

CONSERVACIÓN GENÉTICA DE ENDEMISMOS VEGETALES DE LOS PARQUES NACIONALES DE GARAJONAY Y EL TEIDE: *BETHENCOURTIA*, *SAMBUCUS PALMENSIS* Y *VIOLA CHEIRANTHIFOLIA*

PRISCILA RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ¹, MIGUEL ANGEL GONZÁLEZ PÉREZ²,
AGUSTÍN NARANJO CIGALA³, LETICIA CURBELO MUÑOZ⁴,
JUAN JOSÉ ROBLEDO ARNUNCIO⁵, PEDRO LUIS PÉREZ DE PAZ⁶, PEDRO A. SOSA⁷

RESUMEN

La conservación genética de especies amenazadas es uno de los pilares que integran la biología de la conservación. Por ello, se ha procedido a caracterizar genéticamente mediante el uso de marcadores moleculares variables, microsatélites, tres grupos de endemismos vegetales de Canarias, con una problemática y un interés diferente, en los parques nacionales de Garajonay (La Gomera) y El Teide (Tenerife). El primer análisis consistió en determinar las afinidades y diferencias genéticas (y por ende sistemáticas) de dos taxones endémicos de La Gomera del género *Bethencourtia*: *B. rupicola* y *B. hermosae*, entre las cuales existían discrepancias e incertidumbres taxonómicas. Los resultados demostraron que ambas entidades están constituidas por acervos genéticos diferenciados, y sin la existencia aparente de híbridos entre ellos. También se encuentran separados del endemismo *B. palmensis*, endémico de Tenerife y La Palma. Por tanto, la gestión de los mismos debe establecerse independientemente uno del otro, y atendiendo más a una cuestión de hábitat que de taxón. En el segundo caso, *Sambucus palmensis*, se procedió a caracterizar genotípicamente más de 400 efectivos del Parque Nacional de Garajonay, determinar la relación de parentesco entre los mismos, identificar sus genotipos individualizados y determinar el grado de clonalidad entre los ejemplares cultivados en el parque nacional en sus diferentes programas de recuperación. Los resultados demostraron la presencia de un importante porcentaje de individuos genéticamente idénticos, a la vez que un alto número de individuos con genotipos singulares y alelos raros. Se propone la multiplicación y conservación de 25 ejemplares que albergan dichas singularidades. Finalmente, se analizaron genéticamente varias poblaciones naturales de

¹ Instituto Universitario de Estudios Ambientales y Recursos Naturales (i-UNAT). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Campus Universitario de Tafira. 35017 Las Palmas. Islas Canarias. Email: priscila.rodriguez@ulpgc.es

² Instituto Universitario de Estudios Ambientales y Recursos Naturales (i-UNAT). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Campus Universitario de Tafira. 35017 Las Palmas. Islas Canarias.

³ Instituto Universitario de Estudios Ambientales y Recursos Naturales (i-UNAT). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Campus Universitario de Tafira. 35017 Las Palmas. Islas Canarias.

⁴ Instituto Universitario de Estudios Ambientales y Recursos Naturales (i-UNAT). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Campus Universitario de Tafira. 35017 Las Palmas. Islas Canarias.

⁵ Departamento de Ecología Forestal y Genética. INIA (CIFOR). Ctra. de la Coruña Km 7.5, 28040 Madrid.

⁶ Departamento de Botánica, Universidad de La Laguna, Facultad de Farmacia, 38071, La Laguna. Islas Canarias.

⁷ Instituto Universitario de Estudios Ambientales y Recursos Naturales (i-UNAT). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Campus Universitario de Tafira. 35017 Las Palmas. Islas Canarias.

Viola cheiranthifolia del Parque Nacional del Teide, y se estableció el grado de diferenciación genética entre las mismas, así como el nivel de poliploidía de la especie en Canarias. Los resultados mostraron que existen dos núcleos fuertemente diferenciados en el Parque Nacional, a ambos lados de las Cañadas. Las políticas de gestión deben ir dirigidas a la conservación de dichos acervos genéticos. Por otro lado, el nivel de diversidad genética detectado está acorde con el hecho de que la especie presenta un alto grado de autofecundación.

Palabras clave: conservación genética, Islas Canarias, Garajonay, microsátélites, Teide, genética de poblaciones.

CONSERVATION GENETICS OF ENDEMIC PLANTS OF GARAJONAY AND TEIDE NATIONAL PARKS: BETHENCOURTIA, SAMBUCUS PALMENSIS AND VIOLA CHEIRANTHIFOLIA

ABSTRACT

Conservation genetics is one of the pillars of Conservation Biology. So, in this project, we have characterized genetically through hypervariable molecular markers, microsattellites, three groups of Canary endemic plants with a different interest from two Canary National Parks: Garajonay (La Gomera) and Teide (Tenerife). In the first case, we determined the genetic differences of two endemic taxa of La Gomera: *Bethencourtia rupicola* and *B. hermosae*, with taxonomic uncertainty. The results show that both taxa represent different genetic pools and no hybrids were detected. The management of these species should be done independently from each other. In the second case, a genotypic analysis was conducted in more than 400 individuals of *Sambucus palmensis*. Although we detected a high percentage of clonal individuals, an important number of individuals harbored single alleles and genotypes. A list of 25 priority individuals with rare alleles, was proposed. Finally, we analyzed different natural populations of *Viola cheiranthifolia* from The Teide National Park. We detected that Teide's Violet is polyploid and its populations are genetically differentiated in two pools, separated by Las Cañadas: El Teide mountain and Guajara. These groups should be managed separately, avoiding artificial gene flow between them. At the same time, the genetic diversity level detected consistent with a selfing species.

Keywords: Conservation genetics, Canary Islands, Garajonay, microsattellites, Teide, population genetics.

INTRODUCCIÓN

En la Biología de la conservación vegetal se encuentran implicados aspectos científicos, técnicos, sociológicos y económicos con el fin último de llevar a cabo acciones específicas que finalicen en la reducción de los niveles actuales de pérdida de la biodiversidad (MORENO SAIZ *et al.*, 2003; CAUJA-PÉ-CASTELLS 2010a). Por ello, antes de planificar la

recuperación de una especie vegetal que se encuentre en regresión, con escasos efectivos y amenazada se debe conocer su estado biológico, identificar sus etapas críticas y averiguar las causas de las variaciones en etapas de vida demográficamente sensibles, junto con el conocimiento de su variabilidad genética y mecanismos de reproducción (MENGES 2008; NOËL *et al.*, 2010) De esta forma se llega a un proceder similar al cuerpo médico que primero diag-

nostica la tipología y gravedad de una enfermedad para luego establecer un tratamiento que permita la recuperación del paciente (BAÑARES 2002).

Desde una perspectiva metodológica, la población natural constituye el nivel más adecuado y asequible donde integrar los conocimientos de estas disciplinas. Además, el entendimiento de estos factores y de su interacción se erige como la mejor herramienta para abordar la recuperación y conservación de una especie. La población, más que la especie, es la unidad funcional evolutiva y ecológica y constituye el nexo de unión entre la biodiversidad de especies y la biodiversidad ecológica. En segundo lugar, en la población es donde se producen los cambios genéticos y demográficos fundamentales y por tanto los cambios adaptativos y vitales que influirán en el estado actual, viabilidad y dinámica natural. Además, las poblaciones naturales constituyen la materia prima de la evolución biológica y la que realmente da oportunidad a la especie a desenvolverse bajo diferentes condiciones ambientales y donde mejor puede en general, conservarse una planta (COLE 2003; NOËL *et al.*, 2010; TORÄNG *et al.*, 2010).

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 cómo 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, y minimizar las causas que originan su disminución. 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 (DEREDEC & COURCHAMP 2007, GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.*, 2009a; GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.*,

2009b; ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, 2009; SOSA *et al.*, 2010; ALLENDORF *et al.*, 2010).

Una forma de analizar la diversidad genética de los individuos, poblaciones y especies, así como de aproximar su historia demográfica y evolutiva ancestral, es a través del uso de marcadores moleculares que permiten determinar directamente la variación genética que se produce a nivel de ADN pudiéndose llegar a observar, describir y analizar las diferencias existentes en las secuencias de nucleótidos. La aplicación de las técnicas moleculares en la resolución de los problemas genéticos es un campo en auge permanente que se ha desarrollado y acelerado en los últimos años gracias a la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (FRANKHAM *et al.*, 2002). Estos estudios en Canarias han aumentado en los últimos años (DÍAZ-PÉREZ *et al.*, 2008; GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.*, 2009; SOSA *et al.*, 2010; SOSA *et al.*, 2013), aportando resultados y conclusiones de gran valor desde el punto de vista de la conservación genética (CAUJAPÉ-CASTELLS 2010a; CAUJAPÉ-CASTELLS *et al.*, 2010b; SOSA *et al.*, 2011).

