Gehring & Delph, 1999) al ser analizadas con aloenzimas. En estos estudios se ha propuesto que el flujo genético puede estar ocurriendo en dos escalas espaciales diferentes; por un lado la dispersión localizada de semillas que dan lugar a la distribución gregaria de plantas emparentadas y, por el otro, la dispersión de polen a larga distancia con una frecuencia lo suficientemente alta como para que el flujo genético pueda contrarrestar la deriva genética.

En cuanto a este último aspecto, Bañares *et al.* (2004) han interpretado que el suave aroma producido por las flores de *S. nocteoletens* durante las noches puede estar relacionado con una polinización efectuada por insectos nocturnos; muy probablemente polillas como ocurre en *S. latifolia* (Barluenga *et al.*, 2011) y en *S. lagunensis*, otro endemismo tinerfeño (Greg Anderson, comunicación personal). No obstante, será necesario un análisis exhaustivo de los agentes polinizadores y los patrones específicos de dispersión de polen entre las poblaciones naturales de *S. nocteoletens* en futuros estudios.

Una explicación alternativa para la falta de diferenciación genética entre las poblaciones de *Silene nocteoletens* podría ser que las mismas hayan sido separadas hace relativamente poco tiempo o fueran recientemente fundadas por individuos con la misma población ancestral. Consecuentemente, las

poblaciones no habrían podido tener suficiente tiempo como para que la deriva genética pudiera haber generado diferencias entre ellas (Gehring & Delph, 1999; Luan *et al.*, 2006). De hecho, valores de diferenciación genética similares a los de *Silene nocteolens* han sido encontrados entre las poblaciones tinerfeñas de *Sambucus palmensis* ($F_{ST} = 0,066$; Sosa *et al.*, 2010); especie para la cual se ha propuesto un decrecimiento en el tamaño poblacional o incluso la extinción de algunas poblaciones que pudieron haber existido entre las actuales, haciendo de puentes entre las mismas y contribuyendo a los bajos valores de F_{ST} detectados.

El volcán del Teide es en sí una barrera geológica natural entre las poblaciones de *Silene nocteolens*. El complejo activo formado por el estratovolcán Teide – Pico Viejo, que incluye también el cono pumítico de Montaña Blanca, representa el sistema volcánico más reciente de Tenerife. De acuerdo con la información geológica, el Teide pudo haber terminado su desarrollo hace unos 30 000 años y todo parece indicar que la construcción del Pico Viejo se inició con la culminación de la construcción del Teide (Carracedo, 2006). Según Carracedo (2006), el volcán Pico Viejo mantuvo actividad residual que se prolongó hasta épocas recientes, posiblemente con erupciones de escasa entidad coetáneas de Montaña Blanca.

Las últimas erupciones fonolíticas del Pico Viejo (hace 17 525 años) establecieron su recubrimiento final, mientras que hace sólo 2000 años poderosas erupciones (también de naturaleza fonolítica) formaron los depósitos piroclásticos en Montaña Blanca; con lo cual, cabe la posibilidad de que la población de *Silene nocteolens* en Pico Viejo, al ser más antigua, haya logrado mantener mayor diversidad genética mientras que la población de Montaña Blanca vio diezmada su diversidad genética debido a una actividad volcánica más reciente.

4.4.2. Dinámica Reproductiva

Dada la magnitud de la evolución de los mecanismos de cruzamientos, como la ginodioecia y la dioecia, que basados en la morfología se han encontrado en el género *Silene* (Desfeux *et al.*, 1996); es razonable suponer

que las especies hermafroditas de este género son autocompatibles y, por lo tanto, potencialmente autofecundantes (Meager & Costich, 2008). Tanto *Silene nocteolens* como el resto de sus congéneres endémicos de Canarias pertenecen a la sección *Siphonomorpha* de la familia Caryophyllaceae (Arnoldo Santos-Guerra, comunicación personal). De acuerdo con Meager y Costich (2008) la única especie de la sección *Siphonomorpha* que ha sido estudiada en lo relativo a su sistema de cruzamiento es *S. nutans*, la cual ha mostrado evidencia de ser localmente endogámica (Van Rossum & Prentice, 2004).

El coeficiente de endogamia encontrado en la población de Montaña Blanca de *Silene nocteolens* presenta una tendencia descendente a lo largo de los diferentes estadios del ciclo de vida de la especie (**Fig. 26**). La disminución del coeficiente de endogamia en los sucesivos estadios del ciclo de vida de una especie ha sido relacionada con la selección natural y la eliminación del exceso de homocigosis; siendo esto una característica de las especies autocompatibles (selfing), ya que en las autoincompatibles (outcrossing) se han detectado valores de endogamia más homogéneos a lo largo del ciclo de vida de la planta (Barrett & Harder, 1996; Alvarez-Buylla *et al.*, 1996).

De esta manera, es factible que estemos observando un efecto de erosión de la depresión endogámica según diferentes estadios de vida de la especie, puesto que en las fases más jóvenes existe una mayor proporción de individuos homocigóticos (altos valores de F_{IS} , **Tabla 29**) que albergan una escasa eficacia biológica derivada de su homocigosis. Por consiguiente, una parte de estos individuos no alcanza el siguiente estadio vital y mueren; razón por la cual el grado de endogamia va decreciendo en los estadios de vida sucesivos. De ahí que los índices de endogamia se relacionen con la tasa de mortalidad entre estadios en la población de Montaña Blanca (**Fig. 26**). Estos datos se ven reforzados por los resultados del análisis del sistema de cruzamiento de *Silene nocteolens* que no reflejó endogamia inherente a los reproductores en la población de Montaña Blanca ($F_m = 0,000$; **Tabla 30**).

La forma más extrema de endogamia en organismos que se reproducen sexualmente es la autofecundación que puede favorecerse en condiciones ecológicas particulares como cuando hay baja densidad de polinizadores,

recurrentes cuellos de botella o efecto fundador (Lloyd & Webb, 1992; Barrett & Harder, 1996; Eguiarte *et al.*, 2007). Conforme a esto, los parámetros del sistema de cruzamiento obtenidos para *Silene nocteolens* utilizando el software MLTR (Ritland, 2002) otorgan valores de autofecundación del orden del 32,2% en Montaña Blanca; es decir, la mayor parte de la descendencia en *Silene nocteolens* se produce por apareamiento entre individuos no emparentados. Por lo tanto, podemos deducir que el sistema de cruzamiento de *S. nocteolens* refleja un carácter mixto con posibilidades de autofecundación, pero con preferencia al entrecruzamiento; patrón que también se registró en *S. lagunensis*, especie que ha sido reportada como altamente protándrica (Greg Anderson, comunicación personal).

Los resultados obtenidos sugieren que el apareamiento entre individuos emparentados ($t_m - t_s$) existe a pequeña escala y puede estar ocurriendo como resultado de una dispersión limitada de la progenie y polinización entre vecinos o pares de plantas que florecen sincrónicamente, como sucede en *Picea mexicana* (Thomas Ledig *et al.*, 2002) y en *Sinojackia xylocarpa* (Zhang *et al.*, 2010). Este dato concuerda con resultados del análisis de autocorrelación espacial y los valores positivos de F_{IS} previamente discutidos para *S. nocteolens*; todo lo cual presupone una intensa selección contra individuos endogámicos y homocigóticos que explican a su vez la pérdida de endogamia a través de los estadios de vida de la especie.

Con tan amplio abanico de posibilidades sería aventurado proferir conclusiones fehacientes sobre la biología reproductiva de *Silene nocteolens*, máxime en ausencia de estudios respectivos a este ámbito.

La presencia de alelos exclusivos entre las plántulas y la ausencia de estos en sus respectivos progenitores (Anexo VII) puede deberse principalmente a la herencia paterna no analizada en este estudio, la cual tiene una gran proporción si se toma en cuenta que los individuos analizados representan el 12,64% de la población de Montaña Blanca; pero no puede descartarse la posibilidad de que los alelos exclusivos en las plántulas puedan ser producto de mutaciones en los nuevos descendientes.

4.4.3. Implicaciones para la Conservación Genética

Ya que ambas poblaciones de *Silene nocteolens* en el Teide han logrado mantener de manera natural tan altos niveles de diversidad genética (H_e), se presume que existe cierto grado de flujo genético entre las mismas y que este sea responsable, al menos en parte, de los altos niveles diversidad genética (McCauley *et al.*, 1995); por lo tanto, no se hace necesario el incremento de los niveles de variabilidad mediante introducciones de nuevos efectivos y no se esperan procesos de depresión endogámica debido a las proporciones de heterocigóticos detectadas.

Existen alelos exclusivos en ambas poblaciones; aunque se encontraron en mayor proporción en Pico Viejo que, además, presenta la mayor diversidad genética. Consecuentemente, los esfuerzos en la conservación de los recursos genéticos deberían concentrarse principalmente en esta población. Claramente la mejor estrategia para la conservación *in situ* en *Silene nocteolens* es la preservación de su hábitat natural y la eliminación de las especies introducidas (Francisco-Ortega *et al.*, 2000). En cuanto a la conservación del acervo genético en bancos de germoplasma; se recomienda considerar la recolección de semillas a partir de plantas separadas por al menos 10 m que, de acuerdo con los resultados de autocorrelación espacial, estarían genéticamente menos emparentadas.

Aún cuando se ha detectado que alrededor del 32% de los cruces en la especie ocurren por autofecundación, debe recordarse que estos resultados se han obtenido a partir de semillas que germinaron en invernadero y que las plántulas posiblemente no hubieran podido establecerse en su hábitat natural. Además, se ha podido observar una correlación significativa entre el decrecimiento del coeficiente de endogamia y la tasa de mortalidad por estadios de vida sucesivos en Montaña Blanca (**Fig. 26**); de manera que en la población natural parece existir una reducción del número de homocigóticos por selección natural en los primeros estadios de vida, lo cual se traduce en una mayor proporción de adultos heterocigóticos que podrían sustentar los altos niveles de diversidad genética (H_e) encontrados en la poblaciones naturales.

Es de imperante necesidad el estudio preciso de los hábitos reproductivos de *Silene nocteolens*, lo que incluye la identificación de los agentes polinizantes y la medición directa de la dispersión del polen en y entre las poblaciones. También se recomienda el monitoreo de los índices de mortalidad en la población de Pico Viejo y la determinación de la ocurrencia de patógenos asociados a esta especie en ambas poblaciones, ya que en algunos de sus congéneres ha sido vinculada con procesos de endogamia (Ouborg *et al.*, 2000). Todos estos factores deben ser considerados en futuros planes de gestión y manejo de *Silene nocteolens* para poder preservar la alta variabilidad genética encontrada en esta especie.

Sorbus aria

5.1. *Sorbus aria* (L.) Crantz

El género *Sorbus* L. (Rosaceae) está constituido por árboles de pequeño a mediano tamaño de las zonas templadas del hemisferio norte (Robertson *et al.*, 1991). Son miembros de la subfamilia Maloideae y están relacionados con los géneros comerciales *Malus* y *Pyrus* (Campbell *et al.*, 1995). En el género, que incluye mostajos y serbales; la hibridación, poliploidía, autoploidía y apomixis (tanto obligada como facultativa) han contribuido a los complejos patrones de variación que se han visto entre los taxones intermedios en Europa (Nelson-Jones *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2004a y b; Chester *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2010). Los estudios embriológicos han demostrado, además, que la apomixis en *Sorbus* es una aposporia gametofítica donde el desarrollo del embrión depende de la polinización para producir el endosperma; es decir, una pseudogamia (Robertson *et al.*, 2004a, Robertson *et al.*, 2010).

Existen tres principales centros de diversificación y especiación del género *Sorbus* en Europa: Escandinavia, el Sureste de Europa y Gran Bretaña (Warburg & Kárpáti, 1968); continente para el cual se han descrito cinco especies diploides (*Sorbus aria*, *S. aucuparia*, *S. torminalis*, *S. domestica* y *S. chamaemespilus*) clasificadas en cinco subgéneros distintos (Nelson-Jones *et al.*, 2002). En la mayor parte de estas especies diploides (las primeras cuatro) ha sido descrita la reproducción sexual por cruzamiento y la auto-incompatibilidad; mientras que los citotipos poliploides suelen ser apomícticos (Raspé & Kroh, 2007; Robertson *et al.*, 2010). Los grupos taxonómicamente complejos, como *Sorbus*, encierran importante información evolutiva sobre las interacciones entre la hibridación, la multiplicación del genoma y los sistemas de cruzamiento entre los taxones paternos y sus derivados (Robertson *et al.*, 2010).

El “Peralillo de cumbre”, *Sorbus aria*, se distribuye por las zonas montañosas de casi toda Europa y parte de Asia; desde la Península Ibérica e Irlanda, hasta el Himalaya. También está presente en Argelia, Marruecos y Canarias (Cabezudo *et al.*, 2000). A pesar de su amplia distribución, generalmente se le encuentra de forma escasa y aislada. Es esta la principal

razón por la que se le haya incluido como “Vulnerable” por la UICN (Cabezudo *et al.*, 2000) y en el Anexo III del Catálogo Canario de Especies Protegidas (CCEP, 2010) como “De Interés para los Ecosistemas Canarios”.

Son árboles que pueden alcanzar los 20 m de altura, aunque su porte suele ser menor. Las ramas jóvenes son tomentosas, con abundantes lenticelas; la corteza es lisa y gris con yemas de 5 – 16 mm, cónico ovoideas (Cabezudo *et al.*, 2000). Las hojas son simples (**Fig. 27**), obovadas u ovado-lanceoladas de entre 4 – 12 x 2 – 9 cm; bordes serrados con dientes irregulares, lóbulos laterales marcados, base cuneada o redondeada, no coriáceas, verdes oscuras y glabras en el haz y blanco tomentosas en el envés donde la nerviación es destacable.



Fig. 27 *Sorbus aria*

Florece entre abril y mayo, los frutos maduran entre septiembre y octubre. Produce inflorescencias corimbiformes terminales con ramas densamente pelosas en la floración y casi glabras en la fructificación. Las flores hermafroditas, blancas de cinco pétalos con tricomas, sufren polinización entomófila (sobre todo abejas, dípteros y coleópteros) (Cabezudo *et al.*, 2000). El fruto es un pomo subgloboso de aproximadamente 10 – 17 x 8 – 15 mm, a veces periforme, rojo, con lenticelas y agrupaciones de células taníferas muy evidentes. Es posible que algunos frutos se formen por apomixis y partenocarpia (Cabezudo *et al.*, 2000). Semillas de 5 – 8 x 2 – 4,5 mm; de sección transversal anchamente elípticas, lisas, pardo rojizas. La dispersión de semillas se lleva a cabo por aves frugívoras. La tasa de germinación en condiciones experimentales no supera el 15% (MMA, 2003).

En Canarias se distribuye exclusivamente en las islas de Tenerife y La Palma, por su preferencia a las zonas de alta montaña. En ambas islas el número de ejemplares es muy escaso, siendo más abundante en La Palma (**Fig. 28**) donde hasta ahora se conocen unos 49 individuos muy aislados y

ampliamente separados tanto dentro como cerca del Parque Nacional de la Caldera del Taburiente (MMA, 2003). En Tenerife (**Fig. 29**), los individuos están muy separados unos de otros y se localizan dentro del Parque Nacional del Teide.

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

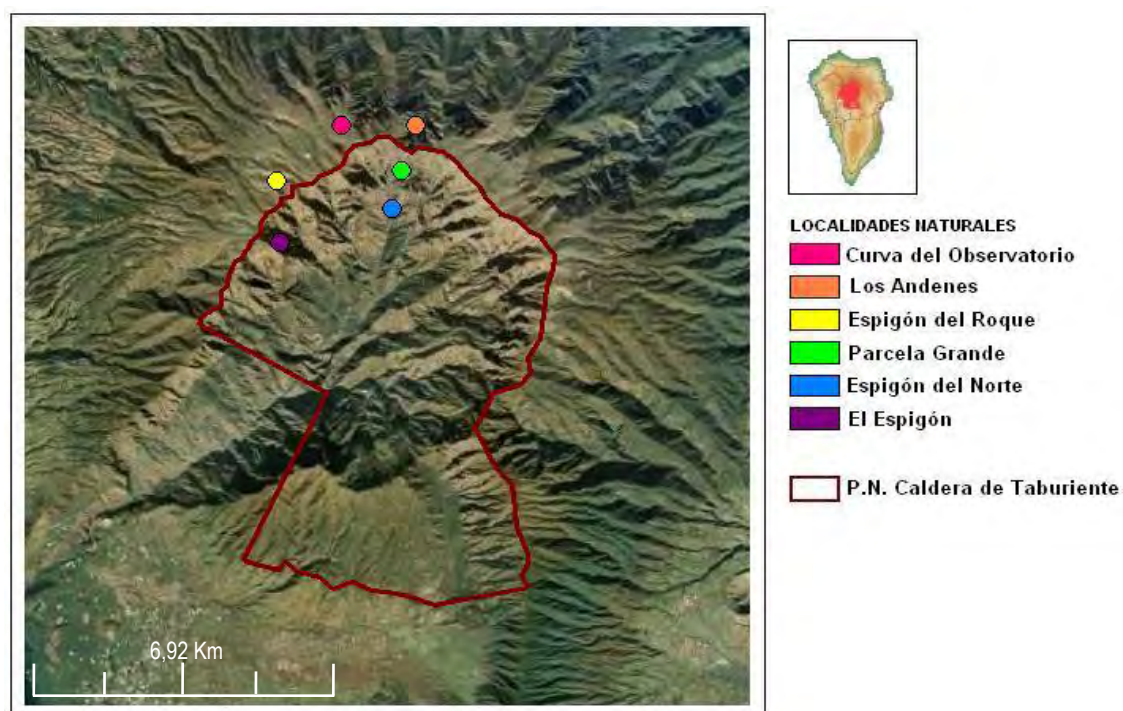


Fig. 28 Ubicación de *Sorbus aria* en el Parque Nacional de la Caldera de Taburiente (La Palma). Fuente: Parque Nacional de la Caldera de Taburiente.



Fig. 29 Ubicación de *Sorbus aria* en el Parque Nacional del Teide (Tenerife). Fuente: Parque Nacional del Teide.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Recogida de Muestras y Poblaciones

En *Sorbus aria* se analizaron 195 muestras: 145 de la Península Ibérica y 50 que procedían de las dos únicas islas del archipiélago Canario en las que se ha descrito la especie (Tenerife y La Palma) (**Tabla 31**). Los individuos colectados datan desde junio de 2007 a octubre de 2008.

De La Palma se recogieron 46 ejemplares procedentes de seis localidades separadas geográficamente (**Fig. 28**). Las cuatro muestras de Tenerife provienen de las dos únicas localidades descritas en esta isla: Los Cachorros y Guajara (**Fig. 29**). Finalmente, dispusimos de muestras provenientes de la Península Ibérica y recogidas en los Parques Nacionales de Cabañeros (Castilla La Mancha), Aigüestortes (Cataluña), Picos de Europa (Asturias-Cantabria-Castilla-León) y Sierra Nevada (Andalucía) (**Tabla 31**).

Tabla 31 Poblaciones y muestras de *Sorbus aria* sometidas a análisis estadístico

LOCALIDAD	CÓDIGO	LUGAR	Nº
Guajara y Los Cachorros	GYCT	Tenerife	4
			4
Curva del Observatorio	COBP	La Palma	3
El Espigón y Espigón del Roque de Los Muchachos	EYMP	La Palma	6
La Parcela Grande	PAGP	La Palma	5
Los Andenes	LANP	La Palma	29
El Espigón del Norte	EPNP	La Palma	3
			46
Parque Nacional Cabañeros	PNCA	Castilla La Mancha	6
Parque Nacional Aigüestortes	PNAI	Cataluña	36
Parque Nacional Picos de Europa	PNPE	Asturias-Cantabria-Castilla-León	51
Parque Nacional Sierra Nevada	PNSN	Andalucía	52
			145
TOTAL			195

Nº: Número de individuos

5.2.2. Análisis Genéticos

Las muestras fueron transportadas y conservadas en bolsas plásticas de cierre hermético con gel de sílice hasta la extracción del ADN. Cada bolsa fue etiquetada con el código correspondiente a cada individuo de cada especie y población.

Se maceró aproximadamente 1 cm² de hoja deshidratada de cada individuo en un molinillo vibratorio (RETSCH MM 301) a fin de realizar la extracción del ADN. El tejido se colocó directamente en los tubos de ensayo de 1,5 ml de capacidad a los que también se les introducía un par de balines de acero inoxidable que contribuían a la trituración de la muestra y el producto triturado fue sometido al protocolo de extracción de ADN de Doyle & Doyle (1987).

Una vez extraído el ADN se procedió a su purificación, esto se hizo mediante kits de purificación comerciales (SIGMA Gene Elute PCR Clean-Up Kit) y utilizándose 150 µl del ADN total de cada muestra.

Las concentraciones y calidad del ADN fueron determinadas por absorbancia. La concentración de ADN fue medida espectrofotométricamente (BECKMAN Coulter DU 530) ya que el ADN presenta la mayor absorción a una longitud de onda (λ) de 260 nm. Para verificar la pureza del ADN se hicieron lecturas a 230 nm, región en la que se estima que se encuentran las impurezas (fenol y urea). Por último, se calculó la tasa de absorción a 260/280 nm para determinar la proporción ADN/ARN. La concentración del ADN purificado de las muestras osciló en el rango de 20 a 64 ng/µl.

En la búsqueda de marcadores para *Sorbus aria* se analizaron individuos con 6 cebadores desarrollados para *Sorbus torminalis* y recomendados para *S. aria* (Oddou-Muratorio *et al.*, 2001). De la misma manera se probaron 7 cebadores desarrollados para los géneros comerciales *Malus* (Gianfranceschi *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002) y *Pyrus* (Yamamoto *et al.*, 2002) (**Tabla 32**). Solo dos de los desarrollados para *S. torminalis* (MSS 05 y MSS 06) reflejaron un carácter polimórfico aceptable en las muestras de *S. aria*.

Debido al poco éxito detectado con estos microsatélites y de manera similar al caso de *Silene nocteolens*, para *Sorbus aria* también hubo que aislar y caracterizar microsatélites específicos; labor que fue encargada a una empresa especializada (ATG GENETICS, Canadá) la cual desarrolló un total de 18 pares de microsatélites cuyas especificaciones originales de amplificación de detallan en la **Tabla 33**.

Tabla 32 Microsatélites ensayados en *Sorbus aria*

NOMBRE	REFERENCIA	ESPECIE	MOTIVO
BGT23b	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002	<i>Pyrus</i> spp.	(TC) _{18.5}
CH01H01	Gianfranceschi <i>et al.</i> , 1998	<i>Malus x domestica</i>	(AG) _{25.5}
CH01H10	Gianfranceschi <i>et al.</i> , 1998	<i>Malus x domestica</i>	(AG) ₂₁
CH02B03b	Gianfranceschi <i>et al.</i> , 1998	<i>Malus x domestica</i>	(GA) ₂₂
CH02c09	Liebhard <i>et al.</i> , 2002	<i>Malus x domestica</i>	(AG)/(CT)
CH02d08	Liebhard <i>et al.</i> , 2002	<i>Malus x domestica</i>	(AG)/(CT)
MS14h03	Liebhard <i>et al.</i> , 2002	<i>Malus x domestica</i>	(GA)/(GT)
MSS1	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	(GA) ₁₅
MSS3	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	(CA) ₁₂
MSS5	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	(GA) ₁₉
MSS6	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	(GT=CA) ₁₄
MSS13	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	(CA) ₁₂
MSS16	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> , 2001	<i>Sorbus torminalis</i>	(CT=GA) ₂₈

Marcadores con amplificación aceptable subrayados

Tabla 33 Descripción de los microsatélites desarrollados para *Sorbus aria*

LOCUS	CEBADORES/SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO (PB)	MOTIVO	Tm (°C)
SA01	R: GGTGGAGGGACAATTGTGTC	229	(GA) ₁₃	64
	F: ATGGAGTTGAGCTCCACATC			62
SA02	R: ACGTAGCACTGAATGGTATAG	293	(GA) ₁₆	56
	F: CTAGGTATCATCTCCGACCA			59
SA03	R: ACTACTGCTACTTCTGTGGG	234	(GA) ₁₂	56
	F: CACTTCTTCTGCTGTTTGG			62
SA04	R: GGTTTAGGCTTCTGACCGGA	384	(GA) _{10... (GA)₇}	65
	F: CCTGATACTATTCGCTTTACC			57
SA05	R: GAATTCTCCCTTCTGATTAC	181	(CT) ₁₇	54
	F: GAAGCCAAGAAGAAGAAAGG			60
SA06	R: TGCAGCGGTTGCAGATTGCA	297	(GA) ₃₂	74
	F: ATTTGATCCATGTGCGACTGCA			70
SA07	R: CTTGCGAGTTCATTAAGCAC	334	(GA) ₁₅	60
	F: ACGTTTTAGTATGATGGCC			61
SA08	R: GAATTCTTGGCAGTTTGCCT	249	(CT) ₁₆	63
	F: CAGAGAGAGTGCCTGCCT			61
SA09	R: CCAATACTTGAGTAGCATAC	174	(AG) ₁₇	51
	F: CTTGTTGGACGGATTTCTTC			61
SA11	R: AAAACCTGCAACTCCGTGCA	286	(TG) ₁₅	68
	F: TGCACCTCGATCTTTAGCCA			67
SA12	R: GAATTCATTGTTTAGGTGAAGG	127	(CT) ₁₄	59
	F: CCATTAGCTCTAGTTGAACAG			56
SA13	R: GTAGGTTATCACCCATCAATTTTC	356	(TC) ₉	61
	F: CCCCAACTGATGAATTATCAC			61
SA14	R: GAGGTAAAACCTACCAGTATAC	203	(TC) ₃₀	53
	F: ATGGATTTAGGTTAACAGTTGTC			58
SA15	R: CCCAATTCAGGGAGCAACAG	165	(CA) ₁₄	67
	F: TTCTAGGCGACGATCATTCTG			66
SA17	R: CTTGAGAGAGAACAGAAGTAA	259	(AC) ₁₅	53
	F: TTTAATCACGTGACTGGCTAA			60
SA19	R: TTGGATAGTTTAGGAACAAA	305	(CA) _n	54
	F: GTAATTAATTACCTTGTGT			47
SA19.1	R: GAATTCATGAAAGCAGCTAATG	241	(GA) ₂₄	60
	F: AAGTTTACAAGAGTGTGTTTCCAG			55
SA22	R: CCAAGTAGATAACCGTAAACC	171	(CA) ₁₆	57
	F: GCTTTGGCTCACAAATTCAC			66

F: Forward, R: Reverse, pb: pares de bases, Tm: Temperatura de hibridación

Las amplificaciones de ADN se hicieron en placas PCR de 96 pocillos. En cada pocillo se depositó aproximadamente 20 ng de ADN, 10 pmol de cada cebador y 24 µl de mezcla maestra para PCR (Reddy-Mix, ABgene, Surrey, UK) que incluye 0,625 unidades de la enzima ADN Taq polimerasa, Tris-HCl 75 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM, Tween 20 0,01%, 1,5 mM (o 2 mM) de MgCl_2 y 0,2 mM de cada dNTP.

5.2.3. Clonación

La clonación de *Sorbus aria* se realizó con el propósito de verificar la ploidía de esta especie en las muestras analizadas, ya que los primeros ensayos con los microsatélites preseleccionados parecieron revelar una naturaleza triploide en *Sorbus aria* detectada en diferentes individuos y distintos loci y, con ello, la posibilidad de encontrarnos ante muestras triploides.

Con el propósito de confirmar ese carácter triploide reflejado en los perfiles de los productos de amplificación por la detección de tres fragmentos en el mismo individuo, se procedió a la secuenciación de dichos productos de amplificación para verificar si los picos se correspondían realmente con mutaciones.

