

BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN DE ENDEMISMOS VEGETALES DE LOS PARQUES NACIONALES CANARIOS: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y DEMOGRÁFICA

PEDRO A. SOSA¹, MIGUEL A. GONZÁLEZ PÉREZ¹,
EDNA A. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ¹, ELISABET RIVERO-SANTANA¹,
AGUSTÍN NARANJO-CIGALA², GERARD OOSTERMEIJER³, JOSÉ J. PESTANO-BRITO⁴
Y THOMAS VAN HENGSTUM³

RESUMEN

El presente proyecto se centra en aplicar técnicas de biología molecular, demográficas y de biología reproductiva en cuatro endemismos canarios amenazados que se encuentran total o parcialmente localizados en los parques nacionales de Canarias: *Silene nocteolens* Webb & Berthel. (Parque Nacional del Teide, Tenerife); *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (G. Kunkel) A. Hansen & Sunding (Parque Nacional Garajonay, La Gomera), *Sorbus aria* (L.) Crantz (Parque Nacional de la Caldera de Taburiente, La Palma) y *Bencomia exstipulata* Svent. (parques nacionales del Teide y Caldera de Taburiente). Se estableció un estudio genético a través de marcadores moleculares hipervariables, microsatélites, y se determinó para cada taxón la variación genética de sus poblaciones, para su posterior aplicación en la gestión en el ámbito de la Biología de la conservación de estos taxones.

En *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* se pudo comprobar que comparte el mismo acervo genético que *I. perado* ssp. *platyphylla*, mientras que *I. canariensis* e *I. azorica* se diferencian considerablemente.

Para *Sorbus aria*, el análisis de los nueve microsatélites polimórficos caracterizados para la especie detectó una baja variación genética en las poblaciones Canarias. Por otro lado, se observó una diferenciación genética entre las muestras de La Palma y Tenerife, así como entre estas y las poblaciones de la Península. Entre las poblaciones de la Península destaca la alta diversidad genética del Parque Nacional de Sierra Nevada. Así mismo, cabe reseñar el carácter triploide detectado en los ejemplares de Canarias, así como de muchas de las muestras de la Península.

¹Departamento de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira, 35017, Las Palmas de Gran Canaria. Islas Canarias, España.

psosa@dbio.ulpgc.es

mgonzalez@proyinves.ulpgc.es

edna.gonzalez101@doctorandos.ulpgc.es

erivero@becarios.ulpgc.es

²Departamento de Geografía, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, C/ Pérez del Toro, 1 (35017), Las Palmas de Gran Canaria. Islas Canarias, España.

anaranjo@dgeo.ulpgc.es

³Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics (IBED) University of Amsterdam Postal address: P.O. Box 94062, 1090 GB Amsterdam, Holanda.

Oostermeijer@science.uva.nl

tvanhengstum@gmail.com

⁴Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de San Cristóbal. Avda. Marítima Sur, s/n, 35016, Las Palmas de Gran Canaria. Islas Canarias, España.

ipestano@dbbf.ulpgc.es

Los cinco microsatélites aislados y caracterizados para *Silene nocteolens* permitieron determinar los niveles de diversidad y diferenciación genética existente entre las dos únicas poblaciones naturales de la especie. Igualmente, estos marcadores moleculares revelaron la existencia de un alto grado de endogamia, sobre todo en los primeros estadios vitales, fruto de la posible autofecundación. Así mismo, se observó que el coeficiente de endogamia disminuye a lo largo de los distintos estadios vitales de la especie y que está proporcionalmente relacionado con la tasa de mortalidad registrada.

Los experimentos de biología reproductiva en *Bencomia exstipulata* determinaron que el viento es el principal dispersor del polen de la especie.

En general se discuten los resultados en el marco de la biología reproductiva para determinar un plan de actuación y manejo consensuado y coordinado bajo criterios científicos dentro del contexto de la biología de la conservación.

Palabras clave: Biología de la Conservación; Demografía Vegetal; Diversidad Genética; parques nacionales de Canarias; Plan de Recuperación.

SUMMARY

The present project proposes apply and coordinate techniques of Molecular Biology, Demography and Reproductive Biology on four vegetal threatened species from the Canary Islands: *Silene nocteolens* Webb & Berthel. (Teide National Park, Tenerife); *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (G. Kunkel) A. Hansen & Sunding (Garajonay National Park, Gomera), *Sorbus aria* (L.) Crantz (Caldera de Taburiente National Park, La Palma) and *Bencomia exstipulata* Svent. (Teide and Caldera de Taburiente National Parks).

A genetic study was carried out using a highly polymorphic molecular marker, microsatellite, genetic variation of each population was determinate, in order to apply it in the management strategies within the Conservation Biology context.

Ilex perado ssp. *lopezlilloi* and *I. perado* ssp. *platyphylla* shared the same genetic pool; whereas *I. canariensis* and *I. azorica* have strong genetic differentiation.

Genetic analysis of the nine polymorphic microsatellite loci characterized in *Sorbus aria* showed a low genetic variation in the populations from the Canary Islands. On the other hand, there were genetic differentiations among La Palma and Tenerife populations, as well as, among these and those populations from the Peninsula. In regard to peninsula populations, a high genetic diversity was detected in the Sierra Nevada National Park. Also, a triploid pattern was recorded in the samples from the canaries, as well as, many individuals from the Peninsula.

Genetic diversity and differentiation in the two natural populations of *Silene nocteolens* were estimated using the five microsatellites loci isolated and characterized for the species. Equally, these molecular markers showed a high inbreeding degree, mainly in the first stages, due to selfing. Also, we observed that inbreeding coefficient decreases along the different vital stages of the species, and possibly is related with the mortality rate recorded.

Reproductive Biology analysis in *Bencomia exstipulata* showed that the wind is the principal pollen disperser.

In general, results are discussed within the reproductive biology context, in order to suggest management strategies.

Key words: Conservation Biology, plant demography, genetic diversity, Canary Islands National Parks, reinforcing strategies.

INTRODUCCIÓN

Es un hecho ampliamente reconocido que las islas oceánicas, como el archipiélago canario, 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 reducidos, razón por la cual se encuentran con algún grado de amenaza y es inminente actuar antes de que la erosión genética impida conservar su riqueza alélica (FERNÁNDEZ-PALACIOS & MARTÍN ESQUIVEL 2001, FRANCISCO-ORTEGA & SANTOS 2001, SOSA *et al.* 2002, BATISTA *et al.* 2004, GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2009a, GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2009b).

En este sentido, en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (CEAC 2000) del Gobierno de Canarias se han inscrito 262 taxones vegetales, de los que 74 se han catalogado en su máxima condición de amenaza (peligro de extinción).

En estas circunstancias, el estado de alta vulnerabilidad de las poblaciones de buena parte de estos endemismos canarios, no sólo es debido al impacto antrópico, sino también consecuencia de la propia dinámica de las poblaciones con un reducido número de individuos. En ellas, los fenómenos de aislamiento y consanguinidad son muy acusados, siendo por tanto imprescindible redoblar los esfuerzos y desarrollar programas y proyectos de conservación que eviten que la erosión genética en estos endemismos se torne irreversible, exhiban procesos de regresión por inestabilidad genética y/o demográfica, dando lugar de esta manera a la extinción local de sus poblaciones (SILVERTOWN & CHARLESWORTH 2001, FRANKHAM *et al.* 2002, SOSA *et al.* 2002, OOSTERMEIJER *et al.* 2003).

En un proyecto de conservación es necesario por un lado averiguar el grado y el nivel de la variación genética de las especies, al mismo tiempo que determinar como esa diversidad se distribuye y se estructura en el espacio y en el tiempo. También es fundamental precisar las causas reales y potenciales que originan (o han originado) esos niveles y estructuración genética en las poblaciones estableciendo las medidas y pautas necesarias para maximizar el mantenimiento de dicha diversidad genética en las poblaciones naturales, y minimizar las razones que originan su disminución (SOSA 2001, SOSA *et al.* 2002). Examinar pues, la diversidad genética de las poblaciones naturales e identificar y ordenar las fuerzas y factores evolutivos responsables que expliquen la arquitectura genética de las mismas (selección natural, mutación, deriva y flujo genético) constituye un aspecto fundamental en la conservación biológica. Cualquier cambio en la distribución de la diversidad genética puede destruir adaptaciones locales o romper complejos y asociaciones genéticas coadaptadas (SILVERTOWN & CHARLESWORTH 2001, SOSA 2001, SOSA *et al.* 2002).

Uno de los más recientes instrumentos utilizados en la conservación genética de las poblaciones naturales son los marcadores moleculares, que nos permiten medir la diversidad genética en una amplia variedad de especies mostrando en ocasiones altos niveles de polimorfismo y numerosos alelos por locus, como es el caso de los microsatélites. Además, el carácter codominante de los microsatélites desvela el genotipo completo de los individuos, sin encubrimientos a causa de características dominantes (GOLDSTEIN & SCHLÖTTERER 1999, FRANKHAM *et al.* 2002).

Son muchos los estudios que aplican esta técnica en especies amenazadas y, de ellos, gran cantidad se centra en el descubrimiento y comparación de

genotipos de especies vegetales. En las islas Canarias esta metodología se ha implementado para la caracterización genética de especies amenazadas como *Bencomia exstipulata* (GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2004a, GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2009a), *Myrica rivas-martinezii* (GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2008) y *Sambucus palmensis* (SOSA *et al.* sometido) entre otras.

Por otro lado, la determinación de los aspectos reproductivos y demográficos constituyen los dos pilares complementarios a la caracterización genética, mediante los cuales nos permitirán disponer de un método científico que contribuya a la conservación biológica de las especies amenazadas.

Taxones estudiados:

Ilex perado ssp. *lopezilloii* (G. Kunkel) A. Hansen & Sunding (Aquifoliaceae).

Ilex perado ssp. *lopezilloii* es un endemismo exclusivo de La Gomera donde se localizan escasos individuos en el interior del Parque Nacional de Garajonay (BAÑARES *et al.* 2003, 2004). Además, y también en la Gomera, existe una segunda localidad (de 16 ejemplares), fruto de las actuaciones de recuperación del taxón que se han desarrollado en el Parque Nacional, y que procede de individuos obtenidos mediante propagación asexual (BAÑARES *et al.* 2003, 2004). Las causas de la escasez de este taxón podrían relacionarse con su aprovechamiento maderero y su interés forrajero en el pasado. Así mismo, el carácter dioico y la existencia de solo tres pies femeninos en condiciones naturales suponen una barrera en principio, insalvable para la reproducción sexual, de tal forma que las múltiples colectas de frutos realizadas muestran una inexistencia de embriones. No obstante, los ensayos de propagación de estaquillas exhiben mejores resultados, sobre todo cuando han sido realizados sin tratamiento previo hormonal (50% de éxito). El taxón se encuentra clasificado como "En Peligro de Extinción" en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (CEAC 2000), en el Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España (BAÑARES *et al.* 2004), y se propone su inclusión en la Directiva de Hábitats como especie prioritaria (VVAA 2000, BAÑARES *et al.* 2004).

