



Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012

EN BÚSQUEDA DE ÁREAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN SIERRA NEVADA: ANÁLISIS DE PLANTAS Y ABEJAS

PABLO VARGAS¹, CONCEPCIÓN ORNOSA², JOSE LUIS BLANCO-PASTOR¹,
DANIEL ROMERO², MARIO FERNÁNDEZ-MAZUECOS¹
Y MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ-GIRONÉS³

RESUMEN

El estudio de la biodiversidad por medio de la genética no solo sirve para obtener un conocimiento más preciso de la diversidad críptica según áreas geográficas sino también para poder señalar las poblaciones mejor preparadas para afrontar cambios climáticos y evolutivos. En el presente estudio se exponen los principales resultados de la localización de áreas ricas en biodiversidad genética dentro del Parque Nacional de Sierra Nevada, sobre la base del número de genotipos (haplotipos de los genomas del plasto y la mitocondria) y linajes de haplotipos. Las especies finalmente seleccionadas fueron tres plantas endémicas (*Chaenorhinum glareosum*, *Linaria glacialis* y *Linaria nevadensis*) y una abeja (*Apis mellifera*), que es un “superpolinizador” de la flora de Sierra Nevada. Además se elaboró un catálogo de las especies de abejas conocidas en la alta montaña nevadense. Finalmente detectamos dos áreas (macizos de El Caballo y Puntal Vacares-Pico Cuervo) que albergan más de la mitad de la variación genética de, al menos, dos de las cuatro especies analizadas. Este novedoso enfoque de localización del patrimonio genético de Sierra Nevada sirve además para priorizar áreas de conservación máxima (microrreservas) que se podrían crear dentro de cualquier parque nacional.

Palabras clave: abejas, *Apis*, *Antirrhinum*, biodiversidad, *Chaenorhinum*, *Linaria*, mitocondria, plasto, secuencias.

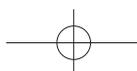
SUMMARY

The assessment of biodiversity based on genetics not only provides a precise knowledge of cryptic diversity from geographical areas, but also helps pinpoint the populations better fitted to cope with climatic and evolutionary changes. The present study shows the main results after searching for rich areas of biodiversity within the National Park of Sierra Nevada using number of genotypes (haplotypes from the plastid and mitochondria genomes) and lineages of haplotypes. Three endemic plant species (*Chaenorhinum glareosum*, *Linaria glacialis* and *Linaria nevadensis*) and a bee (*Apis mellifera*), which is a “superpollinator” of the flora of Sierra Nevada, were eventually chosen. In addition, we built up a check-

¹ Real Jardín Botánico de Madrid (RJB-CSIC), 28014 Madrid, España.

² Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

³ Estación Experimental de Zonas Áridas, EEZA-CSIC, La Cañada de San Urbano, 04120 Almería, España.





VARGAS, P. Y COLS. «En búsqueda de áreas de diversidad genética en Sierra Nevada: análisis de plantas y abejas»

list of species of bees occurring in high altitudes. Two main areas (El Caballo and Puntal Vacares-Pico Cuervo massifs) harbour more than half of the genetic variation observed based, at least, on two of the four species analysed. This new approach to locate genetic diversity across Sierra Nevada help prioritize areas of special conservation that are suggested to be created in any national park.

Key words: *Apis*, *Antirrhinum*, bees, biodiversity, *Chaenorhinum*, *Linaria*, mitochondria, plast, sequences.

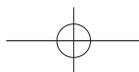
INTRODUCCIÓN

Cualquier profesional en biología que asciende a las cotas superiores del Parque Nacional de Sierra Nevada (PNSN) se da cuenta de que desaparecen los bosques, e incluso los arbustos, y de que la vegetación pasa a estar compuesta por un bajo número de especies herbáceas, que incluso aparecen en menor número que en cotas más bajas (BLANCA *et al.*, 2009). Lo mismo ocurre con la diversidad en el número de especies de animales. En estas cotas elevadas también el número de hábitats se reduce, todo ello como consecuencia del efecto del descenso de las temperaturas en la biodiversidad. Si exceptuamos las zonas ecotónicas, donde las pedreras y roquedos se encuentran con sistemas lacustres y fluviales, es difícil distinguir zonas ricas y pobres, y por tanto predecir en qué áreas de alta montaña se encuentra una mayor diversidad.

El concepto de biodiversidad debe reflejar la variedad de seres vivos de un área y los patrones bióticos que la conforman. Una primera y rápida evaluación de la biodiversidad de un área consiste en contar el número de especies. Pero la biodiversidad es mucho más compleja que el número de especies (diversidad taxonómica) y su abundancia, pues también debe incluir una diversidad más críptica (GIBSON & DWORKIN, 2004). Nos referimos a la diversidad genética, que no solo sirve para obtener un nivel más preciso de diversidad por áreas sino también para señalar las poblaciones mejor preparadas para afrontar cambios climáticos y evolutivos. A mayor diversidad genética mayor probabilidad de sobrevivir a cambios en el ambiente. Por tanto, las poblaciones con poca di-

versidad genética tienen mayor riesgo y una respuesta probabilísticamente más inadecuada ante los impredecibles cambios ambientales.

En este estudio se eligió uno de los grupos de plantas que tienen una asociación más estrecha con la polinización por abejas. Las especies de bocas de dragón (*Antirrhinum*) y parientes próximos (tribu Antirrhineae, Plantaginaceae) tienen una corola ocluida (flor personada) constituida por dos partes (labios): una de tres pétalos inferiores transformados en una estructura (paladar) que se cierra con el labio superior de dos pétalos. Las abejas tienen la habilidad y fuerza para abrir esta corola hermética para otros polinizadores, recoger y diseminar el polen. Para obtener resultados que caractericen mejor Sierra Nevada, elegimos las especies endémicas de esta tribu taxonómica de manera que todos los procesos de diferenciación se hayan producido en el PNSN y alrededores. Sin embargo, no hay consenso taxonómico para todas ellas, especialmente para *Antirrhinum rupestre* Boiss. & Reut., *Linaria nevadensis* (Boiss.) Boiss. & Reut., *Linaria verticillata* Boiss. y *Linaria saturejoides* Boiss. subsp. *angustifolia* (Wilmott) L. Sáez & M. B. Crespo. Por ello, empleamos métodos filogenéticos, basados en las mismas regiones de DNA que las usadas en el estudio de diversidad genética, para determinar grupos monofiléticos dentro de los géneros *Antirrhinum*, *Chaenorhinum* y *Linaria*. Así pudimos tomar decisiones propias sobre la sistemática de la especie y selección final de las mismas sobre la base de patrones evolutivos. En concreto, las especies elegidas nos sirven para valorar los siguientes aspectos en la conservación y gestión del PNSN: (1) utilidad de las técnicas de *barcoding* para detectar diversidad genética



Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012

en extensiones geográficamente pequeñas; (2) estructuración de la diversidad genética en áreas de montaña; (3) localización de lugares y áreas de mayor y menor riqueza genética; (4) priorización en la conservación de poblaciones y especies indicadoras; y (5) priorización en la conservación de poblaciones que favorecen la cohesión entre organismos (interacciones planta-animal).