Posiblemente, la principal fortaleza que los estudios genéticos ofrecen en la disciplina de la conservación es su capacidad para disponer de un escenario más preciso y de crear un panorama sin precedentes más afinado de los patrones y procesos que están aconteciendo en las especies amenazadas, unos procesos que a su vez son cuantificables en términos precisos. Así, los marcadores moleculares están contribuyendo de manera decidida en resolver incertidumbres taxonómicas o disponer del conocimiento exhaustivo de los mecanismos de dispersión, parentesco, capacidad reproductiva o hibridación que imperan en las poblaciones naturales a escala micro- y macrogeográficas debido al desarrollo de algoritmos matemáticos cada vez más precisos y complejos (ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, 2004a; ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, 2004b; ROBLEDO-ARNUNCIO *et al.*, 2009; SOSA *et al.*, 2010; ALLENDORF *et al.*, 2010; ROBLEDO-ARNUNCIO 2011; SOSA *et al.*, 2011).

Objetivo principal

La finalidad del presente proyecto fue determinar los niveles y la distribución de la variabilidad genética intra e interpoblacional a través del uso de marcadores moleculares muy polimórficos, de tres endemismos vegetales amenazados: *Bethencourtia rupicola* (B. Nord.) B. Nord. y *B. hermosae* (Pit.) Kunkel]; *Sambucus palmensis* Link y *Viola cheiranthifolia* Humb. et Bonpl. localizados, total o parcialmente, en los parques nacionales de Garajonay en La Gomera y el Teide en Tenerife. En el caso específico de *Bethencourtia*, se esperaba determinar el grado de similitud genética entre los tres taxones existentes. Para *Viola cheiranthifolia* era imprescindible determinar cómo se estructuraba la variabilidad genética a nivel intra- e interpoblacional, mientras que en *Sambucus palmensis*, se precisaba conocer con exactitud el origen, distribución y frecuencia de los genotipos entre los ejemplares existentes en el Parque Nacional.

Taxones de estudio

Sambucus palmensis Link

Sambucus palmensis Link. (*Sambucus nigra* ssp. *palmensis*); *Sambucaceae*. El Saúco es un rarísimo endemismo canario cuyos efectivos naturales censados en 9 localidades no alcanzan el medio centenar de individuos maduros (SOSA et al., 2010a). Constituye un elemento muy singular de las manifestaciones mejor conservadas del monteverde de fondos de barranco y ocasionalmente como rupícola de paredones rezumantes en el ámbito forestal. Su representación esporádica y escasez de efectivos poblacionales le confiere una extraordinaria fragilidad; posibles fenómenos de auto-incompatibilidad reproductiva y endogamia pudieran constituir las causas de su bajísima capacidad de renovación y esporádica mortalidad de su descendencia. Se desconoce el origen genético de la mayor parte de los ejemplares repoblados en Canarias.

Bethencourtia Choisy

El género *Bethencourtia* Choisy fue reconocido como válido en 2006 (NORDENSTAM 2006a, 2006b) y se incluye en la familia *Asteraceae*, tribu *Senecioneae*, de las Islas Canarias, pasando *Canariothamnus* B. Nord. a ser sinónimo de dicho género. Según este autor, dicho género (endémico canario) quedaría constituido por tres especies denominadas *Bethencourtia hermosae* (Pit.) Kunkel (\equiv *Senecio hermosae* Pit. \equiv *BeCanariothamnus hermosae* (Pit.) B. Nord.); *Bethencourtia palmensis* (Nees) Choisy (\equiv *Senecio palmensis* Buch \equiv *Cineraria palmensis* (Buch) Nees \equiv *Canariothamnus palmensis* (Buch) B. Nord.) y *Bethencourtia rupicola* (B. Nord.) B. Nord. \equiv *Canariothamnus rupicola* B. Nord. in *Compositae Newslett.* 44: 27. 2006. Este último taxón, se incluía como una población de *B. hermosae*, pero en la actualidad y basándose en aspectos morfológicos, se ha propuesto como especie diferente. Así tendríamos *Bethencourtia hermosae* para las poblaciones de Vallehermoso y *B. rupicola* para la población de Los Roques (NORDENSTAM 2006a), dentro del Parque Nacional de Garajonay y del Monumento Natural de Los Roques (VELÁZQUEZ BARRERA & FERNÁNDEZ LÓPEZ 2011). Sin embargo, ningún estudio genético ha confirmado ni corroborado esta clasificación taxonómica.

Viola cheiranthifolia Humb. et Bonpl.

Viola cheiranthifolia Humb. et Bonpl. (*Violaceae*). La violeta del Teide, es un endemismo canario exclusivo de Tenerife que se encuentra limitada dentro de los dominios del Parque Nacional del Teide, ya que sólo crece de forma silvestre por encima de los 2.100 metros de altitud (es la planta que florece a mayor altura en España) y bordes meridionales del mismo: Teide, Pico Viejo, y Montaña Blanca, Cumbres del Circo, etc.

La mayor parte de sus poblaciones se hallan altamente amenazadas por la gran densidad de visitantes del pico Teide, y la introducción de

conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y muflones (*Ovis aries*) en el Parque Nacional. Se encuentra catalogada como Vulnerable (VU D2) en la Lista Roja de la Flora Vasculosa Española (Moreno, 2008). Se desconocen aspectos clave de su biología reproductiva y de la diferenciación y estructuración genética de sus poblaciones naturales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Para todas las especies objetivo de este estudio se realizó el mismo procedimiento de recolección. Se tomaron muestras foliares individuales que fueron posteriormente almacenadas en bolsas plásticas con gel de sílice para su deshidratación y conservación. Igualmente, se recogieron datos cartográficos y ecológicos de todos los individuos muestreados para la elaboración de una base de datos georreferenciada.

Bethencourtia

La recogida de muestras de las tres especies del género *Bethencourtia* se culminó con un total de 276 ejemplares. Se llevó a cabo de manera exhaustiva en la isla de La Gomera para *B. hermosae* y *B. rupicola* en los lugares que inicialmente se habían descrito por informes y publicaciones previas (tabla 1). Cuando fue posible, se recolectaron muestras individuales representativas de cada localidad. Roque Ojila y Roque Agando presentaban un bajo número de ejemplares, por lo que se recolectaron muestras de todos los individuos que se encontraron. En todo momento se contó con los servicios de un escalador profesional para la toma de muestras en los roques, debido a su difícil acceso.

Además, se procedió a la recogida de muestras de tres localidades de *B. palmensis*, una población localizada en Tenerife (PALRIO) y dos en La Palma (PALAND y PALVIZ) (tabla 1).

Tabla 1. Ejemplares muestreados en las poblaciones naturales del género *Bethencourtia* en las islas de La Gomera, La Palma y Tenerife. N = Número de muestras

Especies	Isla	Localidad	Código	N
<i>B. Hermosae</i>	La Gomera	Lomo Las Tejas	Hertej	41
		Presa Del Garabato	Hergar	49
		Roque Chico-Roque Cano	Hercan	31
				121
<i>B. Rupicola</i>	La Gomera	Roque Carmona	Rupcar1	18
			Rupcar2	41
		Roque Las Lajas	Ruplaj	11
		Roque Olija	Rupoji	5
		Roque Agando	Rupaga	4
				79
<i>B. Palmensis</i>	La Palma	Los Andenes	Paland	20
		Fuente Vizcaina	Palviz	22
	Tenerife	Barranco De El Río	Palrio	34
				76
Total				276

Viola cheiranthifolia

De la violeta del Teide se recogieron 269 individuos durante los años 2013 y 2014, provenientes de 8 puntos diferentes en el Parque Nacional del Teide (fig. 1). Las localidades «Torre 4», «La Rambleta», «Refugio de Altavista», «Montaña Blanca» y «Pico Viejo» se encuentran en las inmediaciones del complejo geológico Teide-Pico Viejo (en adelante, Teide), mientras que «Guajara» y «Pasajirón» están situadas en los bordes de las Cañadas del Teide.

Sambucus palmensis

El muestreo de *Sambucus palmensis* en el Parque Nacional de Garajonay se estableció en ejemplares que se encontraban tanto en poblaciones naturales (ejemplares naturales) como individuos que habían sido replantados desde los inicios de los programas de recuperación de la especie y cuyo origen genético era dudoso o desconocido. En total se recogieron 402 muestras correspondientes a 15 áreas de actuación. En la figura 2 se representa la distribución del total de individuos estudiados, ya sean de origen natural o de reintroducción.