Sorbus aria (L) Crantz (*Rosaceae*)

El peralillo de cumbre se distribuye en Canarias exclusivamente en las islas de Tenerife y La Palma debido a que está presente en zonas de alta montaña. Su distribución es amplia en la Península Ibérica y norte de África, con citas en todos los macizos montañosos. Crece casi siempre en forma de individuos aislados, con pies separados entre sí grandes distancias y más raramente en rodales de unos pocos individuos. En Canarias se ha descrito un escaso número de ejemplares, contabilizándose unos 50 individuos en La Palma muy aislados y ocupando un área considerablemente amplia, dentro y cerca de los límites del Parque Nacional (MMA 2003); mientras que en Tenerife, entorno a menos de 10 ejemplares se localizan exclusivamente en el interior del Parque Nacional del Teide, estando también sus individuos considerablemente aislados. Por ello, la especie se encuentra catalogada en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (CEAC 2000) como "De Interés Especial". Desde un punto de vista reproductivo florece en el mes de mayo y sus flores son polinizadas por insectos, sobre todo por abejas y dípteros, aunque posiblemente una parte importante de la producción de frutos se lleve a cabo por apomixis y partenocarpia a partir de primordios seminales sin fertilizar. La dispersión de semillas es llevada a cabo por aves frugívoras, siendo la tasa de germinación en condiciones experimentales muy baja, no superando el 15% (CABEZUDO *et al.* 2000, BAÑARES *et al.* 2004). La especie se encuentra incluida en el Plan de Conservación del Hábitat de Cumbre del Parque Nacional de la Caldera de Taburiente y se considera de gran interés establecer un estudio genético que permita comparar sus poblaciones con las del Teide (MMA 2003).

Silene nocteolens Webb & Berthel.
(Caryophyllaceae)

La conejera de risco es un endemismo de la isla de Tenerife. Crece exclusivamente en el Parque Nacional del Teide donde se presenta solamente en dos localidades en sectores de alta montaña con un número de efectivos relativamente bajo: Montaña Blanca con unos 756 individuos y Pico Viejo con unos 60 (BAÑARES *et al.* 2004). La población

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

Bencomia exstipulata Svent.
(Rosaceae-Sanguisorbeae)

Pertenece a la sección Bencomiella asociada a ecosistemas secos, constituye un endemismo relegado a las cumbres de Tenerife y La Palma, en los parques nacionales del Teide y Caldera de Taburiente, donde se integra en las comunidades rupícolas de *Greenovio-Aeonietea* Santos 1976 del matorral de alta montaña canaria, por encima de los 2.000 metros de altitud. El Rosal del Guanche se encuentra representado por tan sólo dos poblaciones situadas en piedemontes y escarpes prácticamente inaccesibles, una con 52 individuos en la isla de Tenerife (Tiro del Guanche; Parque Nacional del Teide) y, la otra, con 21 individuos en La Palma (Barranco de Tajodeque; Parque Nacional de La Caldera de Taburiente). Se encuentra clasificada en Peligro de extinción en el Catálogo Especies Amenazadas de Canarias además de estar incluida en la Directiva Hábitat y el Convenio de Berna (BELTRÁN *et al.* 1999). La especie ha sido estudiada genéticamente mediante microsatélites (GONZÁLEZ PÉREZ *et al.* 2004a, 2009a), encontrándose unos mayores niveles de diversidad genética en la población natural de La Palma que en la de Tenerife, a pesar de que esta última alberga más del doble de individuos naturales que en la primera. No obstante, los niveles de variabilidad genética disminuyen considerablemente al analizar los individuos restituidos, lo cual demuestra la existencia de un cuello de botella muy importante en dichas poblaciones, existiendo por tanto la necesidad de incluir individuos

genéticamente diferentes en nuevas restituciones (GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2009a).

Objetivos

El objetivo global del presente proyecto es determinar la variabilidad, el grado de diferenciación y el nivel de estructuración genética en las poblaciones naturales de *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*, *Silene nocteolens* y *Sorbus aria* del archipiélago canario. Además de establecer un análisis de la Biología reproductiva de *Bencomia exstipulata* del Parque Nacional del Teide. De esta forma, y con los resultados obtenidos, se espera contribuir a la Biología de la Conservación de estos endemismos vegetales incluidos en los dominios de los parques nacionales canarios. Por otro lado, los objetivos específicos de este proyecto han consistido en:

1. Buscar y desarrollar microsatélites que permitan identificar y diferenciar con rapidez, de forma objetiva y sin ambigüedades la identidad genética de los individuos de las especies analizadas.
2. Analizar la relación genética entre varias especies y subespecies del género *Ilex* de la Macaronesia para verificar el grado de diferenciación existente entre *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* y sus congéneres más cercanos.
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, de los diferentes estadios vitales de la especie.
5. Conocer el grado de diversidad genética entre los individuos de *Sorbus aria* para establecer su acervo genético existente.
6. Determinar los mecanismos y vectores que están imperando en la Biología reproductiva y demográfica de *Bencomia exstipulata* en las poblaciones naturales restituidas del Parque Nacional del Teide.

7. Contribuir, desde la perspectiva genética a la aplicación y desarrollo de los posibles planes de recuperación que se puedan establecer en estos endemismos amenazados.

MATERIAL Y METODOS

Muestreo

Ilex perado ssp. *lopezlilloi*

En el presente proyecto se recolectaron 126 ejemplares de todas las especies y subespecies de *Ilex* en Canarias y Azores, y poder establecer así un análisis genético comparativo entre las mismas. Las muestras procedían de 16 localidades situadas en cinco islas e incluyen las cuatro especies o subespecies descritas hasta el momento (tabla 1): *Ilex perado* ssp. *platyphylla*, *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*, *Ilex azorica* e *Ilex canariensis* (tabla 1).

Sorbus aria

Para afrontar el estudio de *Sorbus aria* se ha recolectado un total de 198 ejemplares procedentes de 12 localidades distintas. Las muestras de Tenerife (4) constituyen todos los ejemplares descritos en la isla. En La Palma se han registrado unos 49 ejemplares de seis localidades separadas

geográficamente. Finalmente, se recogieron muestras de cuatro localidades de la Península: Parque Nacional de Cabañeros (Extremadura), Parque Nacional de Aigüestortes (Cataluña), Parque Nacional de los Picos de Europa y Parque Nacional de Sierra Nevada (tabla 2).

Silene nocteolens

Se ha muestreado un total de 747 individuos procedentes de las dos poblaciones naturales existentes, así como de la germinación de semillas recolectadas en estas (tabla 3). El estudio en esta especie se ha encaminado desde dos enfoques diferentes; por un lado se pretende analizar la diversidad genética poblacional y comparar los niveles de variación y diferenciación genética existente entre ambas poblaciones naturales, y en segundo lugar, conocer la dinámica reproductiva de la especie utilizando para ello la variación molecular detectada en los microsátélites, además del grado de endogamia de los mismos atendiendo al genotipo de los progenitores y los de su descendencia. Los diferentes estadios vitales considerados para llevar a cabo este segundo enfoque fueron; juveniles (Ju): individuos inmaduros, pequeños; virginales (Vi): individuos vegetativos sin rastro de previa floración; vegetativos (Ve): individuos vegetativos con reminiscencia de floración.

ESPECIE	LOCALIDAD	CÓDIGO	ISLA	Nº
<i>Ilex perado</i> ssp. <i>lopezlilloi</i>	La Gomera	ENGO-L	La Gomera	5 5
<i>Ilex perado</i> ssp. <i>platyphylla</i>	Ancule, Bailadero y Reventón Oscuro	SUGO-P	La Gomera	4
	Zona de Parcelas	PARC-P	La Gomera	5
	Aparcamiento	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	San Miguel	10
	Lago de Fogo	LAFO-A	San Miguel	10
				20
<i>Ilex canariensis</i>	La Galería del Barbusano y Valle Hermoso	JACA-C	Gran Canaria y La Gomera	8
				8
TOTAL				126

Tabla 1. Poblaciones de *Ilex* analizadas por taxón, localidad e isla.

Table 1. *Ilex* populations analyzed by taxon, locality and island.

ESPECIE	LOCALIDAD	CÓDIGO	LUGAR	Nº
<i>Sorbus aria</i>	Guajara	GuT	Tenerife	3
	Los Cachorros	CaT	Tenerife	1
	Curva del Observatorio	COT	La Palma	3
	Espigón del Roque	ERP	La Palma	5
	La Parcela Grande	PGP	La Palma	5
	El Espigón	EsP	La Palma	1
	Los Andenes	AnP	La Palma	32
	El Espigón del Norte	ENP	La Palma	3
	P.N. Cabañeros	PNC	Península	6
	P.N. Aigüestortes	PNA	Península	36
	P.N. Picos de Europa	PNP	Península	51
	P.N. Sierra Nevada	PNS	Península	52
TOTAL				198

Tabla 2. Poblaciones de *Sorbus aria* analizadas.

Table 2. *Sorbus aria* populations analyzed.

nes pasadas; reproductor joven (Rj): individuos con flores, sin vestigios de floraciones pasadas; reproductor adulto (Ra): individuos con flores y evidencia de floraciones anteriores (tabla 3).

Bencomia exstipulata

Los estudios sobre la Biología reproductiva y demografía de *Bencomia exstipulata* se establecieron tanto en las poblaciones naturales como

en las restituidas dentro del parque Nacional del Teide.

En mayo de 2008 se procedió a determinar los mecanismos y actores que intervenían en la polinización de la especie. Para ello se prepararon diferentes puntos de observación en la población natural y restituida del Tiro del Guanche, y a través de un monocular de gran amplitud (Tasco 8 x 10) se procedió a contabilizar e iden-

ORIGEN	ESTADIO						TOTAL
	Ju	Vi	Ve	Rj	Ra	S/D	
Montaña Blanca	0		0	0	0	124	124
Montaña Blanca	26	25	26	1	0	0	78
Pico Viejo	27	30	23	25	25	0	130
Montaña Blanca	0	0	0	25	25	0	50
Montaña Blanca	0	0	0	0	35	0	35
Pico Viejo	0	0	0	0	3	0	3
Montaña Blanca	63	0	0	0	0	0	63
Pico Viejo	1	0	0	0	0	0	1
Montaña Blanca	0	0	0	92	0	0	92
Pico Viejo	0	0	0	2	0	0	2
Pico Viejo	0	0	0	0	25	0	25
Montaña Blanca	20	0	0	0	0	0	20
Pico Viejo	24	0	0	0	0	0	24
Montaña Blanca	23	0	0	0	0	0	23
Pico Viejo	48	0	0	0	0	0	48
	29	0	0	0	0	0	29
Total	261	55	49	145	113	124	747

Tabla 3. Número de muestras recogidas de *Silene nocteolens* por fecha y población. Muestras recogidas según estadio de vida (Ju: Juvenil, Vi: Virginal, Ve: Vegetativo, Rj: Reproductor joven, Ra: Reproductor adulto, S/D: sin determinar). Plantas madres sombreadas.

Table 3. Number of samples collected of *Silene nocteolens* by date and population. Specimens collected by stage of life (Ju: Juvenile, Vi: Virginal, Ve: Vegetative, Rj: young player, Ra: adult player, S/D: indeterminate). Mother plants shaded.

tificar los insectos que visitaban la zona. Se determinó la tasa de visita de insectos siguiendo el método estandarizado empleado por ARROYO *et al.* (1985), que consiste en la observación durante 10 min. de los diferentes individuos que visitan la zona en durante seis espacios de tiempo al día (comprendiendo el periodo desde las 9:00 hasta las 17:00 h).

Además, se determinó la proporción de flores masculinas y femeninas en los ejemplares vegetales muestreados en las poblaciones, a la vez que el número total de inflorescencias, distinguiendo por su morfología floral si estas eran bisexuales, masculinas o femeninas. Por otro lado, 23 individuos elegidos al azar se sometieron a tres tratamientos diferentes de polinización que consistía en envolver las inflorescencias femeninas en bolsas especiales y de diferente tamaño de diámetro de malla, de manera que según el tamaño de poro (0,41 y 1,0 mm) impidiesen la entrada de polen transportado por el viento o la polinización por insectos respectivamente. El experimento control se realizó con inflorescencias a las que no se instalaron bolsa alguna, permitiendo en ellas la acción de ambos tipos de polinización.