Se seleccionó el ADN de algunos individuos en los que los productos de amplificación analizados previamente mostraban tres alelos para un determinado locus, escogiéndose las siguientes muestras y condiciones (**Tabla 34**):

Tabla 34 Cebadores y temperatura de hibridación de los individuos clonados

INDIVIDUO	CEBADOR	T _M (°C)
1	SA19,1	55
4	SA08	61
7	SA07	60
8	SA14	57

T_m: temperatura de hibridación, los detalles de los cebadores se describen en la **Tabla 33**

Se procedió a la amplificación de estas muestras en las condiciones específicas de cada cebador (la adición de 1µl de DMSO por cada individuo es recomendable). Los productos de amplificación fueron purificados y una

fracción de ellos se sometió a electroforesis en gel de agarosa (1,8%) para corroborar la presencia de ADN. Se midió la absorbancia a 260 nm de otra fracción para determinar la concentración de ADN mediante espectrofotometría (Tabla 35).

Tabla 35 Datos espectrofotométricos de las muestras

MUESTRA	260 nm	280 nm	230 nm	260/280 nm	260/230 nm
1	0,013	0,011	0,009	1,184	1,358
4	0,016	0,012	0,022	1,349	0,719
7	0,019	0,015	0,063	1,295	0,309
8	0,012	0,007	0,010	1,762	1,206

Los microlitros de ADN de *Sorbus aria* requeridos de cada muestra para el ligado con el vector dependen del tamaño promedio de los fragmentos (kb) que se desean verificar y se obtuvo a través de la siguiente fórmula:

$$ng = \frac{50 ng_{vector} \times kb_{inserto}}{3 kb_{vector}} \times \frac{3}{1}$$

Una vez obtenido este valor se determinaron los microlitros necesarios de cada producto de amplificación mediante la ecuación:

$$\mu l_{muestra} = \frac{ng_{inserto} \times 1 \mu l}{ng_{muestra}}$$

Los resultados se muestran en la **Tabla 36**.

Tabla 36 Resumen de los valores utilizados en la clonación de *Sorbus aria* en células competentes

MUESTRA	$\lambda=260nm$	ng/ μl	CEBADOR	ALELOS DE REFERENCIA (pb)	$\bar{x}/1000$	INSERTO (kb)	INSERTO (ng)	(μl)
1	0,013	13	SA19,1	212, 236,248	232/1000	0,232	11,60	0,89
4	0,016	16	SA8	248, 258, 266	257,33/1000	0,257	12,85	0,80
7	0,019	19	SA7	329, 337, 349	338,33/1000	0,338	16,90	0,89
8	0,012	12	SA14	198, 203, 208, 214	205,75/1000	0,206	10,30	0,85

5.2.1.1. Ligado

Se conoce como ligado a la inserción de una fracción de ADN a un vector bacteriano. En esta etapa se procedió a una breve centrifugación del vector (pGEM-T) y el inserto de ADN control a fin de colectar el contenido de las tapas

y paredes de los tubos que los contenían. Por otro lado, se agitó el tampón de ligado antes de su uso.

Estas soluciones se mezclaron por pipeteo y se incubaron toda la noche a 4 °C para un número máximo de transformaciones. Los volúmenes utilizados tanto para los insertos de *S. aria* preparados como para el inserto control se muestran en la **Tabla 37**.

Tabla 37 Proporciones utilizadas para el ligado en vector

REACTIVO	REACCIÓN ESTÁNDAR	CONTROL POSITIVO
2X Tampón de Ligado Rapid	5 µl	5 µl
pGEM-T (50 ng)	1 µl	1 µl
Producto PCR	X µl	-
Inserto Control	-	2 µl
T ₄ DNA Ligasa (3 Weiss U/µl)	1 µl	1 µl
H ₂ O dd para un volumen final de	10 µl	10 µl

5.2.1.2. Transformación en Células Competentes

Una vez ligados los productos de amplificación al vector, se procedió a la transformación de las células competentes (JM109). Para ello se requirió la elaboración previa de un medio de cultivo SOC (Hanahan *et al.*, 1991) y de placas de agarosa con medio de Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina y enriquecido con IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido).

Las cepas bacterianas se retiraron de su almacenamiento criobiológico a -80 °C y mantuvieron en cama de hielo hasta su uso. Estas células se trataron con sumo cuidado, evitando los movimientos bruscos al manipularlas. Implementos típicos de procesos microbiológicos (mechero, placas petri, asas microbiológicas, campana de aislamiento, etc.) también fueron necesarios.

Para la elaboración de 100 ml del medio SOC se mezclaron bactotriptona, bacto levadura (bactoyeast), NaCl 1 M, KCl 1 M y agua doble destilada para un volumen final de 97 ml. La solución se agitó hasta lograr su homogeneización, seguidamente se esterilizó mediante autoclave a 1 atmósfera de presión y temperatura de 121 °C. Cuando la temperatura disminuyó a aproximadamente 30 - 40 °C, se le añadió Mg⁺ 2 M y glucosa 2 M para alcanzar una

concentración final de 20 mM, respectivamente. Por último, se enrasó a 100 ml con agua destilada y estéril, se filtró y se ajustó el pH a 7. La **Tabla 38** muestra un resumen de este procedimiento.

Tabla 38 Requerimientos para el medio SOC

REACTIVO	100 ml
Bactotripton	2 g
Bacto levadura	0,5 g
NaCl 1 M	1 ml
KCl 1 M	0,25 ml
Esterilizado por autoclave	
Mg ⁺ 2 M	1 ml
Glucosa 2 M	1 ml
Filtración, esterilización y ajuste a pH 7	

Los reactivos y sus cantidades particulares para la elaboración del medio de cultivo LB se detallan en la **Tabla 39**.

Tabla 39 Requerimientos para la elaboración del medio de cultivo "LB"

REACTIVO	200 ml
Bactotripton	2 g
Bacto levadura	1 g
NaCl	1 g
Ajustar a pH (NaOH 10 N)	pH 7
1,5% Agar	3 g
Esterilizar con autoclave	121 °C (20 minutos)
Ampicilina (T° < 50 °C)	1 ml

Se aplicó la ampicilina al medio luego de su esterilización con autoclave, cuando la temperatura estuvo por debajo de los 50 °C debido a que este antibiótico tiende a degradarse con el calor excesivo. El medio de cultivo se distribuyó en placas de petri bajo las condiciones de asepsia típicas para todo proceso microbiológico. Una vez el agar polimerizó, las placas con medios de cultivo fueron almacenadas (pueden resistir hasta un mes a 4 °C o por una semana si se decide dejarlos a temperatura ambiente).

Unos 30 minutos antes del sembrado se añadió en cada placa, con la ayuda de un asa de vidrio previamente esterilizada con etanol y flameada, 100 µl de IPTG (0,1 M) primero y después 20 µl de X-GAL (50 µg/µl). Los detalles para la preparación de las soluciones madres de estos reactivos se describe en la **Tabla 40**.

La transformación de células competentes propiamente dicha se inició centrifugando 2 µl de cada reacción de ligado en un nuevo microtubo esterilizado. Los microtubos que contenían las células competentes permanecían en cama de hielo donde se descongelaban lentamente; este proceso puede durar aproximadamente 5 minutos. Dentro del halo de inhibición de un mechero, se transfirieron 50 µl de la cepa JM109 a aquellos tubos que se habían centrifugado previamente. Los tubos se agitaron cuidadosamente (apenas con el toque de un dedo) y se dejaron en reposar en hielo durante 20 minutos.

Tabla 40 IPTG y X-GAL (Soluciones madres de los reactivos de sembrado)

IPTG SOLUCIÓN MADRE (0,1 M)	
1,2 g	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
50 ml	H ₂ O dd (Volumen final)
Filtrar y guardar a 4 °C	
X-GAL (2 ml)	
100 mg	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
2 ml	N,N'-dimetil-formamida (disolvente)
Cubrir el envase y almacenar a -20 °C	

A continuación, las células competentes junto con los ligados se sometieron a choque térmico (42 °C) durante 45 a 50 segundos e inmediatamente se retornaron al hielo por 2 minutos más. En esta etapa debe evitarse la agitación de las muestras. Posteriormente, se añadió 950 µl de medio SOC a cada tubo de reacción de transformación y los mismos fueron incubados a 37 °C con agitación moderada durante 1,5 horas. Una vez finalizada la incubación las soluciones fueron centrifugadas por 10 minutos a 1000 g.

De cada tubo se descartó un volumen de 800 µl de sobrenadante, el resto se utilizó para resuspender suavemente el precipitado producido por la centrifugación. Estos 200 µl de cada reacción de transformación fueron depositados en las placas con medio LB suplementado con IPTG y X-Gal. La ampicilina impidió el crecimiento de todas aquellas células que no se hubiesen transformado con el vector, ya que este presenta un gen de resistencia al antibiótico.

Por otro lado, el IPTG y el X-Gal separarían a las colonias formadas por células competentes en las que el vector plasmídico había incorporado un fragmento de ADN de la especie en estudio (blancas) de aquellas células competentes donde no se produjo un inserto en el vector plasmídico (azules). Esto se debe a que la región donde se inserta cada fragmento de ADN que hemos ligado se corresponde con el gen de la β -galactosidasa (gen *lacZ*). Por esto, en las colonias que presenten un inserto de *Sorbus aria*, el gen *lacZ* estará interrumpido y no se expresará, dando lugar a colonias de color blanco; mientras que en aquellas colonias donde las células han sido transformadas con un vector sin inserto, el gen estará operativo produciendo colonias de color azul (Fig. 30, esquema en el Anexo VIII).

5.2.1.3. Amplificación de Colonias

Se desecharon aquellas placas que tras su incubación no tenían colonias blancas y de las restantes se seleccionaron aquellas colonias blancas más próximas a las azules y una colonia azul que funcionó como control negativo; puesto que se corresponde con aquellas colonias que han incorporado el vector plasmídico, pero no portan el inserto del ADN genómico de *Sorbus aria*. Nos interesaban aquellas colonias con un inserto que fuera lo suficientemente grande como para albergar un microsatélite.

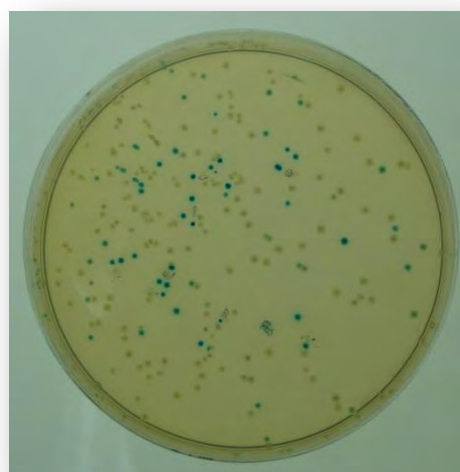


Fig. 30 Placa mostrando colonias de células competentes tras la clonación

Para determinar el tamaño del inserto se realizaron reacciones de amplificación del ADN utilizando el par de cebadores M13 (*forward* y *reverse*), los cuales reconocen las secuencias del vector que se encuentran flanqueando la región donde se ha introducido el inserto. Cada una de las colonias escogidas se retiró de la placa bajo condiciones de asepsia con una punta de pipeta estéril (se recomienda la creación simultánea de placas madres para

futuras pruebas) y se depositó en un tubo preparado para amplificación según la **Tabla 41**. Los tubos fueron sometidos a la técnica PCR según las condiciones mostradas en la **Fig. 31**.

Tabla 41 Reactivos para amplificación de colonias

REACTIVO	SECUENCIA	CANTIDAD
Mezcla maestra para PCR		24 μ l
Cebador pUC/M13 Forward (17-mer)	5'-d(GTTTCCAGTCACGAC)-3'	0,25 μ l
Cebador pUC/M13 Reverse (17-mer)	5'-d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3'	0,25 μ l
BSA		0,25 μ l

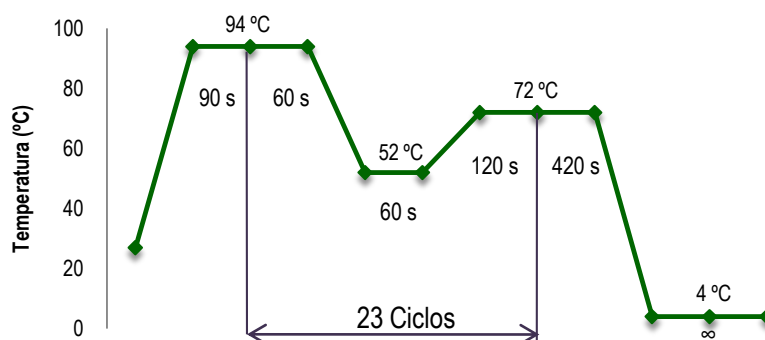


Fig. 31 Perfil de amplificación para colonias

A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1,8%) de esas amplificaciones para verificar la presencia y calidad del ADN. Todas las muestras escogidas fueron purificadas y se reamplificaron utilizando ahora 2 μ l de ADN.

5.2.1.4. Secuenciación de los Fragmentos de ADN

Se secuenciaron aquellas colonias con mayor probabilidad de contener un inserto del ADN genómico de *Sorbus aria* en busca de microsatélites. Esto requirió otra amplificación constituida por 1 μ l de mezcla maestra; 1,7 μ l de agua; 0,8 μ l de cebador (M13-F); 3 μ l de tampón de secuenciación y 3,5 μ l ADN para un volumen total de 10 μ l por muestra.

La mezcla maestra (como en los casos de las PCR anteriores) contenía la *Taq* polimerasa, los nucleótidos y el magnesio. El cebador M13-F tiene un

punto de unión muy cercano al de inserción de los fragmentos de ADN, de tal forma que la secuenciación siempre empieza a partir de este. El perfil de amplificación para la secuencia de ciclos (*cycle sequence*) se muestra en la Fig. 32.

Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados. En este caso la purificación se consiguió precipitando con acetato sódico 3 M y alcohol al 100% para, seguidamente, lavarlos con alcohol al 70%. Las muestras se dejaron secar y luego se cargaron en el gel de un secuenciador capilar ABI 3130 XL.

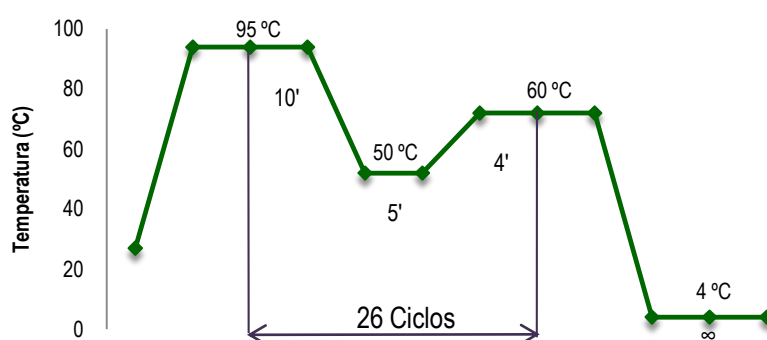


Fig. 32 Perfil de amplificación para la secuenciación de fragmentos de ADN

5.2.4. Análisis de Datos

5.2.4.1. Genotipado

Las secuencias obtenidas como resultado de la clonación del ADN de *Sorbus aria* fueron leídas y alineadas con el programa informático BIOEDIT 5.0.6 (Hall, 2001).

Los productos de la amplificación fueron analizados usando un Secuenciador Capilar ABI 3130XL y los alelos de cada locus y su tamaño respectivo fueron identificados por los picos obtenidos a través de los programas GENESCAN 2.02 y GENOTYPER 1.1 (Applied Biosystems, Inc.). Los datos obtenidos para cada individuo y locus amplificado se incluyeron en una matriz de doble entrada (hoja de cálculo Microsoft EXCEL). Se elaboró entonces una base de datos en la que se incluían los individuos analizados y los alelos identificados por población y locus respectivos. Una vez completada la matriz de datos se empleó el programa TRANSFORMER 3B.01 (Caujapé-Castells y

Baccari-Rosas, 2005), el cual permitió exportar los valores a otros programas de análisis genético.

5.2.4.2. Análisis Estadísticos

El Anexo I muestra un resumen de los programas informáticos utilizados en la caracterización genética de las poblaciones vegetales estudiadas.

A raíz de los resultados de la clonación (ver sección 5.3.3) fue necesario recurrir a la utilización del programa GENODIVE 2.0B20 (Meirmans y Van Tienderen, 2004) el cual admite datos para individuos con diferentes ploidías. En el resto de los análisis estadísticos la matriz de genotipos de *Sorbus aria* tuvo una formación de presencia/ausencia; de esta manera, los datos fueron adaptados a las limitaciones del resto de los programas utilizados.

La estadística elemental de variabilidad genética para *Sorbus aria* se refiere al número medio de alelos (N_A), la heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad dentro de las poblaciones (H_s) calculados a través del programa GENODIVE (Meirmans y Van Tienderen, 2004). El porcentaje de loci polimórficos (P) se obtuvo utilizando el POPGENE 3.2 (Yeh *et al.*, 1999).

Para determinar si las poblaciones analizadas se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg se utilizó el test de probabilidad implementado en el GENODIVE 2.0B20 (Meirmans y Van Tienderen, 2004) que calculó el coeficiente de endogamia (G_{IS}) y también las probabilidades (valores P) correspondientes para cada población y locus.

La obtención de los valores de identidad y distancia genética de Nei (Nei, 1972) en *Sorbus aria* se logró mediante el programa GENODIVE 2.0B20 (Meirmans y Van Tienderen, 2004). Análisis equivalentes para la obtención del UPGMA con 1000 repeticiones fueron hechos con POPTREE 2 (Takezaki *et al.*, 2010), programa que hace uso de las frecuencias genéticas entre poblaciones para calcular la distancia genética estándar de Nei (Nei, 1972). El NJ fue calculado con RAPDPLOT 3.0 (Black, 1995) y luego procesado con la opción "Neighborg" del PHILIP 3.5C (Felsenstein, 1993). Todos los dendrogramas

fueron visualizados y editados en MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) y TREEVIEW 1.1.6 (Roderic, 2001).

Con el programa GENALEX 6.4 (Peakall & Smouse, 2006) se generó el análisis molecular de varianza (AMOVA) y el análisis de coordenadas principales (PCoA) mientras que la obtención de los coeficientes de diferenciación estandarizados (F'_{ST}) se logró a través de GENODIVE 2.0B20 (Meirmans y Van Tienderen, 2004).

La estructura de las poblaciones fue inferida mediante un análisis Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.2 (Falush *et al.*, 2007). Se asumió un modelo de mezcla y frecuencias alélicas independientes. Se obtuvo una serie de carreras independientes para cada valor de K (el número de grupos) entre 1 y 10. El análisis consistió en 10^5 períodos de prueba y una longitud de carrera 10^6 réplicas. En total se corrieron 5 análisis con las mismas especificaciones a fin de corroborar los resultados obtenidos. Los individuos fueron asignados a un "grupo" si su proporción de pertenencia (q_i) a ese grupo era igual o mayor que el umbral de 0,05.

5.3. Resultados

5.3.2. Cebadores Funcionales *Sorbus aria*

Si bien es cierto que dos de los microsatélites desarrollados para otras especies (MSS 05 y MSS 06) reflejaron un carácter polimórfico admisible en las amplificaciones hechas para *Sorbus aria*, se prefirió utilizar aquellos cebadores desarrollados concretamente para esta especie. Los ensayos preliminares revelaron que de los 18 cebadores desarrollados (**Tabla 33**), solamente 9 resultaron ser polimórficos y útiles para las pruebas posteriores (**Tabla 42**).

Tabla 42 Secuencia de los nueve cebadores funcionales en *Sorbus aria*

LOCUS	CEBADOR/SECUENCIA (5' → 3')	RANGO (pb)	MOTIVO	T _m (°C)	EMBL
SA01	F: ATGGAGTTGAGCTCCACATC R: GGTGGAGGGACAATTGTGTC	212-254	(GA) ₁₃	60	FN563114
SA02	F: CTAGGTATCATCTCCGACCA R: ACGTAGCACTGAATGGTATAG	270-325	(GA) ₁₆	60	FN563115
SA03	F: CACTTCTTCCTGCTGTTTGG R: ACTACTGCTACTTCTGTGGG	206-249	(GA) ₁₂	60	FN563116
SA06	F: ATTTGATCCATGTGCCACTGCA R: TGCAGCGGTTGCAGATTGCA	248-297	(GA) ₃₂	60	FN563117
SA07	F: ACGTTTTTCAGTATGATGGCC R: CTTGCGAGTTCATTAAGCAC	325-349	(GA) ₁₅	60	FN563118
SA08	F: CAGAGAGAGTGCAGTGCCT R: GAATTCTTGCCAGTTTGCCT	233-287	(CT) ₁₆	60	FN563119
SA09	F: CTTGTTGGACGGATTTCTTC R: CCAATACTTGAGTAGCATA	161-197	(AG) ₁₇	55	FN563120
SA14	F: ATGGATTTAGGTTAACAGTTGTC R: GAGGTA AACCTACCAGTATAC	197-232	(TC) ₃₀	57	FN563121
SA19.1	F: AAGTTTACAAGAGTGTGTTTCAG` R: GAATTCATGAAAGCAGCTAATG	212-250	(GA) ₂₄	58	FN563122

F: Forward, R: Reverse, pb: pares de bases, T_m: Temperatura de hibridación, EMBL: código correspondiente a cada locus en el Banco Europeo de Secuencias Nucleotídicas

SA01, SA02, SA03, SA06, SA07 y SA08 mostraron mejores resultados en las condiciones básicas de amplificación (SASN60, **Fig. 16**); sin embargo, para SA02 y SA08 se requirió una concentración final de 2,5 mM de MgCl₂.

Por otro lado, SA09 precisó una temperatura de hibridación de 55 °C y una extensión final de 30 s a 72 °C además de 2,5mM de MgCl₂ (**Fig. 33**). Para SN14 la temperatura de hibridación necesaria fue de 57 °C (**Fig. 34**) y en SA19.1 fue de 58 °C (**Fig. 35**) acompañada de otros requerimientos en la

mezcla de amplificación (3 mM MgCl₂, BSA y DMSO). Los detalles se muestran en la **Tabla 43**.

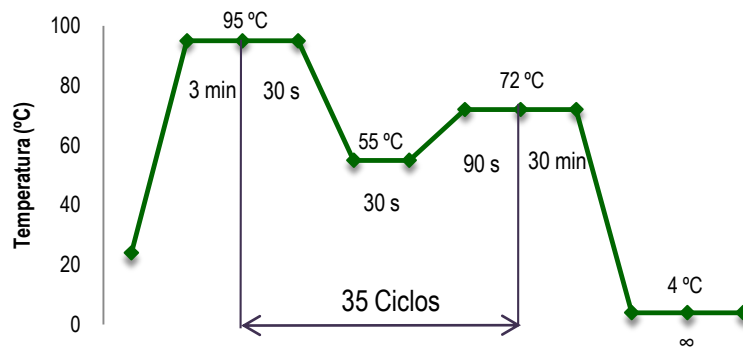


Fig. 33 Perfil de amplificación SASN5572

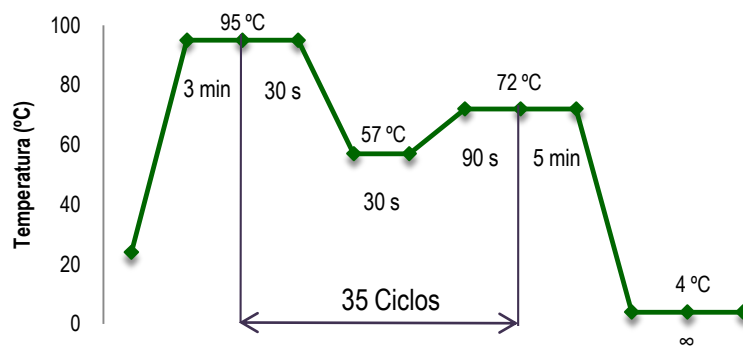


Fig. 34 Perfil de amplificación SASN57

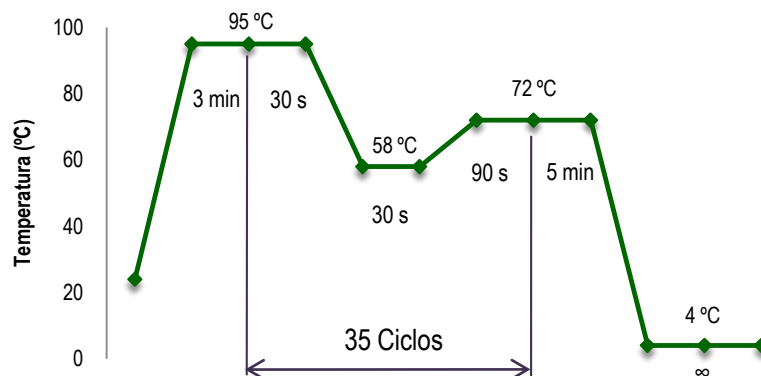


Fig. 35 Perfil de amplificación SASN58

Tabla 43 Condiciones específicas ensayadas para los cebadores de *Sorbus aria*

NOMBRE	T _m	MgCl ₂	BSA	DMSO
SA01	60°C	1,5 mM	-	-
SA02	60°C	2,5 mM	-	-
SA03	60°C	1,5 mM	-	-
SA06	60°C	1,5 mM	-	-
SA07	60°C	1,5 mM	-	-
SA08	60°C	2,5 mM	-	-
SA09*	55°C	2,5 mM	-	-
SA14	57°C	1,5 mM	-	-
SA19,1	58°C	3,0 mM	+	+

T_m: Temperatura de hibridación, *: extensión final de 30 min a 72 °C; +: requiere adición.

5.3.3. Clonación

Pese a que se utilizaron 4 individuos para la clonación del ADN de *Sorbus aria* en células competentes, no se encontraron colonias viables (blancas) en la placa sembrada con las amplificaciones de la primera muestra y, por ende, los resultados que se detallan a continuación se basan en los productos de las muestras 4, 7 y 8 (**Tabla 34**).

Para la amplificación de las colonias se utilizó en primer lugar el cebador M-13; sin embargo, y a pesar de haberse reamplificado a partir de ADN amplificado en lugar de ADN puro, los fragmentos detectados en gel de agarosa presentaban muy baja intensidad, lo que refejaba una baja amplificación. Debido a esto, se hicieron amplificaciones con los cebadores caracterizados particularmente para esta especie (SA07, SA08 y SA14), obteniéndose los mejores resultados con este último procedimiento (**Fig. 36**) en el cual el cebador M-13 solo se aplicó a la muestra control (Blue).



Fig. 36 Foto del gel de electroforesis para la reamplificación de colonias. L: escalera de pesos moleculares; P4, P7 y P8: muestras de colonias de células clonadas con los individuos 4, 7 y 8, respectivamente; SA8, SA7 y SA14: cebadores específicos para *Sorbus aria*; M13: cebador "Forward" y Blue: control negativo.

Siguiendo el procedimiento correspondiente, las muestras que registraron el mejor bandeo en gel fueron purificadas y sometidas a secuenciación haciendo uso del cebador "Forward" específico y el M-13 como control negativo. La secuenciación de los diferentes productos de amplificación confirmó que los tres picos observados en los individuos de *Sorbus aria* se correspondían con verdaderos alelos y su variación se debía a un aumento o disminución del número de repeticiones del motivo dentro del microsatélite y no de mutaciones en las secuencias flanqueantes.

En la **Fig. 37** se muestran los resultados de secuenciación de ADN de células clonadas con *Sorbus aria* para el locus SA07 de un individuo y la **Fig. 38** resume las secuencias halladas, demostrando el carácter triploide de la especie.