Análisis de microsátélites

Bethencourtia

Todos los loci utilizados para la caracterización genética de *Bethencourtia* son de nuevo desarrollo. Las regiones microsátélites fueron seleccionadas por el laboratorio «Savannah River Ecology» (Universidad de Georgia), mediante una biblioteca genómica secuenciada en Illumina a través de ADN genómico de *B. hermosae*. Las 10 parejas de cebadores que amplificaron correctamente en las tres especies y se utilizaron en los posteriores análisis se muestran en la tabla 2.

Una vez seleccionados los cebadores y etiquetados con los correspondientes fluoróforos, se agruparon en dos grupos (Multiplex) para PCR con «QIAGEN Multiplex Kit» (QIAGEN) y condiciones recomendadas por el fabricante.

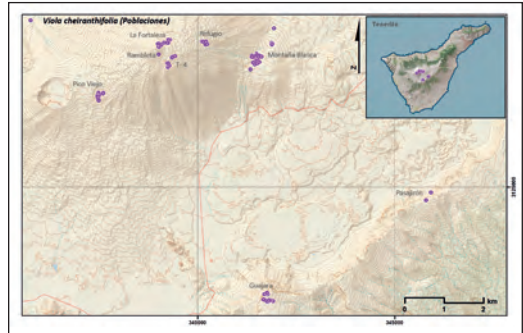


Fig. 1. Mapa de distribución de los individuos muestreados de *Viola cheiranthifolia* en el Parque Nacional del Teide, Tenerife. Los códigos poblacionales se indican entre paréntesis..

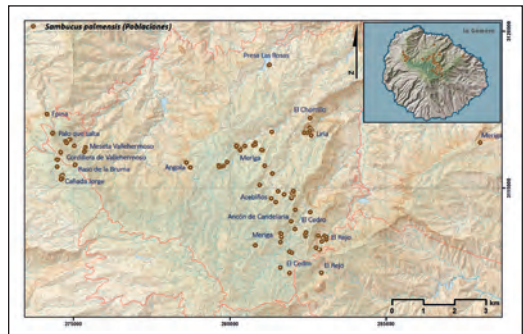


Fig. 2. Mapa de distribución de los individuos muestreados de *Sambucus palmensis* en la isla de La Gomera...

Viola cheiranthifolia

Al igual que en *Bethencourtia*, todos los marcadores microsátélites son de nuevo desarrollo por este grupo de investigación con la colaboración de Savannah River Ecology (Universidad de Georgia). Inicialmente se caracterizaron 16 marcadores que fueron publicados en la revista

«Conservation Genetic Resources» (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, P. et al., 2015). Posteriormente, cuando se analizaron todas las muestras, se excluyeron los marcadores VIOtri-6 y VIOtri-13 debido a las dificultades para interpretar los perfiles. En este caso, las PCR se realizaron individualmente con temperaturas de anillamiento específicas indicadas en la tabla 3.

Durante la lectura de los resultados de secuenciación se detectó un perfil poliploide, con más de dos alelos para un alto porcentaje de marcadores e individuos, hasta un máximo de cuatro alelos. Este hecho no se constató hasta después de la publicación de los marcadores, ya que no se habían analizado el total de muestras para la caracterización de los microsatélites.

Tabla 2. Características de los 10 marcadores microsatélites desarrollados para las poblaciones naturales del género . GenBank: Número de acceso en la base de datos nucleotídica GenBank. Fluoróforo: Nombre del fluoróforo para cada pareja de cebadores. Multiplex; ‡Grupo A, *Grupo B. F: "Forward". R: "Reverse".

Lotus	GenBank	Motivo	Cebadores-Secuencia (5'->3')	Rango (pb)	Fluoróforo
BetTet-2	LN794613	(AAAT) ₃₂	F:TGAATTCGAAGTTGACGTGG R:AGGTCAATGACTAGCCTCGG	217-247	6-FAM*
BetTet-3	LN794614	(AAAT) ₃₂	F:GAGGTAAGTCTAGAGATGATAACTGTAAGG R:TTGTGTTATACTGCAGAGATTGAAGG	131-143	NED*
BetTet-5	LN794618	(ATCT) ₃₂	F:AAAGTGATGGACAAATAAACGG R:TGGTGGTAGGTGTAGAGGAGG	268-292	NED*
BetPen-1	LN794611	(AAATC) ₃₀	F:GACCACCATAGTCAGAAGATCTAACC R:CCGATTCTTCTCAACTGATAATTGC	271-286	VIC‡
BetPen-2	LN794612	(TCTCC) ₃₀	F:AAGAAGAGAGTTATTTATTTGTAAGTGGG R:TTTACTTCCACCTTCCATTTC	196-211	NED‡
BetPen-5	LN794616	(AAAAC) ₃₀	F:CGTTGGCTCAAACAAACACC R:CAAGATCCCTTACAACGGGC	187-212	PET*
BetPen-6	LN794617	(AATGC) ₃₀	F:GAATCCTACTCTACTAACTATCCTCCG R:TTGAAAGTTTGAACCAAATGCC	156-180	6-FAM‡
BetHex-3	LN794609	(TTGCTG) ₄₂	F:CTTCTGAGAATCAGGATGTAAGTCAGC R:CCGGTACTACCTTCTTTCAGTCACC	168-204	VIC‡
BetHex-4	LN794610	(ATAGAG) ₃₆	F:TCTCTCACATCCTTGTCTCTGTAGC R:CCAAACCTAACTCTCCGGC	301-319	PET‡
BetHex-6	LN794615	(TGTGGG) ₃₆	F:AAATCAAGCTTTACCAACTCTCCC R:GAGTGTAAGGAAGGTGGTGGG	128-158	PET‡

Sambucus palmensis

En este caso particular disponíamos de marcadores ya desarrollados para *Sambucus nigra* (CLARKE & TOBUTT 2006) que fueron optimizados para *Sambucus palmensis* por nuestro grupo de investigación (SOSA et al., 2010). Tres de estos marcadores (EMSn017, EMSn025, EMSn003) presentan suficien-

te polimorfismo en las poblaciones de La Gomera y fueron utilizados para este proyecto. Además, se produjeron 4 nuevos marcadores específicos para *S. palmensis* (SamTet2, SamHex2, SamHex1, SamTri8). El desarrollo de estos cebadores se realizó con la colaboración de la empresa española All-Genetics, los cuales previamente secuenciaron una biblioteca genómica a partir ADN genómico de S.

palmensis y detectaron regiones microsatélites. Al igual que el método usado para *Bethencourtia*, las

parejas de cebadores se agruparon en dos grupos Multiplex que se indican en la tabla 4.

Tabla 3. Características de los 16 marcadores microsatélites desarrollados para las poblaciones naturales de *Viola cheiranthifolia*. GenBank: Número de acceso en la base de datos nucleotídica GenBank. Fluoróforo: Nombre del fluoróforo para cada pareja de cebadores. Tm^a = Temperatura de anillamiento de cada pareja de cebadores. F: Forward. R: Reverse.

Locus	GenBank	Motivo	Cebadores-Secuencia (5'->3')	Tm (°C)	Rango (pb)	Fluoróforo
VIODi-2	HE601734	(AG) ₉	F: GCGGAGCAACCTATAATATC R: CACCACGTTCTTCCATACTC	60	139-141	PET
VIOTri-4	HE601739	(ATC) ₈	F: GTGAGGATCGGAAACAATAG R: CTATGGCGGGTGTAGTAATC	60	146-180	VIC
VIODi-8	HE601737	(AC) ₉	F: CACAGCTTCTCCATCACAAC R: TAGGAATGACTTGGCTTCTG	60	259-271	PET
VIOTri-1	HE601738	(AAC) ₇	F: CTTTCGCTGGAGGACTATAG R: TTAGCTGTGGTGGAGAAGTC	60	234-243	NED
VIOTet-8	HE601742	(ACAT) ₁₃	F: AAACAGCCATCACCACCTTAC R: ATTACAAACACGGGAAGTTG	60	194-328	6-FAM
VIODi-6	HE601736	(AG) ₈	F: CTTGATTGCTGGAGTGTGAC R: GCGAATCACTACTGTTGTC	60	169-175	VIC
VIOTri-8	HE601741	(ACT) ₈	F: TCGAAGGGTTCCATATAATC R: TTATCTCCGATCCTCAATTC	60	250-277	PET
VIOTri-7	HG916755	(AAG) ₈	F: CTCGGTTCGGGATATATAAG R: ATGGAAAGTATGCGAGATTC	60	127-157	6-FAM
VIODi-24	HG916762	(AG) ₁₁	F: ACTTCTTGATTGAACGGAAC R: TCACATTCATCGGATCTTTC	60	273-279	TAMRA
VIOTri-9	HG916756	(ATC) ₁₀	F: TCCTTCAAATTCATGGTGAG R: CCACTCTTCAACAAGGAATG	60	183-215	6-FAM
VIODi-10	HG916757	(AC) ₁₃	F: CTA CTGATGGGTGTCGAATC R: GGAACGTGAAACTCTGTAGC	62,5	386-400	NED
VIOTri-14	HG916759	(ATC) ₇	F: CTTCCAGTTTCAAAGACAG R: GTTATAGGCTGAAGGGTCAC	60	132-148	VIC
VIOTet-13	HG916763	(AAAC) ₈	F: AGTCTAGTTTGCGCCTGTAG R: ATCTGCACAGGAGGTAATG	60	146-180	PET
VIOTri-24	HG916761	(ATC) ₈	F: ACTGAGAGCCAATCAAAGAG R: TCACTCCCAATCAAGAAAC	60	263-275	6-FAM