Análisis de microsatélites

En el caso de *Ilex* se llevó a cabo el estudio de la variabilidad genética mediante cebadores caracterizados por TORIMARU *et al.* (2004) para este género. Ocho de estos microsatélites amplificaron correctamente en las muestras de *Ilex perado*, *I. azórica* e *I. canariensis* (tabla 4).

Sin embargo, para *Sorbus aria* y *Silene nocteolens*, los microsatélites caracterizados en otras especies del

género (*Sorbus torminalis*, *Silene latifolia* y *Silene vulgaris*) no dieron lugar a amplificación positiva e interpretable para nuestras especies. Por este motivo, se tuvieron que caracterizar e aislar nuevos microsatélites para ambas especies (tablas 5 y 6).

Las amplificaciones se realizaron a partir de 20 ng de ADN, con 10 pmol de cada cebador y 24 µl de solución Master Mix para PCR (Reddy-Mix, AB-gene, Surrey, UK), que incluye 0,625 unidades de la enzima ADN Taq polimerasa, Tris-HCl 75mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, Tween20 0,01%, 0,2 mM cada dNTP y 1,5 mM ó 2,5mM de MgCl₂ dependiendo del cebador. Así mismo las condiciones generales de amplificación fueron: 3 min de desnaturalización a 94 °C; 30-35 ciclos de 45 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s de hibridación a la Tm correspondiente y 45 s de elongación a 72 °C; seguidos de 5 a 30 min de elongación a 72 °C.

Para los cebadores de *Sorbus aria* se encontró que algunos de los individuos analizados presentaron tres alelos para un mismo locus. Este patrón triploide se observó en todos los microsatélites analizados, a pesar de que las citas existentes (NELSON *et al.* 2002) señalan a *Sorbus aria* como una especie diploide. Aunque el subgénero aria o "agregado de *Sorbus aria*" (*Sorbus aria*, *S. graeca*, *S. wilmottiana*, *S. rupicola*, *S. lancastriensis*, *S. emnensis*, *S. leptophylla*, *S. porrigentiformis*, *S. vexans* y *S. hibernica*) comprende especies triploides y tetraploides apomíticas.

Para determinar si los tres productos de amplificación que se obtuvieron en las muestras de *Sorbus aria* se correspondían con verdaderos alelos o eran artefactos de las técnicas o debido a mutaciones en las secuencias flanqueantes de los mi-

NOMBRE	REFERENCIA	ESPECIE	MOTIVO
ILE03-01	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leucoclada</i>	(CT) ₆
ILE03-38	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leucoclada</i>	(AG) ₂₂
ILE03-53	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leucoclada</i>	(GA) ₁₂
ILE04-02	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leucoclada</i>	(TA) ₁₁ A(CA) ₁₀
ILE04-06	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leucoclada</i>	(CT) ₂₄
ILE04-10	Torimaru <i>et al.</i> , 2004	<i>Ilex leucoclada</i>	(GA) ₂₂
ILE03-86b	Torimaru (Com. Pers.)	<i>Ilex leucoclada</i>	(GA) ₈
ILE05-81	Torimaru (Com. Pers.)	<i>Ilex leucoclada</i>	(AG) ₂₂

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

Table 4. Polymorphic microsatellites and motifs characterized in *Ilex* genus.

LOCUS	CEBADORES/SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO (PB)	MOTIVO	TM (°C)	EMBL
SA1	R: GGTGGAGGGACAATTGTGC F: ATGGAGTTGAGCTCCACATC	229	(GA)13	60	FN563114
SA2	R: ACGTAGCACTGAATGGTATAG F: CTAGGTATCATCTCCGACCA	293	(GA)16	60	FN563115
SA3	R: ACTACTGCTACTTCTGTGGG F: CACTTCTCTCTGCTGTTGG	384	(GA)12	60	FN563116
SA6	R: TGCAGCGGTTGCAGATTGCA F: ATTTGATCCATGTGCGACTGCA	297	(GA)32	60	FN563117
SA7	R: CTTGCGAGTTCATTAAGCAC F: ACGTTTTCAGTATGATGGCC	334	(GA)15	60	FN563118
SA8	R: GAATTCITGGCAGTTGCCT F: CAGAGAGAGTGCCTGCCT	249	(CT)16	60	FN563119
SA9	R: CCAATACTTGAGTAGCATA F: CTGTGGACGGATTCTTC	174	(AG)17	55	FN563120
SA14	R: GAGGTAACCTACCAGTATAC F: ATGGATTAGGTTAACAGTTGTC	203	(TC)30	57	FN563121
SA19.1	R: GAATTCATGAAAAGCAGTAATG F: AAGTTTACAAGAGTGTGTTACG	241	(GA)24	58	FN563122

Tabla 5. Secuencia, motivo y tamaño de los nueve cebadores caracterizados para las poblaciones naturales de *Sorbus aria*. EMBL: código correspondiente a cada loci en el Banco Europeo de Secuencias Nucleotídicas.

Table 5. Primer sequences and characteristics of nine microsatellite loci from natural populations of *Sorbus aria*. EMBL: Genebank accession of each loci in the European Nucleotide Sequence Database.

LOCUS	CEBADORES/SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO (PB)	MOTIVO	TM (°C)	EMBL
SN01	F: AGCTAAGGACCACTAGATCACT R: GGAGATGCGCGTGGTTTCT	190	(AG)15	60	FN563106
SN02	F: GAATTCAAAATAACAAAAGAAGT R: AACTGTTGTACTCATCTTGTTC	143	(AC)35	55	FN563107
SN05	F: CCGAGTGCAACATTATCGTC R: TCGTGCTCGCCTTCCAATC	241	(TC)17	55	FN563111
SN06	F: GCCTTAGTATAAGTTTCC R: CCTTACAATTTGGTGAAAATC	194	(AG)37	55	FN563108
SN12	F: GTGCTCACGGTCTGCATGCC R: CAAACTACTCGACTCGCGAC	117	(AC)10	65	FN563109
SN14	F: GAATTCCTGCTTACCGCC R: GCCCTAAAACCTGTGTGCAC	95	(GA)22	60	FN563110
SN20	F: GTGCTACAACATATGAAGA R: GGTGTGATGCAAATGAAG	166	(GT)9	60	FN563112
SN21	F: TTGCAAAGTTGGGTCCTTATC R: GTCTCCGGTTTAAAGCTCAATC	156	(CT)14	60	FN56311

Tabla 6. Secuencia, motivo y tamaño de los ocho cebadores caracterizados para las poblaciones naturales de *Silene nocteolens*. EMBL: código correspondiente a cada loci en el Banco Europeo de Secuencias Nucleotídicas.

Table 6. Primer sequences and characteristics of eight microsatellite loci from natural populations of *Silene nocteolens*. EMBL: Genebank accession of each loci in the European Nucleotide Sequence Database.

crostatélites, se llevó a cabo la secuenciación de estos productos de amplificación.

Para ello, los productos de amplificación fueron ligados a un vector plasmídico (pGEM-T) que se

utilizó para transformar células competentes (JM109). Las colonias resultantes fueron seleccionadas por la resistencia en un medio con ampicilina, que otorgaba el vector plasmídico y a la no expresión del gen *lacZ* (colonias blancas) debido

a la inserción de un fragmento de ADN en esta región del vector plásmido.

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 debe a un aumento o disminución del número de repeticiones del motivo dentro del microsatélite y no a mutaciones en las secuencias flanqueantes.

Análisis de datos genéticos

Los datos genéticos obtenidos para cada individuo y locus amplificado se incluyeron en una hoja de cálculo EXCEL (Microsoft), para posteriormente ser tratada con el programa TRANSFORMER 3B.01 (CAUJAPÉ-CASTELLS & BACCARIROSAS 2005), que permite exportar los valores a otros programas de análisis genético.

La estadística elemental de los niveles de variabilidad genética: número medio de alelos por locus (A), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y el porcentaje de loci polimórfico (P) fueron calculados en las poblaciones y taxones utilizando POPGENE 3.2 (YEH *et al.* 1997). Este programa también se utilizó para obtener los valores de identidad y distancia genética de Nei (NEI 1972).

Para *Sorbus aria* y debido a que su carácter triploide no se pudo determinar el número exacto de copias de cada alelo en los individuos heterocigóticos, por lo que los análisis se llevaron a cabo basándose en el fenotipo (presencia/ausencia) y también mediante el programa POPGENE 3.2 (YEH *et al.* 1997).

El dendrograma UPGMA de las poblaciones basado en la distancia genética de NEI (1972), así como el Neighbour-joining basado en la distancia de alelos DAS (CHAKRAVORTY & JIN 1995) entre individuos fueron obtenidos utilizando POPULATION 1.2.30BETA (LANGELLA 2005) y los resultados gráficos fueron visualizados en MEGA4 (KUMAR *et al.* 2001).

Para evaluar la diferenciación genética entre las poblaciones, especies o subespecies de *Sorbus aria* e *Ilex perado* se aplicó un análisis Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.2 (FALUSH *et al.* 2007). Se asumió un modelo de mezcla de poblaciones y de frecuencia alélica independiente. Se obtuvo una serie de carreras independientes para cada valor de K (el número de sub poblaciones) entre 1 y 10. El análisis consistió en 10^5 períodos de prueba y una longitud de carrera 10^6 réplicas. Las poblaciones o los individuos fueron asignados a un "grupo" si su proporción de pertenencia (qi) a ese grupo era igual o mayor que el umbral arbitrario de 0,800.

La tasa de mortalidad de los diferentes estadios vitales de *Silene nocteolens* se estimó mediante visitas anuales a las dos poblaciones de la especie (Montaña Blanca y Pico Viejo). En estas visitas se contaba el número de individuos que estaban en los diferentes estadios vitales. En sucesivos años se realizaron recuentos en estas mismas poblaciones para determinar el número de individuos que habían pasado al siguiente estadio vital y el número de individuos que habían muerto desde la última visita.

RESULTADOS Y DISCUSSION

Ilex perado ssp. lopezlilloi

La matriz de datos genotípicos obtenidos para los individuos naturales de *Ilex perado ssp. lopezlilloi* analizados reveló la existencia de 5 genotipos distintos.

Diversidad genética

Los diferentes índices de diversidad genética estimados detectan una considerable variación genética en los cinco individuos de *Ilex perado ssp. lopezlilloi* estudiados (ENGO-L, tabla 7). En general y atendiendo a la clasificación taxonómica *Ilex perado ssp. platyphylla* alberga los mayores niveles de variación genética ($H_e=0,60$), situándose *I. azorica* como el taxón con menor grado de variación ($H_e=0,35$), inferior al observado en *I. perado ssp. lopezlilloi* ($H_e=0,48$) e *I. canariensis* ($H_e=0,42$).

POBLACIÓN	Nº	ESPECIE	ISLA	A	Ho	He	P
ENGO-L	5	<i>I. perado ssp. lopezlilloi</i>	La Gomera	2,13	0,50	0,48	100,00%
SUGO-P	4	<i>I. perado ssp. platyphylla</i>	La Gomera	2,25	0,34	0,42	100,00%
PARC-P	5	<i>I. perado ssp. platyphylla</i>	La Gomera	2,50	0,38	0,43	87,50%
APAT-P	8	<i>I. perado ssp. platyphylla</i>	La Gomera	1,63	0,47	0,28	62,50%
MOQU-P	28	<i>I. perado ssp. platyphylla</i>	Tenerife	3,25	0,42	0,50	100,00%
CAFO-P	17	<i>I. perado ssp. platyphylla</i>	Tenerife	4,13	0,43	0,61	100,00%
CRTA-P	31	<i>I. perado ssp. platyphylla</i>	Tenerife	3,00	0,44	0,48	100,00%
Media	93			5,37	0,42	0,60	100,00%
TROQ-A	10	<i>I. azorica</i>	São Miguel	3,75	0,25	0,33	62,50%
LAFO-A	10	<i>I. azorica</i>	São Miguel	4,13	0,28	0,36	75,00%
Media	20			5,62	0,26	0,35	75,00%
JACA-C	8	<i>I. canariensis</i>	Gran Canaria La Gomera	2,38	0,48	0,42	75,00%

Tabla 7. Parámetros de diversidad genética para las poblaciones del género *Ilex*. Número medio de alelos por locus (A), Heterocigosidad observada (H_o), Heterocigosidad esperada (H_e) y Proporción de loci polimórfico (P). "N" es el número de muestras analizadas por localidad.