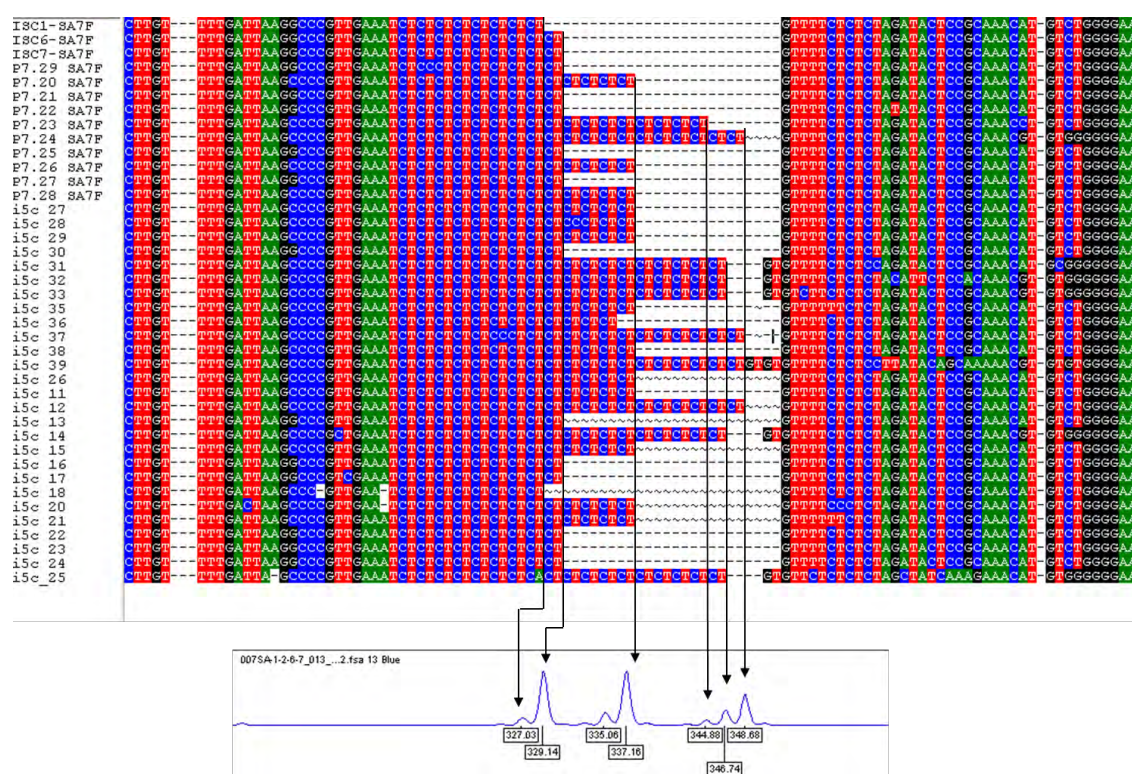


Fig. 37 Secuencias de las colonias (células clonadas con *Sorbus aria*) para el microsatélite SA07. Cada nombre a la izquierda corresponde a una colonia y los picos inferiores representan los alelos encontrados en cada secuencia.

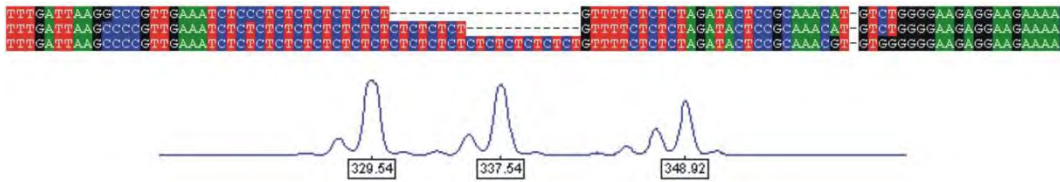


Fig. 38 Perfil de fragmentos del microsatélite SA07 observado en *Sorbus aria* y secuencias correspondientes de la clonación de estos fragmentos que confirman la naturaleza triploide de esta especie en Canarias

Sin embargo, el carácter triploide no se detectó en todos los ejemplares de *Sorbus aria* analizados. Así, mientras que las poblaciones canarias presentan un carácter triploide, al igual que los individuos del Parque Nacional de Cabañeros (PNCA) y el Parque Nacional de Sierra Nevada (PNSN); los ejemplares del Parque Nacional de Aigüestortes (PNAI) fueron diploides. Finalmente, en el Parque Nacional de Picos de Europa (PNPE) se observó una mezcla de ambas ploidías, con un 21,56% de individuos triploides (**Fig. 39**).

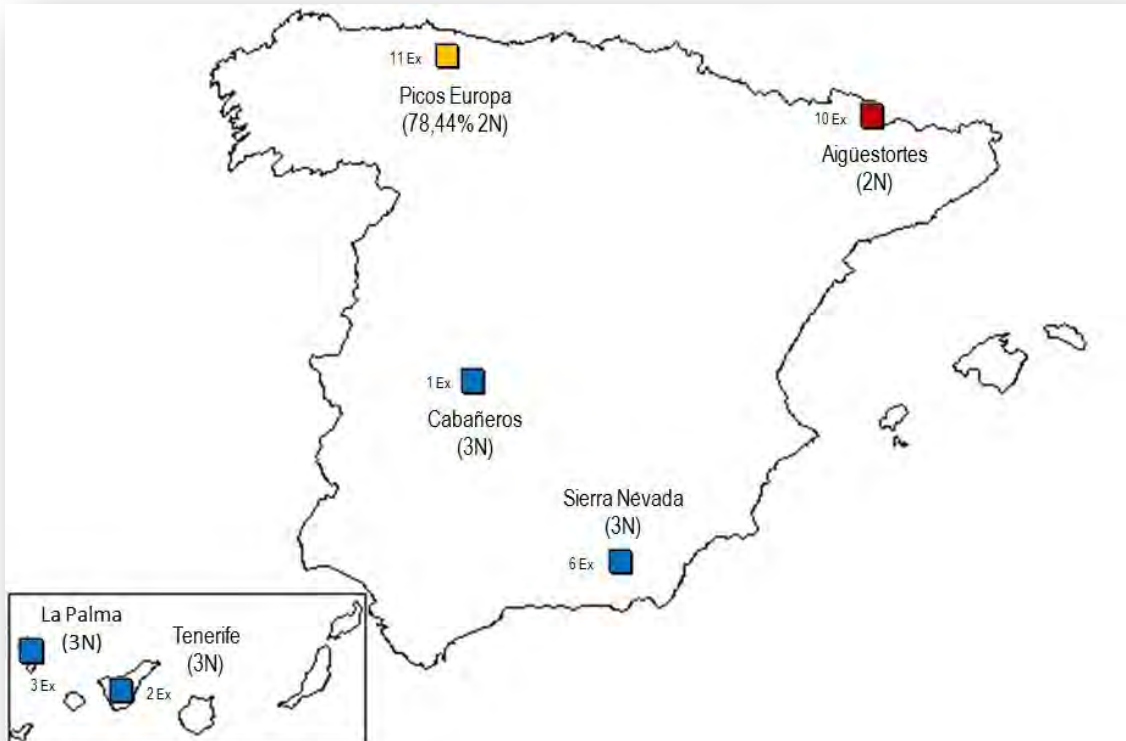


Fig. 39 Distribución de la ploidía y ocurrencia de alelos exclusivos (Ex) en *Sorbus aria*

5.3.4. Niveles de Diversidad Genética

5.3.4.1. Frecuencias Alélicas

En las muestras analizadas del género *Sorbus aria* se detectaron 141 alelos, correspondientes a 9 loci, todos polimórficos (Anexo IX). SA02, con 19 alelos, resultó ser el locus con mayor número de alelos y en orden descendente se encontraron 18 alelos para los loci SA06 y SA08, 17 alelos para los loci SA01 y SA09, 15 alelos para el locus SA14, 14 para el locus SA03, 12 para el locus SA19,1 y 11 para el SA07. Todos los ejemplares de Tenerife fueron genéticamente idénticos, mientras que en La Palma la proporción de genotipos idénticos alcanzó el 86,96%. Por el contrario, los 6 individuos del Parque Nacional de Cabañeros fueron genéticamente diferentes; así como el 92,16%, el 83,83% y el 23,08% de los individuos analizados en los Parques Nacionales de Picos de Europa, Aigüestortes y Sierra Nevada, respectivamente (**Tabla 44**). No se encontraron genotipos compartidos entre Canarias y la Península.

Tabla 44 Porcentaje de genotipos idénticos encontrados en *Sorbus aria* por población

POBLACIÓN	CÓDIGO	Nº	Nº GI	%
Guajara y Los Cachorros	GYCT	4	4	100,00
Tenerife		4	4	100,00
Curva del Observatorio	COBP	3	3	100,00
El Espigón y Espigón del Roque de Los Muchachos	EYMP	6	4	66,67
La Parcela Grande	PGAP	5	3	60,00
Los Andenes	LANP	29	27	93,10
El Espigón del Norte	EPNP	3	3	100,00
La Palma		46	40	86,96
Canarias		50	44	88,00
Parque Nacional de Cabañeros	PNCA	6	0	0,00
Parque Nacional de Aigüestortes	PNAI	36	6	16,67
Parque Nacional de Picos de Europa	PNPE	51	4	7,84
Parque Nacional de Sierra Nevada	PNSN	52	40	76,92
Península		145	50	34,48
Total		195	94	48,21

Nº: número de individuos analizados por localidad, Nº GI: número de individuos genéticamente idénticos.

La mayor proporción de alelos exclusivos en las poblaciones se encontró en PNPE (7,80%), seguida de PNAI (7,09%), PNSN (4,26%), GYCT (1,42%) y PNCA (0,71%). Tres alelos (SA01-254, SA07-349 y SA08-287) estuvieron presentes solamente en poblaciones de La Palma y dos alelos (SA01-226 y SA08-249) aparecieron en todas las poblaciones analizadas (Anexo IX). Al

separar en dos grupos las muestras peninsulares y canarias (Anexo X), la mayor proporción de los alelos exclusivos se detectó en las muestras peninsulares (74,47%) y un porcentaje bastante menor (3,55%) en las canarias. Treinta y un alelos estuvieron presentes en ambas regiones. No se hallaron alelos fijados ni por población ni por región. Si se consideran solamente las poblaciones de la península, la ocurrencia de alelos exclusivos (Ex) decrece progresivamente desde Picos de Europa hacia Cabañeros (**Fig. 39**).

5.2.2.1. Variabilidad Genética

La **Tabla 45** muestra los diferentes índices de diversidad genética obtenidos para las poblaciones de *Sorbus aria*.

Tabla 45 Diversidad genética detectada en las poblaciones de *Sorbus aria*

POBLACIÓN	PROCEDENCIA	Nº	N_A	H_o	H_s	P
GYCT	Tenerife	4	2,89	1,000	0,745	0,72%
COBP	La Palma	3	2,89	1,000	0,790	1,45%
EYMP	La Palma	6	3,00	0,981	0,687	7,25%
PAGP	La Palma	5	2,89	0,978	0,684	3,62%
LANP	La Palma	29	3,33	0,996	0,660	10,87%
EPNP	La Palma	3	2,67	1,000	-	0,00%
<i>Canarias</i>		50	2,79	0,993	0,718	20,29%
PNCA	Castilla La Mancha	6	2,78	0,889	0,615	4,35%
PNAI	Cataluña	36	9,56	0,646	0,814	60,14%
PNPE	Asturias-Cantabria-Castilla-León	51	11,11	0,621	0,831	70,29%
PNSN	Andalucía	52	7,22	0,856	0,759	45,65%
<i>Península</i>		145	3,86	0,753	0,762	94,93%
Total		195	15,667	0,897	0,742	100,00%

Nº: es el número de individuos analizados por localidad, N_A : Número medio de alelos, H_o : Heterocigosidad observada, H_s : Heterocigosidad en las poblaciones y P: Porcentaje de loci polimórficos.

El número medio de alelos en *Sorbus aria* varió desde $N_A = 2,67$ para la población del Espigón del Norte en La Palma (EPNP) hasta $N_A = 11,11$ para las muestras del Parque Nacional de Picos de Europa (PNPE). En general, las poblaciones de la Península mostraron mayor número de alelos que las poblaciones canarias; no obstante, el mayor número de alelos en Canarias ($N_A = 3,00$) que corresponde a la población del Espigón del Roque de los Muchachos de La Palma (EYMP) fue mayor que el encontrado en la población del Parque Nacional de Cabañeros (PNCA, $N_A = 2,78$), siendo este último el mínimo valor en las poblaciones peninsulares.

A nivel de población, El Espigón del Norte (EPNP) en La Palma y el Parque Nacional de Picos de Europa (PNPE) presentaron los valores extremos de variabilidad genética, correspondientes al 0% de loci polimórficos para ESNP frente al 70,29% de PNPE; resultados que concuerdan con los del acápite anterior. A nivel regional, la Península muestra un 94,93% de loci polimórficos, frente a un 20,29% hallado en Canarias.

Al igual que en los parámetros anteriores, la población del Espigón del Norte de La Palma (EPNP) mostró el mínimo valor de variación genética con $H_s = 0$ y la población del Parque Nacional de Picos de Europa (PNPE) ocupó el primer lugar en cuanto a los valores de heterocigosidad ($H_s = 0,831$). De acuerdo a la región, fue mayor la heterocigosidad en las muestras peninsulares ($H_s = 0,762$) que las canarias ($H_s = 0,718$) (**Tabla 45**).

5.3.5. Estructura Genética en las Poblaciones

5.3.5.1. Equilibrio Hardy-Weinberg

En la **Tabla 46** se muestran los valores del coeficiente de endogamia G_{IS} y sus respectivos grados de significación para las poblaciones de *Sorbus aria* analizadas con los distintos loci.

Todos los loci mostraron desviación del equilibrio Hardy-Weinberg. En las poblaciones canarias, prácticamente todos los valores fueron negativos, reflejando un exceso de heterocigóticos ($G_{IS} < 0$). Esta situación se repite entre las poblaciones peninsulares solamente para el locus SA02.

En términos generales, solamente dos poblaciones (PNAI y PNPE) se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg (precisamente aquellas que contenían organismos diploides); el resto de las poblaciones mostraron desviación del equilibrio Hardy-Weinberg con valores negativos y altamente significativos ($G_{IS} < 0$), con excepción de la población del Espigón del Norte de La Palma (EPNP) donde se halló un valor positivo y de menor significancia (defecto de heterocigóticos, $G_{IS} > 0$).

Tabla 46 Análisis de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg de *Sorbus aria* según poblaciones y loci

POBLACIÓN	SA01	SA02	SA03	SA06	SA07	SA08	SA09	SA14	SA19	TOTAL
GYCT	-0,286*	-0,315*	-0,286*	-1,000*	-0,286*	-0,286*	-0,286*	-0,286*	-0,286*	-0,342***
COBP	-1,000 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	-1,000 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	0,100 ^{ns}	-0,266***
EYMP	-0,697**	-0,364**	-0,286*	-0,667**	-0,333**	-0,697**	-0,364**	-0,364**	-0,298**	-0,430***
PAGP	-0,641*	-0,333**	-0,200*	-1,000**	-0,192*	-1,000*	-0,333**	-0,333*	-0,333*	-0,429***
LANP	-0,933***	-0,474***	-0,415***	-0,703***	-0,262***	-0,681***	-0,474***	-0,386***	-0,474***	-0,510***
EPNP	-1,000 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	-1,000 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	-1,000 ^{ns}	-0,200 ^{ns}	-0,200***	1,000 ^{ns}	1,000*
PNCA	-0,364**	-1,000**	-0,100**	-0,330 ^{ns}	-1,000**	0,216 ^{ns}	-0,364**	-0,364 ^{ns}	-0,364**	-0,446***
PNAI	0,465 ^{ns}	-0,020***	0,344 ^{ns}	0,650 ^{ns}	0,280 ^{ns}	-0,022***	-0,058***	0,019**	0,243 ^{ns}	0,207 ^{ns}
PNPE	0,394 ^{ns}	-0,054***	0,434 ^{ns}	0,571 ^{ns}	0,219 ^{ns}	0,449 ^{ns}	0,082 ^{ns}	-0,107 ^{ns}	0,270 ^{ns}	0,252 ^{ns}
PNSN	0,377***	-0,291***	-0,165***	-0,116***	-0,219***	0,282***	-0,175***	-0,210***	-0,431***	-0,128***
Total	-0,212***	-0,286***	-0,165***	-0,266***	-0,178***	-0,191***	-0,225***	-0,237***	-0,127***	-0,208***

ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

5.3.6. Diferenciación Genética entre las Poblaciones

5.3.6.1. Identidad y Distancia Genética

La identidad genética en *Sorbus aria* (Tabla 47) fluctuó de 0,116 entre las muestras de Tenerife y las del Parque Nacional Cabañeros (GYCT – PNCA) a 1,000 para la mayor parte de las comparaciones entre las poblaciones de La Palma (EYMP – COBP, PAGP – COBP, PAGP – EYMP, LANP – PAGP, EPNP – COBP, EPNP – EYMP, EPNP – PAGP y EPNP - LANP), lo cual es un reflejo de la gran proporción de genotipos idénticos encontrados en estas poblaciones.

Al analizar los datos de acuerdo a la procedencia de las muestras se observó que los valores para las muestras de la Península oscilaron entre 0,362 y 0,751; no hubo valores iguales o superiores que 0,900. Por su parte, las muestras de Canarias variaron desde 0,670 hasta 1,000; con un 66,66% de valores superan el 0,900 (todos entre las poblaciones palmeras).

La identidad media fue mayor para La Palma $\bar{I} = (0,997)$ y en general para las muestras procedentes de Canaria ($\bar{I} = 0,911$) que para las de los Parques Nacionales de la Península ($\bar{I} = 0,469$). Finalmente, al comparar los registros entre localidades se encontraron medias por debajo de 0,900; esto es, $\bar{I} = 0,738$ entre Tenerife y La Palma; $\bar{I} = 0,239$ entre La Palma y la Península e $\bar{I} = 0,209$ entre Tenerife y la Península, en orden descendente. Entre Canarias y La Península la identidad media fue $\bar{I} = 0,234$.

Tabla 47 Identidad y distancia genética de Nei (1972) entre las poblaciones de *Sorbus aria*

	GYCT	COBP	EYMP	PAGP	LANP	EPNP	PNCA	PNAI	PNPE	PNSN
GYCT		0,868	0,758	0,670	0,694	0,703	0,116	0,184	0,186	0,352
COBP	0,142		1,000	1,000	0,978	1,000	0,140	0,168	0,174	0,347
EYMP	0,277	-0,124		1,000	0,990	1,000	0,153	0,168	0,196	0,429
PAGP	0,401	-0,036	-0,094		1,000	1,000	0,158	0,186	0,201	0,448
LANP	0,365	0,022	0,010	-0,011		1,000	0,144	0,177	0,216	0,423
EPNP	0,353	-0,118	-0,169	-0,246	-0,109		0,159	0,198	0,213	0,488
PNCA	2,157	1,967	1,877	1,844	1,938	1,838		0,399	0,371	0,486
PNAI	1,695	1,784	1,782	1,680	1,734	1,622	0,919		0,751	0,362
PNPE	1,680	1,750	1,631	1,606	1,532	1,545	0,991	0,287		0,444
PNSN	1,044	1,057	0,846	0,802	0,861	0,717	0,722	1,016	0,811	

Identidad genética (encima de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal). En rojo los menores valores y en verde los valores más altos. Los valores negativos de las distancias genéticas son equivalentes a cero.

5.3.6.2. Coeficiente de Diferenciación Genética y AMOVA

La **Tabla 48** muestra los valores del coeficiente de diferenciación genética (F'_{ST}) con sus respectivos valores P para las poblaciones naturales de *Sorbus aria* de acuerdo a su localidad de procedencia.

El coeficiente de diferenciación genética en las poblaciones de *Sorbus aria* varió desde $F'_{ST} = 0,887$ ($p < 0,05$) entre los individuos provenientes de la población de La Curva del Observatorio en La Palma y los del Parque Nacional Cabañeros (COBP / PNCA) hasta $F'_{ST} = -0,227$ (siendo un valor negativo, es equivalente a 0,00; $p > 0,05$) entre las muestras de La Curva del Observatorio (COBP) y del El Espigón de los Muchachos (EYMP), ambas de La Palma.

Si consideramos la procedencia de las muestras, puede reportarse una $\bar{F}'_{ST} = -0,034$ (que equivale a 0,00) para las poblaciones de La Palma y $\bar{F}'_{ST} = 0,448$ para las peninsulares. Puesto que solamente se cuenta con una población de Tenerife, no es posible obtener una media interpoblacional para la isla; sin embargo, al integrarla con las poblaciones de La Palma para formar el conglomerado “Canarias” se obtuvo un valor de $\bar{F}'_{ST} = 0,084$.

En cuanto la media del coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones, se han obtenido valores de $\bar{F}'_{ST} = 0,320$ entre Tenerife y La Palma; $\bar{F}'_{ST} = 0,696$ entre Tenerife y la Península y $\bar{F}'_{ST} = 0,638$ entre La

Palma y la Península. La diferenciación genética entre las muestras de Canarias y las de la Península fue de $\bar{F}'_{ST} = 0,646$.

Tabla 48 Coeficiente de diferenciación genética (F'_{ST}) para las poblaciones de *Sorbus aria*

	GYCT	COBP	EYMP	PGAP	LANP	EPNP	PNCA	PNAI	PNPE	PNSN
GYCT										
COBP	0,123*									
EYMP	0,237**	-0,227 ^{ns}								
PGAP	0,387**	-0,084*	-0,175*							
LANP	0,404***	0,140***	0,073***	0,064**						
EPNP	0,448*	0,051 ^{ns}	-0,108*	-0,147 ^{ns}	0,068*					
PNCA	0,880**	0,887*	0,790**	0,804**	0,866***	0,865*				
PNAI	0,661***	0,550***	0,580***	0,594***	0,657***	0,592***	0,496***			
PNPE	0,615***	0,436***	0,531***	0,554***	0,615***	0,510***	0,508***	0,107***		
PNSN	0,631***	0,598***	0,564***	0,571***	0,606***	0,583***	0,552***	0,548***	0,474***	

En rojo el menor valor y en verde el valor más alto. ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

En el AMOVA (**Tabla 49**) se encontró que todas las pruebas de diferenciación para los diferentes niveles jerárquicos fueron significativas. La mayor parte de la varianza fue encontrada dentro de las poblaciones (42,56%), luego entre las regiones (36,57%) y finalmente entre las poblaciones dentro de las regiones (20,86%).

Tabla 49 Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) de la diversidad genética de *Sorbus aria*

FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SUMA DE CUADRADOS	VARIANZA EN LOS COMPONENTES	PORCENTAJE DE VARIACIÓN	
Entre regiones	1	490,560	5,441	36,57	$F_{CT} = 0,366$ **
Entre las poblaciones en las regiones	8	455,757	3,104	20,86	$F_{SC} = 0,328$ ***
Dentro de las poblaciones	185	1171,499	6,332	42,56	
Total	194	2117,815	14,877	100,00	$F_{ST} = 0,574$ ***

GL: grados de libertad, F_{CT} : coeficiente de diferenciación genética entre regiones, F_{SC} : coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones en las regiones, F_{ST} : coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

5.3.6.3. UPGMA y NJ

El dendrograma UPGMA obtenido a partir de las distancias genéticas entre las poblaciones (**Fig. 40**) muestra una evidente agregación de las poblaciones de *Sorbus aria* analizadas según su lugar de procedencia. Pueden observarse dos grupos claramente definidos, el primero constituido por las muestras procedentes del archipiélago canario y el otro formado por las

poblaciones peninsulares. Además, las muestras canarias de diferentes localidades se agrupan atendiendo a su isla de origen.

La definición del dendrograma es elevada puesto que, con excepción de la separación entre los parques nacionales de Sierra Nevada (PNSN) y de Picos de Europa (PNPE) que presentan una fortaleza de 74%, todas las agrupaciones manifiestan una fortaleza del 100%. Destaca en cada grupo la separación de las poblaciones de Tenerife (GYCT) y del Parque Nacional de Cabañeros (PNCA), respectivamente; posiblemente debida al bajo número de individuos analizados en las mismas.

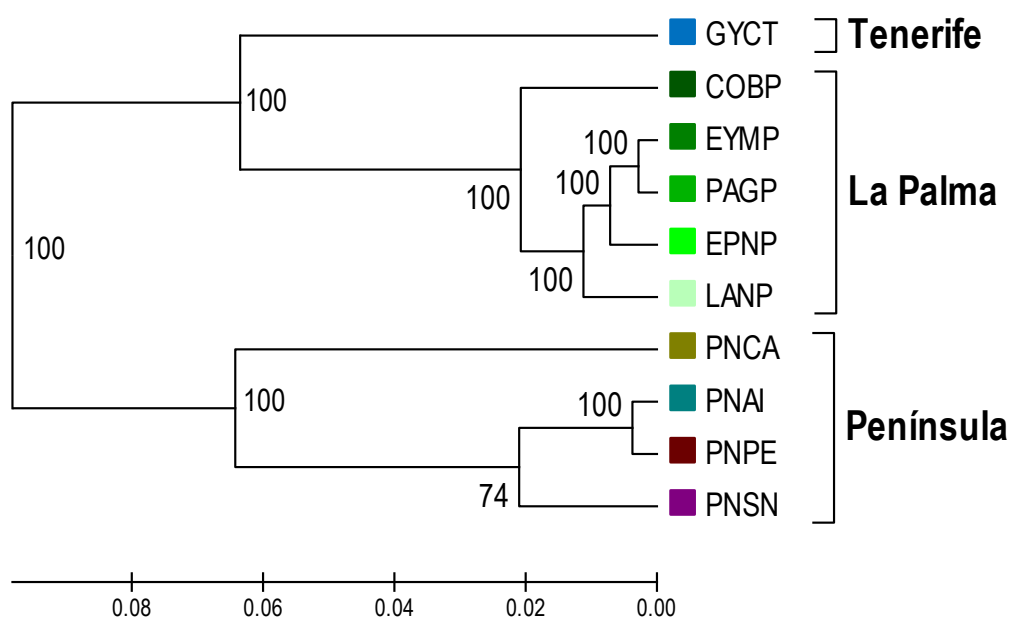


Fig. 40 Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) entre las poblaciones de *Sorbus aria*. Los códigos provienen de la **Tabla 31**

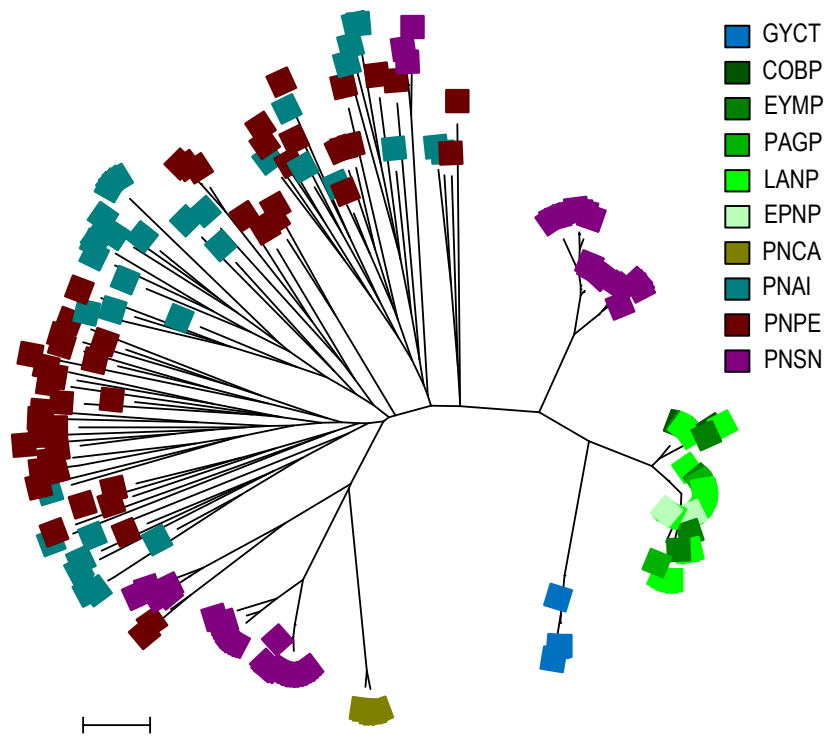


Fig. 41 Neighbor-Joining individual para las poblaciones de *Sorbus aria*. Los códigos provienen de la Tabla 31

Por su parte, el dendrograma NJ (**Fig. 41**) confirmó a nivel individual los resultados que el UPGMA ha mostrado a nivel de poblaciones. Puede observarse que los individuos de Tenerife (GYCT), La Palma (COBP, EYMP, PAGP, EPNP y LANP) y del Parque Nacional Cabañeros (PNCA) se apartan del resto. Este diagrama también aporta una visión más clara de la relación genética existente entre los individuos de la Península Ibérica. Por un lado, se corrobora la estrecha relación entre el Parque Nacional de Aigüestortes y el Parque Nacional de Picos de Europa (PNAI / PNPE) y por otro lado se aprecia nuevamente la diversidad genética de las muestras del Parque Nacional de Sierra Nevada (PNSN) cuyos individuos se relacionan en mayor o menor grado con el resto de las poblaciones peninsulares e incluso se acercan a las canarias.