El objetivo principal de este estudio ha sido obtener resultados fundamentales sobre la biodiversidad del PNSN por medio del listado del número de insectos polinizadores (abejas) en un gradiente que incluye los picos, collados y laderas donde viven ciertas especies de angiospermas (especies de boca de dragón, Antirrhineae, Plantaginaceae) con las que interactúan (diversidad funcional). El siguiente paso en la búsqueda de biodiversidad fue analizar la diversidad de genes indicadores (diversidad genética) tanto de las plantas como de las abejas polinizadoras. Finalmente los objetivos reevaluados fueron: (1) describir la riqueza de insectos (abejas) polinizadores en cuatro especies de Antirrhineae (*Antirrhinum rupestre*, *Chaenorhinum glareosum*, *Linaria glacialis* y *Linaria nevadensis*); (2) analizar la diversidad genética de las cuatro especies de Antirrhineae; (3) analizar la diversidad genética de las abejas polinizadoras; y (4) localizar las áreas de Sierra Nevada con mayor diversidad genética de plantas y abejas para proponer lugares específicos para su conservación (microrreservas).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Durante los veranos de 2009-2012 se visitaron los lugares donde estaban citadas poblaciones de las cuatro especies evaluadas de angiospermas: *Antirrhinum rupestre* (piso de vegetación supramediterráneo), *Linaria nevadensis* (piso de vegetación oromediterráneo), *Linaria glacialis* (piso de vegetación crioromediterráneo) y *Chaenorhinum glareosum* (piso de vegetación crioromediterráneo) (Lámina 1). Es decir, se muestreó

una franja altitudinal desde 1.000 m hasta las cimas de los macizos por encima de 2.700 m (piso crioromediterráneo) (Anexo 1). Otras especies de Antirrhineae fueron finalmente descartadas (véanse criterios más adelante).

Además en estas campañas de toma de material y datos se realizaron censos de polinización de las cuatro plantas sujetos de estudio cuando las condiciones son ideales para la observación de abejas (sin viento, sin lluvia, temperatura > 20 °C). Se muestreó un total de 19 localidades para la recolección de tejido vegetal y la observación de polinizadores (véase Anexo 1).

Fauna polinizadora de Sierra Nevada

Las dudas acerca de la validez taxonómica de algunas especies de Antirrhineae (véanse más adelante) y el hecho de que el número de especies de abejas visitando las especies de alta montaña de Antirrhineae haya sido muy bajo (una sola especie de abeja en *Linaria nevadensis*), nos condujo a cambiar de estrategia respecto a lo inicialmente proyectado. Asimismo el número de especies de abejas visitando otras especies de flora por encima de 3.000 m fue muy escaso durante los años de estudio. Dado que

Anexo 1. Códigos empleados para numerar las localidades y poblaciones muestreadas en el presente estudio (Figuras 1-5).

L. glacialis: 1, Veleta NW; 2, Veleta SW; 3, Mulhacén; 4, Cerro de los Machos; 5, Tozal del Cartujo; 6, El Caballo; 7, Puntal de los Cuartos; 8, Cerro San Juan; 9, Pico del cuervo / Puntal de Vacares; 10, Pico del Globo. **Linaria nevadensis:** 1, Veleta NW; 3, Mulhacén; 5, Tozal del Cartujo; 6, El Caballo; 11, Pico del Cuervo; 12, Puntal de Vacares; 13, Puntal de Trévez; 18, Laguna Hondera; 19, Acucaderos; 20, Hoya de la Mora; 21, Morrón Sanjuanero; 22, Pradollano; 23, Puntal de los Cuartos; 24, San Juan. **Chaenorhinum glareosum:** 1, Veleta; 3, Mulhacén; 5, Tozal del Cartujo; 6, El Caballo; 8, Cerro San Juan; 11, Pico del Cuervo; 12, Puntal de Vacares; 13, Puntal de Trévez; 14, Portal; 15, Culo Perro; 16, Pico Mulhacén. **Antirrhinum rupestre** (*A. hispanicum*): 25, Barranco de las viboras; 26, Pradollano; 27, Abrucena; 28, Trevenque; 29, Güejar-Sierra. **Apis mellifera iberiensis:** 1, Veleta; 3, Mulhacén; 6, El Caballo; 9, Pico del cuervo / Puntal de Vacares; 17, Tajos del Goterón; 18, Laguna Hondera.

VARGAS, P. Y COLS. «En búsqueda de áreas de diversidad genética en Sierra Nevada: análisis de plantas y abejas»

algunas especies de plantas dejaban de ser incluidas en el estudio por falta de lógica evolutiva y validez sistemática, incluimos dos nuevos objetivos: (i) compilar un catálogo de las abejas observadas visitando la flora de Sierra Nevada, y (ii) realizar los estudios de diversidad genética (secuenciación) en las tres especies de abejas más frecuentes en alta montaña. Consideramos que este reenfoque podría ayudar a una mejor gestión de la fauna polinizadora del PNSN.

Estudios piloto de las plantas endémicas de Sierra Nevada

Como quiera que la divergencia genética en animales y plantas suele estar asociada a la distancia geográfica, inicialmente se realizaron estudios piloto de diversidad genética basados en un muestreo geográficamente representativo. Así, se seleccionaron cuatro poblaciones (una muestra por población) geográficamente alejadas entre sí para comprobar dos aspectos fundamentales: (i) si las especies forman grupos monofiléticos, i. e. si tienen un solo origen y la diversidad genética se ha generado únicamente en Sierra Nevada, y (ii) si las regiones de DNA elegidas a partir de técnicas de *barcoding* (véase más abajo) son suficientemente variables. Posteriormente se amplió el muestro a un número mayor de individuos y poblaciones que representó la distribución de las especies.

Técnicas de DNA *barcoding* para localizar áreas de diversidad

El DNA *barcoding* es una herramienta taxonómica en la que se usa la mínima caracterización de DNA que permita identificar una determinada especie y que a la vez la separe de las más próximas. Además, son regiones del genoma que han resultado ser de gran valor evolutivo, ya que proporcionan una señal filogenética de confianza en numerosas familias y géneros de angiospermas. En este estudio se han empleado varias regiones de DNA universalmente proba-

das en plantas y animales, de manera que definan cada especie sujeto de estudio y que además proporcionen suficiente diversidad genética para caracterizar sus poblaciones. Los estudios piloto de las especies de Antirrhineae incluyeron 10-20 regiones del DNA plastidial. Finalmente se seleccionaron y secuenciaron diferentes regiones espaciadoras dependiendo de la variabilidad encontrada en cada especie: *rpl32-trnL^{UAG}*, *trnS-trnG*, *trnQ-rps16* y *rps16-trnK* (VARGAS *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-MAZUECOS & VARGAS, 2011; BLANCO-PASTOR *et al.*, 2012). Para el caso de las abejas, las regiones de DNA están mejor establecidas debido a su comprobada utilidad, por lo que ensayamos directamente una de las más variables, i. e. el espaciador mitocondrial COI-COII (CORNUET *et al.*, 1991; FRANCK *et al.*, 1998; RORTAIS *et al.*, 2011).

Análisis genéticos

Para estimar la diversidad genética de plantas y abejas, se obtuvieron resultados según la diversidad de genotipos y de linajes de estos genotipos. Las regiones utilizadas pertenecen a los genomas organulares (plasto y mitocondria), que están formados por una única molécula no recombinante, por lo que el estudio se basó en el número de genotipos haploides (haplotipos). Para que el estudio dispusiera de diversidad genética sustancial, la comparación entre secuencias de las regiones estudiadas debería mostrar varios cambios nucleotídicos (no se emplean inserciones/delecciones debido a su conocida homoplasia) dentro de cada especie. Es decir, se analizaron secuencias de decenas de individuos (una por individuo) que difirieran (y no) en cambios nucleotídicos a lo largo de la región secuenciada. Una vez obtenidos un buen número de haplotipos por especie (> 10) se analizó su distribución geográfica en Sierra Nevada. Para valorar la repartición de la diversidad genética de cada especie en Sierra Nevada, se analizó el número de haplotipos y el número de linajes de haplotipos (relaciones de haplotipos por parentesco) de cada población.