Análisis de datos genéticos

Todos los productos obtenidos tanto de PCR simple como PCR multiplex fueron detectados en un secuenciador capilar ABI 3730

con una escala LIZ (500-250) y visualizados en GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems, Inc.). Identificamos los perfiles alélicos para cada locus y asignamos un genotipo a cada individuo.

Tabla 4. Características de los 7 marcadores microsatélites utilizados para las poblaciones naturales de *Sambucus palmensis* en el Parque Nacional de Garajonay. GenBank: Número de acceso en la base de datos nucleotídica GenBank. Fluoróforo: Nombre del fluoróforo para cada pareja de cebadores. Multiplex; ‡Grupo A, *Grupo B. F: Forward. R: Reverse.

Locus	GenBank	Motivo	Cebadores-Secuencia (5'->3')	Rango (pb)	Fluoróforo
EMSn017	AM086423	[AG] ₂₁ [AG] ₂₄	F: GGTATTGCTTGAACAATCATCG R: GCCTTTTGTCCCAAATATCC	202-206	6-FAM‡
EMSn025	AM086426	[AC] ₁₃ -[AC] ₈	F: AATGCATCGCAAGAAAAGG R: GGTAAGATAAATGATACAATGTTTTGG	191-197	6-FAM‡
EMSn003	AM086420	[CT] ₁₁	F: TCGTCTTTTCCGACTCTAAAGC R: CTGGACATTTGCGATCTGG	202-224	NED*
Sam_Tet2	Pendiente	(AGAT) ₁₂	F: AAATGCACTGAACAGTGGTTGA R: CCCTAGTCCTCCAACCCATC	118-146	VIC‡
Sam_Hex2	Pendiente	(AATAAC) ₆	F: TGATGATGGTTGTTGGTAGATCA R: GGCAGAATTCTAGGGCCAGT	218-224	PET‡
Sam_Hex1	Pendiente	(AGAGGT) ₅	F: GCAGTGGTGAAGAGATTGC R: AAATTTGCATAGGGCAGCAC	199-211	NED‡
Sam_Tri8	Pendiente	(AAC) ₂₁	F: AATCCCGACACAACCTCAAA R: CGGTGGTAGAGCAAGTGAGG	100-127	PET*

Los datos genéticos obtenidos para cada individuo y locus amplificado se incluyeron en una hoja de cálculo EXCEL (Microsoft), para posteriormente ser analizadas con el complemento GAENLEX 6.5 (PEAKALL & SMOUSE 2012) que permite exportar los valores a otros programas de análisis genético. Este programa también se utilizó para calcular índices básicos de diversidad genética: número medio de alelos por locus (A), heterocigosidad observada (Ho) y heterocigosidad esperada (He) en las especies diploides. Los casos con bajo número de individuos por localidad, como *Bethencourtia*, se calculó mediante rarefacción el número medio de alelos y los alelos privados con HP-rare (KALINOWSKI 2005).

El desequilibrio de ligamiento entre loci y la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para todas las poblaciones fueron es-

timados mediante el programa GENEPOP versión 4.2 (ROUSSET 2008).

En *Sambucus palmensis* se identificaron, además, con la opción de «multilocus matches» en GenAlex, los genotipos que eran compartidos por diferentes individuos y se detectaron aquellos ejemplares que disponían de un genotipo singular o único, que no se repetía en otro individuo. Todos los ejemplares se agruparon en 15 áreas geográficas de actuación acorde con la proximidad de su localización y los criterios del personal del Parque Nacional de Garajonay.

Para *Viola cheiranthifolia* y debido a su carácter poliploide no se pudo determinar el número de copias para cada alelo en los individuos heterocigóticos, por lo que los análisis de diversidad genética se llevaron a cabo basándose en el fenotipo (presencia/ausencia).

Para evaluar la diferenciación genética entre las poblaciones o especies de *Viola cheiranthifolia* y especies de *Bethencourtia* se aplicó un análisis Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). Se asumió un modelo de mezcla de poblaciones y de frecuencias alélicas dependientes. Se obtuvieron 10 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. El número óptimo de K se calculó con el método ΔK (EVANNO et al., 2005) implementado en el servicio web STRUCTURE HARVESTER (EARL 2012). El consenso de las 10 réplicas para el K más óptimo fue procesado con el programa CLUMPP 1.1.2 (JAKOBSSON & ROSENBERG 2007). En el caso de *Bethencourtia*, se hicieron dos tipos de análisis, a nivel interespecífico con el total de muestras y para las muestras correspondientes a cada especie. Para *V. cheiranthifolia* se hizo un análisis con el total de muestras y posteriormente otro sólo con las poblaciones del Teide.

Para *Viola cheiranthifolia* se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA), con el método de la covarianza estandarizada de la distancia genética a pares entre individuos también implementado en GenAlex. La matriz de distancia para el PCoA se estimó con el paquete de R «Polysat» (CLARK & JASIENIUK 2011), que permite análisis en poliploides con ambigüedad genotípica.

Para *Bethencourtia*, también se analizó la información de frecuencias alélicas mediante un análisis de la varianza molecular (AMOVA) con el software ARLEQUÍN (EXCOFFIER & LISCHER 2010), para estimar los componentes de la varianza dentro y entre poblaciones o especies. Las matrices del coeficiente de diferenciación genética F_{ST} (WEIR & COCKERHAM 1984) también fueron obtenidas a través de ARLEQUÍN.

En *Bethencourtia* se calculó una matriz de distancia (NEI & GOJOBORI. 1986) entre localidades y el cladograma UPGMA resultante fue estimado con el programa POPULATIONS (LANGELLA 2002), con 100 «bootstraps» para cada locus. El árbol se representó y editó en FigTree (RAMBAUT 2012).

Con el fin de identificar eventos recientes de cuello de botella en las poblaciones naturales de *Bethencourtia* se testaron dos modelos mediante el software BOTTLENECK (PIRY et al., 1999), «stepwise mutation model» (SSM) y «intermediate two-phased model» (TPM). En *B. rupicola*, dado que el mínimo de individuos recomendados para este test es de 10, las poblaciones RUPOJI y RUPAGA fueron excluidas.

RESULTADOS

Bethencourtia

Todas las parejas de cebadores amplificaron correctamente y mostraron diferentes grados de polimorfismo. Todos los loci fueron polimórficos en *B. palmensis*, aunque BetPen-6 fue monomórfico en *B. hermosae* y *B. rupicola*, con diferentes tamaños alélicos. BetPen-5 fue monomórfico sólo en *B. rupicola*. RUPCAR2 en *B. rupicola* fue la única población con desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg y no hubo desequilibrio de ligamiento para todos los pares analizados. Detectamos presencia de alelos nulos en *B. rupicola* en RUPCARI (Hex4, Tet2), RUPCAR2 (Hex4, Tet3, Tet5) y *B. palmensis* en las poblaciones PALAND (Pen2, Tet3), PALVIZ (Tet3) y PALRIO (Pen2).

Los análisis para detectar eventos recientes de cuello de botella resultaron positivos para dos poblaciones de *B. hermosae*: HERCAN y HERTEJ. HERCAN obtuvo valores significativos de exceso de heterocigosidad con los dos mo-

delos empleados (TPM y SSM). Por otro lado, HERTEJ solo resultó significativo para el modelo TPM.