5.3.6.4. Análisis de Coordenadas Principales

El análisis de coordenadas principales separa en general las muestras canarias de las procedentes de la Península. Igual que en los análisis previos, los individuos del Parque Nacional de Sierra Nevada (PNSN) despliegan una amplia variabilidad genética. Las dos primeras coordenadas del análisis explican el 57,91% de la variación (**Fig. 42**).

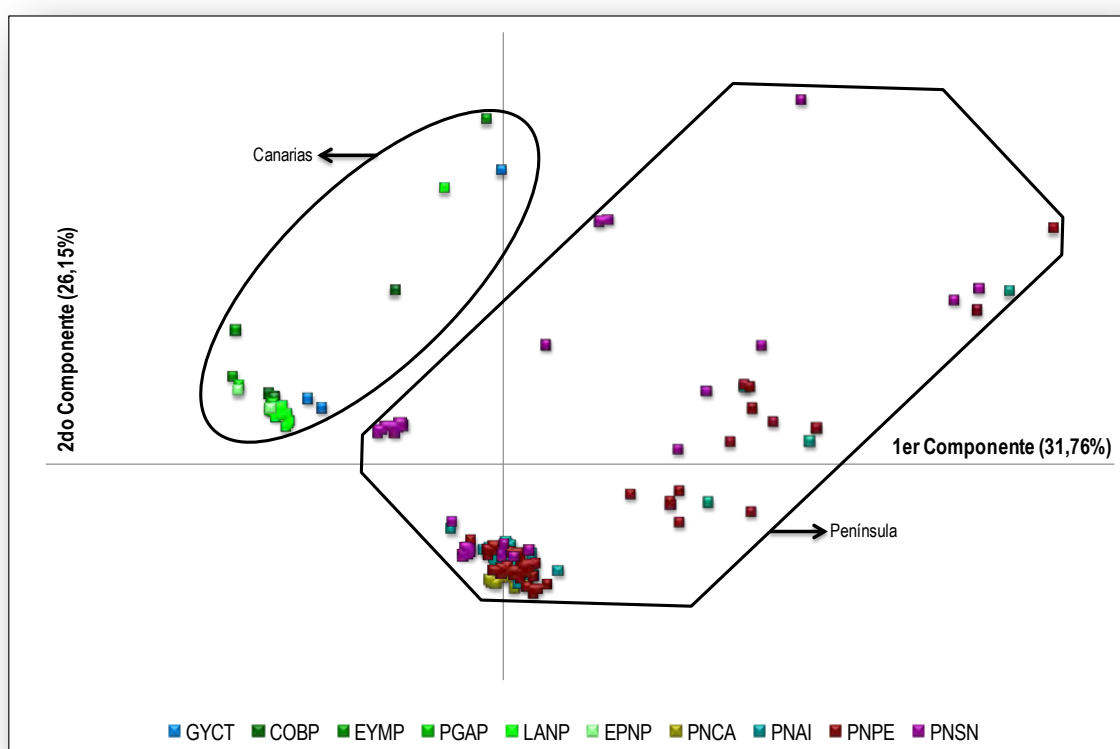


Fig. 42 Análisis de coordenadas principales para las poblaciones naturales de *Sorbus aria*. Códigos de las poblaciones según la **Tabla 31**

5.3.6.5. Análisis Bayesiano

La base de datos para el análisis bayesiano de *Sorbus aria* consistió en 195 individuos, 10 poblaciones y 9 loci. Como en los casos anteriores, las pruebas se hicieron para valores de $K = 1 - 10$ y se obtuvo la máxima probabilidad de los datos en $K = 5$ (**Fig. 43**). Como puede apreciarse en el histograma de barras, en el primer grupo inferido se han concentrado todas las poblaciones de *Sorbus aria* estudiadas de Canarias (GYCT, COBP, EYMP,

PAGP, EPNP y LANP), las muestras del Parque Nacional de Cabañeros (PNCA) se agrupan en el segundo grupo inferido; mientras que en el tercer grupo se reúnen los ejemplares de *S. aria* los Parques Nacionales de Aigüestortes (PNAI) y Picos de Europa (PNPE). Los individuos del Parque Nacional Sierra Nevada (PNSN) fueron asignados a los grupos IV y V. Estos resultados son congruentes con los encontrados tanto en el análisis de coordenadas principales como con el dendrograma NJ.



Fig. 43 Diagrama de barras para las proporciones inferidas con el análisis bayesiano para las poblaciones de *Sorbus aria*. Códigos de las poblaciones según la **Tabla 31**

5.4. Discusión

5.4.1. Triploidía en *Sorbus aria*

Si bien es cierto que *Sorbus aria* ha sido descrita como una especie diploide (Nelson Jones *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2010), también se han definido en el denominado “agregado de *Sorbus aria*” (Robertson *et al.*, 2004b) taxones triploides y tetraploides apomícticos. Dickinson *et al.* (2007) describen especies dentro de la familia Rosaceae, entre las cuales se cita a *S. aria*, constituidas por “microespecies”¹ diploides, triploides y tetraploides; las cuales, de acuerdo con Aldasoro *et al.* (2004), no están reproductivamente aisladas a pesar de ser apomícticas. La complejidad taxonómica de estas “especies intermedias”¹ en el género *Sorbus* se deriva de los efectos combinados de la hibridación, la poliploidía y la apomixia que muchos de sus miembros experimentan de manera natural (Lepší, *et al.*, 2008; Del Río *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2010). Estudios de este género en la Península Ibérica y las islas Baleares (Del Río *et al.*, 2009) han reportado a *S. aria* como una especie diploide que participa en la formación de todas las “especies híbridadas”¹ triploides o tetraploides conocidas en este territorio. De modo que *Sorbus aria* es una especie ampliamente variable, con una serie de microespecies emparentadas que pudieron haberse derivado a través de la poliploidía e hibridación y para las cuales se ha sugerido a *S. aria* como progenitor paternal, ya que existe uniformidad maternal en muchos de los taxones poliploides (Robertson *et al.*, 2004a).

Ha sido ya ampliamente demostrado que tanto la haploidía como la apomixis son fenómenos muy comunes en la subfamilia Maloideae (Dickinson & Campbell, 1991; Campbell *et al.*, 1995). La apomixis es la habilidad natural de al menos 440 géneros de angiospermas para reproducirse asexualmente a través de semillas (Nogler, 1984; Asker & Jerling, 1992; Carman, 1997;

¹ Existe cierta discrepancia en cuanto a la denominación de individuos que surgen como resultado de la introgresión entre especies muy cercanas y taxonómicamente reconocidas del género *Sorbus*. Dichos taxones muestran características intermedias a las de sus predecesores, presentan poliploidía y se reproducen por apomixia. De aquí en adelante se utilizará el término “microespecie” para referirse a ellos.

Cosendai & Hörandl, 2010). De acuerdo con Carman (1997), la familia Rosaceae ocupa el segundo lugar en número de géneros (12) que presentan apomixia dentro de las angiospermas dicotiledóneas; superada únicamente por los 35 géneros de similar condición en la familia Asteraceae. Sin embargo, la proporción de géneros apomícticos relativa al total de géneros en la familia es mayor en las Rosáceas (12 de 85 = 14,1%) que en las Asteráceas (22 de 1600-1700 = 1,3% - 1,4%) (Noyes, 2007). Estas dos familias dicotiledóneas y la familia Poaceae (monocotiledónea) abarcan el 75% de todos los géneros apomícticos en las angiospermas (Carman, 1997).

Según Cosendai & Hörandl (2010) en poblaciones mixtas un donador apomíctico puede fertilizar una planta con reproducción sexual, de modo que se transfiere la apomixia a la descendencia de esta última; sin embargo, el polen de una planta de reproducción sexual no fertiliza a una apomíctica debido a la formación partenogénica de la ovocélula. Esta hibridación unidireccionalidad puede resultar en una introgresión de la apomixis a partir de las poblaciones apomícticas en las poblaciones de reproducción sexual; lo cual coincide con los hallazgos de Chester *et al.* (2007) en los que ninguno de los taxones agrupados como *S. anglica* y *S. latifolia*, tienen a *S. aria* como progenitor femenino sino que *S. aria* suele ser el donante y no receptor de polen en los procesos de hibridación.

De acuerdo con Robertson *et al.* (2004a y b), un pequeño número de clones puede justificarse en taxones recientemente derivados por apomixia; pero debe comprobarse la habilidad de los taxones para generar diversidad genética y así determinar si el comportamiento en las poblaciones naturales obedece a una apomixia obligada o facultativa. Si estuviéramos frente a una apomixia facultativa, entonces la especie debería ser capaz de generar una proporción de su descendencia por métodos sexuales y garantizar así la variabilidad genética. En caso contrario (apomixis obligada), es muy improbable la generación de nuevos genotipos en el mismo nivel de ploidía a partir del taxón apomíctico existente, puesto que no se producen óvulos disponibles para ser fecundados.

Hörandl (2010) afirma que la poliploidía y la apomixis están estrechamente ligadas y que plantas con apomixis gametofítica (como las rosáceas) son casi exclusivamente poliploides. Señala la existencia de sólo dos casos bien documentados de apomixia en plantas diploides: *Boeckera holboellii* (Koltunow & Grossniklaus, 2003) y algunas especies del género *Paspalum* (Siena *et al.*, 2008). En su estudio, Hörandl (2010) también asegura que tanto la autofecundación como la apomixia aparecen frecuentemente como estrategias alternativas en la evolución de las plantas con flores porque resultan favorables en los escenarios de colonización y en situaciones de cuello de botella. Al parecer, la autofecundación es más común en plantas pioneras (Barrett, 1996; Bernardello *et al.*, 2001) mientras que la apomixia es una forma frecuente de reproducción en las especies que colonizaron previamente zonas glaciales y grandes altitudes (Bierzychudek, 1985; Hörandl, 2006).

Prematuramente podríamos deducir que debido a la gran proporción de individuos genéticamente idénticos en Canarias, *S. aria* puede estar sufriendo apomixis facultativa tal y como lo afirman Del Río *et al.* (2009); aunque lo más común suele ser la apomixis obligada en las especies triploides (Antonius & Nybon, 1995). Por esto, en el caso de *S. aria* sería aventurado tomar una u otra posición sin el análisis previo de progenitores y descendientes que nos revelen si las semillas que se están produciendo en el ambiente tienen idéntico fenotipo multilocus que sus progenitores (apomixia) o si, efectivamente, existe evidencia de reproducción sexual. No obstante, los resultados obtenidos parecen confirmar el carácter apomíctico en las poblaciones canarias y algunas peninsulares; principalmente por la elevada proporción de individuos genéticamente idénticos en las mismas (**Tabla 44**) y por el hecho de que tanto las poblaciones canarias como las poblaciones de los Parques Nacionales de Cabañeros (PNCA) y Sierra Nevada (PNSN), donde todos los individuos son triploides, albergan también un exceso de heterocigóticos (**Tabla 46**).

El carácter apomíctico de las poblaciones triploides (PNSN y Canarias, sobre todo) ha provocado que el número de ejemplares iguales sea elevado y, consecuentemente, que no se genere la diversidad genética propia de una recombinación genética, promoviendo el no incremento de la diversidad genotípica en las poblaciones; pero manteniendo la heterocigosidad de los

genotipos híbridos al evitar la segregación meiótica y, por lo tanto, la variación alélica a nivel individual (Hörandl, 2010). La asociación entre la poliploidía y la apomixis ha sido ampliamente documentada y se ha sugerido que la primera actúa como un estímulo para la segunda, como un prerrequisito para su mantenimiento o ambos (Grimanelli *et al.*, 2001; Whitton *et al.*, 2008). En el caso de las poblaciones canarias es posible que el carácter apomíctico vaya unido a un proceso de efecto fundador y deriva genética dando lugar, por un lado, a una fuerte disminución de la variabilidad genética y, por el otro, al desarrollo de divergencia genética muy relevante. Por el contrario, las poblaciones de los Parques Nacionales de Aigüestortes (PNAI) y de Picos de Europa (PNPE) presentan un elevado número de ejemplares diploides y se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg; albergando un escaso porcentaje de individuos genéticamente idénticos (**Tabla 44**) y esto último se ve reflejado en sus mayores niveles de diversidad genética.

Por lo tanto, los resultados obtenidos parecen mostrar la existencia de diferentes mecanismos reproductivos que tienen lugar en las distintas poblaciones. Las poblaciones de los parques nacionales de Aigüestortes (PNAI) y de Picos de Europa (PNPE) disponen de un sistema reproductivo sexual y posiblemente se trate de ejemplares autoincompatibles en los cuales la fecundación cruzada da lugar elevados niveles de diversidad genética (tanto en número medio de alelos por locus como en la heterocigosidad (**Tabla 45**), consecuencia de su capacidad de recombinación genotípica. Este fenómeno no sería extraño ya que es bien conocido que los relativos sexuales de las plantas apomícticas son usualmente autoincompatibles y de apareamiento cruzado obligatorio (Asker & Jerling, 1992; Hörandl, 2010), un aspecto que a su vez se ve reflejado porque se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Mientras que en las poblaciones canarias y la de los Parques Nacionales de Cabañeros (PNCA) y Sierra Nevada (PNSN), la imposibilidad de recombinación genética que viene como resultado de la reproducción apomíctica, los niveles de diversidad son menores.

Estos resultados coinciden con los descritos recientemente por Robertson *et al.* (2010), quienes en un análisis de las poblaciones de 10 especies nativas,

4 introducidas y 4 microespecies presumiblemente híbridas del género *Sorbus* en Avon Gorge (Reino Unido); encontraron que los individuos de taxones con reproducción sexual eran diploides y mostraban valores de diversidad genética mayores que aquellos con reproducción apomíctica (poliploides) y cuyos bajos niveles de diversidad genética sugerían un origen monofilético. También demostraron que la aparición de novedad genética en el complejo agámico de este género en Avon Gorge ha sido impulsada principalmente por una serie de hibridaciones interespecíficas y cruces entre los taxones cercanamente relacionados en donde cada nuevo genotipo se fija y se propaga a través de reproducción apomíctica. No obstante, en el caso de las islas Canarias no se han reportado otras especies del género *Sorbus*; por lo que los fenómenos de hibridación e introgresión en las islas (al menos recientemente) están descartados.

El origen de *Sorbus aria* en Canarias es más difícil de determinar, sobre todo porque sería necesario analizar las poblaciones más cercanas (las del norte de África) que no pudieron recolectarse. Existen varias teorías que tratan de explicar la aparición de una microespecie triploide. En su estudio del género *Taraxacum* sp. (Asteraceae), Meirmans *et al.* (2003) han descrito la posibilidad de que un linaje triploide procediera de un antecesor diploide capaz de producir citotipos diploides (que seguían produciendo ambos citotipos) y triploides (incapaces de producir diploides); con la reducción progresiva y posterior desaparición del citotipo diploide. Chester *et al.* (2007) que estudiaron el género *Sorbus* sp. en las islas Británicas, han sugerido que los gametos femeninos producidos asexualmente de un antecesor tetraploides pseudógamo pudieron originar un linaje triploide al ser fecundados por polen normalmente producido. En el caso de *S. arranensis*, Robertson *et al.* (2004b) han propuesto el origen de esta microespecie triploide a partir de la reducción del polen de otra microespecie tetraploide del “agregado *S. aria*” que llegó a fertilizar una especie diploide.

De cualquier modo, lo más probable es que el linaje triploide encontrado en Canarias haya tenido su origen previamente a su llegada a las islas; debido, como ya se ha señalado, a la ausencia de otras especies del género en el archipiélago y además a que, según Crawford *et al.* (2006), la evolución de

poliploides a partir de ancestros diploides *in situ* en islas oceánicas es poco común. En la península, sin embargo, el citotipo triploide de *S. aria* pudo haber surgido a partir de hibridaciones interespecíficas entre *S. aria sensu stricto* (2n) y *S. torminalis* (4n); esta última un autotetraploides. Esta sería una adaptación de la teoría que sostienen Robertson *et al.* (2004a) para el origen de *S. arranensis* (3n) en Arran.

La partenogénesis geográfica sostiene que los individuos asexuales usualmente tienen mayor distribución y esta es más septentrional (al menos en el hemisferio norte) que la de sus relativos sexuales (Hörandl *et al.*, 2008). Ya que el fenómeno ocurre tanto en plantas como en animales, en el caso de las plantas superiores Bierzychudek (1985) concluyó que los grupos de plantas apomícticas tienden, además, a ocupar mayores altitudes y colonizar áreas que han sufrido glaciación previamente. Las poblaciones de *Sorbus aria* estudiadas mostraron un cierto patrón geográfico, ya que las poblaciones triploides resultaron ser las más meridionales y aquellas que se constituían parcial o totalmente de individuos diploides estaban situadas en el norte (**Fig. 39**); por lo tanto, es posible que en *S. aria*, como también ocurre con *Boechea holboellii* (Brassicaceae), la apomixis sea una ventaja para la colonización territorios hacia el sur, mientras que los diploides prevalecen en el norte (Dobeš *et al.*, 2004; Sharbel *et al.*, 2005).

Además, parece haber una correspondencia entre la ploidía y la altitud de las poblaciones analizadas ya que la población del Parque Nacional de Aigüestortes (PNAI), de donde todas las muestras resultaron ser diploides, la altitud promedio fue 691 msnm; en tanto que en el resto de las poblaciones supera los 848 msnm. Sin embargo, esta circunstancia no se aprecia en el Parque Nacional de Picos de Europa (PNPE) en relación con la distribución de los citotipos dentro de la población.

En el estudio de *Taraxacum*, sección Ruderalia; Meirmans *et al.* (2003) encontraron un predominio del citotipo triploide (66,4%) frente al citotipo diploide (33,6%) en el total de plantas analizadas. Estos autores hallaron también una diferenciación ecológica entre los citotipos, siendo los diploides más frecuentes a mayores elevaciones y los triploides a bajas; pero este

parámetro explicaba sólo una pequeña parte de la variación en el nivel de ploidía. En un estudio anterior Meirmans *et al.* (1999) habían reportado que las frecuencias relativas a triploides en las poblaciones de Suiza aumentaban en la medida que lo hacían las perturbaciones por la actividad humana.

De acuerdo con Meirmans *et al.* (2003), si los triploides son estrictamente asexuales y están reproductivamente aislados de los diploides, los patrones genéticos espaciales de los citotipos pueden ser independientes; esto es debido a que en los diploides la estructura está restringida tanto a la dispersión de polen como de semillas, mientras que los triploides dependen únicamente de la última opción. La reproducción asexual a través de apomixis ofrece un método seguro de perpetuación de nuevas microespecies y genotipos aloploidos adaptados a condiciones ambientales específicas y permite de manera inmediata, y muchas veces total, el aislamiento reproductivo de los taxones parentales (Robertson *et al.*, 2010). Asociada con los procesos de hibridación y poliploidía, la apomixia contribuye al establecimiento de la novedad taxonómica que surge como consecuencia de estos procesos al fijar las combinaciones exitosas de genes y propagar esos genotipos a través de generaciones (Barcaccia *et al.*, 2006; Hörandl & Paun, 2007; Whitton *et al.*, 2008).

5.4.2. Diversidad Genética

A pesar de la extensión de los estudios genéticos a través de microsatélites en plantas dicotiledóneas triploides, la mayor parte de los resultados se corresponden con cultivares (*Pyrus* spp., Kimura *et al.*, 2002; *Solanum tuberosum*, Ghislain *et al.*, 2006; *Malus pumila*, Ramos-Cabrer *et al.*, 2007; *Malus X domestica*, Cannava *et al.*, 2008; *Eriobotrya japonica*, Watanabe *et al.*, 2008; *Dianthus caryophyllus*, Yagi, 2009; *Rosa damascena*, Kiani *et al.*, 2010; entre otros). Estos reportes agrológicos suelen omitir los datos de diversidad genética con excepción (en algunos casos) del número medio de alelos por locus (*A*) obtenido en la caracterización de los marcadores moleculares en cuestión.

Cuando se han abordado estudios de poblaciones vegetales naturales y las muestras analizadas resultan tener distintos niveles de ploidía, los investigadores suelen optar por restringir el análisis de diversidad a los individuos diploides (Oddou-Muratorio *et al.*, 2001; Anderssen *et al.*, 2005; Kloda *et al.*, 2008); esto se debe a la mayor dificultad para cuantificar la diversidad genética y la diferenciación entre poblaciones de organismos poliploides que para poblaciones exclusivamente diploides (Obbard *et al.*, 2006; Kloda *et al.*, 2008) y una vez descartados otros niveles de ploidía se utilizan los estadísticos estándares de diversidad genética (A , H_o , H_e , P) para microsatélites nucleares. No obstante, otros estudios han evaluado la variación genética al cuantificar la diversidad de genotipos multilocus, tal como lo recomiendan Robertson *et al.* (2004b) para especies triploides apomícticas y, siendo que de esta manera se analizan las poblaciones poliploides (Refoufi & Esnault, 2006; Andreakis *et al.*, 2007; Vinson *et al.*, 2009; González-González, 2010), los índices de medición suelen ser distintos aunque análogos.

Investigaciones realizadas a través de microsatélites en poblaciones naturales de *Sorbus torminalis* en Francia (Oddou-Muratorio *et al.*, 2001, Oddou-Muratorio *et al.*, 2003) y en Dinamarca (Rasmussen y Kollman, 2008) han revelado un número medio de alelos por locus (A) de 10,7 - 13,5 y 10, respectivamente; mientras que en los análisis de *S. domestica* en Suiza (Kamm *et al.*, 2009) se encontró $A = 6,89$. Todos estos valores son menores que el encontrado para *Sorbus aria* a nivel de especie ($N_A = 15,66$; **Tabla 45**). Al considerar las poblaciones individualmente, el número medio de alelos fue mayor en la población con ambas ploidías (PNPE; $N_A = 11,11$) y en la diploide (PNAI; $N_A = 9,56$) que en las poblaciones triploides de Canarias ($N_A = 2,79$); lo cual coincide con los hallazgos de Robertson *et al.* (2010) en donde los valores del número total de alelos diferentes a través de los loci (A') fueron menores en los taxones poliploides ($A' = 10 - 17$) que en los diploides ($A' = 26 - 38$), sugiriendo un origen monofilético (eventos de hibridación simple) y el subsecuente aislamiento por reproducción a través de apomixis en los citotipos triploides.

Por otro lado, Robertson *et al.* (2004a) encontraron valores de diversidad genética más bajos para la especie triploide *S. arranensis* ($H_g = 0,09$) que para la tetraploide *S. psedofennica* ($H_g = 0,63$). En *Sorbus aria* la diversidad genética fue menor para las poblaciones canarias ($H_s = 0,718$) que para las peninsulares ($H_s = 0,762$) donde existen diferentes grados de ploidías. En general, se ha demostrado mediante el uso de isoenzimas y RAPD's que las especies vegetales endémicas de canarias disponen de unos grados de diversidad elevados (Francisco-Ortega y Santos, 2001; Sosa *et al.*, 2002; González-Pérez *et al.*, 2008); sin embargo, esta generalización está por demostrarse al utilizar microsatélites.

Contrariamente, la diversidad genética encontrada en *S. torminalis* ($H_e = 0,691$; Oddou-Muratorio *et al.*, 2001) y en *S. domestica* ($H_e = 0,547$; Kamm *et al.*, 2009) fue menor que la registrada para *S. aria* a pesar de que en el estudio de *S. torminalis* solo se tomaron en cuenta los individuos diploides y que *S. domestica* ha sido reportada como una especie diploide que no participa en fenómenos de hibridación (Del Río *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2010). En otro extremo se encuentran los resultados arrojados por los análisis realizados con microsatélites para *S. milensis* (3n) en la República Checa en los cuales no se reveló variación genética, suceso que fue atribuido a la singularidad del origen evolutivo y a la reproducción apomíctica de esta especie (Lepši *et al.*, 2008).

Ahora bien, los análisis genéticos llevados a cabo en *Sorbus aria* diferencian claramente las localidades presentes en el archipiélago canario con respecto a aquellas analizadas de la Península Ibérica ($\bar{F}'_{ST} = 0,646$; **Tabla 45**). Esta elevada diferenciación genética es probablemente fruto del aislamiento geográfico que puede estar actuando en combinación, quizás, con un efecto fundador que *S. aria* haya sufrido en su aparición en las islas; diferenciándose genéticamente de las poblaciones peninsulares (Kučerová *et al.*, 2010). Consecuentemente, se pudo haber propiciado una separación genética entre las mismas ($\bar{F}'_{ST} = 0,320$) y es posible que por ello dispongan de menores niveles de variación genética. En cualquiera de los casos, los resultados sobre las poblaciones son equivalentes y se reflejan en una importante diferenciación genética y bajos niveles de variación genética (deriva

genética); tal y como se ha detectado. Valores de diferenciación genética muy similares a los encontrados entre las poblaciones de *S. aria* de Tenerife y La Palma fueron detectados en pruebas realizadas con microsatélites para *S. torminalis* ($F_{ST} = 0,341$; Rasmussen & Kollmann, 2008 y $F_{ST} = 0,228$; Kučerová *et al.*, 2010) que también ocurre en poblaciones muy pequeñas, con distribución dispersa y bajos niveles de flujo genético entre sus poblaciones (Bednorz *et al.*, 2006). Los valores detectados con aloenzimas para esta misma especie fueron mucho menores ($F_{ST} = 0,067$; Hoebee *et al.*, 2007), lo que no sorprende ya que suele detectarse mayor variabilidad con el uso de microsatélites (Bakker *et al.*, 2001; Nagamitsu *et al.*, 2004).

En Canarias, la relación entre los ejemplares de ambas islas es relevante según se observa en las diferentes agrupaciones espaciales (UPGMA, NJ y Structure), hasta el punto de que podemos considerar que pueden proceder de un único ancestro o de una única introducción. No obstante; el bajo número de ejemplares de Tenerife (GYCT) y el hecho de que sean todos idénticos genéticamente condiciona mucho las conclusiones al respecto, pudiéndose considerar como el resultado de un conjunto más numeroso de ejemplares diferenciados de La Palma o que su diferenciación genética sea consecuencia de la deriva, un proceso muy difícil de discernir. A pesar de todo, sorprende que existan 2 alelos exclusivos (de 30 en total) en los cuatro individuos de Tenerife. Entre las muestras de La Palma no se encontró ningún alelo exclusivo a una sola población; pero tres alelos estuvieron presentes sólo en poblaciones palmeras (**Tabla 44**). La existencia de individuos con el mismo genotipo en Tenerife también se encontró en *Bencomia exstipulata*, otra especie poliploide de la alta montaña canaria, para la que se identificó un total de 14 genotipos procedentes de La Palma y tan solo 7 para Tenerife a pesar de que el número de muestras analizadas procedentes de Tenerife fue el doble que las de La Palma (González-Pérez *et al.*, 2009a). Las pruebas realizadas por García-Verdugo *et al.* (2009) con AFLP en diferentes subespecies de *Olea europea* entre las cuales se cuenta una subespecie canaria (*Olea europea* ssp. *guanchica*) revelaron mayor diversidad genética a nivel poblacional en Tenerife que La Palma; se ha relacionado este fenómeno con la actividad volcánica de las islas, sustentando que los eventos volcánicos en La Palma han podido

propiciar una más reciente colonización, patrones de diversidad intrapoblacional y diferenciación interpoblacional determinados por la edad geológica.