RESULTADOS

Polinizadores de las especies de Antirrhineae

Un total de 12 especies de abejas fueron encontradas accediendo a las flores de las especies de Antirrhineae seleccionadas (Tabla 1). Información filogenética de la tribu Antirrhineae procedente de análisis que estamos llevando a cabo en paralelo en la tribu Antirrhineae desaconsejó, al poco tiempo de empezar el presente estudio, incluir ciertas subespecies subendémicas, que además tenían escaso valor taxonómico, debido a que estos táxones no forman grupos monofiléticos. Por ello realizamos censos de polinizadores en *Antirrhinum rupestre*, *Chaenorhinum glareosum*, *Linaria glacialis* y *Linaria nevadensis*. Como se preveía inicialmente (VARGAS *et al.*, 2010), prácticamente solo especies de abejas entraron en las flores de las especies de Antirrhineae (Tabla 1). Además, una polilla (*Macroglossum stellatarum*, Sphingidae), fue observada en dos especies de Antirrhineae.

Antirrhinum rupestre Boiss. & Reut

Se realizaron censos de polinizadores de esta especie en tres poblaciones empleadas para el estudio de diversidad genética (Barranco de las Víboras, Trevenque y Güéjar-Sierra). En la población de Barranco de las Víboras el censo se realizó sobre un parche de 50 flores (promedio) durante 660 minutos. Las abejas que visitaron legítimamente las flores fueron: *Anthophora crassipes* (4 visitas), *Lasioglossum interruptum* (2), *Chalicodoma pyrenaica* (1), *Bombus terrestris* (1) y *Anthophora mucida* (1). También se observó la visita del lepidóptero *Macroglossum stellatarum* (1). En la población del Trevenque el censo se realizó sobre un parche de cerca de 40 flores (promedio) durante 465 minutos. Las abejas que visitaron legítimamente las flores fueron: *Anthophora crassipes* (18 visitas), *Lasioglossum buccale* (12), *Chalicodoma pyrenaica* (11) y *Rhodanthidium sticticum* (5). En la población de Güéjar-Sierra el censo se realizó sobre un parche de 35 flores (promedio) durante 310 minutos. Las abejas que visitaron legítimamente las flores fue-

Especies de plantas	nº. minutos	Especies de abejas	Especies de Lepidópteros
<i>Antirrhinum rupestre</i> Boiss. & Reut.	1435	<i>Anthidium manicatum</i> (Linnaeus, 1758) <i>Anthidium oblongatum</i> (Illiger, 1806) <i>Anthophora crassipes</i> Lepeletier, 1841 <i>Anthophora mucida</i> Gribodo, 1873 <i>Bombus terrestris</i> (Linnaeus, 1758) <i>Chalicodoma pyrenaica</i> Lepeletier, 1841 <i>Lasioglossum interruptum</i> (Panzer, 1798) <i>Lasioglossum buccale</i> (Pérez, 1903) <i>Rhodanthidium sticticum</i> (Fabricius, 1787) <i>Osmia</i> sp. Panzer, 1806	<i>Macroglossum stellatarum</i> Linnaeus, 1758
<i>Chaenorhinum glareosum</i> (Boiss.) Willk	c. 1000	<i>Bombus terrestris</i> (Linnaeus, 1758) <i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758	<i>Macroglossum stellatarum</i> Linnaeus, 1758
<i>Linaria glacialis</i> Boiss.	c. 2000	-	-
<i>Linaria nevadensis</i> Boiss. & Reuter	1360	<i>Chalicodoma parietina</i> (Geoffroy, 1785) <i>Bombus terrestris</i> (Linnaeus, 1758)	-

Tabla 1. Número de visitas resultantes de los censos de polinizadores de las especies de Antirrhineae.

Table 1. Number of visits observed on Antirrhineae species in the pollination censuses.

VARGAS, P. Y COLS. «En búsqueda de áreas de diversidad genética en Sierra Nevada: análisis de plantas y abejas»

ron: *Chalicodoma pyrenaica* (30 visitas), *Bombus terrestris* (12), *Anthidium manicatum* (4), *Lasioglossum buccale* (3), *Osmia* sp. (2) y *Anthidium oblongatum* (2).

Chaenorhinum glareosum (Boiss.) Willk

Se realizaron censos de esta especie en tres poblaciones (La Carihuela, Veleta y Pico Veleta-Pico del Cuervo). En la población de La Carihuela se realizó un censo durante 90 minutos. La única abeja que visitó legítimamente las flores fue *Bombus terrestris* (1 visita). También se observó la visita del lepidóptero *Macroglossum stellatarum* (6 visitas). Fuera del censo se observó *Apis mellifera* en una flor. En la población del Veleta se realizó un censo durante 90 minutos. La abeja que visitó legítimamente las flores fue *Bombus terrestris* (3 visitas). También se observó la visita del lepidóptero *Macroglossum stellatarum* en otras de sus flores fuera del censo. En el transecto del Pico Veleta-Pico del Cuervo (4 días) solo se observó *Macroglossum stellatarum* accediendo a las flores de esta planta.

Linaria glacialis Boiss

Esta especie no presenta ni un número elevado de individuos por m² (normalmente 1-8) ni de flores por individuo (normalmente 1-4 en flor a la vez), por lo que ningún parche proporcionó un número elevado de flores. Se realizaron censos de esta especie en cinco poblaciones (La Carihuela, Lavaderos de la Reina, Veleta, Cerro de los Machos, Tozal del Cartujo). En la población de La Carihuela se realizó un censo durante 90 minutos pero no se observó ninguna visita. El mismo resultado se obtuvo en un censo de 90 minutos en los Lavaderos de la Reina, en otro censo de 360 minutos en el Veleta, en otro censo de 240 minutos en el Cerro de los Machos y en un transecto de 60 minutos en el Tozal del Cartujo. Otros transectos con resultados negativos se realizaron en el Puntal de Vacares (120 minutos) y el Mulhacén (240 minutos).

Linaria nevadensis (Boiss.) Boiss & Reut

Se realizaron censos y transectos para esta especie en cinco poblaciones (Hoya de la Mora,

Laguna Hondera, Tajos del Goterón, Laguna de Vacares y Borreguiles). En la población de la Hoya de la Mora se realizó un censo sobre un parche de 70 flores (promedio) durante 270 minutos. Las abejas que visitaron legítimamente las flores fueron: *Chalicodoma parietina* (9 visitas) y *Bombus terrestris* (2). En la población de la Laguna Hondera se realizó un transecto durante 60 minutos. La única abeja que visitó legítimamente las flores fue *Chalicodoma parietina* (5 visitas). En la población de los Acucaderos se realizó un transecto durante 600 minutos. La única abeja que visitó legítimamente las flores fue *Chalicodoma parietina* (12 visitas). En la población de la Laguna de Vacares se realizó un transecto durante 30 minutos. La única abeja que visitó legítimamente las flores fue *Chalicodoma parietina* (1 visita). En la población de los Borreguiles se realizó un censo durante 460 minutos. La única abeja que visitó legítimamente las flores fue *Chalicodoma parietina* (170 visitas). Otros transectos con resultados negativos se realizaron en el Caballo (2 horas) y Pico del Cuervo (7 horas). En esta última localidad fue observada *Chalicodoma parietina* en flores de otras especies de angiospermas.