Los índices básicos de diversidad genética se muestran en la tabla 5. Los mayores valores de diversidad se detectaron en *B. palmensis*, con el mayor valor de He en PALAND (0.420). Por

el contrario, *B. hermosae* presentó los valores más bajos con He = 0.212. La media de riqueza alélica rarefacta entre loci varió desde 1.57 en *B. hermosae* (HERCAN, HERGAR) hasta 2.34 (PALAND). La mayor presencia de alelos privados se detectó en *B. palmensis* (PALRIO) con valor de 0.240 y *B. hermosae* (HERTEJ) con un valor de 0.180.

Tabla 5. Índices de diversidad genética en las poblaciones de Bethencourtia. N=número medio de muestras entre loci; NA=número de alelos; Ar=Riqueza alélica con rarefacción; Par=Riqueza de alelos privados con rarefacción; Ho= Heterocigosidad observada; He= heterocigosidad esperada; Fis = coeficiente de endogamia. No significativo (ns); ***P < 0.001.

Especie	Poblacion	N	NA	Ar	PAr	Ho	He	Fis
<i>B. hermosae</i>	HERCAN	30,8	16	1,57	0,01	0,237	0,252	0,059 ^{ns}
	HERGAR	48,9	19	1,57	0,01	0,208	0,212	0,017 ^{ns}
	HERTEJ	40,9	27	2,00	0,18	0,335	0,365	0,083 ^{ns}
	Total <i>B. hermosae</i>	120,6	27	2,14	0,35	0,258	0,302	
<i>B. rupicola</i>	RUPAGA	4,0	19	1,90	0,02	0,400	0,321	-0,297 ^{ns}
	RUPLAJ	10,9	22	1,86	0,11	0,336	0,309	-0,093 ^{ns}
	RUPOJI	4,9	23	2,15	0,11	0,240	0,356	0,351 ^{ns}
	RUPCARI	18,0	23	1,94	0,02	0,311	0,356	0,129 ^{ns}
	RUPCARI2	41,0	29	2,07	0,08	0,278	0,358	0,226 ^{***}
	Total <i>B. rupicola</i>	78,8	33	2,62	0,50	0,297	0,382	
<i>B. palmensis</i>	PALAND	19,9	31	2,34	0,11	0,391	0,420	0,072 ^{ns}
	PALVIZ	22,0	25	2,03	0,07	0,0414	0,379	-0,093 ^{ns}
	PALRIO	33,9	28	2,00	0,24	0,359	0,358	-0,003 ^{ns}
	Total <i>B. palmensis</i>	75,8	38	2,99	1,18	0,383	0,454	

En cuanto a la estructura genética, el análisis molecular de la varianza (AMOVA) indicó que el 45.3 % de la variación se encontró entre las especies de *Bethencourtia* mientras que el 9.1 % de la variación se explica entre poblaciones dentro de especie y 45.7 % entre el total de poblaciones. Los análisis realizados dentro de especies mostraron un patrón similar para los tres taxones, donde la mayor parte de la variación se halló entre individuos dentro de poblaciones.

Además, los valores de FST variaron desde 0.011 (entre RUPCARI1 y RUPCAR2) hasta 0.669 (entre HERGAR y PALRIO). Los valores medios entre especies oscilaron entre 0.490 (*B. hermosae*-*B. rupicola*) hasta 0.601 (*B. palmensis*-*B. hermosae*) con un valor intermedio de 0.513 entre *B. palmensis* y *B. rupicola*. Hay que destacar la diferencia entre los valores encontrados entre especies en comparación con los valores entre poblaciones dentro de especie, siendo 0.136 (*B. hermosae*), 0.156 (*B. rupicola*) y 0.199 (*B. palmensis*).

Por otro lado, el árbol UPGMA confirmó la diferenciación entre especies, con altos valores de «bootstraps», apareciendo *B. hermosae* y *B. rupicola* más relacionadas entre ellas que *B. palmensis*. (fig. 3).

Incluyendo el total de ejemplares, el análisis bayesiano en STRUCTURE identificó 3 grupos de acuerdo con el método de ΔK ($K=3$) (fig. 4). Todos los individuos fueron agrupados acorde con

su origen taxonómico con más de un 80 % de asignación. Sin embargo, en los análisis individuales a nivel de especie, detectamos que cada una se encontraba dividida en 2 grupos ($K=2$). Al igual que en AMOVA y FST, la mayor diferenciación genética dentro de especie se encontró en *B. palmensis*, segregando la población de Tenerife de las de La Palma. Por otro lado, no encontramos una clara estructura en *B. rupicola*, mientras que *B. hermosae* presentó una mayor agrupación para HERTEJ.

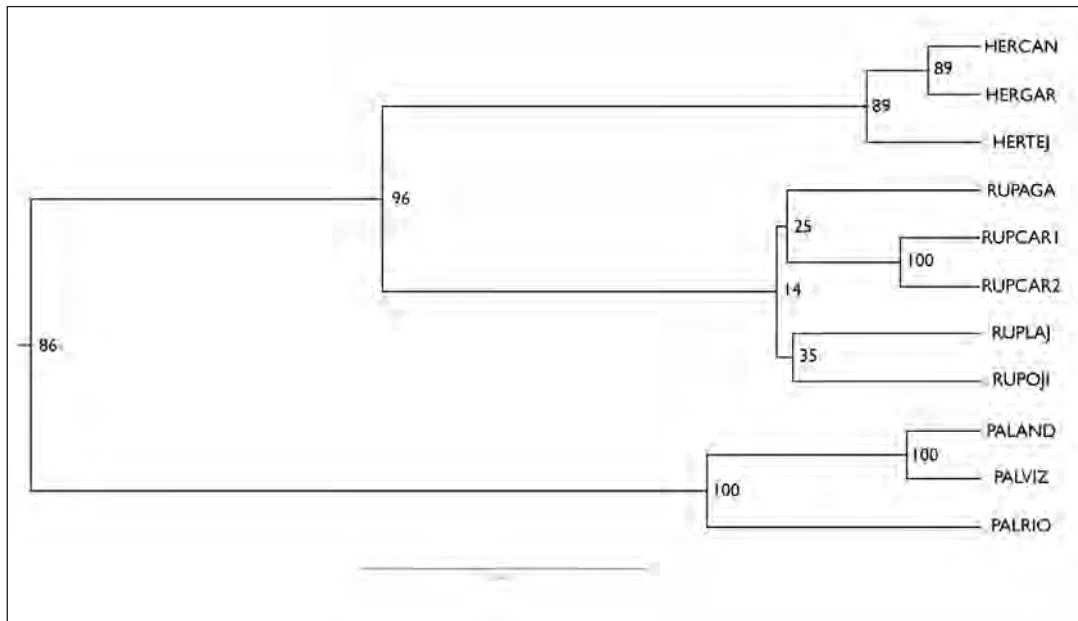


Fig. 3. UPGMA basado en la distancia genética (Nei & Gojobori 1986) entre las 11 localidades de *B. hermosae*, *B. rupicola* y *B. palmensis*. Los valores de bootstraps están indicados a la derecha de los nodos. Los códigos de las poblaciones se corresponden con la tabla 1.

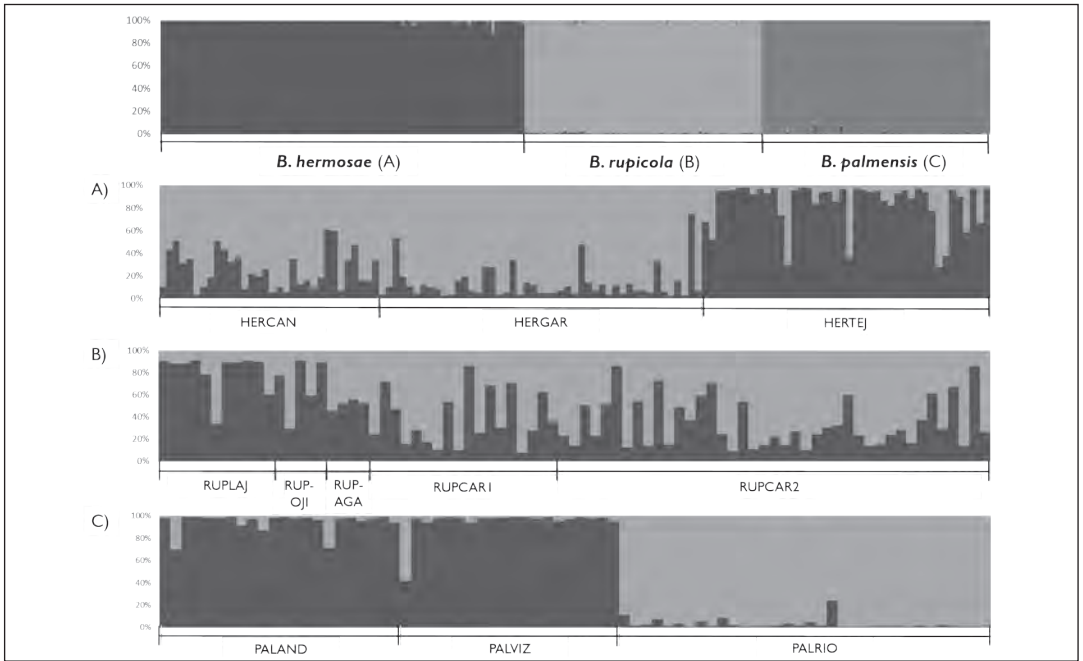


Fig. 4. Gráficos de barras para la proporción de coancestría mediante un análisis de agrupamiento bayesiano implementado en STRUCTURE y CLUMPP para *Bethencourtia*. El primer gráfico incluye el total de muestras ($K=3$), (A) *B. hermosae*, (B) *B. rupicola* y (C) *B. palmensis* con ($K=2$) para cada una. Los nombres de las poblaciones se indican en la tabla.