En las poblaciones peninsulares, los resultados de heterocigosidad para las poblaciones (**Tabla 44**) coinciden con los obtenidos mediante el número medio de alelos por locus ya que los valores más elevados fueron los encontrados en la población con varios niveles de ploidía (PNPE; $H_s = 0,831$) y la diploide (PNAI; $H_s = 0,814$). Esto parece indicar que si bien en una población diploide la reproducción sexual permite un mayor nivel de diversidad genética que el de una población triploide debido a la reproducción apomíctica de esta última; la coexistencia de ambos citotipos en una misma población garantiza una diversidad genética todavía mayor a la obtenida cuando los citotipos se desarrollan de manera independiente.

Por otra parte; la diferenciación genética entre las poblaciones peninsulares fue alta ($\bar{F}'_{ST} = 0,448$; **Tabla 45**), aunque en menor proporción a la diferenciación que existe entre estas con Tenerife ($\bar{F}'_{ST} = 0,696$) o La Palma ($\bar{F}'_{ST} = 0,638$). El análisis de estructuración genética de *Sorbus aria* de la Península Ibérica (**Fig. 43**) muestra que las poblaciones de Aigüestortes (PNAI) y Picos de Europa (PNPE) podrían estar compartiendo ancestros comunes, posiblemente relacionado con el citotipo diploide, ausente en las demás poblaciones. Basados en lo anterior, todo parece indicar que en las poblaciones ubicadas al norte de la Península Ibérica (PNPE y PNAI) la diversidad genética fue mayor gracias a la presencia de individuos diploides que pueden reproducirse sexualmente y propician la existencia de un mayor número de alelos exclusivos (11 y 10, respectivamente; **Fig. 39**).

5.4.3. Consideraciones para la Conservación Genética

Tomando en cuenta el valor de la diferenciación genética encontrado entre las poblaciones de *Sorbus aria* de La Palma y Tenerife ($\bar{F}'_{ST} = 0,320$), el movimiento de individuos de una isla a otra podría involucrar la ruptura de la cohesión y adaptaciones locales que se han desarrollado en cada isla de

manera independiente. Por lo tanto, en términos de conservación genética, las traslocaciones a Tenerife podrían ser desaconsejables.

La ocurrencia de individuos exclusivamente triploides en las poblaciones canarias y la gran proporción de genotipos genéticamente idénticos tanto en Tenerife (100%) como en La Palma (86,96%) hace muy probable que los procesos de reproducción de esta especie en el archipiélago canario involucren la apomixia; sin embargo, serán necesarios análisis entre progenitores y descendientes a fin de revelar el grado en que la producción de semillas en cada población hace uso de la apomixia obligada (dando lugar a genotipos idénticos a sus progenitores) o si además de la apomixis, las poblaciones también recurren a procesos de reproducción sexual (apomixis facultativa).

Si se comprobara la apomixia facultativa en las poblaciones de canarias, serían factibles los reforzamientos interpoblacionales dentro de cada isla, bien a través de cruzamientos controlados o por la implementación de bancos de semilla para la conservación de la variabilidad genética en bancos de germoplasma. En caso contrario, y debido a la existencia alelos exclusivos tanto en Tenerife como en La Palma, los esfuerzos deberían concentrarse en la conservación de estos alelos propios de cada isla con el propósito de mantener la diversidad genética existente. La detección de nuevos efectivos que pudieran aportar otros genotipos sería de mucha importancia en el incremento de la variabilidad de *S. aria* en las islas.

Finalmente, siendo que las poblaciones más septentrionales de la península presentaron mayor riqueza genética; esta información puede ser una herramienta importante en el establecimiento de estrategias de conservación y futuros planes de manejo. Identificar y salvaguardar a las poblaciones que contengan individuos diploides podría representar la conservación de la mayor variabilidad genética. Es posible que la revisión taxonómica del citotipo triploide analizado en este estudio también pueda dar más luces acerca de la microespecie de *S. aria* presente en Canarias.

Conclusiones



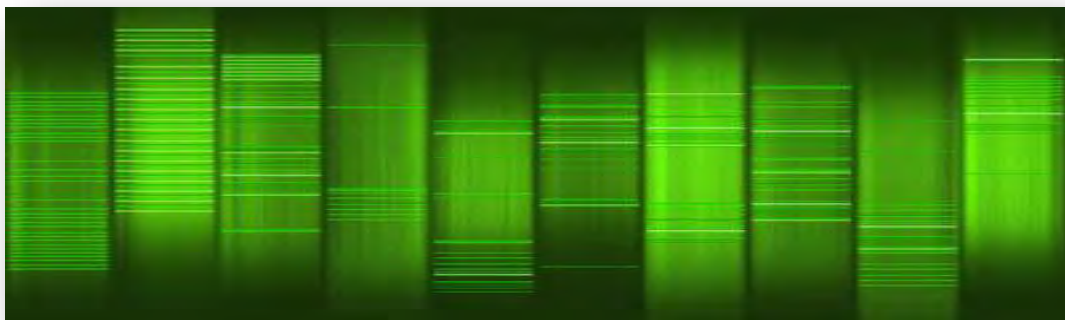
1. Se han analizado un conjunto de cebadores moleculares que amplificaron 8 microsatélites polimórficos en tres especies de *Ilex*: *I. perado*, *I. canariensis* e *I. azorica*. Además, se han caracterizado y aislado cebadores específicos que amplificaron 6 microsatélites variables en *Silene nocteolens* y 9 microsatélites polimórficos en *Sorbus aria*.
 2. Para el caso de *Ilex*, la matriz de genotipos obtenida con los 8 microsatélites reveló que la mayoría de las muestras catalogadas como *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* eran genéticamente iguales, existiendo solo 5 genotipos diferentes entre todos los ejemplares analizados.
 3. Todos los sistemas de agrupamiento e índices de diferenciación genética utilizados, y basados en los marcadores moleculares, separan claramente los individuos y poblaciones de *Ilex perado*, *Ilex azorica* e *Ilex canariensis*; por lo que constituyen entidades genéticamente diferentes. Sin embargo, los marcadores moleculares no diferencian los individuos de ambas subespecies de *Ilex perado*, compartiendo el mismo acervo genético; a la vez, sus poblaciones muestran una variabilidad genética más relacionada con su isla de origen que con su categoría taxonómica.
 4. Las dos únicas poblaciones de *Silene nocteolens* existentes albergan unos elevados niveles de variabilidad genética, superiores a los detectados en otros endemismos vegetales del archipiélago Canario. Unos niveles sorprendentes dado su reducida distribución, su carácter endémico y su aislamiento geográfico. Posiblemente, el grado de perennidad de los individuos y una reproducción mayoritariamente alógama explicaría, al menos parcialmente, estos elevados niveles de variabilidad genética.
 5. Existe un escaso nivel de diferenciación genética entre las poblaciones de *Silene nocteolens*, sugiriendo la existencia de un considerable flujo genético entre las mismas. No obstante, se detectaron alelos exclusivos en ambos núcleos poblacionales, lo cual puede ser debido a la existencia de una estructuración genética a pequeña escala.
-

6. En la población de *Silene nocteolens* de Montaña Blanca se ha detectado correlación entre la distancia geográfica y el nivel de diferenciación genética a menos de 10 m; esto se puede explicar mediante la existencia de una limitada dispersión de semillas en la población. La recolección de semillas para la formación de bancos de germoplasmas debería considerar esta distancia de separación para garantizar la preservación de una mayor diversidad genética.
 7. La dinámica reproductiva de *Silene nocteolens* detectada a través de microsatélites indica unos niveles de endogamia que rondan el 32%. Sin embargo, la mayor parte de los individuos homocigóticos parecen morir en los primeros estadios de la vida de la especie, ya que existe una importante relación entre el grado de endogamia y la tasa de mortalidad; así que no se esperan fenómenos de depresión endogámica sino un mantenimiento de la diversidad genética.
 8. Las poblaciones analizadas de *Sorbus aria* presentan diferentes niveles de ploidía, siendo diploides los individuos analizados del Parque Nacional de Aigüestortes, mientras que el resto de las poblaciones analizadas (incluidas las poblaciones canarias) fueron triploides; a excepción de la población del Parque Nacional de Picos de Europa donde coexisten individuos de ambas ploidías en proporciones de 78,44% y 21,56% de diploides y triploides, respectivamente.
 9. El grado de diversidad genética detectado en las poblaciones canarias de *Sorbus aria* fue mucho menor que el encontrado en las poblaciones peninsulares. De hecho, las poblaciones enteramente triploides mostraron menor diversidad genética que aquellas donde el citotipo diploide estuvo presente, posiblemente consecuencia de la apomixis en las poblaciones triploides.
 10. A pesar de la diferenciación genética entre las poblaciones de *Sorbus aria* en Canarias, se encontró una mayor diversidad genética en Tenerife que en La Palma; sin embargo, existen alelos exclusivos en cada isla. Por lo tanto, la movilidad de individuos de La Palma a Tenerife debería evitarse;
-

pero en caso extremo (dado el reducido número de efectivos en Tenerife) debe llevarse con sumo cuidado, a fin de evitar la reducción de la variación genética local.

11. Todos los resultados y conclusiones obtenidas se basan en el análisis y variabilidad de microsatélites, los cuales han demostrado su carácter neutral. Por ello, las recomendaciones señaladas deben ser consideradas con precaución en los programas de conservación genética que se desarrollen en las diferentes especies o poblaciones.

Bibliografía



- Aldasoro, J.J.; Aedo, C.; Garmendia, F.M.; Pando de la Hoz, F. & C. Navarro (2004) Revision of *Sorbus* Subgenera *Aria* and *Torminaria* (Maloideae – Rosaceae). Systematic Botany Monographs 69: 148.
- Allendorf, F.W. & G. Luikart (2007) Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Australia.
- Allendorf, F.W.; Hohenlohe, P.A. & G. Luikart (2010) Genomics and the Future of Conservation Genetic. Nature Reviews Genetics 11: 679-709.
- Alvarez-Buylla, E.R.; Chaos, Á.; Piñedo, D. & A.A. Garay (1996) Demographic Genetic of a Pioneer Tropical Tree Species: Patch dynamics, seed dispersal, and seed banks. Evolution 50: 1155-1166.
- Anderssen, N.S.; Seigismund, H.R.; Meyer, V. & R.B. Jørgensen (2005) Low Level of Gene Flow from Cultivated Beets (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) into Danish Populations of Sea Beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *maritima* (L.) Arcangeli). Molecular Ecology 14: 1391-1405.
- Andersson, H. (1999) Female and Hermaphrodite Flowers on a Chimeric Gynomonoecius *Silene vulgaris* Plant Produce Offspring with Different Genders: A case of heteroplasmic sex determination? Journal of Heredity 90: 563-565.
- Andreakis, N.; Kooistra, W.H.C.F. & G. Procaccini (2007) Microsatellite Markers in an Invasive Strain of *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): Insights in ploidy level a sexual reproduction. Gene 407: 144-151.
- Andrews, S. (1983) A Reappraisals of *Ilex aquifolium* and *I. perado* (Aquifoliaceae). Kew Bulletin 39: 141-155.
- Antonius, K. & H. Nybom (1995) Discrimination between Sexual Recombination and Apomixis/automixis in a *Rubus* Plant Breeding Programme. Hereditas 123: 205-213.
-

- Arboal, J.R.; Arévalo, J.R. & Á. Fernández (2005) Allometric Relationship of Different Tree Species and Stand above Ground Biomass in the Gomera Laurel Forest (Canary Islands). *Flora* 200: 264-274.
- Arechavaleta, M.; Rodríguez, S.; Zurita, N. y A. García (2010) Lista de Especies Silvestres de Canarias: Hongos, plantas y animales terrestres. 2009. Gobierno de Canarias, España.
- Arévalo, J.R.; Delgado, J.D. & J.M. Fernández-Palacios (2007) Variation in Fleshy Fruits Fall Composition in an Island Laurel Forest of the Canary Islands. *Acta Oecologica* 32: 152-160.
- Asker, S.E. & L. Jerling (1992) *Apomixis in Plants*. Boca Roton, Fl: CRC Press. Florida, E.U.
- Avise, J.C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall. New York, USA.
- Ayala, F.J. (1982) *Population and Evolutionary Genetics*. The Benjamin/Cummings Publishing, California, USA.
- Baas, P. (1978) Inheritance of Foliar a Nodal Anatomical Characters in some *Ilex* Hybrids. *Botanical Journal of the Linnean Society* 77: 41-52.
- Bakker, E.G.; Van Dam, B.C.; Van Exk, H.J. & E. Jacobsen (2001) The Description of Clones of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. with Microsatellite and AFLP in an Ancient Woodland. *Plant Biology* 3: 616-621.
- Bañares, Á.; Carqué, E.; Durbán, M.; González, M.A.; Marrero, M.V. y P. Sosa (2002) *Biología de la Conservación de la Flora Amenazada del Parque Nacional del Teide (Islas Canarias)*. Organismo Autónomo Parques Nacionales, España.
-

- Bañares, Á.; Marrero, E.; Carqué, E. y Á. Fernández (2003) Plan de Recuperación de la Flora Amenazada del Parque Nacional de Garajonay, La Gomera (Islas Canarias): Germinación y restitución de *Pericallis hamsenii*, *Gonospermum gomerae* e *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*. Botánica Macaronésica 24: 3-16.
- Bañares, Á.; Blanca, G.; Güemes, J.; Moreno, J.C. y S. Ortiz (2004) Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. DGCN, Madrid, España.
- Barcaccia, G.; Arzenton, F.; Sharbel, T.F.; Varotto, S.; Parrini, P. & M. Lucchin (2006) Genetic Diversity and Reproductive Biology in Ecotypes of the Facultative Apomictic *Hypericum perforatum* L. Heredity 96: 322-334.
- Barluenga, M.; Austerlitz, F.; Elzinga, J.A.; Teixeira, S.; Goudet, J. & G. Bernasconi (2011) Fine-scale Spatial Genetic Structure and Gene Dispersal in *Silene latifolia*. Heredity 106: 13-24.
- Barrett, S.C.H. (1996) The Reproductive Biology and Genetics of Islands Plants. Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences 351: 1271-1280.
- Barrett, S.C.H. & L.D. Harder (1996) Ecology and Evolution in Plant Mating. Trends in Ecology and Evolution 11: 73-79.
- Bernardello, G.; Anderson, G.J.; Stuessy, T.F. & D.J. Crawford (2001) A Survey of Floral Traits, Breeding Systems, Floral Visitors, and Pollination System of the Angiosperm of the Juan Fernández Islands (Chile). Botanical Review 67: 255-308.
- Beattie, A.J. (1995) Natural History at the Cutting Edge. Ecological Economics 13: 93-97.
-

- Bednorz, L.; Myczko, L. & P. Kosinski (2006) Genetic Variability and Structure of the Wild Service Tree (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz) in Poland. *Silvae Genetica* 55: 197-202.
- Beerli, P. (2004) Effect of Unsamped Populations on the Estimation of Population Sizes and Migration Rate between Samped Populations. *Molecular Ecology* 13: 827-836.
- Biere, A. (1991) Parental Effects in *Lychnis flos-cuculi*. I: Seed-size, germination and seedling performance in controlled environment. *Journal of Evolutionary Biology* 3: 447-465.
- Bierzychudek, P. (1985) Patterns in Plant Parthenogenesis. *Experientia* 41: 1255-1264.
- Black IV, W.C. (1995) FORTRAN Programs for Analysis of RAPD-PCR Markers in Populations. Colorado State University, Colorado, USA.
- Blaringhem, L. (1924) Sur le Dimorphisme Sexuel des Flues et Variabilité Spécifique. *Bulletin de la Société Botanique de France* 71: 265-273.
- Bock, C. (1976) Polimorphisme Floral et Sterile Male Chez le *Silene acaulis* (L.) Jacq. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 282: 1865-1868.
- Borgen, L. (1996) Genetic Differentiation in Endemic *Lobularia* (Brassicaceae) in the Canary Islands. *Nordic Journal of Botany* 16: 487-203.
- Bouzat, J.L. (2010) Conservation Genetics of Population Bottlenecks: The role of chance, selection, and history. *Conservation Genetics* 11: 463-478.
- Brown, A.H.D. & R.W. Allard (1970) Estimation of Mating System in Open-pollinated Maize Populations Using Isozyme Polymorphisms. *Genetics* 66: 133-145.
-

- Buide, M.L. & J. Guitián (2002) Breeding System in the Dichogamous Hermaphrodite *Silene acutifolia* (Caryophyllaceae). *Annals of Botany* 90: 691-699.
- Cabezudo, B.; Hernández-Bermejo, J.E.; Herrera, C.M.; Muñoz, J. & B. Valdés (2000) Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía, II: Especies vulnerables. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla, España.
- Cabrera García, N.; Caccarani Rosas, M.; Oliva-Tejera, F.; Navarro Déniz, J. & J. Caujapé-Castells (2005) Memoria Final para Biota-Genes. Laboratorio de Biodiversidad Molecular. Jardín Botánico "Viera & Clavijo". Informe Técnico, pp. 82-88 (documento interno).
- Campbell, C.S.; Donoghue, M.J.; Baldwin, B.G. & M.F. Wojciechowski (1995) Phylogenetic Relationships in Maloideae (Rosaceae): Evidences of sequences of the internal transcribed spacers for nuclear ribosomal DNA and its congruence with morphology. *American Journal of Botany* 82: 903-918.
- Cannava, M.; Marinoni, D.T.; Bounous, G. & R. Botta (2008) Genetic Diversity in Ancient Apple Germplasm from Northwest Italy. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 83: 549-554.
- Cardoso, P.; Borges, P.A.V.; Costa, A.C.; Cunha, R.T.; Gabriel, R.; Martins, A.M.F.; Silva, L.; Homem, N.; Martins, M.; Rodrigues, P.; Martins, B. & E. Mendonça (2008). A perspectiva arquipelágica: Açores. En: Martín, J.L.; Arechavaleta, M.; Borges, P.A.V. & B. Faria, B. (eds.). TOP 100: Las 100 especies amenazadas prioritarias de gestión en la región europea biogeográfica de la Macaronesia. Consejería de Medio Ambiente & Ordenación Territorial. Gobierno de Canarias, España, pp. 421-449.
- Carman, J.G. (1997) Asynchronous Expression of Duplicate Genes in Angiosperms may Cause Apomixis, Biospory, Tetraspory, and Poliembriony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 51-94.
-

- Carracedo, J.C. (2006) El Volcán Teide: Volcanología, interpretación de paisajes e Itinerarios comentados. Servicio de Publicaciones de la Caja General de Ahorros de Canarias. Islas Canarias, España.
- Caujapé-Castells, J. & M. Baccarani-Rosas (2005) Transformer-3: A program for analysis of molecular population genetic data. EXEGEN software, Jardín Botánico Canario "Viera & Clavijo". Gran Canaria, España.
- Caujapé-Castells, J. (2006) Brújula para Bótanicos Desorientados en la Genética de Poblaciones. Exegen Ediciones. Gran Canaria, España.
- CBD (1992) Convenio sobre la Diversidad Biológica. Disponible en: <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
- CCEP (2010) Catálogo Canario de Especies Protegidas. BOC, 9 de junio de 2010.
- Chakravorty R. & L. Jin (1995) Estimation of Genetic Distance and Coefficient of Gene Diversity from Single-Probe Multilocus DNA Fingerprinting Data. *Molecular Biology and Evolution* 11: 120-127.
- Chater, O.A. & S.M. Walters (1964) *Silene* L. En: Tutin, T.G. (ed.). *Flora Europea*. Cambridge University Press, Inglaterra, pp. 158-181.
- Cheliak, W.M.; Morgan, K.; Strobeck, C.; Yeh, F.C.H. & B.P. Dancik (1983) Estimation of Mating System Parameters in Plant Population Using EM Algorithm. *Theoretical and Applied Genetics* 65: 157-161.
- Chester, M.; Cowan, R.S.; Fay, M.F. & T.C.G. Rich (2007) Parentage of Endemics *Sorbus* L. (Rosaceae) Species in the British Isles: Evidence from plasmid DNA. *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: 291-304.
- Chybicki, I.J. & J. Burczyk (2008) Simultaneous Estimation of Null Alleles and Inbreeding Coefficients. *Journal of Heredity* 100: 106-113.
-

- Coelho, G.C. & J.E.A. Mariath (1996) Inflorescent Morphology of *Ilex* L. (Aquifoliaceae) Species from Rio Grande do Sul, Brazil. Feddes Repertorium 107: 19-30.
- Comisión Europea (2006) Convenio sobre la Diversidad Biológica: Aplicación en la Unión Europea. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, Luxemburgo.
- Conner, J.K. & D.L. Hartl (2004) A Primer Ecological Genetics. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, USA, 304pp.
- Corander, J. & P. Marttinen (2006) Bayesian Identification of Admixture Events Using Multilocus Molecular Markers. Molecular Ecology 15: 2833-2843.
- Corniquel, B. & L. Mercier (1994) Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivar Identification by RFLP and RAPD. Plant Science 101: 163-172.
- Correns, C. (1928) Bestimmung, vererbung und verteilung des Geschlechte bei den höheren pflanzen. En: E. Baur & M. Hartmann (eds.). Handbuch der vererbungswissenschaft, vol. 2. Borträeger, Berlin, pp. 1-138.
- Cosendai, A.N. & E. Hörandl (2010) Cytotype Stability, Facultative Apomixis and Geographical Parthenogenesis in *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). Annals of Botany 105: 457-470.
- Crawford, D.J.; Archibald, J.K.; Santos-Guerra, A. & M.E. Mort (2006) Allozyme Diversity within and Divergence among Species of *Tolpis* (Asteraceae-Lacuceae) in the Canary Islands: Systematic, evolutionary, and biogeographical implications. American Journal of Botany 93: 656-664.
- Cuénoud, P.; Del Pero Martinez, M.A.; Loizeau, P.A.; Spichiger, R.; Andrews, S. & J.F. Manen (2000) Molecular Phylogenetic and Biogeography of the Genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae). Annals of Botany 85: 111-122.
-

- De Bilde, J.D. (1984) Etude su la „Systématique“ Synthétique du *Silene nutans* L. (Caryophyllaceae) d'Europe Nord-occidentale. Ph.D. Thesis, Université de Bruxelles.
- Del Río, J.; Martínez de Azagra, A. & J.A. Oria de Rueda (2009) Ecología del Paisaje del Género *Sorbus* L. en la Península Ibérica y en Baleares. *Ecología* 22: 25-44.
- Dellaporta, S.; Wood, I. & J.B. Hicks (1983) A Plant DNA Minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 14: 19-21.
- DeSalle, R. & G. Amato (2004) The Expansion of Conservation Genetics. *Nature Reviews Genetics* 5: 702-712.
- Desfeux, C.; Maurice, S.; Henry, J.P.; Lejeune, B. & P.H. Gouyon (1996) Evolution of Reproductive Systems in the Genus *Silene*. *Proceedings of the Royal Society of London* 263: 409-414.
- DeWoody, J.A.; Bickham, J.B.; Michler, C.H.; Nichols, K.M.; Rhodes, O.E. Jr. & K.E. Woeste (2010) *Molecular Approches in Natural Resource Conservation and Management*. Cambridge University Press. New York, USA.
- Dickinson, T.A. & C.S. Campbell (1991) Population Structure and Reproductive Ecology in the Maloidae (Rosaceae). *Systematic Botany* 16: 350-362.
- Dickinson, T.A.; Lo, E. & N. Talent (2007) Polyploidy, Reproductive Biology, and Rosaceae: Understanding evolution and making classifications. *Plant Systematics and Evolution* 266: 59-78.
- Dobeš, C.; Mitchell-Olds, T. & M.A. Koch (2004) Interspecific Diversification in North American *Boechea stricta* (= *Arabis drummondii*), *Boechea X divaricarpa*, and *A. holboelli* (Brassicaceae) Inferred from Nuclear and Chloroplast Molecular Markers – An integrative approach. *American Journal of Botany* 91: 2087-2101.
-

- Doyle, J.J. & J.L. Doyle (1987) A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America* 19: 11-15.
- Dulberger, R. & A. Horovits (1984) Gender Polymorphism in Flowers of *Silene vulgaris* (Moenche) Garcke (Caryophyllaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 89: 101-117.
- Duran, A. & Y. Menemen (2003) A New Species of *Silene* (Caryophyllaceae) from South Anatolia, Turkey. *Botanical Journal of the Linnean Society* 143: 109-113.
- Eguiarte, L.E.; Perez-Nasser, N. & D. Piñero (1992) Genetic Structure, Outcrossing Rate and Heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): Implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217-228.
- Eguiarte, L.E.; Souza, V. y X. Aguirre (2007) *Ecología Molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología, UNAM. México D.F.
- Engel, S.R.; Linn R.A.; Taylor, J.F. & S.K. Davis (1996) Conservation of Microsatellite Loci across Species of Artiodactyls: Implications for Population Studies. *Journal of Mammalogy* 77: 584-518.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E. & J.M. Quattro (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Falush, D.; Stephens, M. & 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, Version 3.5C*. Department of Genetic, University of Washington. Seattle, USA.
-

- Fernández-Palacios, J.M. y J.L. Martín Esquivel (2001) Las Islas como Experimento de Laboratorio. En: Fernández-Palacios, J.M. & J.L. Martín Esquivel (eds.). Naturaleza de las Islas Canarias: Ecología & conservación. Ediciones Turquesa. Tenerife, España, pp. 39-44.
- Fontdevila, A. y A. Moya (1999) Introducción a la Genética de Poblaciones. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España.
- Francisco-Ortega, J.; Jackson, M.T.; Catty, J.P. & B.V. Ford-Lloyd (1992) Genetic Diversity in the *Chamaecytisus proliferus* Complex (Fabaceae: Genisteae) in the Canary Islands in Relation to in situ Conservation. Genetic Resources and Crop Evolution 39: 149-158.
- Francisco-Ortega, J.; Crawford, D.J.; Santos-Guerra, A. & R.K. Jensen (1997) Origin and Evolution of *Argyranthemum* (Asteraceae: Anthemideae) in Macaronesia. En: Givnish, T.J. & K.J. Sytsma (eds.). Molecular Evolution and Adaptive Radiation. Cambridge University Press. Cambridge, UK, pp. 407-431.
- Francisco-Ortega, J.; Santos-Guerra, A.; Kim, S.C. & D.J. Crawford (2000) Plant Genetic Diversity in the Canary Islands: A conservation perspective. American Journal of Botany 87: 909-919.
- Francisco-Ortega, J. y A. Santos (2001) Genes & Conservación de Plantas Vasculares. En: Fernández-Palacios, J.M & J.L. Martín Esquivel (eds.). Naturaleza de las Islas Canarias: Ecología & conservación. Ediciones Turquesa, Tenerife, España, pp. 357-365.
- François, O. & E. Durand (2010) Spatially Explicit Bayesian Clustering Models in Population Genetics. Molecular Ecology Resources 10: 773-784.
- Frankel, O.H.; Brown, A.H.D. & J.J. Burdon (1995) The Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
-