Especies de abejas en zonas altas de Sierra Nevada

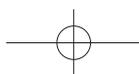
En la Tabla 2 se muestran las abejas observadas en cotas medias y altas de Sierra Nevada. Además de las especies capturadas por nosotros en esa tabla se incluyen aquellas recogidas en la literatura. Aunque se hayan observado un total de 44 especies de abejas en zonas altas, dos (*Bombus terrestris* y *Apis mellifera*) han resultado ser "superpolinizadores", es decir polinizadores de la mayor parte de la flora alpina de Sierra Nevada. Una más (*Chalicodoma parietina*) se ve más esporádicamente, si bien es el polinizador principal de una de las especies de Antirrhineae (*Linaria nevadensis*). A continuación resumimos características básicas de esta especie de abeja y de los dos "superpolinizadores" de la flora de Sierra Nevada (Lámina 1).

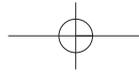


Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012

Especies de abejas	Localidad, altitud y referencias	Número de individuos recolectados
<i>Andrena afrensis</i> Warncke, 1967	2.160 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Andrena carbonaria</i> (Fabricius, 1781)	2.160 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Andrena nigroaenea</i> (Kirby, 1802)	2.160 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Andrena niveata</i> Friese, 1887	2.160 - 3.130 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Andrena ovatula</i> (Kirby, 1802)	2.160 - 2.550 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Andrena similis</i> Smith, 1849	2.160 - 3.130 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Anthidium manicatum</i> (Linnaeus, 1758)	Güéjar-Sierra y Barranco de las Víboras, 1100-1500 m (JLB) (este trabajo)	1
<i>Anthidium montanum</i> Morawitz, 1864	Citado para "Sierra Nevada" (Ebmer 2003)	-
<i>Anthidium oblongatum</i> (Illiger, 1806)	Güéjar-Sierra, c. 1500 m (JLB) (este trabajo)	1
<i>Anthophora crassipes</i> Lapeletier, 1841	Barranco de las Víboras y Trevenque, c. 1500 m (CO, JLB y PV) (este trabajo)	18
<i>Anthophora furcata</i> (Panzer, 1798)	Pradollano, 2.040 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Anthophora mucida</i> Gribodo, 1873	Barranco de las Víboras, 1500 m (PV) (este trabajo)	1
<i>Apis mellifera iberiensis</i> Engel, 1999	2.500-3.400 m (CO, JLB y PV) (este trabajo)	56
<i>Bombus maxillosus</i> Klug, 1817	Puerto de la Ragua, 2.270 m (PV) (este trabajo)	2
<i>Bombus pascuorum bofilli</i> Vogt 1911	Caballo, 2.320 m (76PV11) (este trabajo)	2
<i>Bombus pratorum</i> (Linnaeus, 1761)	Veleta, 3.300 m (66PV11) (este trabajo)	1
<i>Bombus reinigiellus</i> (Rasmont, 1983)	1.900-3.255 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Bombus ruderatus rondensis</i> Castro, 1991	800-1.650 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Bombus ruderatus ruderatus</i> (Fabricius, 1775)	Caballo 2.320 m (75PV11a y b), 2.800 m (78PV11a) (este trabajo)	3
<i>Bombus terrestris lusitanicus</i> Krüger, 1956	Hasta 3.400 m (CO, JLB y PV) (este trabajo)	32
<i>Bombus terrestris terrestris</i> (Linnaeus, 1758)	Normalmente hasta 2.200 m (CO, JLB y PV) (este trabajo)	6
<i>Ceratina cucurbitina</i> (Rossi, 1792)	Güéjar-Sierra, 1.200 m (JLB) (este trabajo)	1
<i>Chalicodoma albonotata</i> (Radoszkowski, 1886)	Pradollano, 2.200 m (JLB) (este trabajo)	2
<i>Chalicodoma parietina</i> (Geoffroy, 1785)	2.100-3.400 m (CO, JLB y PV) (este trabajo; véase también Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> , en prensa)	32
<i>Chalicodoma pyrenaica</i> Lapeletier, 1841	Barranco de las Víboras, Güéjar-Sierra y Trevenque, 1.100-1800 m (CO, JLB y PV) (este trabajo)	14
<i>Colletes carinatus</i> Radoszkowski, 1891	Borreguiles del río, Monachil, 2.700 m (Ortiz-Sánchez, Ormosa <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Colletes floralis</i> Eversmann, 1852	2.800-2.900 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Colletes nigricans</i> Gistel, 1857	2.550 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Colletes schmidi</i> Noskiewicz, 1962	1.200-3.000 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Dasypoda albimana</i> Pérez, 1905	Fuente de Don Manuel, Monachil, 2.100 m (Ortiz-Sánchez, Ormosa <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Dasypoda morotei</i> (Quilis, 1928)	Veleta, 3.200 m (CO) (este trabajo)	1
<i>Dufourea paradoxa nivalis</i> Ebmer, 1989	2.700-3.100 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Flavipanurgus granadensis</i> (Warncke, 1987)	1.300-1.430 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-

(continúa)





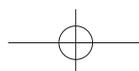
VARGAS, P. Y COLS. «En búsqueda de áreas de diversidad genética en Sierra Nevada: análisis de plantas y abejas»

(continuación)

Especies de abejas	Localidad, altitud y referencias	Número de individuos recolectados
<i>Halictus nivalis</i> Ebmer, 1985	2.500–3.100 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Hoplitis claviventris columba</i> (Warncke, 1991)	Puerto de la Ragua, 1.700 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Hoplitis mitis granadae</i> Tkalc, 1984	2.500–2.600 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Hoplitis ochraceicornis</i> (Ferton, 1902)	Citado para “Sierra Nevada”, 1.400 m (Warncke, 1992)	-
<i>Hoplitis praestans</i> (Morawitz, 1893)	Collado de Las Sabinas, 2.170 m (JLB) (este trabajo)	2
<i>Hoplitis ravouxi</i> (Pérez, 1902)	Pico Veleta, 2.850 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Hylaeus euryscapus</i> Förster, 1871	2.550 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Lasioglossum buccale</i> (Pérez, 1903)	Güéjar-Sierra y Trevenque, 1.100-500 m (CO, JLB y PV) (este trabajo)	6
<i>Lasioglossum interruptum</i> (Panzer, 1798)	Barranco de las Vifloras, 1500 m (PV) (este trabajo)	1
<i>Lasioglossum leucozonium elysium</i> Ebmer, 1979	Puerto de la Ragua, 2.000 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Lasioglossum malachurum</i> (Kirby, 1802)	2.550 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Lasioglossum mediterraneum</i> (Blüthgen, 1926)	2.160 - 3.130 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Lasioglossum pauperatum</i> (Brullé, 1832)	Veleta, 2.800 m (82JLB09) (este trabajo)	1
<i>Lasioglossum soror</i> (Saudners, 1901)	2.160 m (Gómez & Zamora 1999)	-
<i>Megachile analis</i> Nylander, 1852	2.500–3.100 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Megachile lagopoda</i> (Linnaeus, 1761)	Más de 2.000 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Megachile maritima</i> (Kirby, 1802)	Distintas localidades, orófilo (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Melitta iberica</i> Warncke, 1973	Hasta 2.400 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Osmia cyanoxantha</i> Pérez, 1879	Citado para “Sierra Nevada”, 2.250 m (Zanden 1991)	-
<i>Osmia emarginata</i> Lepeletier, 1841	carretera al Veleta, Parking Los Peñones, 2.100 m (JLB) (este trabajo)	1
<i>Osmia gallarum</i> Spinola, 1808	Collado de Las Sabinas, 2.170 m (JLB) (este trabajo)	1
<i>Osmia labialis</i> Pérez, 1879	Barranco de San Juan, 2.600 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Osmia parietina</i> Curtis, 1928	Collado de Las Sabinas, 2.170 m (JLB) (este trabajo)	1
<i>Osmia saxicola</i> Duce, 1899	Veleta, 2.880 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Osmia viridana</i> Morawitz, 1874	Citado para “Sierra Nevada”, 2.250 m (Warncke 1991)	-
<i>Protosmia stigmatica</i> (Pérez, 1895)	Puerto de la Ragua, 1.800 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Psithyrus vestalis obenbergeri</i> May, 1944	Hasta 2.600 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Rhodanthidium sticticum</i> (Fabricius, 1787)	Trevenque, c. 1500 m (JLB) (este trabajo)	1
<i>Stelis breviscula</i> Nylander, 1848	Puerto de la Ragua, 2.000 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Stelis minuta</i> Lepeletier & Serville, 1825	Cita antigua “VII-16-21” de “Sierra Nevada” (Ornosa <i>et al.</i> 2009)	-
<i>Stelis punctulatissima</i> (Kirby, 1802)	Pradollano, 2.040 m (Ortiz-Sánchez <i>et al.</i> en prensa)	-
<i>Xylocopa violacea</i> (Linnaeus, 1758)	Veleta, 2.708 m (CO) (este trabajo)	2