Table 7. Genetic diversity index of *Ilex* populations and species analyzed. Average number of alleles per locus (A), Observed heterozygosity (H_o), Expected heterozygosity (H_e) and Proportion of polymorphic loci (P). "N" is the number of individuals analyzed per location.

Estructuración de la Diversidad Genética

La base de datos para el análisis bayesiano incluyó 126 individuos, 8 loci y 10 poblaciones del género *Ilex*. Las pruebas se hicieron para valores de $K=1-10$, obteniéndose la máxima probabilidad de los datos en $K=5$. Esto sugiere niveles de estructuración adicionales al número de taxones (4) en la muestra total. Según ROSENBERG *et al.* (2002), escoger un valor de K que maximice la probabilidad posterior de datos (PPD) puede ser difícil para un conjunto de datos complejos, incluyendo muchos grupos. Dado que K toma valores que incrementan de acuerdo a la diferencia de los grupos y separa primero los grupos más divergentes en distintos racimos, en el caso de datos muy estructurados una segunda opción para escoger K es considerar el incremento sucesivo de la probabilidad de datos posterior (PPD) en el aumento de los valores de K . Al evaluar el incremento de PPD se observa un alto valor para $K=3$, mientras que para $K>3$ el incremento en información se hace menor y va decreciendo progresivamente. Esto significa que la información obtenida a partir del cuarto grupo no es tan relevante como la de los tres primeros.

La asignación de los miembros de cada población a uno de los tres grupos definidos anteriormente se ilustra en un histograma para las proporciones

inferidas a partir del análisis bayesiano (fig. 1) en el que cada línea vertical representa a un individuo, el cual tiene tantos segmentos coloreados como fracciones de pertenencia tenga en los grupos K.

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

Distancia e identidad genética

La tabla 8 muestra los valores de identidad y distancia genética (NEI 1972) obtenidos para las diferentes poblaciones del género *Ilex* analizadas. El rango de la identidad genética varía ampliamente desde $I=0,972$, entre las poblaciones de *I. azorica* (TROQ-A y LAFO-A) y 0,008 entre las

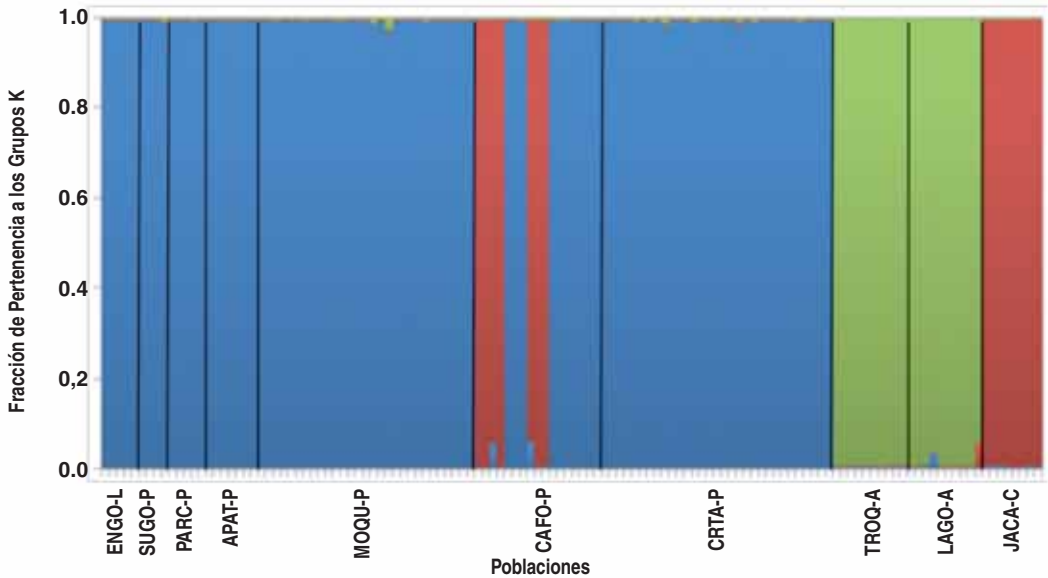


Figura 1. Diagrama de barras para las proporciones inferidas (K=3) en el análisis bayesiano de las poblaciones de *Ilex* analizadas. Cada individuo es representado por una línea vertical, que es dividida en tantos segmentos coloreados como fracciones de pertenencia tenga en los grupos K. Las líneas negras separan individuos de diferentes poblaciones.

Figure 1. Bar plots for proportion of inferred from Bayesian cluster analysis (K=3) of *Ilex* populations analyzed. Each individual is represented by a thin vertical line, which is partitioned into K colored segments that represent the individual's estimated membership fractions in K clusters. Black lines separate individuals from different populations.

POBLACIÓN	ESGO-L	SUGO-P	PARC-P	APAT-P	MOQU-P	CAFO-P	CRTA-P	TROQ-A	LAFO-A	JACA-C
ENGO-L		0,805	0,863	0,783	0,662	0,564	0,724	0,297	0,282	0,079
SUGO-P	0,217		0,899	0,726	0,491	0,368	0,581	0,196	0,187	0,081
PARC-P	0,148	0,107		0,670	0,507	0,429	0,642	0,177	0,167	0,074
APAT-P	0,244	0,320	0,400		0,516	0,376	0,537	0,233	0,229	0,046
MOQU-P	0,413	0,711	0,680	0,662		0,774	0,899	0,489	0,479	0,151
CAFO-P	0,574	1,000	0,847	0,980	0,256		0,803	0,258	0,270	0,437
CRTA-P	0,324	0,543	0,444	0,623	0,106	0,220		0,462	0,457	0,138
TROQ-A	1,213	1,631	1,729	1,455	0,716	1,353	0,772		0,972	0,008
LAGO-A	1,264	1,678	1,792	1,474	0,736	1,309	0,784	0,029		0,017
JACA-C	2,545	2,508	2,607	3,084	1,894	0,829	1,982	4,890	4,051	

Tabla 8. Identidad (arriba) y distancia (abajo) de Nei (1972) entre las poblaciones naturales del género *Ilex* analizadas.

Table 8. Genetic identity (above) and distance (below) between natural population of *Ilex* populations analyzed.

poblaciones de JACA-C (*Ilex canariensis*) y LAFO-A (*Ilex azorica*).

Los valores de la distancia genética de NEI (1972) sirvieron de base para la construcción del dendrograma UPGMA por población (fig.2) en el cual se observa la importante separación de las poblaciones de *I. canariensis* (con una fortaleza del 92%) e *I. azorica* (con 76% de fortaleza) del

resto de las poblaciones estudiadas; mientras que la disgregación entre *I. perado* ssp. *platyphylla* e *I. perado* ssp. *lopezilloi* no está lo suficientemente marcada.

De acuerdo con este dendrograma, las poblaciones de *I. perado* ssp. *lopezilloi* están más relacionadas con las poblaciones de *I. perado* ssp. *platyphylla* de La Gomera, de donde la primera

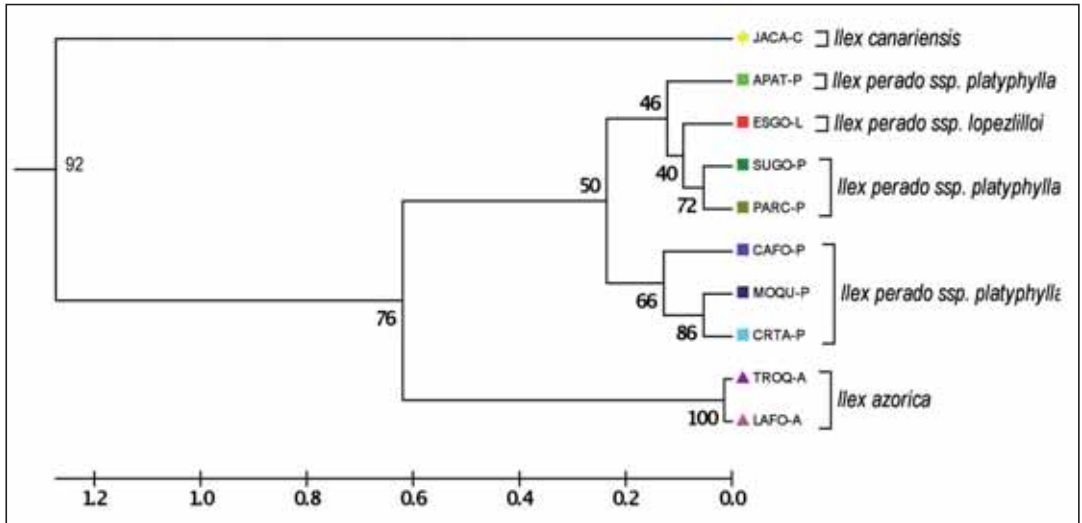


Figura 2. Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) para las poblaciones del género *Ilex* analizadas. En tonos verdes *I. perado ssp. platyphylla* (La Gomera), en tonos azules *I. perado ssp. platyphylla* (Tenerife), *I. perado ssp. lopezlilloi* (rojo), *I. canariensis* (amarillo) e *I. azorica* (tonos violetas). Los códigos corresponden con la Tabla 1.

Figure 2. UPGMA dendrogram based on Nei genetic distance (1972) of *Ilex* populations analyzed. In shades of green *I. perado ssp. platyphylla* (La Gomera), in blues *I. perado ssp. platyphylla* (Tenerife), *I. perado ssp. lopezlilloi* (red), *I. canariensis* (yellow) and *I. azorica* (violet hues). Codes correspond to those of Table 1.

subespecie es endémica. Por lo tanto, parece que la condición geográfica e insular condiciona mucho más las diferencias genéticas entre las poblaciones analizadas que el rango taxonómico que a nivel de subespecie ha separado a *I. perado ssp. lopezlilloi* e *I. perado ssp. platyphylla*.

Un segundo árbol (Neighbour-joining) basado en las distancias individuales DAS (CHAKRAVORTY & JIN 1995) se presenta en la figura 3. Otra vez es evidente la separación de los individuos de *I. azorica* (triángulos violáceos) e *Ilex canariensis* (rombos amarillos). También es visible la mayor afinidad de las plantas de *I. perado ssp. platyphylla* de acuerdo a su isla de procedencia. No obstante, 7 individuos de la población de la Casa Forestal de Tenerife (CAFO-P1, CAFO-P2, CAFO-P3, CAFO-P4, CAFO-P8, CAFO-P9 y CAFO-P10) identificados como *I. perado ssp. platyphylla* se mezclan con los individuos de *I. canariensis* (fig. 3).

Esta aproximación genética de los individuos de *I. perado ssp. platyphylla* con *I. canariensis* constituye un resultado inesperado, sobretodo porque son especies completamente distintas, y a priori

bien diferenciadas, tanto morfológicamente como genéticamente según el dendrograma UPGMA anteriormente descrito; en segundo lugar, porque los individuos analizados de ambas especies pertenecen a diferentes islas (*I. canariensis* de Gran Canaria y La Gomera, e *I. perado ssp. platyphylla* de Tenerife). Aunque es necesario incrementar el número de individuos de *I. canariensis* para poder determinar las causas de esta similitud genética, es factible que estos ejemplares tengan una naturaleza híbrida que sería necesario comprobar en futuras investigaciones.