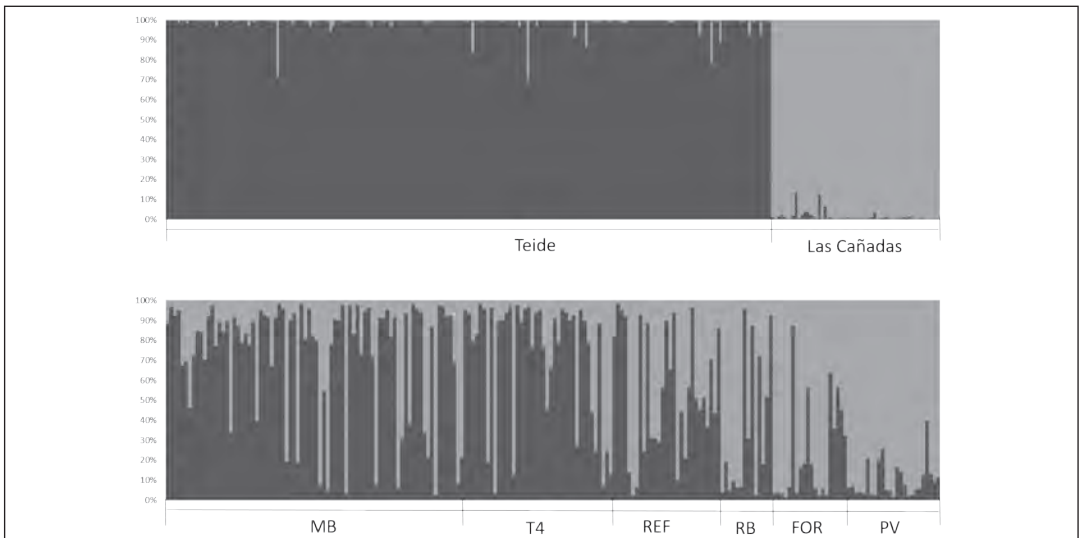


Fig. 5. Gráficos de barras para la proporción de coancestría mediante un análisis de agrupamiento bayesiano de *Viola cheiranthifolia* implementado en STRUCTURE y CLUMPP. El primer gráfico incluye el total de muestras ($K=2$), y el segundo las correspondientes al complejo Teide – Pico. Los nombres de las poblaciones se indican en la figura 1.

Viola cheiranthifolia

Los 14 microsatélites empleados en el genotipado de *V. cheiranthifolia* amplificaron correctamente en todas las localidades. El grado de polimorfismo varió desde el 13.97% en Pasajirón, hasta 73.53% en Montaña Blanca (tabla 6). Montaña blanca también fue el núcleo con mayor número de bandas y mayor número medio de alelos, lo cual se puede deber al mayor número de individuos analizados. Sin embargo, Guajara fue la localidad con mayor diversidad en cuanto al Índice de Shannon (*I*), heterocigosidad esperada (*He*) y la que presentó el mayor número de bandas privadas. Los índices

de diversidad genética por población se indican en la tabla 6.

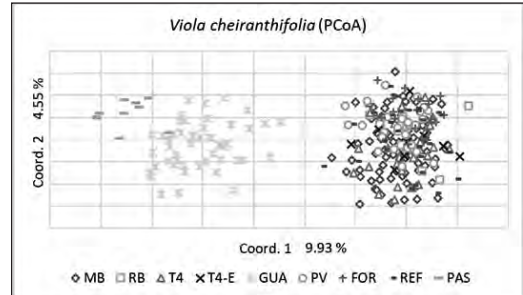


Fig. 6. Análisis de coordenadas principales basado en la distancia genotípica entre individuos en *Viola cheiranthifolia*. Los nombres de las poblaciones se indican como en la figura 1.

Tabla 6. Índices de diversidad genética por población de *Viola cheiranthifolia* del Parque Nacional del Teide. N: N° medio de ejemplares; NA: N° medio de alelos; P: Porcentaje de polimorfismo; I: Índice de diversidad de Shannon; He: Heterocigosidad esperada; NB: N° total de bandas. NBP: N° bandas privadas o únicas.

Poblacion	N	NA	P	I	He	NB	NBP
MB	76,478	1,493	73,53%	0,196	0,119	103	5
RB	13,529	0,809	38,97%	0,166	0,110	57	0
T4	37,838	1,338	66,18%	0,195	0,121	92	3
GUA	46,750	1,397	69,12%	0,218	0,133	96	12
PV	26,338	1,088	52,94%	0,176	0,109	79	2
FOR	17,162	0,824	39,71%	0,161	0,105	58	0
REF	29,456	1,081	52,94%	0,184	0,116	75	3
PAS	9,485	0,368	13,97%	0,080	0,059	31	0

En cuanto a la estructura poblacional, el análisis de coordenadas principales reveló muy claramente dos grupos diferenciados que corresponden al Teide (MB, RB, T4 y FOR) y a Las Cañadas (GUA y PAS).

Similares resultados se hallaron mediante el análisis bayesiano encontrándose dos grupos claramente diferenciados entre el Teide y las localidades de Las Cañadas. Cuando analizamos solo los individuos correspondientes al Teide, no se encontró una estructura genética clara, aunque se aprecia cierto grado de diferenciación en los individuos de Pico Viejo.

Sambucus palmensis

De los 402 ejemplares genotipados, 84 (20,89%) presentaron genotipos únicos, es decir, que no se repetían en ningún otro individuo. Curiosamente, más de la mitad de esos genotipos singulares (57,14%) se encuentran exclusivamente en dos localidades, Barranco de Liria y El Rejo (figura. 7). Por otro lado, hay que destacar que tres de los genotipos detectados (denominados como JJ, V y UU) se repitieron en 81, 30 y 15 ejemplares respectivamente, es decir en el 30% de los ejemplares estudiados.

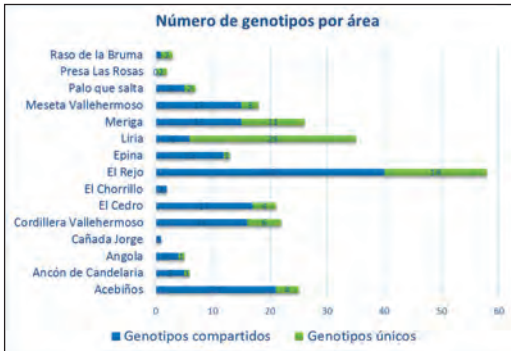


Fig. 7. Número de genotipos multilocus idénticos (con más de un ejemplar) y genotipos únicos en cada área de *Sambucus palmensis* en La Gomera.

DISCUSIÓN

Bethencourtia

Los niveles de diversidad genética fueron reducidos en las tres especies de *Bethencourtia*, siendo *B. hermosae*, la especie con los niveles más bajos a pesar de disponer del mayor número de efectivos, mientras que *B. rupicola*, que mantiene un bajo número de ejemplares en algunos de sus núcleos, presenta valores de diversidad más altos.

En todos los casos, los índices de diversidad genética encontrados en *Bethencourtia* son más bajos que los detectados en otros endemismos canarios, como son los casos de *Ruta oreojasme* ($He = 0.687$) (MELONI *et al.*, 2015), *Parolinia ornata* ($He = 0.515$) (GONZÁLEZ-PÉREZ & CAUJAPÉ-CASTELLS 2014) o *Silene nocteolens* ($He = 0.780$) (SOSA *et al.*, 2013). Sin embargo, las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, y no se han encontrado signos de autofecundación o endogamia.