- Frankham, R.; Ballou, J.D. & D.A. Briscoe (2009) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Frantz, A.C.; Cellina, S.; Krier, A.; Schley, L. & T. Burke (2009) Using Spatial Bayesian Methods to Determine the Genetic Structure of a Continuously Distributed Population: Clusters of isolation by distance? *Journal of Applied Ecology* 46: 493-505.
- Galeuchet, D.J.; Husi, R.; Perret, C.; Fischer, M. & B. Gautschi (2002) Characterization of Microsatellite Loci in *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllacea). *Molecular Ecology Notes* 2: 491-492.
- Galle, F.C. (1997) *Hollies: the genus Ilex*. Timber Press, Oregon, USA.
- García, M.B. & J.M. Iriondo (2002) Modelos Matriciales de Proyección Poblacional. En: Bañares, Á. (ed.). *Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de diagnóstico del estado de conservación*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. España, pp. 43-53.
- García-Verdugo, C.; Fay, M.F.; Granado-Yela, C.; Rubio de Casas, R.; Balaguer, L.; Besmard, G. & P. Vargas (2009) Genetic Diversity and Differentiation Processes in the Ploidy Series of *Olea europea* L.: A multiscale approach from subspecies to insular populations. *Molecular Ecology* 18: 454-467.
- García-Verdugo, C.; Méndez, M., Velázquez-Rosas, N. & L. Balanguer (2010a) Contrasting Patterns of Morphological and Physiological Differentiation across Insular Environments: Phenotypic variation and heritability of light-related traits in *Olea europea*. *Oecologia* 164: 647-655.
- García-Verdugo, C.; Forrest, A.D.; Fay, M.F. & P. Vargas (2010b) The Relevance of Gene Flow in Metapopulation Dynamics of an Oceanic Island Endemic, *Olea europea* subsp. *guanchica*. *Evolution* 64: 3525-3536.
-

- Gehring, J.L. & L.F. Delph (1999) Fine-Scale Genetic Structure and Clinal Variations in *Silene acaulis* despite Higher Gene Flow. *Heredity* 82: 628-637.
- Ghislain, M.; Andrade, D.; Rodríguez, F.; Hijimans, R.J. & D.M. Spooner (2006) Genetic Analysis of the Cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1515-1527.
- Gianfranceschi, L.; Seglias, N.; Tarchini, R.; Komjanc, M. & C. Gessler (1998) Simple Sequence Repeats for the Genetic Analysis of Apple. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1069-1076.
- Giles, B.E.; Lundqvist, E. & J. Goudet (1998) Restricted Gene Flow and Subpopulation Differentiation in *Silene dioica*. *Heredity* 80: 715-723.
- Goldstein, D.B. & C. Schötterer (1999) *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press. Oxford, UK.
- González-González, E.A.; González-Pérez, M.A.; Rivero, E. & P.A. Sosa (2010) Isolation and Characterization of Microsatellite Loci in *Sorbus aria* (Rosaceae). *Molecular Ecology Resources* 2: 341-343.
- González-Pérez, M.A.; Sosa, P.A.; González-González, E.A.; Bañares, Á.; Marrero, M.; Carqué, E. & M. Polifrone (2008) *Gnaphalium teydeum* and *Gnaphalium luteo-album*: Two taxa of Canary Islands with different genetic histories. *Plant Systematic and Evolution* 247: 39-49.
- González-Pérez, M.A.; Lledó, M.D.; Lexer, C.; Fay, M.; Marrero, M.; Bañares, A.; Carqué, E. & P.A. Sosa (2009a) Genetic Diversity and Differentiation in Natural and Reintroduced Populations of *Bencomia exstipulata* and Comparisons with *B. caudata* (Rosaceae) in the Canary Islands: An analysis using microsatellites. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160: 429-441.
-

- González-Pérez, M.A.; Sosa, P.A. & F. Batista (2009b) Genetic Variation and Conservation of Endangered Endemic *Anagyris latifolia* Brouss. Ex Willd. (Leguminosae) from the Canary Islands. *Plant Systematics and Evolution* 279: 59-68.
- González-Pérez, M.A.; Sosa, P.A.; Rivero, E.; González-González, E.A. & A. Naranjo (2009c) Molecular Markers Reveal no Genetic Differentiation between *Myrica rivas-martinezii* and *M. faya* (Myricaceae). *Annals of Botany* 103: 79-86.
- Griffiths, D.A. (1987) *Spatial Autocorrelation: A primer*. Washington D.C. Association of American Geographer. Pennsylvania, USA.
- Grimanelli, D.; Leblanc, O.; Perotti, E. & U. Grossniklaus (2001) Developmental Genetic of Gametophytic Apomixis. *Trends in Genetics* 17: 597-604.
- Grivet, D.; Robledo-Arnuncio, J.J.; Smouse, P.E. & V.L. Sork (2009) Relative Contribution of Contemporary Pollen and Seed Dispersal to the effective Parental Size of Seedling Population of Californian Valley Oak (*Quercus lobata*, Née). *Molecular Ecology* 18: 3967-3979.
- Hall, T. (2001) BioEdit version 5.0.6. Department of Microbiology. North Carolina State University. North Carolina, USA.
- Hamrick, J.L. & M.J.W. Godt (1989) Allozyme Diversity in Plant Species. En: Brown, H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. & B.S. Weir (eds.). *Plant Populations Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Massachusetts, USA, pp. 43-63.
- Hanahan, D.; Jessee J. & F.R. Bloom (1991) Plasmid Transformation of *Echerichia coli* and Other Bacteria. *Method Enzymology* 204: 63-113.
- Hanson, T.R.; Brunfeld, S.J.; Finegan, B. & L.P. Waits (2008) Pollen Dispersal and Genetic Structure of the Tropical Tree *Dipteryx panamensis* in a Fragmented Costa Rican Landscape. *Molecular Ecology* 17: 2060-2073.
-

- Harmanutz, L.A. & D.J. Innes (1994) Gender Variation in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *Plant Systematic Ecology* 191: 69-81.
- Hartl, D.L. & A.G. Clark (1997) *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA.
- Hauser, T.P. & V. Loeschcke (1994) Inbreeding Depression and Mating-distance Dependent Offspring Fitness in Large and Small Populations of *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllaceae). *Journal of Evolutionary Biology* 7: 609-622.
- Hedrick, P.W. (1983) *Genetic of Populations*. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Boston, USA.
- Hedrick, P.W. (2000) *Genetic of Populations*. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Boston, USA.
- Hedrick, P. & K. Ritland (1990) Gamete Disequilibrium and Multilocus Estimation of Selfing Rates. *Heredity* 65: 343-347.
- Hemborg, Å.M. & P.S. Karlsson (1999) Sexual Differences in Biomass and Nutrient Allocation in First-year *Silene dioica* Plants. *Oecologia* 118: 453-460.
- Hernández, J.M.V. (1992) *Métodos de Regresión y Análisis Multivariante*. Tomo II. Primera reimpresión, IMPRE S.A. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid, España.
- Heslop-Harrison, J. & Y. Heslop-Harrison (1958) Long-day and Auxin Induced Male Sterility in *Silene pendula* L. *Portugaliae Acta Biologica* 5: 79-94.
- Hey, J. & R. Nielsen (2004) Multilocus Methods for Estimating Population Size, Migration Rates and Divergence Time, with Applications to the Divergence of *Drosophilla pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167: 747-760.
-

- Heywood, V.H. & J.M. Iriondo (2003) Plant Conservation: Old problems, new perspectives. *Biological Conservation* 113: 321-336.
- Hoebee, S.E.; Arnold, U.; Düggelein, C.; Gugerli, F.; Brodbeck, S.; Rotach, R. & R. Holderegger (2007) Mating Patterns and Contemporary Gene Flow by Pollen in a Large Continuous and a Small Isolated Population of the Scattered Forest tree *Sorbus torminalis*. *Heredity* 99: 45-55.
- Hoelzel, A.R. (1998) *Molecular Genetic Analysis of Populations: A practical approach*. IRL Press at Oxford University Press. New York, USA.
- Hörandl, E. (2006) The Complex Causality of Geographical Parthenogenesis. *New Phytologist* 171: 525-538.
- Hörandl, E. & O. Paun (2007) Patterns and Sources of Genetic Diversity in Apomictic Plants: Implications for evolutionary potentials and ecology. En: Hörandl, E.; Gossniklaus, U., Van Dijk, P.J. & T. Sharbel (eds.). *Apomixis: Evolution, mechanisms and perspective*. A.R.G. Gantner Verlag. Ruggell, Liechtenstein, pp. 169-194.
- Hörandl, E.; Cosendai, A.C. & E.A. Temsch (2008) Understanding the Geographical Distribution of Apomictic Plants: A case for a pluralistic approach. *Plant Ecology and Diversity* 1: 309-320.
- Hörandl, E. (2010) The Evolution of Self-fertility in Apomictic Plants. *Sexual Plant Reproduction* 23: 73-86.
- Hubisz, M.J.; Falush, D.; Stephens, M. & J.K. Pritchard (2009) Inferring Weak Population Structure with the Assistance of Sample Group Information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322-1332.
- Husband, B.C. & D.W. Schemske (1995) Evolution of Magnitude and Timing of Inbreeding Depression in Plants. *Evolution* 50: 54-70.
-

- Ingvarsson, P.A. & B.E. Giles (1999) Kin-Structured Colonization and Small-scale Genetic Differentiation in *Silene dioica*. *Evolution* 53: 605-611.
- IUCN (2011) The IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org
- Izquierdo, I.; Martín, J.L.; Zurita, N. y M. Arechavaleta (2004) Lista de Especies Silvestres de Canarias (Hongos, Plantas & Animales Terrestres) 2004. Consejería de Medio Ambiente & Ordenación Territorial. Gobierno de Canarias, España.
- Jaén Molina, R.; Marrero Rodríguez, A.; Reyes Betancourt, J.A.; Naranjo Suárez, J.; Santos-Guerra, A. & J. Caujapé-Castells (2010) La Flora Endémica del Parque Nacional de Garajonay bajo la Perspectiva Molecular: Las secuencias de ADN como herramienta en la identificación taxonómica. En: Ramírez, L. y B. Asensio (eds.). *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales: 2006-2009*. Organismos de Parques Nacionales. España, pp. 249-273.
- Jennersten, O.; Berg, L. & C. Lehman (1988) Phenological Differences in Pollinator Visitation, Pollen Deposition and Seed-set in the Sticky Cash-fly, *Viscaria vulgaris* (Caryophyllaceae). *Journal of Ecology* 76: 1111-1132.
- Jones, A.G.; Small, C.M.; Paczolt, K.A. & N.L. Ratterman (2010) A Practical Guide to Methods of Parentage Analysis. *Molecular Ecology* 10: 6-30.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & P.F. Stevens (1999) *Plant Systematic – A Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Juillet, N.; Freymond, H.; Degen, L. & J. Goudet (2003) Isolation and Characterization of Highly Polymorphic Microsatellite Loci in the Bladder Campion, *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae). *Molecular Ecology Notes* 3: 358-359.
-

- Kalia, R.K.; Rai, M.K.; Kalia, S.; Singh, R. & A.K. Dhawan (2011) Microsatellite Markers: An overview of the recent progress. *Euphytica* 177: 309-334.
- Kamm, U.; Rotach, P.; Gugerli, F.; Siroky, M.; Edwards, P. & R. Holderegger (2009) Frequent Long-distance Gene Flow in a Rare Temperate Forest Tree (*Sorbus domestica*) at the Landscape Scale. *Heredity* 103: 476-482.
- Kephart, S.R.; Brown, E. & J. Hall (1999) Inbreeding Depression and Partial Selfing: Evolutionary implications of mixed-mating in a coastal endemic, *Silene douglassi* var. *oraria* (Caryophyllaceae). *Heredity* 82:543-554.
- Kiani, M.; Zamani, Z.; Khalighi, A.; Fatahi, R. & D.H. Byrne (2010) Microsatellite Analysis of Iranian Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) Gerplasm. *Plant Breeding* 129: 551-557.
- Kim, S.C.; Crawford, D.J.; Francisco-Ortega, J. & A. Santos-Guerra (1996) A Common Origin for Woody *Sonchus* and Five Related Genera in the Macaronesian Islands: Molecular evidence extensive radiation. *Proceeding of National Academy of Sciences, USA* 93: 7743-7748.
- Kimuara, T.; Shi, Y.Z.; Shoda, M.; Kotobuki, K.; Matsuta, N.; Hayshi, T.; Ban, Y. & T. Yamamoto (2002) Identification of Asian Pear Varieties by SSR Analysis. *Breeding Science* 52: 115-121.
- Kittelson, P.M. & J.L. Maron (2000) Outcrossing Rate and Inbreeding Depression in the Perennial Yellow Bush Lupine, *Lupinus arboreus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 87: 652-660.
- Kloda, J.M.; Dean, P.D.G.; Maddren, C.; McDonald, D.W. & S. Mayer (2008) Using Principle Component Analysis to Compare Genetic Diversity Across Polyploid Levels within Plant Complexes: An example from British Restharrow (*Ononis spinosa* and *Ononis repens*). *Heredity* 100: 253-260.
- Knuth, P. (1908) *Handbook of flower pollination*, vol. II. Oxford: Clarendon Press. Oxford, UK.
-

- Koltunow, A. & U. Grossniklaus (2003) Apomixis, A developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 547-574.
- Kučerová, V.; Honec, M.; Paule, L.; Zhelev, P. & D. Gömöry (2010) Genetic Differentiation of *Sorbus torminalis* in Eastern Europe as Determined by Microsatellite Markers. *Biologia* 65: 817-821.
- Kunkel, G. (1977a) Endemismos Canarios: Inventario de las plantas vasculares endémicas en la provincia de Las Palmas. ICONA. Madrid, España.
- Kunkel, G. (1977b) The *Ilex*: Complex in the Canary Islands and Madeira. *Cuaderno de Botánica Canaria* 28: 17-19.
- Kunkel, G. 1981 Árboles y Arbustos de las Islas Canarias: Guía de Campo. Colección Botánica Canaria, Vol. 1. Impresiones Pérez Galdós. Las Palmas de Gran Canaria, España.
- Langella, O. (2005) Populations 1.2.30. Laboratoire Populations, Génétique et Evolution, Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS UPR9034, Gif Sur Yvette. Paris, France.
- Lardon, A.; Georgiev, S.; Aghmir, A.; Le Merrer, G. & I. Negrutiu (1999) Sexual Dimorphism in White Campeon: Complex control of carpel number is revealed by Y chromosome deletions. *Genetics* 153: 1173-1185.
- Lems, K. (1968) Hollies of the Canary and Madeira Islands. *American Horticultural Society* 1968: 290-995.
- Lepší, M.; Vít, P.; Lepší, P.; Blublík, K. & J. Suda (2008) *Sorbus milensis*, a New Hybridogenous Species from Northwestern Bohemia. *Preslia* 80: 229-244.
- Liebhart, R.; Gianfranceschi, L.; Koller, B.; Ryder, C.D.; Tarchini, R.; Van den Weg, E. & C. Gessler (2002) Development and Characterization of 140
-

New Microsatellites in Apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* 10: 217-241.

Linhart, Y.B.; Mitton, J.B.; Sturgeon, K.B. y M.L. Davis (1981) Genetic Variation in Space and Time in a Population of Ponderosa Pine. *Heredity* 46: 407-426.

López de Heredia, U.; Venturas, M.; López, A.R. & L. Gil (2010) High Biogeographical and Evolutionary Value of Canary Island Pine Populations out of the Elevational Pine Belt: The case of a relict coastal population. *Journal of Biogeography* 37: 2371-2383.

Lowe, A.J.; Boshier, D.; Ward, M.; Cacles, C.F.E. & C. Navarro (2005) Genetic Resources Impacts of Habitat Loss and Degradation: Reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273.

Loyd, D.G. & C.J. Webb (1992) The Evolution of Heterostyly. En: Barrett, S.C.H. (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag. Berlín, Alemania.

Luan, S.; Chiang, T.Y. & X. Gong (2006) High Genetic Diversity vs Low Genetic Differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a Narrowly Distributed and Endemic Species in China, Revealed by ISSR Fingerprinting. *Annals of Botany* 98: 583-589.

Manen, J.F.; Boulter, M.C. & Y. Naciri-Graven (2002) The Complex History of the Genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae): Evidence from the comparison of plasmid and nuclear DNA sequences and from fossil data. *Plant Systematics and Evolution* 235: 79-98.

Manen, J.F. (2004) Are Both Sympatric Species *Ilex perado* and *Ilex canariensis* Secretly Hybridizing? Indication from nuclear markers in Tenerife. *BMC Evolution Biology* 4: 46

- Manen, J.F.; Barriera, G.; Loizeau, P.A. & Y. Naciri (2010) The History or Extant *Ilex* Species (Aquifoliaceae): Evidence of hybridization within a Miocene radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 961-977.
- Marsden-Jones, E.M. & W.B. Turill (1957) *The Bladder Campeons*. The Royal Society. London, UK.
- Martín, A.; Hernández, M.A.; Nogales, M. y C. González (2000) *Las Palomas Endémicas de Canarias*. SEO/Birdlife. Gobierno de Canarias, España.
- Maurice, S.; Desfeux, C.; Migot, A. & J.P. Henry (1998) Is *Silene acaulis* (Caryophyllaceae) a Trioecious Species? Reproductive biology of two subspecies. *Canadian Journal of Botany* 76: 478-485.
- Meager, T.R. & D. Costich (2008) „Junk“ DNA and Phenotypic Evolution in *Silene* Section *Siphonomorpha*. *Genetics Research* 90: 111-118.
- McCauley, D.E.; Raveill, J.A. & J. Antonovics (1995) Local Founding Events as Determinants of Genetic Structure in a Plant Metapopulation. *Heredity* 75: 630-636.
- McCauley, D.E.; Stevens, J.E. & J.A. Raveill (1996) The Spatial Distribution of Chloroplast DNA and Allozyme Polymorphisms within a Population of *Silene alba* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 83: 727-731.
- Meirmans, P.G.; Calme, F.G.; Bretagnolle, F.; Felber, F. & J.C.M. Den Nijs (1999) Anthropogenic Disturbance and Habitat Differentiation between Sexual and Triploid Asexual Dandelions (*Taraxacum* section *Ruderalia*). *Folia Geobotanica* 34: 451-469.
- Meirmans, P.G.; Vlot, E.C.; Den Nijs, J.C.M. & S.B.J. Menken (2003) Spatial Ecological and Genetic Structure of a Mixed Population of Sexual Diploid and Apomictic Triploid Dandelions. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 343-352.
-

- Meirmans, P.G. & P.H. Van Tienderen (2004) GenoType and GenoDive: Two programs for analysisi of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* 4: 792-794.
- Melzheimer, V. (1988) *Silene* L. En: Rechinger, K.H. (ed.). *Flora Iranica* 163. Academische Druck and Verlagsanstalt. Graz, Austria, pp: 341-509.
- Menges, E.S. (1995) Factors Limiting Fecundity and Germination in Small Populations of *Silene regia* (Caryophyllaceae), a Rare Hummingbird-pollinated Prairie Forb. *American Midland Naturalist* 133: 242-255.
- MMA (2003) Informe Anual. Parque Nacional de la Caldera de Taburiente. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Islas Canarias, España.
- Moran, P. (1948) The Interpretation of Statistical Maps. *Journal of the Royal Statistical Society* 10B: 243-251.
- Moreno, J.C.; Bañares, Á.; Blanca, G.; Güemes, J. y S. Ortiz (2008) Lista Roja 2008 de la Flora Vascular Española. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural Marino y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas). Madrid, España.
- Moyle, L.C. (2006) Correlates of Genetic Differentiation and Isolation by Distance in 17 Congeneric *Silene* Species. *Molecular Ecology* 15: 1067-1081.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. & H. Erlich (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Hargor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273.
- Nagamitsu, T.; Ogawa, M.; Ishida, K. & H. Tanouchi (2004) Clonal Diversity, Genetic Structure, and Mode of Recruitment in a *Prunus ssiori* Population Established after Volcanic Eruptions. *Plant Ecology* 174: 1-10.
-

- Neff, B.D. & B.A. Fraser (2010) A Program to Compare Genetic Differentiation Statistics across Loci Using Resampling of Individuals and Loci. *Molecular Ecology Resources* 10: 546-550.
- Nei, M. (1972) Genetic Distance between Populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei, M. (1973) Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, USA. 512p.
- Nelson-Jones, E.B.; Briggs, D. & A.G. Smith (2002) The Origin of Intermediate Species of the Genus *Sorbus*. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 953-963.
- Nogler, G.A. (1984) Gametophytic Apomixis. En: B.M. Johri (ed.). *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag. Berlin, Alemania, pp. 475-518.
- Noyes, R.D. (2007) The Evolutionary Genetics of Apomixis in *Erigeron* sect. *Phalacrolooma* (Asteraceae). En: Hörandl, E.; Grossniklaus, U.; Van Dijk, P. & T. Sharbel (eds.). *Apomixis: Evolution, mechanisms and perspectives*. A.R.G. Gantner Verlag. Ruggell, Liechtenstein, pp. 337-358.
- Nuez, F. y J.M. Carrillo (2000) *Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal*. Universidad Politécnica de Valencia. Sociedad Española de Genética. Valencia, España.
- Obbard, D.J.; Harris, S.A. & J.R. Pannell (2006) Simple Allelic-phenotype Diversity and Differentiation Statistics for Allopolyploids. *Heredity* 97: 296-303.
-

- Oddou-Muratorio, S.; Aligon, C.; Decroocq, S.; Plomion, C.; Lamant, A.T. & B. Mush-Demesure (2001) Microsatellite Primers for *Sorbus torminalis* and Related Species. *Molecular Ecology Notes* 1: 297-299.
- Oddou-Muratorio, S.; Houot, M.L.; Demesure-Musch, B. & F. Austerlitz (2003) Pollen Flow in the Wildservice Tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Molecular Ecology* 12: 3427-3439.
- Oostermeijer, J.G.B.; Luijten, S.H. & J.C.M den Nijs (2003) Integrating Demographic and Genetic Approaches in Plant Conservation. *Biological Conservation* 113:389-398.
- Ouborg, N.J.; Biere, A. & C.L. Mudde (2000) Inbreeding Effects on Resistance and Transmission-related Traits in the *Silene-Microbotryum* Pathosystem. *Ecology* 81: 520-531.
- Ouborg, N.J.; Pertoldi, C.; Loeschcke, V.; Bijlsma, R. & P.W. Hedrick (2010) Conservation Genetics in Transition to Conservation Genomics. *Trends in Genetics* 26: 177-187.
- Oxelman, B. & M. Lidén (1995) Generic Boundaries in the Tribe *Sileneae* (Caryophyllaceae) as Inferred from Nuclear rDNA Sequences. *Taxon* 44: 525-542.
- Palop-Esteban, M. & F. González-Candelas (2002) Development of Microsatellite Markers for Critically Endangered *Limonium dufourii* (Girard) Kuntze (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology Notes* 2: 521-523.
- Peakall, R. & P.E. Smouse (2006) GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pearse, D.E. & K.A. Crandall (2004) Beyond F_{ST} : Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* 5: 585-602.
-

- Pettersson, M.W. (1992) Advantages of Being a Specialist Female in Gynodioecy *Silene vulgaris* S. I. (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 79: 1389-1395.
- Pettersson, M.W. (1997) Solitary Plants do as well as Clumped Ones in *Silene uniflora* (Caryophyllaceae). *Ecography* 20: 375-382.
- Patterson, N.; Price, A.L. & D. Reich (2006) Population Structure and Eigenanalysis. *PLoS Genetics* 2: e190.
- Picca, A.; Helguera, M.; Solomón, N. y A. Carrera (2002) Marcadores Moleculares. En: Echenique, V.; Rubinstein, C. y L. Mroginski (eds.). *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina, pp. 61-68.
- Pomonarev, A.N. & E.I. Demyanova (1975) On the Study of Gynodioecy in Plants. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 60: 3-15.
- Prentice, H.C. (1984) Enzyme Polymorphism, Monometric Variation and Population Structure in Restricted Endemic, *Silene diclinis* (Caryophyllaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 22: 125-143.
- Primack, R.B. y J.D. Ros (2002) *Introducción a la Biología de la Conservación*. Ariel Ciencia. Barcelona, España.
- Ramel, C. (1997) Mini and Microsatellite. *Environmental Health Perspectives* 105: 781-789.
- Ramos-Cabrera, A.M.; Díaz-Hernández, M.B. & S. Pereira-Lorenzo (2007) Morphology and Microsatellites in Spanish Apple Collections. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 82: 257-265.
- Rasmussen, K.K. & J. Kollmann (2008) Low Genetic Diversity in Small Peripheral Populations of a Rare European Tree (*Sorbus torminalis*) Dominated by Clonal Reproduction. *Conservation Genetics* 9: 1533-1539.
-

- Raspé, O. & J.R. Kohn (2007) Population Structure at the S-locus of *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae). *Molecular Ecology* 16: 1315-1325.
- Raven, P.H. & D.I. Axelrod (1974) Angiosperm Biogeography and Past Continental Movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 539-673.
- Refoufi, A. & M.A. Esnault (2006) Genetic Diversity and Population Structure of *Elytrigia pycnantha* (Gord.) (Triticaceae) in Mont Saint-Michel Bay Using Microsatellite Markers. *Plant Biology* 8: 234-242.
- Rigueiro, C.; Arroyo, J.M.; Valido, A. & P. Jordano (2009) Isolation and Characterization of 13 Microsatellite Loci for *Noechamaelea pulverulenta* (Cneoraceae). *Molecular Ecology Resources* 9: 1497-1500.
- Ritland, K. & S.K. Jain (1981) A Model for the Estimation of Outcrossing Rate and Gene Frequencies Using Independent Loci. *Heredity* 47: 35-52.
- Ritland, K. (1990) A Series of FORTRAN Computer Programs for Estimating Plant Mating System. *Journal of Heredity* 81: 235-237.
- Ritland, K. (2002) Extensions of Models for the Estimation of Mating Systems Using n Independent loci. *Heredity* 88: 221-228.
- Robertson, K.R.; Phipps, J.B.; Rohrer, J.R. & P.G. Smith (1991) A Synopsis of Genera in *Maloideae* (Rosaceae). *Systematic Botany* 16: 376-394.
- Robertson, A.; Newton, A.C. & R.A. Ennos (2004a) Breeding Systems and Continuing Evolution in the Endemic *Sorbus* Taxa on Arran. *Heredity* 93: 487-495.
- Robertson, A.; Newton, A.C. & R.A. Ennos (2004b) Multiple Hybrid Origins, Genetic Diversity and Population Genetic Structure of Two Endemic *Sorbus* taxa on the Isle of Arran, Scotland. *Molecular Ecology* 13: 123-134.
-

- Robertson, A.; Rich, T.C.G.; Allen, A.M.; Houston, L.; Roberts, C.; Bridle, J.R.; Harris, S.A. & S.J. Hiscock (2010) Hybridization and Polyploidy as Drivers of Continuing Evolution and Speciation in *Sorbus*. *Molecular Ecology* 19: 1675-1690.
- Roderic, D.M. (2001) TreeView. Universidad de Glasgow, Glasgow, Escosia.
- Rosenberg, N.A.; Pitchard, J.K.; Weber, J.L.; Cann, H.M.; Kidd, K.K.; Zhivotovsky, L.A. & M.W. Feldman (2002) Genetic Structure of Human Populations. *Science* 298: 2381-2385.
- Rousset, F. (2008) GENEPOP⁰⁰⁷: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- Ruas, C.F.; Nakayama, T.J.; Ortíz, M.Á.; Kuroki, M.A.; Stuessy, T.F.; Tremetsberger, K.; Ruas, E.A.; de Oliveira Santos, M.; Talavera, S. & P.M. Ruas (2009) Isolation and Characterization of Eight Microsatellite Loci from the Endangered Plant Species *Hypochaeris salzmanniana* (Asteraceae). *Conservation Genetics* 10: 1413-1416.
- Sahuquillo, E. & R. Lumaret (1995) Variation in the Subtropical Group *Dactylis glomerata* L. – 1. Evidence from allozyme polymorphism. *Biochemical Systematics and Ecology* 23: 407-418.
- Salemi, M. & A.M. Vandamme (2003) *The Phylogenetic Handbook: A practical approach to DNA and protein phylogeny*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Salvande, M.; Mulet, M. & L.A. Gómez (2006) *Ilex canariensis* Poir (Aquifoliaceae) Post-dispersal Seed Predation in Canary Islands. *Plant Ecology* 187: 143-151.
- Schaal, B.A. (1984) Life-history Variation, Natural Selection, and Maternal Effects in Plant Populations. En: Dirzo, R. & Sarukhán, J. (eds.).
-

Perspectives on Plant Population Ecology. Sinauer. Sunderland, Massachusetts, USA, pp. 188-206.