En cuanto a *I. perado ssp. lopezlilloi*, este diagrama (con algunas pocas excepciones) coincide con el anterior agrupando los individuos de ambas subespecies atendiendo a la isla de origen.

Teniendo en cuenta el estrecho parentesco genético detectado entre *Ilex perado ssp. lopezlilloi* e *I. perado ssp. platyphylla*, ya que los diferentes análisis estadísticos practicados (UPGMA, NJ, STRUCTURE) no separan las poblaciones e individuos de estas subespecies, la estructura poblacional de *Ilex*

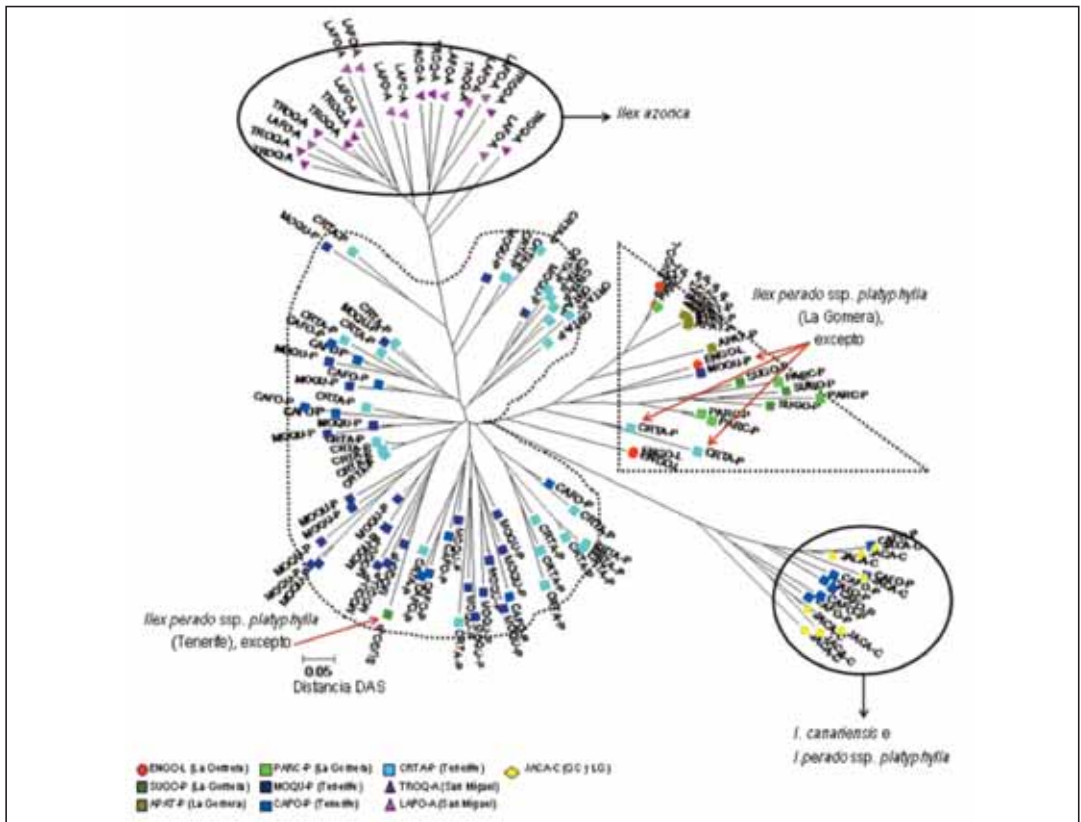


Figure 3. Neighbour-joining basado en la distancia entre alelos compartidos DAS (Chakravorty and Jin, 1995) de los individuos de *Ilex* analizados. Los códigos de las poblaciones se indican en la Tabla 1.

Figure 3. Neighbour-joining based on shared allele distance DAS (Chakravorty and Jin, 1995) of *Ilex* individuals analyzed. Populations coded are as Table 1.

perado parece estar más relacionada con la isla de origen de las muestras analizadas que con su categoría taxonómica. Estos resultados parecen indicar que ambas subespecies comparten el mismo acervo genético y probablemente pueden considerarse el mismo taxón. No obstante, el número de ejemplares de *I. perado* ssp. *lopezlilloi* es considerablemente bajo y la inexistencia de diferenciación no asegura la igualdad de ambos taxones. Sin embargo, esta escasa diferenciación genética entre estos dos supuestos taxones es corroborada por WERNER *et al.* (2007). Mediante la secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2, y de marcadores ISSR, estos autores concluyen, como en nuestra investigación, que la subespecie *lopezlilloi* es de un valor taxonómico bastante dudoso.

Por otro lado, la clara separación (con la excepción de los 7 individuos de *I. canariensis* procedentes de la Casa Forestal en Tenerife) de los dos taxones de *Ilex* afines (*I. canariensis* e *I. azorica*) contribuye a considerar la similitud de *I. perado* ssp. *platyphylla* e *I. perado* ssp. *lopezlilloi*. En este sentido, otros investigadores utilizando distintos marcadores moleculares, han encontrado resultados similares y una gran diferenciación genética entre las poblaciones de *Ilex canariensis* con respecto a *Ilex perado*. En los diferentes estudios filogenéticos realizados ambas especies son situadas en clados biogeográficos diferentes (CUÉ-NOUD *et al.* 2000, MANEN *et al.* 2002, MANEN 2004, SELBACH-SCHNADELBACH *et al.* 2009). La discrepancia entre las filogenias realizadas

con marcadores moleculares plásticos y nucleares es la regla general en el género, sugiriendo que la introgresión nuclear y/o plástica interespecífica ha jugado un papel importante en los procesos de evolución en *Ilex* (MANEN 2004), lo cual podría explicar la asociación de los 7 ejemplares de *I. perado* ssp. *platyphylla* en las casa forestal con *I. canariensis*. Obviamente la similitud genética de ambas subespecies de *I. perado* condicionaría su gestión, pudiendo ser una de las recomendaciones, el cruzamiento controlado de ejemplares procedentes de ambos taxones y el análisis de los resultados obtenidos de estos cruces controlados.

Sorbus aria

Diversidad genética

Los valores de diversidad genética estimados para las muestras de *Sorbus aria* de los parques nacionales de Canarias muestran en general una baja variabilidad genética (tabla 9). La escasa diversidad genética en las poblaciones del Parque Nacional del Teide se debe posiblemente al bajo número de individuos analizados (4 ejemplares). En el caso de las poblaciones del Parque Nacional de la Caldera de Taburiente, a pesar de haberse analizado un número de individuos similar al de

las poblaciones de los parques nacionales de la Península la diversidad genética es mucho menor ($H=0,044$ y $H=0,149$, respectivamente). Entre las poblaciones peninsulares destacan los altos niveles de diversidad genética de Sierra Nevada y los escasos niveles de Cabañeros, aunque en este último caso solamente se analizaron 6 ejemplares (tablas 2 y 9). En este sentido, los valores de variabilidad genética detectados en las poblaciones de los parques nacionales de la Península están significativamente relacionadas con el tamaño de la muestra ($r^2=0,93$).

La base de datos para el análisis bayesiano incluyó 198 individuos, 9 loci y 12 poblaciones de *Sorbus aria*. Las pruebas se hicieron para valores de $K=1-10$, obteniéndose la máxima probabilidad de los datos en $K=6$, sugiriendo que las 12 poblaciones analizadas se pueden agrupar en 6 grupos.

La asignación de los miembros de cada población a uno de los grupos definidos anteriormente se ilustra en un histograma (fig. 4) para las proporciones inferidas a partir del análisis bayesiano en el que cada línea vertical representa a un individuo, tal y como se describió anteriormente. Como se muestra en dicho diagrama de barras las poblaciones de *Sorbus aria* de Canarias se separan claramente de las poblaciones de la Penín-

LOCALIDAD	POBLACIÓN	CÓDIGO	Nº	NF	P	H
Tenerife	Guajara	GuT	3	0	0,00	0,000
	Los Cachorros	CaT	1	0	0,00	0,000
Todos	P.N. Teide		4	1	0,72	0,008
La Palma	Curva del Observatorio	CoP	3	2	1,45	0,004
	Espigón del Roque	ErP	5	6	4,35	0,015
	La Parcela Grande	PgP	5	5	3,62	0,015
	El Espigón	EsP	1	0	0,00	0,000
	Los Andenes	AnP	32	15	10,87	0,039
	El Espigón del Norte	EnP	3	0	0,00	0,000
Todos	P.N. Caldera Taburiente		47	18	13,04	0,044
Ciudad Real	P.N. Cabañeros	PNC	6	6	4,35	0,014
Lleida	P.N. Aigüestortes	PNA	36	83	60,14	0,093
Asturias	P.N. Picos de Europa	PNP	51	97	70,29	0,097
Granada	P.N. Sierra Nevada	PNS	52	63	45,65	0,119
TOTAL			198	138	100,00	0,149

Tabla 9. Diversidad genética de las poblaciones de *Sorbus aria* analizadas. N: tamaño de la muestra, NF: número de fragmentos polimórficos, P: porcentaje de loci polimórfico, H: diversidad genética (Nei 1973).

Table 9. Genetic diversity of *Sorbus aria* populations analyzed. N: simple size, NF: number of polymorphic fragments, P: polymorphic loci percentage, H: genetic diversity (Nei 1973).

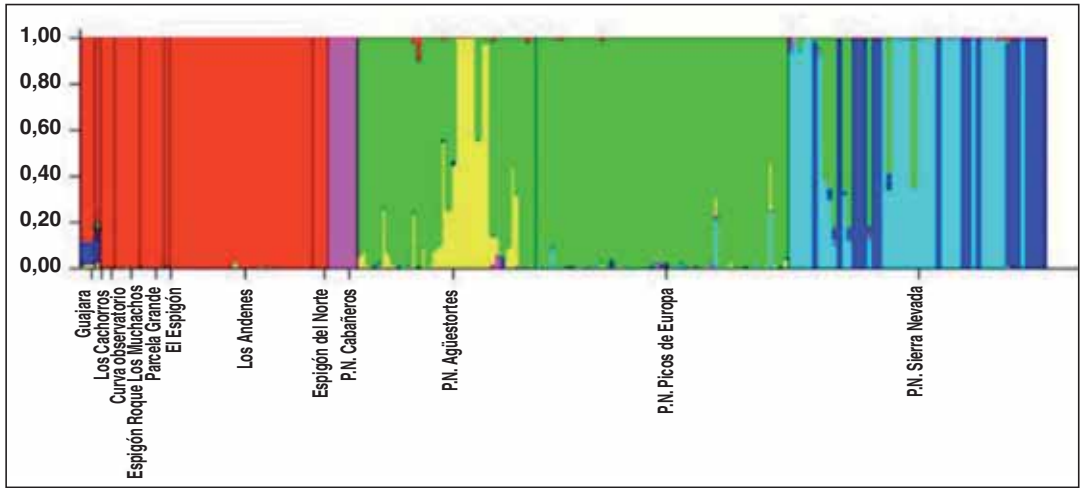


Figura 4. Diagrama de barras para las proporciones inferidas ($K=6$) en el análisis bayesiano de las poblaciones de *Sorbus aria* analizadas. Cada individuo es representado por una línea vertical, que es dividida en tantos segmentos coloreados como fracciones de pertenencia tenga en los grupos K . Las líneas negras separan individuos de diferentes poblaciones.