Posiblemente, y por ello, son las peculiaridades de *Bethencourtia*, su ubicación preferencial por roques fonolíticos y su área de distribución res-

tringida las que podrían explicar estos niveles de diversidad. Entendemos que han sucedido eventos de reducción histórica significativa de sus poblaciones, pasando por cuellos de botella recientes, que han afectado a los niveles de variabilidad genética, especialmente en *B. hermosae*.

Uno de los principales objetivos de este proyecto era determinar la diferenciación genética entre las tres especies de *Bethencourtia*, especialmente entre ambas especies de La Gomera, *B. hermosae* y *B. rupicola*. Esta categorización es importante desde el punto de vista conservacionista ya que la especie es la unidad mínima que recibe protección legal acorde con la IUCN. Todos los resultados genéticos obtenidos en este género endémico, valores de diferenciación genética (FST), UPGMA, análisis bayesiano, AMOVA o análisis de coordenadas principales señalan una clara diferenciación genética entre los tres taxones, que concuerda con la catalogación descrita previamente por NORDENSTAM (2006).

En conclusión, nuestros resultados corroboran la caracterización del género *Bethencourtia* en Canarias y la delimitación del mismo en tres entidades genéticamente diferenciadas: *B. rupicola*, *B. hermosae* y *B. palmensis*. La falta de consenso en la nomenclatura en las diferentes listas oficiales de especies afecta a los aspectos legales para la conservación y el manejo, especialmente en *B. rupicola*. Por lo tanto, proponemos la inclusión de *B. rupicola* en las diferentes listas de especies silvestres a nivel estatal y regional, además de reconsiderar su estado de conservación. El hecho de su reducida distribución geográfica y su presencia en sólo 5 localidades con un bajo número de individuos en Agando y Ojila son razones suficientes para estar incluida en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias, así como en otras listas. Con el fin de mantener y reforzar la diversidad genética a nivel intraespecífico en la Isla de La Gomera, se deberían recolectar propágulos y semillas de distintas localidades in-

dividualmente para mantener un reservorio en el caso de que puedan suceder eventos que puedan ir en detrimento de las poblaciones. Finalmente, las tareas de conservación se deberían concentrar evitando las translocaciones entre el «Monumento Natural de Los Roques» y las localidades de Vallehermoso, debido a la posibilidad de que existan procesos de hibridación indeseados entre *B. rupicola* y *B. hermosae* como se han descrito en otras especies afines (BRENNAN et al., 2012).

Viola cheiranthifolia

Los niveles de diversidad genética de la especie son moderados para una especie poliploide, que en general, se caracteriza por presentar mayor diversidad respecto a los diploides (COMAI 2005). Uno de los factores que más condiciona los niveles de variabilidad genética en las poblaciones naturales de especies vegetales, es su Biología Reproductiva (SOSA et al., 2010). En el caso de *V. cheiranthifolia*, se ha podido constatar (a través de los resultados del proyecto de investigación financiado por parques nacionales, VULTEIDE, ver capítulo en este mismo volumen) que la especie presenta unos niveles de autogamia del 50% (SEGUÍ et al., en preparación). En estas circunstancias, y desde un punto de vista genético, las especies con altos niveles de autofecundación se caracterizan por presentar una fuerte diferenciación genética interpoblacional, en las cuales el flujo genético entre las poblaciones es escaso o nulo, generando fuertes estructuras genéticas en espacios geográficos reducidos. De hecho, la distancia entre los núcleos Guajara-Pasajirón y Pico Viejo- es tan solo de 6 km, pero ha dado lugar a una diferenciación genética que separa fuertemente ambos núcleos.

Adicionalmente y en coordinación con el grupo de investigadores del proyecto VULTEIDE y Alejandro González (CSIC, Jardín Botánico Real

de Madrid), se está realizando un análisis de modelo de nicho ecológico en el que se incluyen datos nivológicos (cobertura de nieve), evapotranspiración, topografía y distribución de la especie. Los resultados preliminares más optimistas en una predicción futura de la distribución de *V. cheiranthifolia* determinan que la especie quedaría reducida a las zonas altitudinales más altas hacia el año 2080, de continuar el cambio climático que viene aconteciendo.

Las estrategias de conservación que se proponen estarían enfocadas, por un lado, a la preservación de los dos acervos genéticos mencionados (Teide vs. Las Cañadas) mediante la creación de un banco de semillas individualizado e independiente de cada área, dada sus singularidades genéticas; además, el núcleo de Las Cañadas es si cabe, de más interés desde el punto de vista de la conservación biológica dado que alberga mayores niveles de variabilidad genética y un importante número de alelos exclusivos. Por otro lado, consideramos de vital importancia el control y manejo de los herbívoros introducidos (conejos y muflones especialmente) en el Parque Nacional del Teide, y en especial en estas dos áreas, debido a los evidentes y comprobados efectos nocivos que éstos animales tienen sobre los ejemplares de *V. cheiranthifolia*.

Es también fundamental evitar la mezcla o combinación de individuos procedentes de ambos núcleos, dadas sus diferencias genéticas y su comportamiento reproductivo, siendo muy relevante la preservación del núcleo de Las Cañadas dado su mayor nivel de diversidad genética y su aislamiento geográfico del resto de las poblaciones de la especie. Sería, finalmente muy importante, profundizar en las condiciones necesarias para potenciar e incrementar la capacidad germinativa de la especie, la cual y según los resultados obtenidos en viveros, es considerablemente baja. De esta manera, se podría desarrollar un programa de recuperación ortodoxo basado en un banco de semillas variable y viable.

Sambucus palmensis

Se identificaron los genotipos de los ejemplares de *Sambucus palmensis* del Parque Nacional de Garajonay, encontrándose, por un lado, la existencia de un relevante número de individuos, con una combinación genotípica singular y única. Estos individuos deben ser el primer objetivo en la recuperación de la especie, y, por tanto deben recogerse semillas de los mismos ya que presentan genotipos que no se repiten en otros ejemplares. Finalmente, se filtraron aquellos con mayor número de alelos privados y H-ind (heterocigosidad individual, promedio de marcadores heterocigóticos por individuo) mayor a 0,500, para detectar los individuos más variables.

Con todo ello, se procedió a realizar un listado de priorización de ejemplares con estas

características, para la creación de un vivero que actúe como pool genético de esta especie en La Gomera (Tabla 7). Este listado con 25 genotipos, alberga el 100% de todos los alelos encontrados en la Isla, mediante los marcadores moleculares empleados. De esta forma, se incluye en las medidas de conservación y gestión a llevar a cabo por el Parque Nacional de Garajonay, y que constituía el objetivo principal del proyecto con respecto a esta especie. El aumento de individuos singulares, la conservación de alelos exclusivos y la recuperación de alelos que, siendo singulares, se encuentren en baja frecuencia son aspectos básicos en la realización de los futuros programas de recuperación de esta especie en el Parque Nacional de Garajonay en La Gomera.

Tabla 7. Lista de ejemplares preferentes por área propuestos para la recuperación de *Sambucus palmensis* en La Gomera.

Área	Códigos Individuos <i>Sambucus palmensis</i>
Presa Las Rosas	794
Acebiños	732
Meriga	775
Ancón de Candelaria	677
Meseta Vallehermoso	578, 590
El Rejo	876, 885, 890, 912, 935
Liria	554, 802, 805, 806, 809, 811, 813, 817, 823, 824, 827, 832, 835, 837

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Ángel Fernández, Cito China y Ángel García del Parque Nacional de Garajonay, Eduardo Carqué, Manuel Marrero, José Luis Martín Esquivel y Manuel Suárez del Parque Nacional del Teide por la ayuda en la recogida de muestras. A Claudio Moreno de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por su ayuda en la recogida de muestras y en las fotografías realizadas. A todos los integrantes del proyecto VULTEIDE, por una grata colaboración e indudable ayuda durante

todo el proyecto, especialmente a Jaime Seguí, Marta López y Benito Pérez por las intensas horas de campo. A Alejandro Lorenzo del Cabildo de La Palma, por la georreferenciación centimétrica de los individuos de *Viola cheiranthifolia* en el Refugio del Teide con una Estación Total Trimble. Finalmente, a Thomas Marcussen, por sus valiosos comentarios sobre la poliploidía de las violetas. Este proyecto forma parte de la tesis doctoral de Priscila Rodríguez, cuya beca ha sido financiada por la Agencia Canaria de Investigación y Desarrollo con la referencia «TESIS20120004».