Schemske, D.W.; Husband, B.C.; Ruckelshaus, M.H.; Goodwillie, C.; Parker, I.M. & J.G. Bishop (1994) Evaluating Approaches to the Conservation of Rare and Endangered Plants. *Ecology* 75: 584-606.

Schoen, D.J. & M.T. Clegg (1984) Estimation of Mating System Parameters when Outcrossing Events are Correlated. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 11: 5258-5262.

Segarra-Moragues, J.G. & P. Catalán (2010) The Fewer and the Better: Priorizing of populations for conservation under limited resources, a genetic study with *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae) in the Pyrenean National Park. *Genetica* 138: 363-376.

Selbach-Schnadelbach, A.; Smith Cavalli, S.; Manen, J.F.; Cohelo, G.C. & T. Teixeira de Souza-Chies (2009) New information for *Ilex* Phylogenetic Based on the Plasmid psbA-trnH Intergenic Spacer (Aquifoliaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 159: 182-193.

Setoguchi, H. & I. Watanabe (2000) Intersectional Gene Flow between Insular Endemics of *Ilex* (Aquifoliaceae) on the Bonin Island and the Ryukyu Islands. *American Journal of Botany* 87: 793-810.

Sharbel, T.; Mitchell-Olds, T.; Dobeš, C.; Kantama, L. & H. de Jong (2005) Biogeographic Distribution of Polyploidy and B Chromosomes in the Apomictic *Boechera holbellii* complex. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 283-292.

Shykoff, J.A. (1988) Maintenance of Gynodioecy in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae): Stage-specific fecundity and viability selection. *American Journal of Botany* 75: 844-850.

- Siena, L.A.; Sartor, M.E.; Espinoza, F.; Quarin, C.L. & J.P.A. Ortiz (2008) Genetic and Embryological Evidences of Apomixis at the Diploid Level in *Paspalum refum* Support Recurrent Auto-polyploidization in the Species. *Sexual Plant Reproduction* 21: 205-215.
- Silvertown J.W. & D. Charlesworth (2001) *Introduction to Plant Population Biology*. Blackwell Science. London, UK.
- Sjögren, E. (2001) *Plants and Flowers of the Azores*. Direcção Regional da Cultura. Açores.
- Smouse, P.E. & R. Peakall (1999) Spatial Autocorrelation Analysis of Individual Multiallele Genetic Structure. *Heredity* 82: 561-573.
- Smyth, C.A. & J.L. Hamrick (1984) Variation in Estimates of Outcrossing in Musk Thistle Populations. *Journal of Heredity* 75: 303-307.
- Sokal, R.R. (1979) Testing Statistical Significance of Geographical Variation Patterns. *Systematic Zoology* 28: 227-232.
- Soldaat, L.L.; Vetter, B. & S. Klotz (1997) Sex Ratio in Populations of *Silene otites* in Relation to Vegetation Cover, Population Size and Fungal Infection. *Journal of Vegetation Science* 8: 697-702.
- Sosa, P.A. (2001) Genes, Poblaciones y Especies. En: Martín-Esquivel J. & J.M. Fernández-Palacios (eds.). *Naturaleza de Canarias*. Publicaciones Turquesa. Tenerife, España, pp. 151-155.
- Sosa, P.; Batista, F.; González, M.A. y N. Bouza (2002) La Conservación Genética de las Especies Amenazadas. En: Bañares, Á. (ed.). *Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de diagnóstico del estado de conservación*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. España, pp. 133-160.
-

- Sosa, P.A.; González-Pérez, M.A.; González-González, E.A.; Rivero-Santana, E.; Naranjo-Cigala, A.; Oostermeijer, G.; Pestano-Brito, J.J. & T. Van Hengstum (2010a) Biología de la Conservación de Endemismos Vegetales de los Parques Nacionales Canarios: Caracterización genética y demográfica. En: Ramírez, L. & G. Asensio (eds.) Proyectos de Investigación en Parques Nacionales (2006 – 2009). Organismos de Parques Nacionales. Gran Canaria, España, pp. 225-248.
- Sosa, P.A.; González-Pérez, M.A.; Moreno, C. & J.B. Clarke (2010b) Conservation of the Endangered Endemic *Sambucus palmensis* Link (Sambucaceae) from the Canary Islands. Conservation Genetics 11: 2357-2368.
- Swofford, D.L. & G.J. Olsen (1990) Phylogeny Reconstruction. En: Hills, D.M. & C. Moritz (eds.). Molecular Systematics. Massachusetts, USA, pp. 411-501.
- Sytsma, K.J. & B.A. Schaal (1985) Genetic Variation, Differentiation, and Evolution in Species Complex of Tropical Shrubs based on Isozymic Data. Evolution 39: 582-593.
- Takezaki, N.; Nei, M. & 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.
- Talavera, S.; Arista, M. & F.J. Salgueiro (1996) Population Size, Pollination and Breeding System of *Silene stockenii* Chater (Caryophyllaceae), an Annual Ginodioecious Species of Southern Spain. Botanica Acta 109: 333-339.
- Tamura, K., Dudley, J. Nei, M. y S. Kumar (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.
-

- Tautz, D. (1989) Hipervariability of a Simple Sequence as a General Source for Polymorphic DNA Markers. *Nucleic Acids Researches* 7: 6463-6470.
- Teixeira, S. & G. Bernasconi (2007) High Prevalence of Multiple Maternity within Fruits in Natural Populations of *Silene latifolia*, as Revealed by Microsatellite DNA Analysis. *Molecular Ecology* 16: 4370-4379.
- Templeton, A.R. (2006) Population Genetics and Microevolutionary Theory. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, USA.
- Tero, N.; Aspi, J.; Siikamäki, P.; Jäkäläniemi, A. & J. Toumi (2003) Genetic Structure and Gene Flow in a Metapopulation of an Endangered Plant Species, *Silene tatarica*. *Molecular Ecology* 12: 2073-2085.
- Tero, N. & C. Schlötterer (2005) Isolation and Characterization of Microsatellite Loci from *Silene tatarica*. *Molecular Ecology Notes* 5: 517-518.
- Thomas Ledig, F.; Hodgskiss, P.D & V. Jacob-Cervantes (2002) Genetic Diversity, Mating System, and Conservation of a Mexican Subalpine Relict, *Picea Mexicana* Martínez. *Conservation Genetics* 3: 113-122.
- Torimaru, T.; Tomaru, N.; Nishimura, N. & S. Yamamoto (2003) Clonal Diversity and Genetic Differentiation in *Ilex leuococlada* M. Patches in an Old-growth Beech Forest. *Molecular Ecology* 12: 209-818.
- Torimaru, T.; Tani, N.; Tsumura, Y.; Hiraoka K. & N. Tomaru (2004) Development and Polymorphism of Simple Sequence Repeat DNA Markers for the Evergreen Shrub *Ilex leuococlada* M *Molecular Ecology Notes* 4: 531-533.
- Torimaru, T. & N. Tomaru (2005) Fine-scale Clonal Structure and Diversity within Patches of a Clone-forming Dioecious Shrub, *Ilex leuococlada* (Aquifoliaceae). *Annals of Botany* 95: 295-304.
-

- Torimaru, T. & N. Tomaru (2006) Relationship between Flowering Phenology, Plant Size, and Female Reproductive Output in a Dioecious Shrub, *Ilex leucoclada* (Aquifoliaceae). *Canadian Journal of Botany* 84: 1860-1869.
- Torimaru, T.; Tani, N.; Tsumura, Y.; Nishimura, N. & N. Tomaru (2007) Effects of Kin-structured Seed Dispersal on the Genetic Structure of the Clonal Dioecious Shrub *Ilex leucoclada*. *Evolution* 61: 1289-1300.
- Tutin, T.G. (1933) Notes from the University Herbarium, Cambridge: On *Ilex perado* Ait. and *Notelaea excelsa*. *Journal of Botany* 71: 99-101.
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F; Wills, D.P.M & P. Shipley (2004) MICRO-CHECHER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Van Rossum, F. & H.C. Prentice (2004) Structure of Allozyme Variation in Nordic *Silene nutans* (Caryophyllaceae): Population size, geographical position and immigration history. *Biological Journal of the Linnean Society* 81: 357-371.
- Vilches, B.; Roca, A.; Naranjo, J.; Navarro, B.; Bramwell, D. y J. Caujapé-Castells (2004) Estructura Espacial de la Variación Genética de *Erysimum albescens* (Cruciferae) en Gran Canaria: Implicaciones para la conservación ex situ en bancos de germoplasma. *Botánica Macaronésica* 25: 15-30.
- Vinson, C.C.; Ribeiro, D.O.; Harris, S.A.; Sampaio, I. & A.I. Ciampi (2009) Isolation of Polymorphic Microsatellite Markers for the Tetraploid *Dipterix odorata*, an Intensely Exploited Amazonian Tree Species. *Molecular Ecology Resources* 9: 1542-1544.
- VVAA (2000) Lista Roja de Flora Vasculare Española (valoración según las categorías de la UICN). *Conservación Vegetal* 6: 11-38.
-

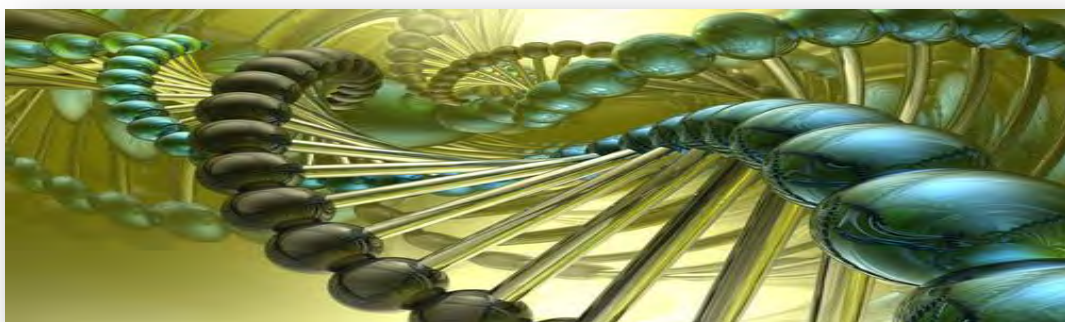
- Warburg, E.F. & Z.E. Kárpáti (1968) *Sorbus* L. En: Tutin *et al.* (eds.). Flora Europea, Vol. 2. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 67-71.
- Waser, N.M. (1987) Spatial Genetic Heterogeneity in a Population of the Montane Perennial Plant *Delphinium nelsonii*. *Heredity* 58: 249-256.
- Watanabe, M.; Yamamoto, T.; Ohara, M.; Nishitani, C. & S. Yahata (2008) Cultivar Differentiation Identified by SSR Markers and the Application for Polyploid Loquat Plant. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 77: 388-394.
- Watson, L.E.; Evans, T.M. & T. Boluarte (2000) Molecular Phylogeny and Biogeography on Tribe Anthemideae (Asteraceae) based on the Chloroplast Gene *ndhF*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 59-69.
- Weller, S.A.; Sakai, A.K. & C. Straub (1996) Allozyme Diversity and Genetic Identity in *Schiedea* and *Alsinidendron* (Caryophyllaceae: Alsinoideae) in the Hawaiian Islands. *Evolution* 50: 23-34.
- Werner, O.; Ros, R.M. y A. Fernández (2007) Caracterización Genética de Poblaciones de Varias Especies Amenazadas en el Parque Nacional de Garajonay. Puerto de la Cruz, España. III Congreso de Biología de la Conservación de Plantas.
- Whitton, J.; Sears, C.J.; Baack, E.J. & S.P. Otto (2008) The Dynamic Nature of Apomixis in the Angiosperm. *International Journal of Plant Science* 169: 169-182.
- Williams, C.F. (1994) Genetic Consequences of Seed Dispersal in Three Sympatric Forest Herbs. II. Microspatial genetic structure within populations. *Evolution* 48: 1959-1972.
- Williams, G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. & S.V. Tingey (1990) DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Researches* 18: 6531-6535.
-

- Woodson, R.E. Jr.; Schery, R.W. & G. Edwin (1967) Flora of Panama. Part VI. Family 102. Aquifoliaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 54: 381-387.
- Wright, S. (1931) Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S. (1951) The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Yagi, M.; Kimura, T.; Yamamoto, T. & T. Onozaki (2009) Estimation of Ploidy Levels and Breeding Backgrounds in Pot Carnation Cultivars Using Flow Cytometry and SSR Markers. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 78: 335-343.
- Yamamoto, T.; Kumura, T.; Shoda, M; Ban, Y.; Hayashi, T. & N. Matsuta (2002) Development of Microsatellite Markers in the Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Molecular Ecology Notes* 2: 14-16.
- Yeh, F.C.; Yang, R.C.; Boyle, T.B.J.; Ye, Z.H. & J.X. Mao (1999) POPGENE 3.2, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta. Alberta, Canadá.
- Young, A.G. & G.M. Clarke (2000) Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations. Cambridge, UK.
- Zapata, C. (1987) La Variación Genética de las Poblaciones. En: Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta (eds.). *Genética en Acuicultura*, CAICYT. Madrid, España, pp. 33-53.
- Zhang, J.; Ye, Q.; Yao, X. & H. Huang (2010) Microsatellite Diversity and Mating System of *Sinojackia xylocarpa* (Styracaceae), a Species Extinct in the Wild. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 154-159.
-

Zuur, A.F.; Ieno, E.N. & G.M. Smith (2007) *Analyzing Ecological Data*. Springer Science + Business Media, LLC. Philadelphia, USA.



Anexos



1. Programas informáticos utilizados en la caracterización 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	Caujapé-Castells y Baccari-Rosas, 2005	http://perso.wanadoo.es/mamario/software.htm
Índices de variabilidad, Identidades genéticas y Distancias genéticas	PopGene 3.2	Yeh <i>et al.</i> , 1999	http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh
	GenoDive 2.0b20	Meirmans y Van Tienderen, 2004	http://www.patrickmeirmans.com/software/GenoDive.html
UPGMA y NJ	Populations 1.2.30Beta	Langella, 2005	http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/
	PopTree 2	Takezaki <i>et al.</i> , 2010	http://homes.bio.psu.edu/people/faculty/nei/software.htm
	Rapdplot 3.0	Black, 1995	http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/data.2.html
	Philip 3.5C	Felsenstein, 1993	http://www.be.embnet.org/phyliphelp/phyliip.html
	TreeView 1.1.6	Roderic, 2001	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
Bayesiano	Mega 4	Tamura <i>et al.</i> , 2007	http://www.megasoftware.net/
Hardy-Weingberg	Structure 2.2	Falush <i>et al.</i> , 2007	http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html
PCoA y Coeficientes de diferenciación	GenePop V4	Rousset, 2008	http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm
	GenoDive 2.0b20	Meirmans y Van Tienderen, 2004	http://www.patrickmeirmans.com/software/GenoDive.html
Correlación y regresión	GeneAEx 6.4	Peakall & Smouse, 2006	http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAEx/genalex_download.php
AMOVA	PAWS Statistics 18	IBM Company, Chicago, IL	-
Test de alelos nulos	GeneAEx 6.4	Peakall & Smouse, 2006	http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAEx/genalex_download.php
Sistema de cruzamiento	Micro-Checker	Van Oosterhout <i>et al.</i> , 2004	http://www.microchecker.hull.ac.uk/
Secuenciación	MLTR 3.3	Ritland, 2002	http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html
	BioEdit 5.0.6	Hall, 2001	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html

II. Frecuencias alélicas en las poblaciones de //ex

Locus	ALELOS	ENGO-L	SUGO-P	PARC-P	APAT-P	MOQU-P	CAFO-P	CRTA-P	TROQ-A	LAFO-A	VAHE-C	LOJA-C	MOQU-C	CALD-C	TILO-C	TAMA-C
ILE04-02	N	5	4	5	8	26	9	31	9	10	3	0	0	0	5	23
	71										1,000				0,200	
	74		0,750	0,400		0,077										
	76									0,100						
	86							0,016		0,050						
	90								0,278	0,050						
	94	0,600		0,400	0,063	0,577	1,000	0,935		0,050						0,500
	95								0,056	0,050						
	96	0,400	0,250	0,200	0,938	0,346		0,048								0,500
	98								0,056	0,200						
	100									0,050						
	103								0,056							
	113									0,050						
	117								0,167	0,050						
	119								0,056							
	121									0,050						
	123									0,100					0,800	
	127									0,050						
	129								0,056							
	137								0,056							
140								0,056								
143									0,050							
145								0,111	0,100							
158								0,056								
ILE04-10	N	5	4	5	8	27	10	31	10	10	7	9	19	17	14	26
	218					0,444	0,400	0,306			0,714	0,444	0,579	0,500	0,607	0,750
	220											0,222		0,029		
	221										0,071					
	223										0,071	0,056			0,036	0,192
	226									0,150						
	228								0,950	0,800						
	229					0,056	0,050	0,081								
	231	0,200	0,125	0,200		0,093	0,350	0,387	0,050	0,050	0,143	0,278	0,421	0,471	0,357	0,058
	237					0,037	0,200	0,065								
	243	0,800	0,875	0,400	1,000											
	255			0,400		0,370		0,161								
	ILE03-38	N	5	4	5	8	27	10	31	10	10	3	7	17	14	11
259							0,100				0,500	0,214	0,324	0,214	0,545	0,625
261		0,200	0,375	0,100		0,944	0,800	0,790	1,000	1,000		0,286	0,088	0,071		
267											0,500	0,500	0,500	0,571	0,273	0,125

Locus	ALELOS	ENGO-L	SUGO-P	PARC-P	APAT-P	MOQU-P	CAFO-P	CRTA-P	TROQ-A	LAFO-A	VAHE-C	LOJA-C	MOQU-C	CALD-C	TILO-C	TAMA-C
	271	0,800	0,625	0,900	1,000	0,056	0,100	0,210							0,182	
	279												0,071			
	283															0,063
	285															0,063
	289															0,125
	291											0,059	0,036			
	295											0,029				
	299												0,036			
ILE03-53	N	5	4	5	7	26	9	31	10	10	2	6	18	15	20	24
	156	0,400	0,250	0,400	0,429	0,154		0,306	1,000	1,000						0,083
	159	0,200	0,500	0,500	0,571	0,058	0,333	0,290			0,417	0,111	0,167			0,042
	161						0,056				0,750	0,333	0,472	0,533	0,775	0,854
	164					0,154	0,167	0,065								
	167	0,400	0,250	0,100		0,538	0,444	0,323			0,250	0,250	0,417	0,300	0,225	0,021
	171							0,016								
	172					0,096										
ILE03-01	N	5	4	5	8	28	10	31	10	10	6	3	12	13	16	26
	199								0,050							
	208								0,050	0,050						
	210								0,100							
	212								0,800	0,950						
	214					0,050					0,417	0,500	0,333	0,154	0,438	0,154
	216	0,500	0,875	0,800	0,500	0,286	0,250	0,661			0,333	0,167	0,208	0,231	0,313	0,442
	218	0,500		0,100	0,500	0,643	0,700	0,339			0,167	0,167	0,417	0,462	0,156	0,192
	220					0,071						0,167		0,077	0,031	0,212
	227										0,083					
	229														0,063	
	247		0,125	0,100												
	256												0,042	0,077		
ILE04-06	N	5	4	5	7	28	8	31	10	10	3	9	25	22	19	20
	189								0,050							
	191					0,036	0,375	0,016						0,023		
	193								0,050					0,023		
	194										0,389	0,500	0,864	0,474	1,000	
	199	0,400	0,500	0,300	1,000	0,518	0,438	0,548								
	201	0,600	0,375	0,600		0,429	0,188	0,435	0,500	0,350						
	203								0,150	0,100						
	205								0,050							
	211									0,150						
	213								0,100	0,200						
	215										0,667	0,167	0,200	0,068	0,263	
	217		0,125	0,100					0,100	0,100	0,333	0,056	0,200		0,211	
	219					0,018				0,050		0,056	0,060	0,023	0,053	
	221								0,050			0,333	0,040			

LOCUS	ALELOS	ENGO-L	SUGO-P	PARC-P	APAT-P	MOQU-P	CAFO-P	CRTA-P	TROQ-A	LAFO-A	VAHE-C	LOJA-C	MOQU-C	CALD-C	TILO-C	TAMA-C
ILE05-81	N	5	4	5	8	28	10	31	10	10	7	9	20	18	12	23
	242									0,050						
	244	0,400	0,125	0,100	0,563	0,607	0,400	0,484	1,000	0,950						
	246	0,600	0,875	0,900	0,438	0,393	0,500	0,516								
	250										0,357	0,333	0,325	0,139	0,458	0,239
	252						0,050				0,571	0,556	0,500	0,500	0,250	0,543
	254											0,025				0,109
	256						0,050					0,056	0,075	0,278	0,083	0,109
	258														0,208	
	260											0,056	0,075	0,083		
262										0,071						
ILE03-86b	N	5	4	5	8	28	10	31	10	10	7	11	31	23	24	26
	205								0,050							
	209	0,200	0,125		0,563	0,643	0,450	0,677	0,600	0,550						
	213					0,100				0,050	1,000	1,000	1,000	1,000	0,958	0,885
	215								0,350	0,400					0,021	0,115
	219	0,800	0,875	1,000	0,438	0,357	0,450	0,323								
	236														0,021	

Nota: en marrón alelos exclusivos. En verde alelos fijados. "N" es el número de individuos que presentaron alelos del locus en cada población. Códigos de las poblaciones según la **Tabla 2**.

III. Frecuencias alélicas por taxones del género *Ilex*

LOCUS	ALELO	<i>I. PERADO</i> SSP. <i>LOPEZLILLOI</i>	<i>I. PERADO</i> SSP. <i>PLATYPHYLLA</i>	<i>I. AZORICA</i>	<i>I.</i> <i>CANARIENSIS</i>
ILE04-02	N	5	84	19	31
	71				0,129
	74		0,083		
	76			0,053	
	86		0,006	0,026	
	90			0,158	
	94	0,600	0,673	0,026	0,371
	95			0,053	
	96	0,400	0,238		0,371
	98			0,132	
	100			0,026	
	103			0,026	
	113			0,026	
	117			0,105	
	119			0,026	
	121			0,026	
	123			0,053	0,129
	127			0,026	
	129			0,026	
	137			0,026	
140			0,026		
143			0,026		
145			0,105		
158			0,026		
ILE04-10	N	5	85	20	92
	218		0,294		0,614
	220				0,027
	221				0,005
	223				0,071
	226			0,075	
	228			0,875	
	229		0,053		
	231	0,200	0,235	0,050	0,283
	237		0,059		
	243	0,800	0,159		
	255		0,200		
	ILE03-38	N	5	85	20
259					0,375
261		0,200	0,718	1,000	0,075
267					0,425
271		0,800	0,282		0,033
279					0,017

LOCUS	ALELO	<i>I. PERADO</i> SSP. <i>LOPEZLILLOI</i>	<i>I. PERADO</i> SSP. <i>PLATYPHYLLA</i>	<i>I. AZORICA</i>	<i>I.</i> <i>CANARIENSIS</i>
	283				0,008
	285				0,008
	289				0,017
	291				0,025
	295				0,008
	299				0,008
ILE03-53	N	5	82	20	85
	156	0,400	0,244	1,000	0,024
	159	0,200	0,262		0,094
	161				0,659
	164		0,091		
	167	0,400	0,366		0,224
	171		0,006		
	172		0,030		
ILE03-01	N	5	86	20	76
	199			0,025	
	208			0,050	
	210			0,050	
	212			0,875	
	214				0,276
	216	0,500	0,500		0,322
	218	0,500	0,465		0,263
	220		0,023		0,099
	227				0,007
	229				0,013
	247		0,012		
	256				0,020
ILE04-06	N	5	84	20	98
	189			0,025	
	191		0,060		0,005
	193			0,025	0,005
	194				0,653
	199	0,400	0,548		
	201	0,600	0,375	0,425	
	203			0,125	
	205			0,025	
	211			0,075	
	213			0,150	
	215				0,153
	217		0,012	0,100	0,107
	219		0,006	0,025	0,036
	221			0,025	0,041
ILE05-81	N	5	86	20	89
	242			0,025	
	244	0,400	0,494	0,975	

LOCUS	ALELO	<i>I. PERADO</i> SSP. <i>LOPEZLILLOI</i>	<i>I. PERADO</i> SSP. <i>PLATYPHYLLA</i>	<i>I. AZORICA</i>	<i>I.</i> <i>CANARIENSIS</i>
	246	0,600	0,506		
	250				0,287
	252				0,489
	254				0,034
	256				0,118
	258				0,028
	260				0,039
	262				0,006
ILE03-86b	N	5	86	20	122
	205			0,025	
	209	0,200	0,570	0,575	
	213			0,025	0,967
	215			0,375	0,029
	219	0,800	0,430		
	236				0,004

Nota: en marrón alelos exclusivos. En verde alelos fijados. "N" es el número de individuos que presentaron alelos del locus en cada taxón.

IV. Detalles de la toma de muestras de *Silene nocteolens*

Colecta N°: 1

Integrantes: Pedro Sosa

Fecha: 5 de junio del 2007

Agustín Naranjo

Edna González

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

Colecta N°: 2

Integrantes: Pedro Sosa

Fecha: 13 de julio del 2007

Gerald Oostermeijer

Edna González

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

Colecta N°: 3

Integrantes: Gerald Oostermeijer

Fecha: 16 de julio del 2007

Eduardo Carqué

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

Colecta N°: 4

Integrantes: Edna González

Fecha: 22 de agosto del 2007

Eduardo Carqué

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

Colecta Nº: 5
Fecha: 18 de octubre del 2007

Integrantes: Eduardo Carqué

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

Colecta Nº: 6
Fecha: 11 de junio del 2008

Integrantes: Eduardo Carqué
Pedro Sosa

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadios					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
9	Montaña Blanca (La Parcela)		423→486		63	63	0	0	0	0	0
10	Pico Viejo		425		1	1	0	0	0	0	0
Total					64	64	0	0	0	0	0

Colecta Nº: 7
Fecha: 5 de agosto del 2008

Integrantes: Eduardo Carqué
Pedro Sosa

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadios					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
11	Montaña Blanca (La Parcela)		487→578		92	92	0	0	0	0	0
12	Pico Viejo		579→580		2	2	0	0	0	0	0
Total					94	94	0	0	0	0	0

Colecta Nº: 8
Fecha: 1 de octubre del 2008

Integrantes: Eduardo Carqué

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadios					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
13	Pico Viejo		581→605		25	0	0	0	0	25	0
Total					25	0	0	0	0	25	0

Colecta Nº: 9
Fecha: 3 de diciembre del 2008

Integrantes: Eduardo Carqué
Pedro Sosa

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadios					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
14	Montaña Blanca (La Parcela)		606→625		20	20	0	0	0	0	0
Total					20	20	0	0	0	0	0

Colecta N°: 10
Fecha: 6 de junio del 2009

Integrantes: Eduardo Carqué
Pedro Sosa

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadíos					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
15	Pico Viejo		626→649		24	24	0	0	0	0	0
16	Montaña Blanca		650→672		23	23	0	0	0	0	0
Total					47	47	0	0	0	0	0

Colecta N°: 11
Fecha: 17 de diciembre del 2009

Integrantes: Eduardo Carqué
Edna González

Pobl.	Nombre	Trans.	Desde ... hasta...	Exc.	Total	Estadíos					
						Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
15	Pico Viejo		673→720		48	48	0	0	0	0	0
16	Montaña Blanca		721→749		29	29	0	0	0	0	0
Total					77	77	0	0	0	0	0

Gran Total a la fecha: (12 de enero del 2010)

Total	Estadíos					
	Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	N/D
747	355	55	49	51	113	124

* Muestras 8 y 48 extraviadas!