Figure 4. Bar plots for proportion of inferred from Bayesian cluster analysis ($K=6$) of *Sorbus aria* populations analyzed. Each individual is represented by a thin vertical line, which is partitioned into K colored segments that represent the individual's estimated membership fractions in K clusters. Black lines separate individuals from different populations.

sula. Mientras que Agüestortes y Picos de Europa parecen compartir ancestros comunes, los individuos analizados del Parque Nacional de Cabañeros están completamente diferenciados del resto de parques nacionales de la Península. Así mismo, este análisis revela a la población del Parque Nacional de Sierra Nevada como la más diversa, en concordancia con los valores observados en los diferentes índices de diversidad genética (tabla 9).

Distancia e identidad genética

El dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de NEI (1972) (fig. 5) muestra una clara separación de las muestras de *Sorbus aria* procedentes del archipiélago canario con respecto a los ejemplares de la Península. Así mismo, dentro de Canarias, las diferentes localidades se agrupan atendiendo a su isla de origen. Por otro lado, las muestras de la Península se agrupan conjuntamente, si bien Parque Nacional de Cabañeros se separa ligeramente del resto dentro del mismo agrupamiento (fig. 5). No obstante, es importante señalar que las diferencias genéticas entre las poblaciones de la Palma y Tenerife son superiores a

las encontradas entre las distintas poblaciones de la Península.

Los análisis genéticos llevados a cabo en las muestras de *Sorbus aria* diferencian claramente las localidades presentes en el archipiélago canario con respecto a aquellas analizadas de la Península Ibérica. Esta diferenciación genética puede ser consecuencia de un cuello de botella reciente que posiblemente ha sufrido esta especie en Canarias y que ha dado lugar a una separación genética de las mismas. No descartamos, no obstante, la posibilidad de que *Sorbus aria* haya sufrido la consecuencia de un efecto fundador, aunque en un caso u otro los resultados sobre las poblaciones son equivalentes dando lugar a una importante diferenciación genética y depauperados niveles de variación genética (deriva genética), tal y como se ha detectado. Resultados similares se han encontrado en otras especies endémicas de Canarias (*Bencomia extipulata*; GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2009a, *Anagyris latifolia*; GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2009b, etc.). Sin embargo, llama la atención los escasos valores detectados en *Sorbus aria*, ya que en general los niveles de variación genética en especies vegetales endémicas en Canarias suelen ser superiores

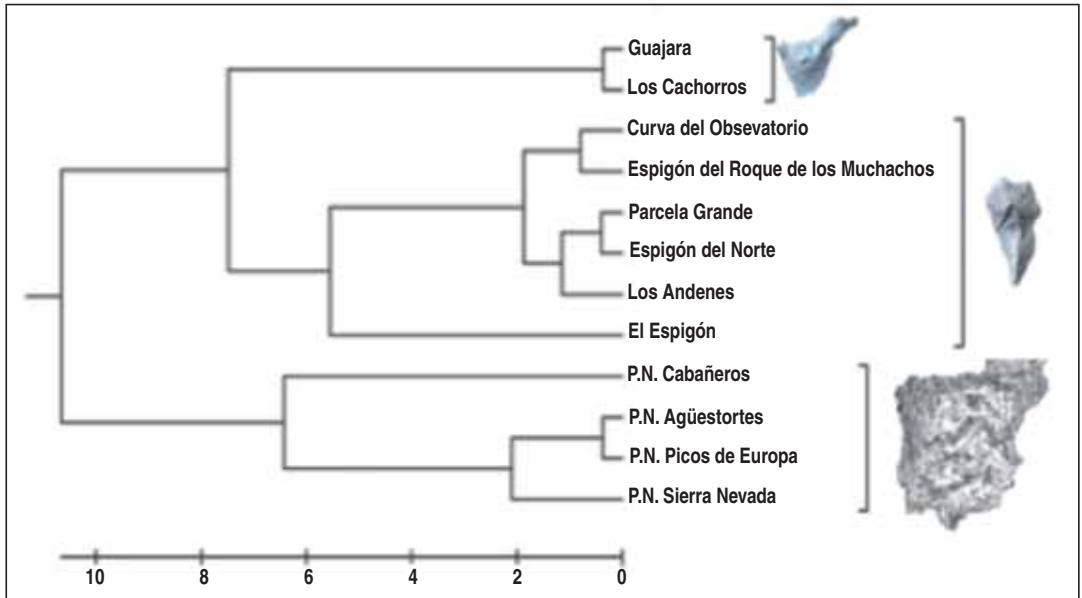


Figura 5. Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de Nei (1972) de las poblaciones de *Sorbus aria* analizadas.

Figure 5. UPGMA dendrogram based on Nei genetic distance (1972) of *Sorbus aria* populations analyzed.

a los descritos en otras islas oceánicas (SOSA *et al.* 2002, GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2004b, GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2009a, GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2009b).

La fuerte diferenciación genética encontrada entre los ejemplares de Tenerife y La Palma desaconsejan el movimiento de individuos de una isla a otra, con el propósito de evitar la ruptura de la cohesión y adaptaciones locales que puedan haberse desarrollados en cada isla de forma independiente.

Por otro lado, teniendo en cuenta que *Sorbus aria* ha sido descrita como una especie diploide (NELSON *et al.* 2002), aunque el denominado “agregado de *Sorbus aria*” comprende especies triploides y tetraploides apomíticas, no sería de extrañar que en Canarias, como en algunas de las muestras de la Península que han mostrado un carácter triploide, no estemos frente a *Sorbus aria sensu stricto*, sino más bien delante de uno de los miembros triploides de este agregado, o un híbrido entre los anteriores. Por todo ello, consideramos que una revisión exhaustiva a nivel

taxonómico de los ejemplares de *Sorbus aria* presentes en los parques nacionales de Canarias es imprescindible para afrontar cualquier estrategia de conservación que se fuese a emprender con este taxón en el archipiélago canario.

Silene nocteolens

Diversidad genética

Las dos poblaciones naturales analizadas muestran algunas diferencias genéticas. Así, la diversidad genética detectada en la población de Pico Viejo es superior a la detectada en Montaña Blanca, a pesar de que en la primera se analizó solamente la mitad de ejemplares que en la segunda (tabla 10). También se detecta en la población de Montaña Blanca, que la variabilidad genética aumenta a medida que nos desplazamos en los diferentes estadios de la planta desde descendientes hasta reproductores jóvenes. Sin embargo, esta tendencia no es tan evidente en la población de Pico Viejo, donde los valores de *He* varían arbitrariamente según el estadio. Los valores globales de diversidad genética observados en ambas po-

POBLACIÓN	ESTADIO	CÓDIGO	Nº	A	H _o	H _e	P
Montaña Blanca	Descendientes	Sd	132	10,80	0,516	0,634	100%
	Juveniles	Ju	26	7,00	0,525	0,639	100%
	Virginales	Vi	24	7,20	0,610	0,666	100%
	Vegetativos	Ve	26	7,40	0,637	0,685	100%
	Reproductores jóvenes	Rj	26	6,60	0,693	0,709	100%
	Reproductores adultos	Ra	36	7,60	0,608	0,684	100%
Total Población			270	7,70	0,598	0,669	100%
Pico Viejo	Descendientes	Sd	24	7,00	0,556	0,694	100%
	Juveniles	Ju	26	9,60	0,680	0,765	100%
	Virginales	Vi	30	11,20	0,721	0,756	100%
	Vegetativos	Ve	23	8,60	0,645	0,742	100%
	Reproductores jóvenes	Rj	25	9,40	0,706	0,757	100%
	Reproductores adultos	Ra	25	9,80	0,677	0,740	100%
Total Población			153	9,267	0,664	0,742	100%

Tabla 10. Parámetros de diversidad genética para las poblaciones *Silene nocteolens*. Número medio de alelos por locus (A), Heterocigosidad observada (H_o), Heterocigosidad esperada (H_e) y Proporción de loci polimórfico (P). "N^o" es el número de individuos analizados por estadio de vida o población.

Table 10. Parameters of genetic diversity of *Silene nocteolens* populatios. Average number of alleles per locus (A), Observed heterozygosity (H_o), Expected heterozygosity (H_e) and Proportion of polymorphic loci (P). "N^o" is the number of individuals analyzed by stage of life or population.

blaciones naturales de *S. nocteolens* (He=0,669 y He = 0,742) son ligeramente inferiores a los descritos para su congénere *S. flos-cuculi* (He = 0.828), la cual es una especie de amplia distribución en el continente Europeo (GALEUCHET *et al.* 2005).

Distancia e identidad genética

El dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de NEI (1972) (fig. 6) muestra una separación bien definida entre los diferentes estadios de las poblaciones de Montaña Blanca y Pico Viejo (con una fortaleza de 98%). Según este gráfico, los individuos de Montaña Blanca se encuentran más emparentados entre sí que con los de Pico Viejo (fig. 6). En esta última población es notable la fuerte diferenciación genética de las plántulas (100%) del resto de los estadios de vida. Esta diferenciación genética entre las plántulas (descendientes) y el resto de estadios de vida de la especie posiblemente es debida al exceso de homocigóticos detectado en el primero.

Dinámica reproductiva

El coeficiente F_{is} mide la magnitud de la homocigosis en relación con la expectativa al asumir el apareamiento al azar dentro de una población. Para todos los estadios, excepto en los reproduc-

tores jóvenes de Montaña Blanca, y en ambas poblaciones los valores del coeficiente de endogamia son positivos, lo que implica que existe un defecto de heterocigóticos en cada uno de ellos. Este defecto de heterocigóticos puede ser debido al hecho de que existe cierto grado de autofecundación o fecundación cruzada entre individuos genéticamente relacionados en *Silene nocteolens*, incrementando la endogamia.

En este sentido, al comparar el coeficiente de endogamia entre los diferentes estadios se observa una tendencia descendente a lo largo de los diferentes estadios del ciclo de vida de la especie. Así, la homocigosis relativa al cruzamiento aleatorio para la población Montaña Blanca es mayor en las plántulas (Sd) y va disminuyendo a través de los estadios sucesivos (Ju, Vi, Ve, Rj); sin embargo, aumenta repentinamente en los reproductores adultos (Ra). En Pico Viejo, la magnitud de homocigotos en la fase vegetativa (Ve) es mayor y persiste la tendencia de un alto valor para los reproductores adultos en esta población (Fig. 7). La disminución del coeficiente de endogamia en los sucesivos estadios del ciclo de vida de una especie está relacionada con la selección natural y la eliminación del exceso de homocigosis y es característica de especies autocompatibles (selfing). Ya que en especies autoincompatibles (outcross-

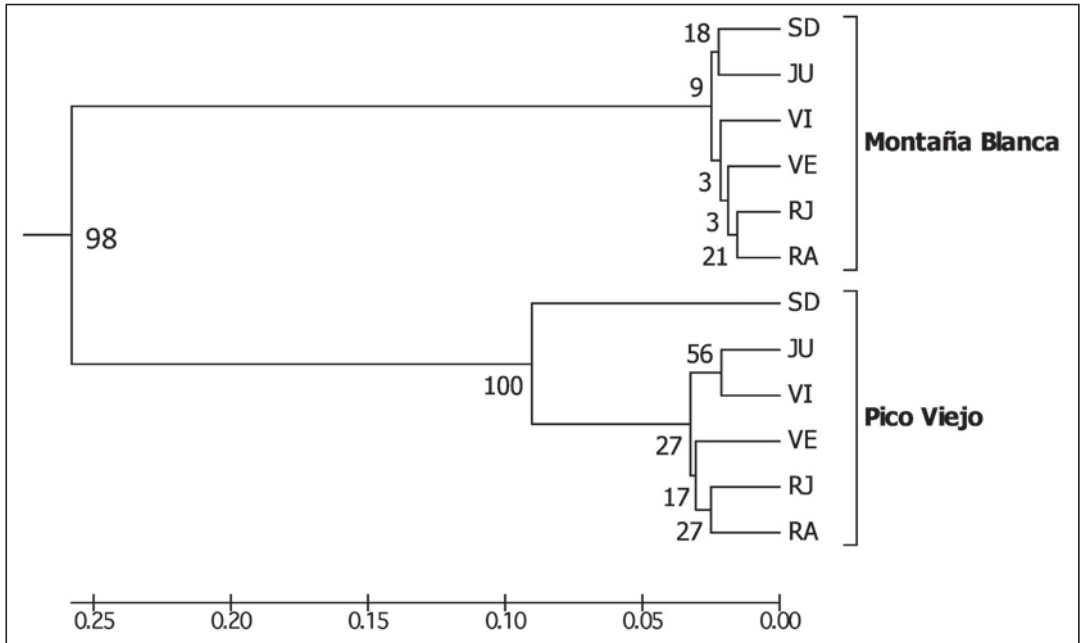


Figura 6. Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de Nei (1972) de los diferentes estadios considerados en las poblaciones de *Silene nocteolens*.