Tabla 2. Catálogo de las abejas de Sierra Nevada. En negrita los polinizadores principales (“superpolinizadores”) de la flora de alta montaña de Sierra Nevada. Se indican las especies por orden alfabético, las altitudes y códigos de captura, número de individuos y referencias bibliográficas. Abreviaturas de recolectores: CO, Concepción Ornosa; JLB, José Luis Blanco-Pastor; PV, Pablo Vargas.

Table 2. Check-list of bee species from Sierra Nevada. In black main pollinators for the alpine flora of Sierra Nevada. Species names, locations, altitude, collecting codes, number of individuals and bibliographic references are indicated. Collector abbreviations: CO, Concepción Ornosa; JLB, José Luis Blanco-Pastor; PV, Pablo Vargas.



Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012

Lámina 1. Especies clave del presente estudio. A, *Antirrhinum rupestre*; B, *Chaenorhinum glareosum*; C, *Linaria glacialis*; D, *Linaria nevadensis*; E, *Bombus terrestris lusitanicus*; F, *Bombus terrestris terrestris*; G, *Apis mellifera iberiensis*; H, *Chalicodoma parietina*. Fotografías Pablo Vargas y José Luis Blanco-Pastor.



Bombus terrestris (Linnaeus, 1758)

Abejorro paleártico de hábitos sociales, nidificación subterránea y especie polinizadora por excelencia de montañas y zonas frías, pero también distribuida en zonas bajas. Ha sido introducida en gran parte del planeta, incluidos territorios tan lejanos como los americanos del norte (EEUU) y del sur (Brasil y Chile) o Japón, Tasmania y Nueva Zelanda. En Sierra Nevada están representadas las dos subespecies ibéricas: *Bombus terrestris terrestris* y *Bombus terrestris lusitanicus*, si bien la subespecie *lusitanicus* es predominante (32 de 38 ejemplares capturados). No es infrecuente, de cualquier modo, hallar formas híbridas. *Bombus terrestris lusitanicus* presenta la clásica coloración a bandas amarillas, negras y blanca en que

el color negro tiende a ser sustituido por un tono pardo herrumbroso, muy patente ventralmente y en las patas (Lámina 1). Esta subespecie se reparte por la Península Ibérica y las islas Baleares, Madeira y penetra en el sur de Francia (ORNOSA & ORTIZ-SÁNCHEZ, 2004). En cuanto a su distribución altitudinal, lo más frecuente es hallarla por debajo de 3.000 m; sin embargo en Sierra Nevada la hemos capturado hasta los 3.400 m. *Bombus terrestris terrestris* se caracteriza por una coloración a bandas amarillas, negras y blanca, sin coloración parda herrumbrosa. Su dispersión natural es paleártica occidental, penetrando por el norte en la Península Ibérica (cuadrante nororiental) y alcanzando hasta los 2.200 m de altitud. La introducción de esta subespecie en cultivos de invernadero en el sur y en el levante ibéricos ha favorecido más ampliamente su dispersión peninsular. Su hallazgo en Sierra Nevada no es sorprendente, aunque sí la altitud (hasta 3.400 m) a la que hemos encontrado algunos ejemplares.

Intentamos sin éxito secuenciar la región COI-COII en el estudio piloto. No obstante, un estudio previo indicó una bajísima diversidad (tres haplotipos) de esta especie en Europa (ESTOUP *et al.* 1996). Ello nos hizo desistir en la búsqueda de diversidad genética.

Apis mellifera Linnaeus, 1758

La abeja de la miel está presente en Sierra Nevada desde tiempos muy remotos tanto de forma natural como introducida. Su manejo ha sido hasta nuestros días muy intenso en las zonas bajas de Sierra Nevada, si bien no hay colmenas registradas en el PNSN. No obstante, los hábitos de desplazamientos diarios en altitud no nos permiten distinguir si los 56 ejemplares capturados son silvestres o pertenecen a colmenas, incluso en el caso de los ejemplares capturados por encima de 3.200 m. Los caracteres morfológicos de todos los ejemplares nos conducen a reconocer únicamente la subespecie *iberiensis* en el PNSN. En concreto, nos estamos refiriendo principalmente a las siguientes características: pubescencia poco abundante, corta y en tono pardo y el aspecto oscuro de la cutícula; terguitos con rasgos característicos como la presencia en el se-

VARGAS, P. Y COLS. «En búsqueda de áreas de diversidad genética en Sierra Nevada: análisis de plantas y abejas»

gundo terguito gastral de una banda amarillenta proximal, aunque de tamaño variable que va desde solo dos manchas laterales hasta llegar a cubrir la totalidad del terguito.

Por otra parte, se trata de un taxon endémico ibérico (ORNOSA & ORTIZ-SÁNCHEZ, 2004), si bien todavía no se ha encontrado su identidad filogenética (monofilia) (FRANCK *et al.*, 1998; HAN *et al.*, 2012). La región mitocondrial COI-COII fue amplificada satisfactoriamente, a pesar de no haber ningún estudio de diversidad genética de esta conocida especie empleando secuencias de esta región (aunque sí con RFLPs, CÁNOVAS *et al.*, 2007). Los resultados se muestran más adelante.

Chalicodoma parietina (Geoffroy, 1785)

Abeja totalmente negra (Lámina 1), de tamaño grande (c. 3 cm de largo), que pertenece a una de las familias mejor representadas en la Península Ibérica (Megachilidae). En Iberia se distribuye principalmente en Sierra Nevada (2.100-3.300 m), aunque se citó de zonas más bajas de Almería y Portugal (ORNOSA *et al.*, 2007; ORTIZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2012). La población nevadense de esta especie solitaria de abeja parece estar bien asentada, ya que hemos observado un número considerable de individuos en vuelo entre 2.500 y 3.400 m desde El Veleta hasta el Puntal de los Cuartos (no se observó en El Caballo).

Desgraciadamente no pudimos amplificar la región mitocondrial COI-COII. Ello no nos sorprende debido a que no se han conseguido hasta la fecha secuencias de esta región para esta familia a pesar de que comprende miles de especies. Tampoco conocemos ningún estudio de diversidad genética en una región geográfica (filogeografía) en el que se hayan empleado otras regiones de DNA. Ello nos hizo desistir en la inclusión de esta especie en el estudio genético.