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF, F.W.; HOHENLOHE, P.A. y LUIKART, G. (2010): Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews* 11: 697-709.
- BAÑARES, A. (2002) (Coord.): *Biología de la conservación de plantas amenazadas*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente. 263 pp.
- BRENNAN, A. C.; BARKER, D.; HISCOCK, S. J. y ABBOTT, R. J. (2012): «Molecular Genetic and Quantitative Trait Divergence Associated with Recent Homoploid Hybrid Speciation: A Study of *Senecio squalidus* (Asteraceae)». *Heredity* 108. Nature Publishing Group: 87-95.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J. (2010a): General GST and θ inflation due to biased intra-population sampling, and its consequences for the conservation of the Canarian Flora. *Conservation Genetics* 11: 709-720.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J.; TYE, A.; CRAWFORD, D. J.; SANTOS-GUERRA, A.; SAKAI, A.; BEAVER, K.; LOBIN, W.; VINCENT FLORENS, F. B.; MOURA, M.; JARDIM, R.; GÓMES, I. y KUEFFER, C. (2010b): Conservation of oceanic island floras: Present and future global challenges. *Perspective in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12: 107-129.
- CLARK, L.V. y JASIENIUK, M. (2011): POLYSAT: An R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources* 11: 562-566.
- CLARKE, J. B. y TOBUTT, K. R. (2006): Development of Microsatellite Primers and Two Multiplex Polymerase Chain Reactions for the Common Elder (*Sambucus nigra*). *Molecular Ecology Notes* 6: 453-55.
- COLE, C.T. (2003): Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 34: 213-237.
- COMAI, L. (2005): The Advantages and Disadvantages of Being Polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6. Nature Publishing Group: 836-46.
- DEREDEC, A. y COURCHAMP, F. (2007): Importance of the Allele effect for reintroductions. *EcoScience* 14: 440-451.
- DÍAZ-PÉREZ, A.; SEQUEIRA, M.; SANTOS-GUERRA, A. y CATALÁN, P. (2008): Multiple Colonizations, In Situ Speciation, and Volcanism-Associated Stepping-Stone Dispersals Shaped the Phylogeography of the Macaronesian Red Fescues (*Festuca* L., Gramineae). *Systematic Biology* 57: 732-749.
- EARL, D.A. y VONHOLDT, B. M. (2012): STRUCTURE HARVESTER: A Website and Program for Visualizing STRUCTURE Output and Implementing the Evanno Method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S. y GOUDET, J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* 14: 2611-2620.
- EXCOFFIER, L. y LISCHER, H. E. (2010): Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10: 564-567.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D. y BRISCOE, D.A. (2002): *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A. y CAUJAPÉ-CASTELLS, J. (2014): Development and characterization of nuclear microsatellite markers for *Parolinia ornata* Webb (*Brassicaceae*), and cross-species amplification in all species described in the Canarian endemic genus *Parolinia*. *Conservation genetics resources*, 6: 705-706.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A.; SOSA, P.A.; RIVERO, E.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E. A. y NARANJO, A. (2009a): Molecular markers reveal no genetic differentiation between *Myrica rivas-martinezii* and *M. faya* (*Myricaceae*). *Annals of Botany* 103: 79-86.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A.; LEXER, M. F.; FAY, M. D.; LLEDÓ, M. L. y SOSA, P.A. (2009b): 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.
- JAKOBSSON, M. y ROSENBERG, N.A. (2007): CLUMPP: A Cluster Matching and Permutation Program for Dealing with Label Switching and Multimodality in Analysis of Population Structure. *Bioinformatics* 23: 1801-6.
- KALINOWSKI, S.T. (2005): HP-RARE 1.0: A Computer Program for Performing Rarefaction on Measures of Allelic Richness. *Molecular Ecology Notes* 5: 187-89.
- LANGELLA, O. (2002): POPULATIONS 1.2.28. Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). CNRS, France.

- MELONI, M.; REID, A.; CAUJAPÉ-CASTELLS, J.; SOTO, M.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, J. M. y CONTI, E. (2015): High genetic diversity and population structure in the endangered Canarian endemic *Ruta Oreojasme* (*Rutaceae*). *Genetica* 143: 571-80.
- MENGES, E. S. (2008): Restoration demography and genetics plants: when is a translocation successful? *Australian Journal of Botany* 56: 187-196.
- MORENO SAIZ, J. C.; LOZANO, F. D. y OLLERO, H. S. (2003): Recent progress in conservation of threatened Spanish vascular flora: a critical review. *Biological Conservation* 113: 419-431.
- MORENO, J. C. (Coord.) (2008): Lista Roja 2008 de la flora vascular española. Dirección General del Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente y medio Rural y Marino y Sociedad Española de la Biología de la Conservación de Plantas), Madrid 86 pp.
- NEI, M. y GOJOBORI, T. (1986): Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular biology and evolution* 3: 418-426.
- NOËL, F. S.; MAURICE, A.; MIGNOT, S.; GLÉMIN, D.; CARBONELL, F.; JUSTY, I.; GUYOT, I.; OLIVIERI y PETIT, C. (2010): Interaction of climate, demography and genetics: a ten-year study of *Brassica insularis*, a narrow endemic Mediterranean species. *Conservation Genetics* 11: 509-526.
- NORDENSTAM, B. (2006a): *Canariothamnus* B. Nord., a new genus of the Compositae-Senecioneae, endemic to the Canary Islands. *Compositae Newsletters* 44: 24-31.
- NORDENSTAM, B. (2006b): *Bethencourtia*. En: Greuter W, von Raab-Straube E (eds). *Notulae adfloram Euro-Mediterranean Pertinentes* 22. *Wildenowia* 36: 709.
- PIRY, S.; LUIKART, G. y CORNUET, J. M. (1999): BOTTLENECK: a program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. *Journal of Heredity* 90: 502-503.
- PEAKALL, P. E. y SMOUSE, R. S. (2012): GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M. y DONNELLY, P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- RAMBAUT, A. (2012): FigTree version 1.4.0. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; ALÍA, R. y GIL, L. (2004a): Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Molecular Ecology* 13: 2567-2577.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; SMOUSE, P. E.; GIL, L. y ALÍA, R. (2004b): Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Central Spain. *Forest Ecology and Management* 197: 245-255.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J.; NAVASCUÉS, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C. y GIL, L. (2009): Estimating gametic introgression rates in a risk assessment context: a case study with Scots pine relicts. *Heredity* 103: 385-393.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J. (2011): Wind pollination over mesoscale distances: an investigation with Scots pine. *New Phytologist* 190: 222-233.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, P.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M. A.; CULLEY, T. M.; CARQUÉ, E.; SOSA, P. A. (2015): Isolation and Characterization of 16 Microsatellite Loci in the Endemic *Viola cheiranthifolia* Humb. & Bonpl. (*Violaceae*) and Their Transferability to *Viola Palmensis* Web & Berthel. *Conservation Genetics Resources* 7: 455-458.
- ROUSSET, F. (2008): GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- SOSA, P. A.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E. A.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M. A. y PÉREZ DE PAZ, P. L. (2013): Contrasting patterns of genetic differentiation in Macaronesian lineages of *Ilex* (*Aquifoliaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 173: 258-268.
- SOSA, P. A.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M. A.; MORENO, C.; CLARKE, J. B. (2010): Conservation genetics of the endangered endemic *Sambucus palmensis* Link (*Sambucaceae*) from the Canary Islands. *Conservation Genetics* 11: 2357-2368.
- SOSA, P. A.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M. A.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E. A. y RIVERO, E. (2011): Genetic diversity of Canarian endemism revealed by microsatellites: knowledge after one decade of analysis. *International Conferences on Island Biodiversity. Present and Emerging Knowledge on the Evolution, Diversity and Conservation of the Canarian Flora*. Las Palmas de Gran Canaria. March 14th-18th. Las Palmas de Gran Canaria.

- TORÁNG, P.; EHLÉN, J. y ÅGREN, J. (2010): Linking environmental and demographic data to predict future population viability of a perennial herb. *Oecologia* 163: 99-109.
- VELÁZQUEZ BARRERA, M. E. y FERNÁNDEZ LÓPEZ, A. (2011): Programa de recuperación de especies amenazadas del Parque Nacional de Garajonay. Documento de Diagnóstico. Dirección Adjunta de Asuntos Medio Ambientales. Parque Nacional de Garajonay y TRAGSATEC. Informe inédito.
- WEIR, B. S. y COCKERHAM, C. C. (1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 1358-1370.