Figure 6. UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance (NEI 1972) of the different state considered of *Silene nocteolens* populations.

sing) se ha detectado unos valores de endogamia más homogéneos a lo largo del ciclo de vida de la planta. Sin embargo, el coeficiente de endogamia observado en los reproductores adultos (Ra) de Montaña Blanca y Pico Viejo, así como los vegetativos (Ve) de esta última población presentan unos valores superiores a los esperados. Aunque por el momento no tenemos una explicación definitiva para estos resultados, éstos parecen estar relacionado con los índices de mortandad registrados en la especie. En este sentido, cruzando los valores de endogamia con la tasa de mortalidad estimada en los diferentes estadios (fig. 8) observamos una importante correlación entre ambas variables.

Es factible que estemos observando el efecto de la erosión de la depresión endogámica según los diferentes estadios. Así, en las fases más jóvenes existen un importante número de individuos homocigóticos (altos valores de Fis - tabla 11) que albergan una escasa eficacia biológica conse-

cuencia de su homocigosidad. Parte de estos individuos no alcanzan el siguiente estadio vital y mueren, por lo que el grado de endogamia en el siguiente estadio es inferior, relacionándose con el índice de mortalidad entre los estadios.

Bencomia exstipulata

Biología Reproductiva

Los individuos de *Bencomia* fueron visitados de manera muy frecuente por abejas obreras melíferas (*Apis mellifera*), detectándose más de 9.300 observaciones de visitas. La gran mayoría de las abejas (77,4%) visitaron las inflorescencias masculinas, y sólo un 22,5% visitó también las inflorescencias mixtas masculinas y femeninas.

En el experimento de polinización se capturó un número importante de granos de polen de *Bencomia* en las placas de cristal instaladas en la población y sometidas a diferentes tratamientos de

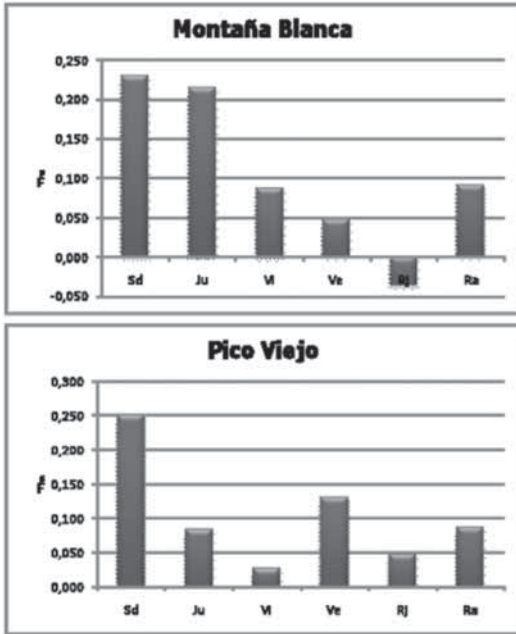


Figura 7. Coeficiente de endogamia por estadio de vida para las poblaciones de *Silene nocteolens*. (Sd: descendientes, Ju: Juvenil, Vi: Virginal, Ve: Vegetativo, Rj: Reproductor joven, Ra: Reproductor adulto)

Figure 7. Inbreeding coefficient by stage of life in *Silene nocteolens* populations. (Sd: seedling, Ju: Juvenile, Vi: Virginal, Ve: Vegetative, Rj: young player, Ra: adult player).

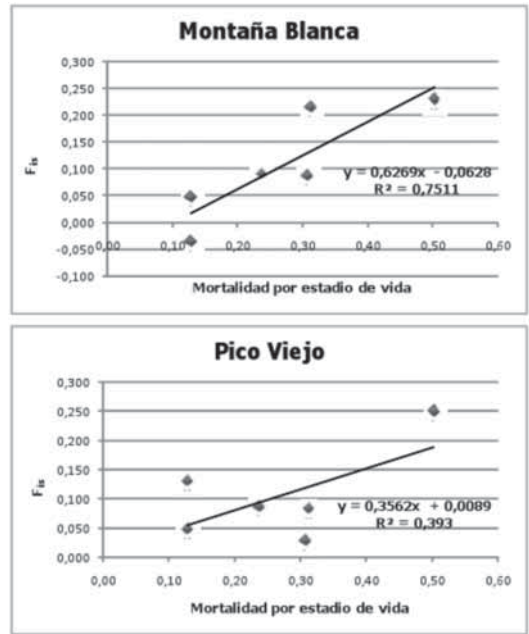


Figura 8. Correlación entre la mortalidad y el coeficiente de endogamia en *Silene nocteolens*.

Figure 8. Correlation between mortality and inbreeding coefficient in *Silene nocteolens*.

ESTADIOS	CÓDIGO	HO	HE	FIS	M
MONTAÑA BLANCA					
Descendientes	Sd	0,516	0,634	0,229	0,50
Juveniles	Ju	0,525	0,639	0,215	0,31
Virginales	Vi	0,61	0,666	0,088	0,31
Vegetativos	Ve	0,637	0,685	0,048	0,13
Reproductores jóvenes	Rj	0,693	0,709	-0,036	0,13
Reproductores adultos	Ra	0,608	0,684	0,091	0,24
Total		0,598	0,669	0,106	0,27
PICO VIEJO					
Descendientes	Sd	0,556	0,694	0,251	0,50
Juveniles	Ju	0,68	0,765	0,084	0,31
Virginales	Vi	0,721	0,756	0,028	0,31
Vegetativos	Ve	0,645	0,742	0,131	0,13
Reproductores jóvenes	Rj	0,706	0,757	0,049	0,13
Reproductores adultos	Ra	0,677	0,74	0,088	0,24
Total		0,664	0,742	0,105	0,27

Tabla 11. Diversidad genética, coeficientes de endogamia e índices de mortalidad para *Silene nocteolens*. H_o = Heterocigosidad observada, H_e = Heterocigosidad esperada, F_{is} = coeficiente de endogamia y M = tasa de mortalidad

Table 11. Genetic diversity, inbreeding coefficient and mortality index for *Silene*. H_o = observed heterozygosity, H_e = expected heterozygosity, F_{is} = inbreeding coefficient and M = mortality rate.

envolvimiento. Así, en las placas cubiertas por bolsas de plástico con poros de 0,4 mm (pollen proof) se pudieron contar en torno a una media de 10 granos de polen por cada porta, lo cual significó un 90% menos que el valor medio capturado en portas cubiertos por mallas de 1,0 (insect proof), donde el número de granos de polen capturado alcanzó una media de 100 granos por porta. El experimento control alcanzó una media de dos veces superior a este último tratamiento, llegando en torno a 225 granos de polen por porta (fig. 9).

Dicho de otro modo, las bolsas de 1,0 mm de diámetro de malla (insect-proof) dejaron pasar una media del 41% de los granos de polen respecto al experimento control, mientras que las bolsas de 0,4 mm (pollen-proof) mantenían fuera la mayor parte del polen (alrededor de un 96% de media del experimento control). Por otro lado, destaca el elevado número de granos de polen que parece existir en el aire de las poblaciones de *Bencomia*, lo cual se traduce en que el viento

constituye el principal agente dispersor del polen de *Bencomia exstipulata* en las poblaciones estudiadas. Aunque los tratamientos con las bolsas que impedían la polinización por insectos mantenían un 41% menos de polen que el experimento control, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre la producción de semillas obtenidas mediante ambos sistemas de bolsas. De la misma forma, tampoco hubo diferencias significativas entre los experimentos de cruzamiento llevados a cabo con cruzamientos manuales, ya que las flores que se encontraban completamente abiertas, y por tanto expuestas a la polinización (cross 1 en fig. 10), producían la misma cantidad de semillas (o al menos no existían diferencias significativas) con aquellas flores que no se habían abierto completamente (cross 2 en fig. 10). Además, las inflorescencias mixtas que albergaban flores masculinas y femeninas a la vez que se cubrieron con bolsas de plástico de malla pequeña (mixed inflo en fig. 10). Esto permitía la autofecundación, y dio lugar

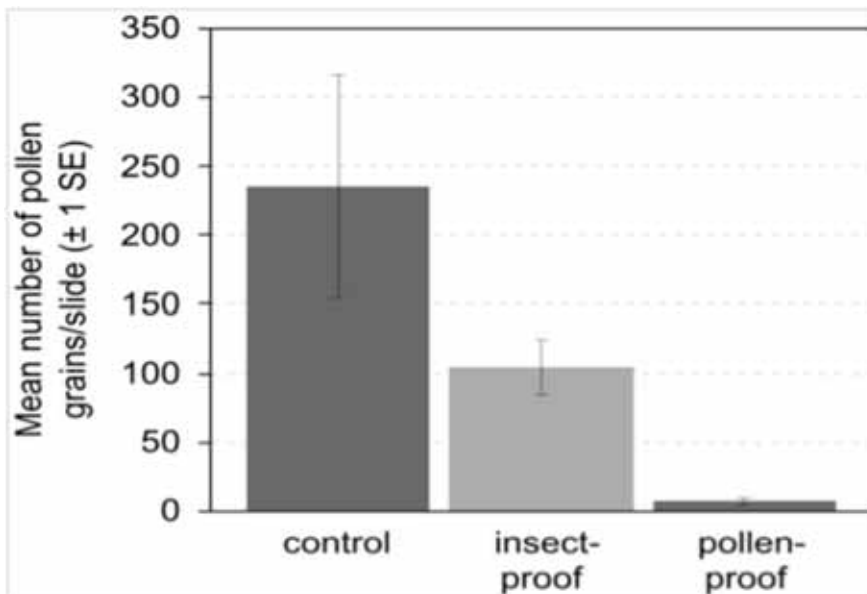


Figura 9. Número medio de granos de polen de *B. exstipulata* capturados mediante portas de cristal cubiertos de un gel pegajoso. **Insect-proof:** Placas envueltas con bolsas de 1 mm de diámetro; **pollen-proof:** Placas envueltas con bolsas de 0,4 mm. de diámetro; **Control:** Placas situadas en las poblaciones totalmente expuestas y sin bolsas.