Diversidad genética en la alta montaña nevadense

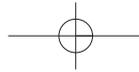
Finalmente se realizó y analizó un estudio genético extensivo de poblaciones de Sierra Nevada

de cinco especies, cuatro de Antirrhineae (*Antirrhinum rupestre*, *Chaenorhinum glareosum*, *Linaria glacialis* y *Linaria nevadensis*) y una especie de abeja (*Apis mellifera*).

Antirrhinum rupestre Boiss. & Reut. (*A. hispanicum* Chav.)

Se trata de una especie dudosa que se reconocía para la zona antes de iniciar el proyecto (MELLENDO *et al.*, 2003), pero durante la realización del presente estudio se desestimó su valor taxonómico. Para la Flora vascular de Andalucía oriental, BLANCA *et al.*, (2009) incluyeron esta especie como sinónimo de *A. hispanicum*, especie de una distribución mucho más amplia que las inmediaciones de Sierra Nevada. Un criterio taxonómico similar encontramos en la revisión más reciente del género *Antirrhinum* para la Península Ibérica (GÜEMES, 2009), donde también se sinonimizó a *A. hispanicum*. No obstante, algún otro investigador con experiencia en el género indica que esta especie no se ha estudiado bien y por tanto el actual tratamiento taxonómico es incorrecto (Fernández Casas, comunicación personal). Dados los tratamientos taxonómicos incongruentes, hicimos un esfuerzo en evaluar el valor sistemático de la especie basado en la filogenia al incluir muestras del PNSN en una matriz mayor publicada por nuestro equipo (VARGAS *et al.*, 2009).

Para el estudio de diversidad genética interpoblacional se analizaron 39 muestras (individuos) de cinco poblaciones para analizar los niveles de diversidad genética (Figura 1). Fue difícil encontrar localidades distantes dentro de los límites del PNSN (Figura 1). Se realizó un amplio estudio piloto de 20 regiones del DNA plastidial. Finalmente se seleccionaron y secuenciaron las dos regiones del plasto (*rpl32-trnL^{UAG}*, *trnS-trnG*) que dieron variabilidad y señal evolutiva máximas. Para comprobar el valor taxonómico de la especie, realizamos un análisis filogenético con dichas regiones plastidiales donde se obtuvieron tres linajes y se puso de manifiesto la falta de monofilia (resultados no mostrados). Por tanto, según estos resultados la especie perdería valor, ni siquiera como subendemismo de Sierra Nevada. Estos resultados



Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012



Figura 1. Distribución geográfica de los tres linajes (azul, verde y rojo) de *Antirrhinum rupestre* (considerado finalmente en *A. hispanicum*) y sus respectivos haplotipos. Obsérvese que hay dos poblaciones (no. 25, 29) con un haplotipo, una (no. 27) con dos haplotipos y otras dos con tres haplotipos (nos. 26, 28). Precisamente la única población (Trevenque, no. 28) dentro del PNSN es la que presenta máxima diversidad con tres haplotipos pertenecientes a dos linajes.

Figure 1. Geographical distribution of the three lineages (blue, green and red) and haplotypes of *Antirrhinum hispanicum* (circumscribed *A. hispanicum* eventually). Notice that two populations (no. 25, 29) have one haplotype, one (no. 27) has two haplotypes and two more have three haplotypes (nos. 26, 28). The only population (Trevenque, no. 28) within the National park has the highest diversity including three haplotypes of two lineages.

coinciden con los resultados taxonómicos comentados más arriba.

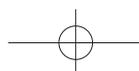
Aun así, realizamos un análisis de diversidad genética con las secuencias obtenidas de nuestro muestreo en el PNSN (y proximidades). Se han encontrado tres linajes diferentes de dos, dos y cuatro haplotipos (véanse colores en la Figura 1). La distribución de la diversidad genética tanto en número de haplotipos (8) como de linajes (un linaje del este y dos linajes del oeste) tiene un fuerte componente geográfico, tal y como ya se ha descrito para el género *Antirrhinum* (VARGAS *et al.*, 2009). En cualquier caso, la población más diversa por número de haplotipos (3) y linajes (2) se ha localizado en el área del Trevenque (Figura 1). Resulta interesante señalar que precisamente esta población es la única localidad situada dentro del PNSN.

Chaenorhinum glareosum (Boiss.) Willk.

En este caso se trata de una especie muy bien definida ya que no se han encontrado incongruencias taxonómicas de importancia. Además, su aislamiento geográfico (piso de vegetación criomediterráneo de Sierra Nevada) da garantías

de ser un buen bioindicador de diversidad genética vegetal en el PNSN para las cotas entre 2700 y 3400 m. Finalmente se analizaron 94 muestras (individuos) de 11 poblaciones para analizar los niveles de diversidad genética y se seleccionaron y secuenciaron las dos regiones del plasto (*rpl32-trnL^{UAG}* y *trnQ-rps16*) que dieron gran variabilidad y señal filogeográfica.

Un total de 11 haplotipos fueron detectados en las poblaciones de *Chaenorhinum glareosum*. La relación entre los haplotipos es compleja y no se obtuvo una estructura clara entre los mismos (resultados no mostrados). No obstante, los cinco linajes menores detectados que se formaron a partir un haplotipo central (azul) nos permiten interpretar la diversidad genética de la especie tanto por la distribución geográfica de los haplotipos como por la distribución geográfica de esos cinco linajes. Por otra parte, esa elevada diversidad genética tiene una amplia distribución geográfica. Por ejemplo, dos haplotipos separados por solo dos mutaciones se han localizado en poblaciones extremas: Tozal del Cartujo al oeste (haplotipos negro y morado) y Puntal de Trévez al este (haplotipos negro y azul marino) (Figura 2). Y no solo esto. Las poblaciones



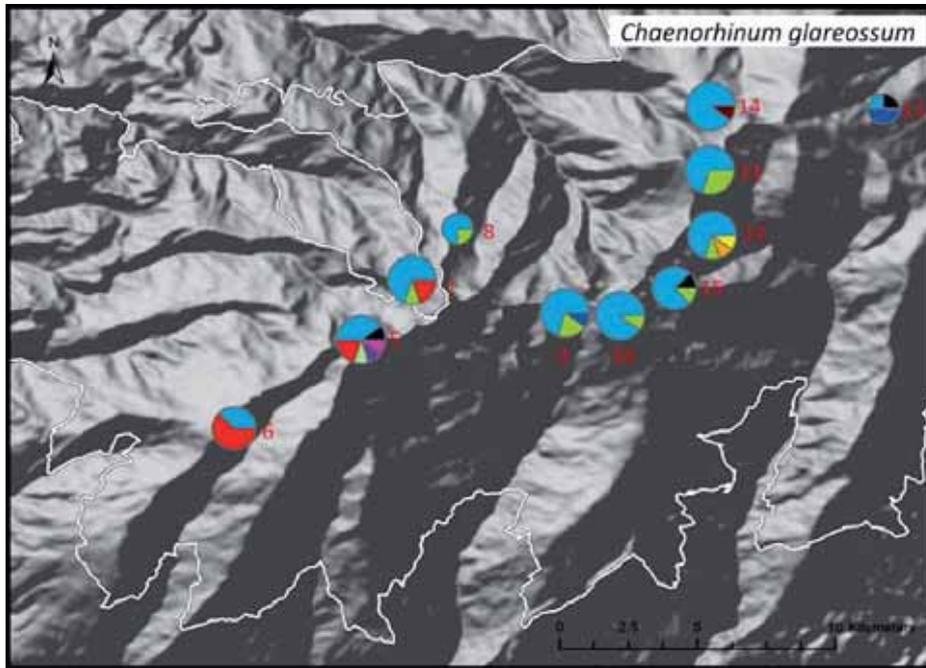
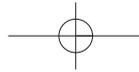


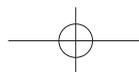
Figura 2. Distribución geográfica de los haplotipos de *Chaenorhinum glareosum*. Obsérvense varios colores (con sus tonalidades) que corresponden a varios linajes menores como consecuencia de la estructura de relación evolutiva entre haplotipos. La máxima diversidad haplotípica se ha encontrado en la población de El Tozal del Cartujo (no.5). La diversidad máxima de linajes (el haplotipo central más dos linajes) se localizó no solo en esta población (no.5), sino también en el Veleta (no.1), Mulhacén (no.3), Culo Perro (no.15) y Puntal de Vacares (no.12).