V. Frecuencias alélicas en *Silene nocteolens* por población

Locus	Alelos	Montaña Blanca	Pico Viejo	
SN01	N	118	129	
	176		0,027	
	182		0,016	
	184	0,119	0,357	
	186	0,653	0,190	
	188	0,157	0,341	
	190		0,050	
	201	0,013	0,012	
	207		0,008	
	211	0,004		
	213	0,055		
	SN02	N	126	126
		114	0,008	0,060
130			0,012	
138			0,012	
142		0,151	0,012	
144			0,012	
147		0,004		
149			0,044	
152		0,079	0,056	
154		0,369	0,417	
156		0,238	0,095	
158		0,067	0,004	
160			0,028	
162			0,004	
164		0,008	0,012	
168			0,004	
172		0,004	0,016	
174			0,016	
176		0,004	0,016	
178		0,004	0,044	
180			0,040	
182		0,008	0,008	
185		0,024		
187	0,004	0,052		
189		0,016		
191	0,044			
193	0,004			
221	0,004			

Locus	Alelos	Montaña Blanca	Pico Viejo
SN06	N	127	128
	171	0,059	
	173	0,012	
	175		0,004
	179	0,004	
	181		0,039
	183		0,023
	185	0,035	0,027
	187	0,453	0,434
	189	0,102	0,145
	191	0,004	0,012
	195		0,027
	197	0,106	0,020
	199	0,055	0,012
	201		0,063
	203	0,150	0,066
	205	0,020	0,066
	207		0,004
	209		0,031
	211		0,004
	227		0,008
	229		0,008
	231		0,008
SN14	N	106	123
	66	0,061	0,073
	68	0,236	0,244
	70	0,033	0,024
	74	0,033	0,004
	76	0,085	0,089
	78	0,142	0,191
	86		0,008
	88		0,146
	90	0,401	0,207
	92	0,009	
	100		0,012
	SN20	N	126
226		0,448	0,043
228		0,091	0,252
230		0,139	0,221
232		0,321	0,481
234			0,004
SN21	N	120	112
	156	0,429	

Locus	Alelos	Montaña Blanca	Pico Viejo
	158	0,104	0,009
	160	0,000	0,018
	168	0,063	
	170	0,058	0,036
	172		0,116
	174	0,033	0,134
	176		0,156
	178		0,018
	182		0,049
	184	0,004	0,027
	186	0,029	0,156
	188		0,076
	190	0,108	
	192	0,046	0,004
	194	0,063	0,054
	196		0,018
	198	0,029	0,022
	201	0,033	0,045
	204		0,054
	206		0,009

Nota: en marrón alelos exclusivos. "N" es el número de individuos que presentaron alelos del locus en cada población.

VI. Frecuencias alélicas en *Silene nocteolens* por estadios

Locus	Alelo	MB-JU	MB-VI	MB-VE	MB-RJ	MB-RA	PV-JU	PV-VI	PV-VE	PV-RJ	PV-RA	
SN01	N	24	22	23	24	25	26	30	23	25	25	
	176						0,058	0,033		0,020	0,020	
	182							0,050		0,020		
	184	0,042	0,136	0,130	0,167	0,120	0,365	0,317	0,348	0,360	0,400	
	186	0,771	0,682	0,565	0,625	0,620	0,250	0,150	0,130	0,260	0,160	
	188	0,125	0,159	0,152	0,167	0,180	0,308	0,383	0,391	0,280	0,340	
	190						0,019	0,067	0,065	0,060	0,040	
	201	0,021							0,065			
	207										0,040	
	211			0,022								
	213	0,042	0,023	0,130	0,042	0,040						
	SN02	N	26	24	26	26	24	26	30	20	25	25
		114	0,019	0,021				0,058	0,083	0,100	0,040	0,020
130										0,020	0,040	
138									0,075			
142		0,192	0,104	0,135	0,231	0,083	0,019	0,017			0,020	
144								0,033			0,020	
147						0,021						
149							0,058	0,067		0,060	0,020	
152		0,096	0,042	0,058	0,019	0,188	0,038	0,067		0,060	0,100	
154		0,250	0,542	0,404	0,346	0,313	0,385	0,400	0,500	0,420	0,400	
156		0,269	0,229	0,250	0,231	0,208	0,077	0,083	0,100	0,100	0,120	
158		0,058	0,021	0,058	0,096	0,104				0,020		
160							0,038	0,017	0,050	0,020	0,020	
162								0,017				
164				0,019		0,021	0,019	0,017		0,020		
168								0,017				
172		0,019								0,040	0,040	
174								0,017		0,020	0,040	
176			0,021					0,017	0,025	0,020	0,020	
178						0,019	0,077	0,017	0,050	0,060	0,020	
180							0,115			0,060	0,020	
182		0,019		0,019					0,025		0,020	
185							0,019	0,083				
187						0,019	0,058	0,050	0,075	0,040	0,040	
189							0,038				0,040	
191		0,077	0,021	0,058			0,063					
193						0,019						
221					0,019							
SN06	N	26	24	26	26	25	25	30	23	25	25	
	171	0,038	0,021	0,058	0,038	0,140						

Locus	Alelo	MB-JU	MB-VI	MB-VE	MB-RJ	MB-RA	PV-JU	PV-VI	PV-VE	PV-RJ	PV-RA
	173	0,038	0,021								
	175								0,022		
	179		0,021								
	181						0,040	0,033	0,043		0,080
	183							0,067		0,040	
	185		0,063	0,019	0,058	0,040	0,020	0,033	0,043		0,040
	187	0,538	0,438	0,558	0,385	0,340	0,320	0,433	0,391	0,480	0,540
	189	0,096	0,063	0,077	0,096	0,180	0,180	0,067	0,261	0,120	0,120
	191			0,019				0,017	0,022		0,020
	195						0,040	0,017	0,022	0,040	0,020
	197	0,115	0,167	0,077	0,115	0,060		0,017	0,022		0,060
	199	0,038	0,063	0,038	0,077	0,060	0,040		0,022		
	201						0,080	0,067	0,043	0,060	0,060
	203	0,115	0,125	0,135	0,192	0,180	0,080	0,083	0,022	0,140	
	205	0,019	0,021	0,019	0,038		0,100	0,083	0,043	0,080	0,020
	207									0,020	
	209						0,040	0,017	0,043	0,020	0,040
	211							0,017			
	227						0,020	0,017			
	229						0,020	0,017			
	231						0,020	0,017			
SN14	N	25	24	26	15	16	26	30	17	25	25
	66	0,060	0,021	0,058	0,067	0,125	0,096	0,083	0,088	0,020	0,080
	68	0,300	0,271	0,212	0,100	0,250	0,269	0,283	0,206	0,280	0,160
	70	0,060	0,021	0,058			0,038	0,033		0,020	0,020
	74	0,020	0,104	0,019			0,019				
	76	0,080	0,125	0,135		0,031	0,135	0,100	0,059	0,040	0,100
	78	0,180	0,083	0,135	0,100	0,219	0,173	0,217	0,176	0,220	0,160
	86								0,033		
	88						0,154	0,083	0,206	0,180	0,140
	90	0,300	0,333	0,385	0,733	0,375	0,115	0,167	0,206	0,220	0,340
	92		0,042								
	100								0,059	0,020	
SN20	N	26	24	26	26	24	26	30	23	25	25
	226	0,288	0,542	0,519	0,442	0,458	0,077	0,033		0,060	0,040
	228	0,173	0,063	0,077	0,096	0,042	0,192	0,233	0,304	0,320	0,220
	230	0,096	0,104	0,173	0,192	0,125	0,212	0,200	0,217	0,200	0,280
	232	0,442	0,292	0,231	0,269	0,375	0,519	0,517	0,478	0,420	0,460
	234								0,017		
SN21	N	26	24	26	25	19	23	25	16	25	23
	156	0,538	0,292	0,423	0,400	0,500					
	158	0,058	0,167	0,115	0,100	0,079		0,040			
	160						0,022			0,020	0,043
	168	0,058	0,042	0,038	0,080	0,105					

Locus	Alelo	MB-JU	MB-VI	MB-VE	MB-RJ	MB-RA	PV-JU	PV-VI	PV-VE	PV-RJ	PV-RA
	170	0,096	0,063	0,058	0,040	0,026	0,043	0,020	0,063	0,020	0,043
	172						0,152	0,180	0,125	0,080	0,043
	174		0,063	0,077		0,026	0,152	0,100	0,094	0,140	0,174
	176						0,130	0,160	0,188	0,140	0,174
	178							0,020		0,040	0,022
	182						0,022	0,020	0,063	0,100	0,043
	184			0,019			0,022	0,040	0,031		0,043
	186	0,038	0,042		0,060		0,239	0,220	0,094	0,060	0,152
	188						0,065	0,120	0,063	0,060	0,065
	190	0,058	0,125	0,096	0,160	0,105					
	192	0,058	0,042	0,019	0,040	0,079			0,031		
	194	0,058	0,083	0,038	0,060	0,079	0,022	0,020	0,094	0,060	0,087
	196						0,022		0,031	0,020	0,022
	198		0,042	0,038	0,060		0,022	0,020	0,031	0,020	0,022
	201	0,038	0,042	0,077			0,022	0,020	0,094	0,080	0,022
	204						0,065	0,020		0,120	0,043
	206									0,040	

Nota: en marrón alelos exclusivos. "N" es el número de individuos que presentaron alelos del locus en cada estadio por población.

VII. Frecuencias alélicas en parentelas de *S. nocteolens*

Locus	Alelos	Madres MB	Plántulas MB	Madres PV	Plántulas PV
SN01	N	12	149	5	40
	184	0,042	0,074	0,600	0,613
	186	0,875	0,836	0,100	0,250
	188	0,083	0,091	0,300	0,113
	190				0,013
	201				0,013
SN02	N	12	140	2	23
	114			0,250	0,196
	142	0,250	0,211		0,022
	144		0,004		
	147		0,007		
	149	0,042	0,025		
	152		0,029		
	154	0,417	0,429	0,250	0,391
	156	0,125	0,139	0,250	
	158	0,042	0,029		
	160				0,022
	172		0,004		
	178				0,196
	180				0,065
	182	0,042	0,007		
	185				0,022
	187				0,022
	189			0,250	0,065
	191	0,042	0,064		
	193		0,007		
221	0,042	0,046			
SN06	N	12	146	5	38
	171	0,083	0,079		
	173		0,007		
	175				0,013
	185	0,042	0,045	0,500	0,118
	187	0,542	0,568	0,400	0,632
	189	0,083	0,048		0,013
	191		0,003		
	195		0,003		
	197	0,042	0,010		
	199		0,007		
	201				0,013
	203	0,125	0,151	0,100	0,132
	205		0,034		0,039
	207				0,013
217		0,003			

Locus	Alelos	Madres MB	Plántulas MB	Madres PV	Plántulas PV
	219	0,083	0,031		
	221		0,007		
	227		0,003		0,013
	229				0,013
SN14	N	12	130	2	27
	66	0,083	0,058		0,093
	68	0,292	0,277		0,130
	70	0,125	0,127		
	74	0,042	0,015		
	76	0,125	0,127		0,093
	78	0,167	0,181		0,019
	86				0,019
	88			0,500	0,389
	90	0,167	0,215		
	92			0,500	0,259
SN20	N	12	145	1	37
	226	0,458	0,428		0,122
	228	0,083	0,097	0,500	0,149
	230	0,083	0,100		0,081
	232	0,375	0,372	0,500	0,554
	234		0,003		0,095
SN21	N	11	134	1	23
	143	0,045	0,049		
	156	0,455	0,429		
	158	0,091	0,093		
	164		0,011		
	168		0,034		
	170	0,182	0,104		0,065
	172			0,500	0,304
	174		0,007		0,130
	176		0,004	0,500	0,435
	186	0,045	0,060		0,022
	188		0,004		
	190	0,045	0,052		
	192	0,045	0,052		
	194	0,045	0,060		0,022
	196		0,011		
	198	0,045	0,030		
	201				0,022

Nota: en marrón alelos exclusivos. "N" es el número de individuos que presentaron alelos del locus en cada grupo.

VIII. Diagrama del protocolo de clonación



Crear las reacciones de ligado e incubar a temperatura ambiente por una hora o a 4 °C toda la noche.



Descongelar las células competentes sobre hielo. Añadir 50 μ l de células competentes a 2 μ l de la reacción de ligado. Incubar en hielo por 20 minutos.



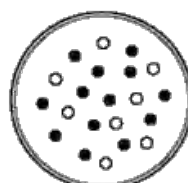
Llevar a choque térmico por 45 – 50 minutos a exactamente 42 °C.



Incubar en hielo por 2 minutos.



Añadir el medio SOC. Incubar por 1,5 horas a 37 °C con agitación.



Sembrar en platos con medio LB enriquecido con IPTG y X-Gal. Seleccionar las colonias blancas.

IX. Frecuencias alélicas en las poblaciones de *Sorbus aria*

LOCUS	ALELO	GYCT	COBP	EYMP	PGAP	LANP	EPNP	PNCA	PNAI	PNPE	PNSN	TOTAL
SA01	N	12	4	13	11	59	6	18	68	87	141	419
	212								0,103	0,046		0,026
	216								0,147	0,012		0,026
	218									0,046		0,010
	222	0,333							0,029	0,012	0,106	0,053
	226	0,333	0,500	0,615	0,636	0,525	0,500	0,333	0,191	0,115	0,114	0,239
	228							0,333	0,059	0,092		0,043
	230							0,333	0,221	0,230	0,660	0,320
	232								0,059	0,046	0,121	0,060
	234									0,103		0,022
	235	0,333							0,103	0,046		0,036
	236								0,044	0,069		0,022
	238									0,035		0,007
	241								0,015			0,002
	242								0,029	0,103		0,026
	250									0,035		0,007
	252									0,012		0,002
	254		0,500	0,385	0,364	0,475	0,500					0,100
SA02	N	11	9	18	15	87	9	12	70	109	156	496
	270								0,057	0,138		0,038
	274								0,114		0,019	0,022
	276								0,043	0,220		0,054
	284								0,229	0,101		0,054
	287								0,129	0,028	0,006	0,026
	289	0,364	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	0,100	0,110	0,128		0,179
	291							0,086	0,147	0,314		0,143
	293	0,273	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333					0,099
	295	0,364						0,029				0,012
	297		0,333	0,333	0,333	0,333	0,333			0,009	0,282	0,184
	300								0,057			0,008
	301							0,500	0,071	0,119	0,032	0,059
	305								0,043			0,006
	307								0,014			0,002
	309								0,029			0,004
	311							0,500		0,028	0,192	0,079
	313										0,026	0,008
	323									0,018		0,004
	325									0,083		0,018
SA03	N	12	9	12	9	85	9	12	70	104	148	470
	206							0,500			0,169	0,066
	210										0,189	0,060
	218							0,500			0,203	0,077
	222								0,357	0,337	0,034	0,138
	224									0,048	0,020	0,017
	225	0,333	0,333	0,333	0,333	0,318	0,333				0,122	0,132
	229								0,043	0,019		0,011
	231	0,333	0,333	0,333	0,333	0,341	0,333	0,143	0,010	0,122		0,160
	233					0,047					0,020	0,015
	237									0,106	0,122	0,062
	239								0,343	0,087		0,070
	243								0,043	0,058		0,019
	245	0,333	0,333	0,333	0,333	0,294	0,333			0,019		0,094
	249								0,071	0,317		0,081

LOCUS	ALELO	GYCT	COBP	EYMP	PGAP	LANP	EPNP	PNCA	PNAI	PNPE	PNSN	TOTAL	
SA06	N	6	6	10	10	56	6	15	66	93	118	386	
	248								0,030	0,086		0,026	
	250									0,022		0,005	
	254							0,133			0,212	0,070	
	255								0,061	0,022		0,016	
	257							0,867	0,303	0,161		0,124	
	259	0,500	0,500	0,100		0,107			0,030	0,054		0,052	
	261			0,400	0,500	0,393	0,500		0,030	0,194	0,339	0,244	
	263									0,054	0,068	0,034	
	267								0,318	0,151	0,119	0,127	
	269								0,030	0,065		0,021	
	271										0,186	0,057	
	273									0,097	0,025	0,031	
	275	0,500											0,008
	277		0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500			0,022		0,119
	281										0,022	0,051	0,021
	283										0,011		0,003
	285								0,197	0,022			0,039
287										0,022		0,005	
SA07	N	12	9	15	15	87	9	12	72	104	122	457	
	325							0,500	0,125	0,144	0,205	0,120	
	327							0,500	0,208	0,135	0,180	0,125	
	329	0,333	0,333	0,333	0,067	0,149			0,069	0,212	0,230	0,177	
	331				0,267	0,184	0,333		0,208	0,192	0,221	0,186	
	333								0,306	0,154	0,016	0,088	
	335								0,056	0,144		0,042	
	337	0,333	0,333	0,333	0,067	0,149				0,010	0,066	0,077	
	339				0,267	0,184	0,333					0,082	0,072
	345								0,028	0,010		0,007	
	347	0,333										0,009	
349		0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333					0,099	
SA08	N	12	9	13	10	58	6	16	72	110	150	456	
	233								0,069	0,300		0,083	
	243								0,014			0,002	
	247							0,125	0,042		0,147	0,059	
	249	0,333	0,333	0,462	0,500	0,500	0,500	0,375	0,069	0,018	0,527	0,311	
	251							0,250	0,083	0,164		0,061	
	253							0,125				0,004	
	255							0,125		0,036	0,033	0,024	
	257								0,083	0,027	0,160	0,072	
	259	0,333					0,379			0,064		0,072	
	261		0,333	0,462	0,500	0,121	0,500		0,028	0,055		0,070	
	263									0,027		0,007	
	265								0,056	0,118	0,007	0,040	
	267	0,333							0,069	0,055	0,120	0,072	
	269										0,007	0,002	
	271								0,056	0,118		0,037	
272								0,431	0,009		0,070		
274									0,009		0,002		
287		0,333	0,077									0,009	
SA09	N	12	9	18	15	87	9	18	71	105	151	495	
	161									0,010		0,002	
	163							0,333	0,225	0,210		0,089	
	165	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333				0,119	0,137	
	167										0,172	0,053	
	169							0,333			0,192	0,071	
	173								0,056			0,008	

LOCUS	ALELO	GYCT	COBP	EYMP	PGAP	LANP	EPNP	PNCA	PNAI	PNPE	PNSN	TOTAL
	175	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333			0,019		0,105
	177	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333		0,028	0,038		0,113
	179								0,056	0,019		0,012
	183								0,099	0,181	0,139	0,095
	185								0,056	0,229		0,057
	187								0,296	0,067	0,152	0,103
	189								0,042	0,010	0,020	0,014
	191							0,333	0,014	0,057	0,185	0,083
	193									0,010	0,020	0,008
	195								0,099	0,124		0,040
	197								0,028	0,029		0,010
SA14	N	12	9	18	15	86	9	18	72	109	151	499
	197								0,125	0,101	0,020	0,046
	199								0,014			0,002
	203	0,333	0,333	0,333	0,333	0,081	0,333		0,208	0,101		0,108
	205					0,256			0,306	0,349		0,164
	208	0,333	0,333	0,333	0,333	0,337	0,333					0,100
	210								0,014	0,055	0,053	0,030
	212										0,119	0,036
	214	0,333	0,333	0,333	0,333	0,326	0,333	0,333		0,037	0,139	0,160
	216									0,018	0,007	0,006
	218								0,097	0,046	0,199	0,084
	220									0,184	0,159	0,088
	224								0,153	0,009		0,024
	226							0,333	0,069	0,101	0,285	0,130
	230										0,013	0,004
	232							0,333	0,014		0,007	0,016
SA19,1	N	12	6	18	15	87	3	18	72	101	143	475
	212	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333			0,020	0,343	0,206
	215							0,333	0,181	0,020		0,044
	222								0,028			0,004
	224										0,021	0,006
	230								0,014			0,002
	232							0,333	0,056			0,021
	234							0,333	0,333	0,505	0,238	0,242
	236	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333	0,333		0,028	0,099	0,364	0,234
	242								0,014			0,002
	246		0,167	0,278	0,333	0,333	0,333		0,014			0,088
	248	0,333	0,167	0,056					0,028	0,069		0,032
	250								0,306	0,287	0,035	0,118

Nota: en marrón alelos exclusivos, "N" es el número de individuos que presentaron alelos del locus en cada población.

X. Frecuencias alélicas de *Sorbus aria* según regiones

LOCUS	ALELO	CANARIAS	PENÍNSULA
SA01	N	105	314
	212		0,035
	216		0,035
	218		0,013
	222	0,038	0,057
	226	0,524	0,143
	228		0,057
	230		0,427
	232		0,080
	234		0,029
	235	0,038	0,035
	236		0,029
	238		0,010
	241		0,003
	242		0,035
	250		0,010
	252		0,003
	254	0,400	
SA02	N	149	347
	270		0,055
	274		0,032
	276		0,078
	284		0,078
	287		0,038
	289	0,336	0,112
	291		0,205
	293	0,329	
	295	0,027	0,006
	297	0,309	0,130
	300		0,012
	301		0,084
	305		0,009
	307		0,003
	309		0,006
	311		0,112
	313		0,012
	323		0,006
325		0,026	
SA03	N	136	334
	206		0,093
	210		0,084
	218		0,108
	222		0,195
	224		0,024
	225	0,324	0,054
	229		0,015
	231	0,338	0,087
	233	0,029	0,009
	237		0,087
	239		0,099
	243		0,027
	245	0,309	0,006
249		0,114	

LOCUS	ALELO	CANARIAS	PENÍNSULA
SA06	N	94	292
	248		0,034
	250		0,007
	254		0,093
	255		0,021
	257		0,164
	259	0,138	0,024
	261	0,362	0,206
	263		0,045
	267		0,168
	269		0,027
	271		0,075
	273		0,041
	275	0,032	
	277	0,468	0,007
	281		0,027
	283		0,003
285		0,051	
287		0,007	
SA07	N	147	310
	325		0,177
	327		0,184
	329	0,177	0,177
	331	0,157	0,200
	333		0,129
	335		0,061
	337	0,177	0,029
	339	0,157	0,032
	345		0,010
	347		0,027
	349		0,306
SA08	N	108	348
	233		0,109
	243		0,003
	247		0,078
	249	0,463	0,264
	251		0,081
	253		0,006
	255		0,032
	257		0,095
	259	0,241	0,020
	261	0,222	0,023
	263		0,009
	265		0,052
	267	0,037	0,083
	269		0,003
	271		0,049
	272		0,092
274		0,003	
287	0,037		
SA09	N	150	345
	161		0,003
	163		0,128
	165	0,333	0,052
	167		0,075
	169		0,101
	173		0,012

LOCUS	ALELO	CANARIAS	PENÍNSULA
	175	0,333	0,006
	177	0,333	0,017
	179		0,017
	183		0,136
	185		0,081
	187		0,148
	189		0,020
	191		0,119
	193		0,012
	195		0,058
	197		0,015
SA14	N	149	350
	197		0,066
	199		0,003
	203	0,188	0,074
	205	0,148	0,171
	208	0,336	
	210		0,043
	212		0,051
	214	0,329	0,089
	216		0,009
	218		0,120
	220		0,126
	224		0,034
	226		0,186
	230		0,006
	232		0,023
SA19,1	N	141	334
	212	0,333	0,153
	215		0,063
	222		0,006
	224		0,009
	230		0,003
	232		0,030
	234		0,344
	236	0,333	0,192
	242		0,003
	246	0,291	0,003
	248	0,043	0,027
	250		0,168

Nota: en marrón alelos exclusivos, "N" es el número de individuos que presentaron alelos del locus en cada región.

XI. Listado de siglas y abreviaturas

A	Número medio de alelos por locus.
PCoA	Análisis de Coordenadas Principales.
AFLP	Tipo de marcador nuclear basado en una combinación de la variación de los sitios de restricción y amplificación de PCR (Amplified Fragment Length Polymorphism).
BSA	Albúmina de Suero Bovino. A concentraciones superiores a 0,8 µg/µl, el BSA incrementa la eficiencia de la PCR ya que actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa.
D	Distancia genética de Nei.
DAS	Distancia de alelos compartidos (Shared Allele Distance).
DMSO	Dimetilsulfóxido. Sustancia que facilita la separación de las hebras de ADN (difícil cuando existe abundancia de enlaces GC) interrumpiendo el apareamiento de las bases, lo cual mejora la eficiencia de la PCR.
EMBL	Código correspondiente a cada locus en el Banco Europeo de Secuencias Nucleotídicas.
F_{IS}	Coefficiente de endogamia.
\bar{F}_{IS}	Coefficiente de endogamia promedio
F_{ST}	Coefficiente de diferenciación genética.
\bar{F}_{ST}	Coefficiente de diferenciación genética promedio.
F'_{ST}	Coefficiente de diferenciación genética estandarizado para poblaciones de diferentes ploidías (GenoDive).
\bar{F}'_{ST}	Coefficiente de diferenciación genética estandarizado promedio para poblaciones con varias ploidías (GenoDive).
G_{IS}	Coefficiente de endogamia en poblaciones de diferentes ploidías (GenoDive).
\bar{G}_{IS}	Coefficiente de diferenciación genética promedio en poblaciones con varias ploidías (GenoDive).
H_0	Hipótesis nula.
H_e	Heterocigosidad esperada.
H_o	Heterocigosidad observada.
H_s	Heterocigosidad en poblaciones con varias ploidías (GenoDive).
I	Identidad genética de Nei.
\bar{I}	Identidad genética media.
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
ISSR	Marcador molecular genético (Inter-Simple Sequence Repeat).
ITS	Marcador molecular genético (Internal Transcribed Spacers).
JM109	Cepa de células competentes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas para clonación de <i>Sorbus aria</i> .
K	Número de grupos inferidos en el análisis bayesiano.
LB	Medio de cultivo de Luria-Bertani.
matK	Previamente conocido como ORF (por "open reading frame"), es una región del ADN cloroplástico que está en el intrón que separa las regiones codificantes del trnK. Su tasa de mutaciones es más alta que el rbcL.
N_A	Número medio de alelos en poblaciones de diferentes ploidías (GenoDive).
NJ	Algoritmo de agrupamiento basado en el principio de la evolución mínima en el cual el mejor árbol es aquel que minimiza la suma de las longitudes de todas las ramas (Neighbor Joining).
P	Proporción de loci polimórficos (porcentaje).

pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction).
pGEM-T	Vector bacteriano utilizado en la clonación de <i>Sorbus aria</i> .
rbcl	Región del ADN cloroplástico (ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigena subunidad Larga).
SOC	Medio de cultivo utilizado para la recuperación de células competentes tras el choque térmico.
SSR	Microsatélites (Simple Sequence Repeats).
Tm	Temperatura de hibridación en la PCR.
UPGMA	Algoritmo donde el nivel de agrupamiento es determinado por la media aritmética de la distancia entre cada individuo y el grupo previo y con cuyas distancias se genera un dendrograma (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean).
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.