Figure 9. Average number of pollen grains of *B. exstipulata* caught using glass slides covered with a sticky gel. **Insect-proof:** plates wrapped in bags of 1 mm in diameter, **pollen-proof:** plates wrapped in bags of 0,4 mm. diameter; **Control:** plates located in the towns were completely exposed and without bags.

a una producción de semillas equivalente a la de que aquellas inflorescencias exclusivamente femeninas cubiertas por mallas de diámetro pequeño (*pollen proof* en fig. 10).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Ángel Bañares, Manolo Marrero y Eduardo Carqué (Parque Nacional Teide) por facilitarnos gran cantidad de datos del Parque Nacional y por su ayuda en la recogida de muestras. A Ángel Palomares, Álvaro Rodríguez Felipe (Parque Nacional Caldera del Taburiente), Ángel Fernández, Cito China (Parque Nacional de Garajonay), Agustín Naranjo, Juan Ojeda, Alicia

Escandell y Nancy Cabanillas por su colaboración en el muestro en los parques nacionales de Canarias. A Mónica Moura (Universidade dos Açores) por los ejemplares de *Ilex azorica*, al Dr. Juli Caujapé y Ruth Jaén (Jardín Botánico Viera y Clavijo) por cedernos ADN de *Ilex canariensis*, al personal de los parques nacionales de Picos de Europa, Cabañeros, Sierra Nevada y Aigüestortes que nos han facilitado las muestras de *Sorbus aria* de la Península. A la Dra. Pilar García (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria) por su asesoramiento en el proceso de clonación. Finalmente, al Dr. Takeshi Torimaru (Universidad de Nagoya, Japón) por su cooperación desinteresada al compartir información no publicada sobre los microsatélites desarrollados para *Ilex leucoclada*.

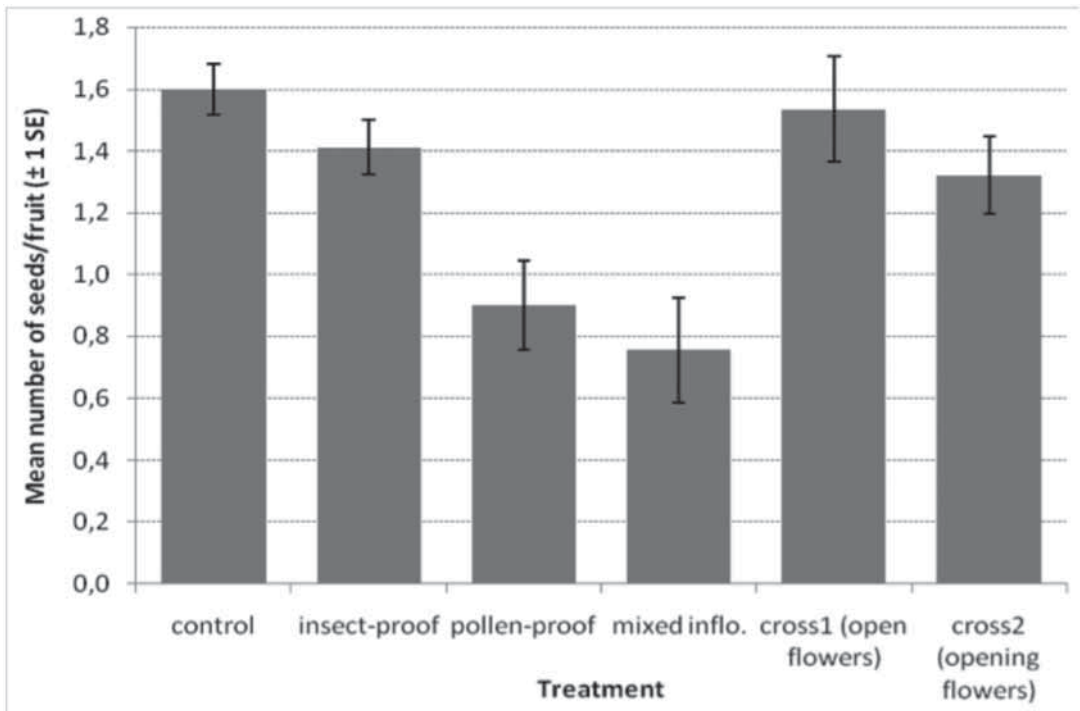


Figura 10. Media (± 1 SE) de la producción de semillas en cada tratamiento de polinización en *B. exstipulata*. Las diferentes letras en la parte superior de cada barra indican las diferencias significativas obtenidas entre las medias (Bonferroni Posthoc test $P < 0.05$).

Figure 10. Mean (± 1 SE) seed set for each pollination treatment for *B. exstipulata*. Different letters on top the bars indicate significant differences between means (Bonferroni Posthoc test $P < 0.05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARROYO, M.T.K., ARMESTO, J.J. & PRIMACK, R.B. 1985. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. *Plant Systematics and Evolution*, 149, 187-203.
- BAÑARES, A., BLANCA, G., GÜEMES, J., MORENO, J.C. & ORTIZ, S. 2004. Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España. DGCN. Madrid. 1072p.
- BAÑARES, A., MARRERO, E., CARQUÉ, E. & FERNÁNDEZ, Á. 2003. Plan de recuperación de la flora amenazada del Parque Nacional Garajonay, La Gomera (Islas Canarias): Germinación y restitución de *Pericallis hamsenii*, *Gonospermum gomerae* e *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi*. *Botánica Macaronésica*, 24: 3-16.
- BATISTA, F., BOUZA, N., GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A., CAUJAPÉ-CASTELLS, J., SOSA, P.A. 2004. Genetic variation within and between populations of two endangered endemic species of the laurel forest from the Canary Islands, *Myrica rivis-martinezii* (Myricaceae) and *Sideritis discolor* (Lamiaceae). *Australian Journal of Botany*, 52: 471-480.
- BELTRÁN, E., W. WILDPRET, M.C. LEÓN, A. GARCÍA & REYES, J. 1999. Libro Rojo de la Flora Canaria contenida en la Directiva-Hábitats Europea. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente.
- CABEZUDO, B., HERNÁNDEZ-BERMEJO, J.E., HERRERA, C.M., MUÑOZ, J. & VALDÉS, B. 2000. Libro rojo de la flora silvestre amenazada de Andalucía, II: Especies vulnerables. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla, España.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J. & BACCARANI-ROSAS, M. 2005. Transformer-3: a Program for analysis of molecular population genetic data. EXEGEN software, Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo".
- CEAC 2000. Catálogo de especies amenazadas de Canarias. BOC. 1 de agosto de 2000.
- CHAKRAVORTY, R. & JIN, L. 1995. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-locus multilocus DNA fingerprinting data. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 120-127.
- CUÉNOUD P., DEL PERO MARTINEZ, M.A., LOIZEAU, P.A., SPICHIGER, R., ANDREWS, S. & MANEN, J.F. 2000. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae). *Annals of Botany*, 85: 111-122.
- FALUSH, D., STEPHENS, M. & PRITCHARD, J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null allele. *Molecular Ecology Note*, 7: 574-578. Disponible en: http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure2_2.html
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.M. & MARTÍN ESQUIVEL, J.L. 2001. Las islas como experimento de laboratorio en: *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y Conservación*. Fernández-Palacios, J.M y J.L. Martín Esquivel (Eds.). Ediciones Turqueza. pp. 39-44.
- FRANCISCO-ORTEGA, J. & SANTOS, A. 2001. Genes y Conservación de Plantas Vasculares en: *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y Conservación*. Fernández-Palacios, J.M. y J.L. Martín Esquivel (Eds.). Ediciones Turqueza.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J.D. & BRISCOE, D.A. 2002 Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. United Kingdom. 617p.
- GALEUCHET DJ, PERRET C, FISCHER M. 2005. Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis flos-cuculis* L., in a fragment landscape. *Molecular Ecology*, 14: 991-1000.
- GOLDSTEIN, D.B. & SCHÖTTERER, C. 1999. Microsatellites: Evolution and applications. Oxford University Press. United Kingdom. 352p.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A., LLEDÓ, M.D., FAY, M.F., LEXER, C. & SOSA, P.A. 2004a. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bencomia exstipulata* and *B. caudata* (Rosaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4: 130-132.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A., CAUJAPÉ-CASTELLS, J., SOSA, P.A. 2004b. Allozyme variation and structure of the canarian endemic palm tree *Phoenix canariensis* (Arecaceae): implications for conservation. *Heredity*, 93: 307-15.

- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A., SOSA, P.A., RIVERO, E., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E.A. & NARANJO, A. 2008. Molecular markers reveal no genetic differentiation between *Myrica rivas-martinezii* and *M. faya* (Myricaceae). *Annals of Botany*, 103: 79-86.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A., LLEDÓ, L., LEXER, C., FAY, M., MARRERO, M., BAÑARES, A., CARQUÉ, E. & SOSA, P.A. 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., BATISTA, F.J. 2009b. Genetic variation and conservation of the endangered endemic *Anagyris latifolia* Brouss. ex Willd. (Leguminosae) from the Canary Islands. *Plant Systematics and Evolution*, 279: 59-68.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B. & NEI, M. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17: 1244-1245.
- LANGELLA, O. 2005. Populations 1.2.30. Laboratoire populations, Génétique et evolution, Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS UPR9034, Gif Sur Yvette.
- MANEN J.F. 2004. Are both sympatric species *Ilex perado* and *Ilex canariensis* secretly hybridizing? Indication from nuclear markers collected in Tenerife. *BMC Evolutionary Biology*, 4:46
- MANEN, J.F., BOULTER, M.C. & NACIRI-GRAVEN, Y. 2002. The complex history of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae): evidence from the comparison of plastid and nuclear DNA sequences and from fossil data. *Plant Systematics and Evolutions*, 235: 79-98.
- MMA 2003. Informe anual. Parque Nacional de la Caldera de Taburiente. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Islas Canarias, España.
- NEI, M. 1972 Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- NELSON-JONES, E.B., BRIGGS, D. & SMITH, A.G. 2002. The origin of intermediate species of the genus *Sorbus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 953-963.
- OOSTERMEIJER, J.G.B., LUIJTEN, S.H., & DEN NIJS, J.C.M. 2003. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation*, 113: 389-398.
- ROSENBERG, N.A., PITCHARD, J.K., WEBER, J.L., CANN, H.M., KIDD, K.K., ZHIVOTOVSKY, L.A & FELDMAN, M.W. 2002. Genetic structure of human populations. *Science*, 298: 2381-2385.
- SELBACH-SCHNADELBACH, A., CAVALLI, S.S., MANEN, J.F., COELHO, G.C. & SOUZA-CHIES, T.T. 2009. New information for *Ilex* phylogenetics based on the plastid psbA-trnH intergenic spacer (Aquifoliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159: 182-193.
- SILVERTOWN, J.W. & CHARLESWORTH, D. 2001. Introduction to plant population biology. Blackwell Science, London, UK. 347p.
- SOSA, P.A. 2001. Genes, poblaciones y especies. In: Martín-Esquível J, Fernández-Palacios JM (eds) *Naturaleza de Canarias*. Publicaciones Turquesa S L, Santa Cruz de Tenerife, pp 151-155.
- SOSA, P.A., BATISTA, F., GONZÁLEZ, M.A. & BOUZA, N. 2002. La conservación genética de las especies amenazadas en: *Biología de la conservación de plantas amenazadas: Técnicas de diagnóstico del estado de conservación*. Bañares, A. (Ed.). Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España. pp. 133-160.
- SOSA, P.A., GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A., MORENO, C. & CLARKE, J.B. (sometido). Conservation Genetics of the endangered endemic *Sambucus palmensis* Link (Sambucaceae) from the Canary Islands. *Conservation Genetics*.
- TORIMARU, T., TANI, N., TSUMURA, Y., HIRAOKA K. & TOMARU, N. 2004. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for the evergreen shrub *Ilex leucoclada* M. *Molecular Ecology Notes*, 4: 531-533.
- VVAA 2000. Lista roja de flora vascular española (valoración según las categorías de la UICN). *Conservación Vegetal*, 6: 11-38.
- WERNER, O., ROS R.M. & FERNÁNDEZ, A. 2007. Caracterización genética de poblaciones de varias especies amenazadas en el Parque Nacional de Garajonay. Puerto de la Cruz, SPAIN: III Congreso de Biología de la Conservación de Plantas.
- YEH, F.C., YANG, R.C., BOYLE, T., YE, Z.H. & MAO, J.X. 1997. Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Alberta, Canada.