Figure 2. Geographical distribution of the haplotypes of *Chaenorhinum glareosum*. Notice different colours indicating sublineages as a result of evolutionary relationships of the haplotypes. The highest haplotype diversity was found in El Tozal del Cartujo population (no.5). The highest haplotype-lineage diversity (the central haplotype plus two lineages) was found not only in population no. 5 but also in el Veleta (no. 1), Mulhacén (no.3), Culo Perro (no.15) and Puntal de Vacares (no.12).

muestreadas albergan un número de haplotipos elevado (entre dos y seis), lo que indica una riqueza genética por población muy elevada.

Precisamente esta elevada diversidad genética nos ha permitido señalar la población más rica (Tozal del Cartujo) con seis haplotipos y tres linajes, seguida de otra de cuatro haplotipos y dos linajes (Puntal de Vacares) y por último tres poblaciones con tres haplotipos y dos linajes (Veleta, Mulhacén y Culo Perro) (Figura 2). Por el contrario, otra población del Mulhacén (no.16) y Cerro de San Juan y Pico del Cuervo mostraron solo dos haplotipos muy próximos (una sola mutación). Además, esos dos haplotipos son los mismos y bien distribuidos en todas (azul claro) o casi todas (verde) las poblaciones de Sierra Nevada.

Todos estos resultados indican que la especie tiene una gran diversidad genética, que hay poca estructuración geográfica de la diversidad y que ciertas áreas son más ricas que otras, pero a pequeña escala (no observamos un patrón geográfico latitudinal o longitudinal claro en Sierra Nevada, pongamos por caso). Es decir, ciertas áreas albergan poblaciones muy pobres en diversidad genética, mientras que otras albergan una importante diversidad genética tanto en haplotipos como en linajes. Tanto es así que solo dos poblaciones (Tozal del Cartujo y Puntal de Vacares) albergan nueve de los once haplotipos detectados, lo que supone más de un 80% de la diversidad genética de la especie. Es decir, nuestros resultados indican que si conserváramos la diversidad genética de tan solo estas dos poblaciones conservaríamos la mayor parte de la diversidad genética estimada.



Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012

Linaria glacialis Boiss.

Al igual que la especie anterior, se trata de una planta bien definida taxonómicamente y sin incongruencias taxonómicas desde su descripción original. También coincide con la especie anterior en un gran aislamiento geográfico (piso de vegetación crioromediterráneo de Sierra Nevada). En este caso su límite altitudinal inferior (cotas por encima de 3000 m) es incluso más elevado (BLANCA *et al.*, 1988), por lo que estamos ante uno de los endemismos más interesantes para la reconstrucción de la historia evolutiva de Sierra Nevada y para el análisis de cambio climático. Por si esto fuera poco, esta especie ha sido catalogada como “vulnerable” en el catálogo de flora amenazada de Andalucía (BOJA nº 60 de 27/03/2012).

Finalmente se analizaron 106 muestras (individuos) de 16 localidades para analizar los niveles de diversidad genética. A falta de estudios de flujo génico, algunas de estas poblaciones podrían considerarse subpoblaciones dentro de un mismo macizo montañoso dada su proximidad geográfica, por lo que finalmente consideramos 10 poblaciones para los análisis (Figura 3). Se seleccionaron y secuenciaron las dos regiones del plasto (*rpl32-trnL^{UAG}* y *rps16-trnK*) que daban mayor variabilidad y mayor señal evolutiva. Se detectó un total de 19 haplotipos en las poblaciones de *Linaria glacialis*. La relación evolutiva entre los haplotipos está muy bien estructurada, lo que indica procesos pretéritos de aislamiento dentro de Sierra Nevada. En concreto, se describen claramente dos linajes: haplotipos 1-10 (en negro) y linaje 11-19 (en blanco) (Figura 3).

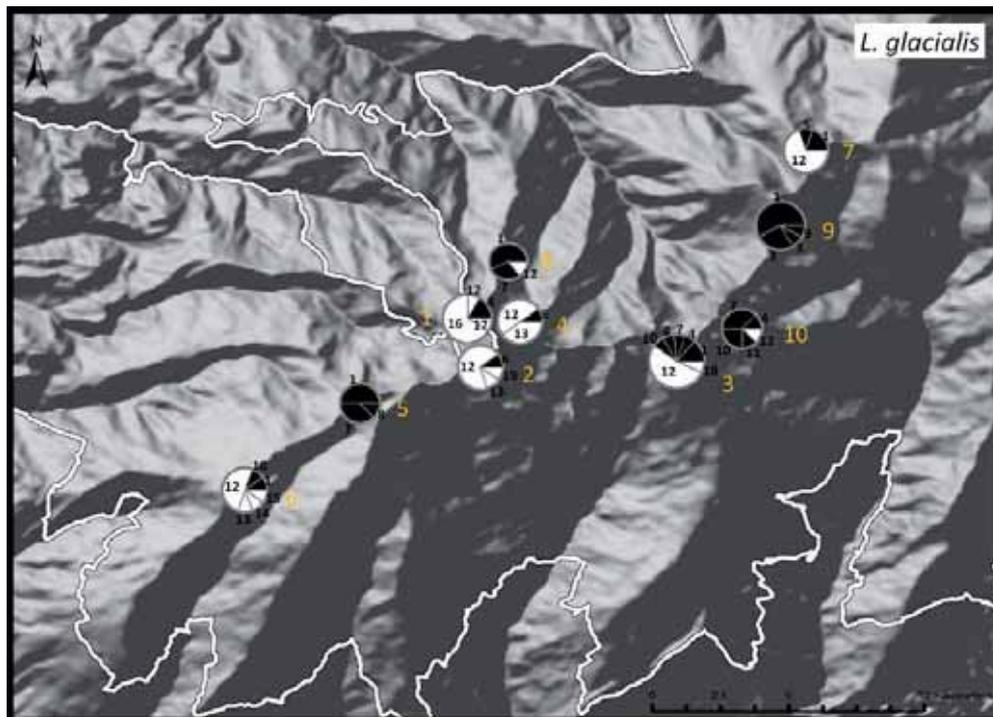


Figura 3. Distribución geográfica de los 19 haplotipos y linajes (en blanco y negro) de *Linaria glacialis*. Obsérvense las máximas diversidades haplotípicas de siete y seis haplotipos encontradas en la población de El Caballo (no.6) y Mulhacén (no.3). Por el contrario, otras cuatro poblaciones solo mostraron tres haplotipos.

Figure 3. Geographical distribution of the 19 haplotypes and two lineages (black and white) of *Linaria glacialis*. Notice that the highest haplotype diversity was found in *El Caballo* (no.6) and *Mulhacén* (no.3) based on seven and six haplotypes, respectively. In contrast, four populations harboured only three haplotypes.

El número de haplotipos por población fluctúa entre tres y siete. La población con el número más elevado de haplotipos es la del Mulhacén (no. 3) con siete haplotipos, seguida de El Caballo (no. 6) con seis haplotipos y el Pico del Globo (no. 10) con cinco haplotipos. El bajo número de haplotipos de ciertas poblaciones no coincide necesariamente en todos los casos con una baja diversidad de linajes, dado que algunas poblaciones tienen un bajo número de haplotipos (tres), pero de los dos linajes: Cerro de los Cuartos (no. 4), Puntal de los Cuartos (no. 7) y Cerro de San Juan (no. 8). Cuando tenemos en cuenta los resultados de diversidad haplotípica (número de haplotipos) y de la diversidad de linajes (número de linajes) en su conjunto, los dos análisis señalan al macizo del Mulhacén como el área de mayor riqueza. Es más, la diversidad de linajes está presente en el macizo del Mulhacén en similares porcentajes (linaje blanco c. 60% y el negro c. 40%).

Todos estos resultados sugieren que ciertas áreas, y no amplias regiones de Sierra Nevada, albergan gran riqueza genética. Además, nuestros resultados indican importantes diferencias de diversidad genética entre áreas de manera que unas pocas áreas albergan un porcentaje muy considerable de la diversidad total. Es decir, si conservamos la diversidad genética de tan solo las poblaciones del Mulhacén y del Puntal de los Cuartos conservaríamos 10 haplotipos de los dos linajes, lo que supone más del 50 % de la diversidad total estimada de la especie.

En cualquier caso, pese a su buena salud genética, se prevén unas consecuencias catastróficas para esta especie en el próximo siglo debido al cambio climático (BLANCO-PASTOR *et al.*, 2013).

***Linaria nevadensis* (Boiss.) Boiss. & Reut.**

A diferencia de las dos anteriores, esta especie sí que ha sufrido distintos tratamientos taxonómicos como especie (*Linaria nevadensis*) o subespecie (*Linaria aeruginea* subsp. *nevadensis*). El último tratamiento taxonómico (SÁEZ & BERNAL,

2009) adopta este último criterio. Por otro lado, esta especie representa unas cotas altitudinales diferentes a las de las especies anteriores (piso de vegetación oromediterráneo de Sierra Nevada). En concreto, este taxon se desarrolla principalmente en la franja entre 2.300 y 3.300 m.

Se analizaron 56 muestras (individuos) de 14 poblaciones para analizar los niveles de diversidad genética (Figura 4). Finalmente se seleccionaron y secuenciaron las dos regiones del plasto (*rpl32-trnL^{UAG}* y *trnQ-rps16*) que dieron variabilidad y señal evolutiva máximas. Un total de 21 haplotipos fueron detectados en las poblaciones de *Linaria nevadensis*. La relación evolutiva entre los haplotipos está muy bien estructurada, y es muy similar a la de la especie anteriormente descrita (*Linaria glacialis*). Igualmente interpretamos procesos pretéritos de aislamiento dentro en Sierra Nevada. En concreto, se describen claramente dos linajes, si bien uno de ellos (números con fondo negro) solo está formado por los haplotipos 1-5 y el otro (en blanco) por los haplotipos 6-21 (Figura 4).

Asimismo, esta elevada diversidad genética tiene una amplia distribución geográfica (Figura 4). Se trata del taxon que tiene una diversidad aun más repartida geográficamente. Un haplotipo se encuentra en toda Sierra Nevada (el haplotipo 6 está en todas las poblaciones). La diversidad haplotípica intrapoblacional varía entre uno (Hoya de la Mora, no. 20 y San Juan, no. 24) y cinco haplotipos. Las poblaciones con máxima diversidad haplotípica (cinco haplotipos) son El Veleta (no. 1) y el Pico del Cuervo (no. 11), seguidas del Puntal de Vacares (no. 12) con cuatro haplotipos. Otras poblaciones de las que se han tomado 5-6 muestras no han dado proporcionalmente una alta variabilidad genética: Tozal del Cartujo (dos haplotipos), San Juan (un haplotipo), Acucaderos (tres haplotipos) y Puntal de los Cuartos (tres haplotipos).

También se puede deducir una buena distribución geográfica de linajes al observar que seis localidades tienen haplotipos de los dos linajes (negro y blanco). Además, el bajo número de haplotipos de ciertas poblaciones no coincide necesariamente en todos los casos con una baja

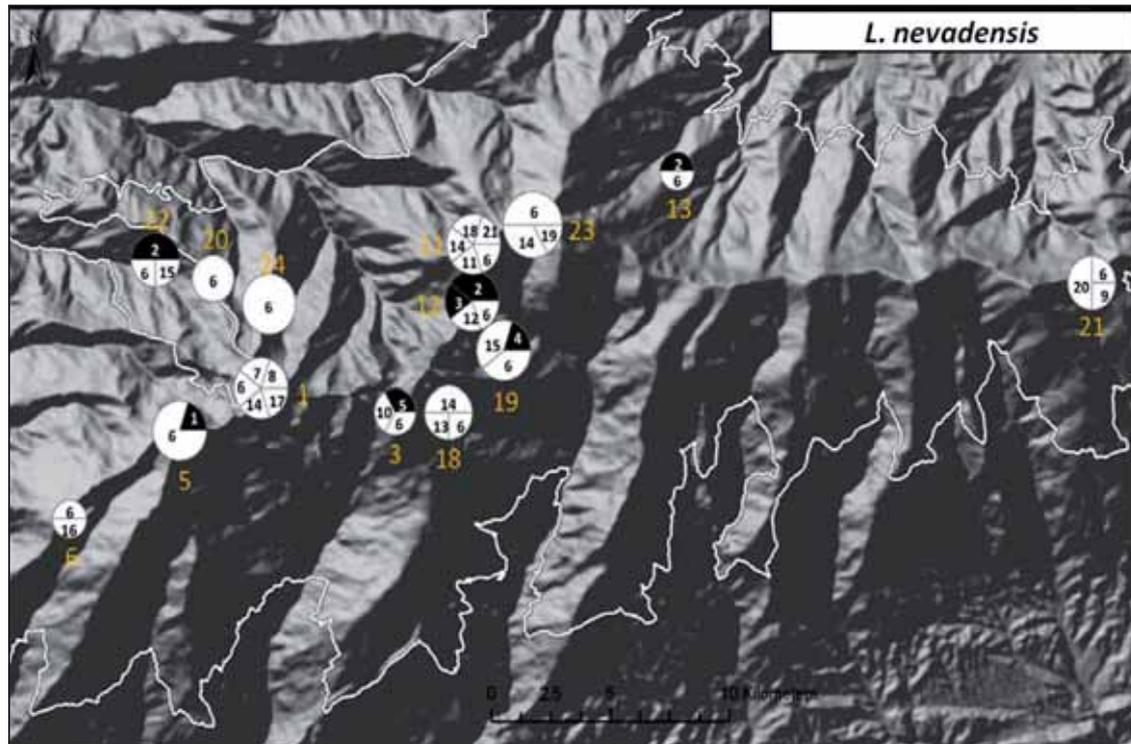


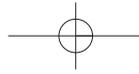
Figura 4. Distribución geográfica de los 21 haplotipos y linajes (en blanco y negro) de *Linaria nevadensis* (considerada *L. aeruginea* subsp. *nevadensis* por algunos autores). Obsérvese que la diversidad genética está bastante bien distribuida en todo el Parque Nacional.

Figure 4. Geographical distribution of the 21 haplotypes and two lineages (black and white) of *Linaria nevadensis* (considered as *L. aeruginea* subsp. *nevadensis* by some authors). Notice that the genetic diversity of this species is well distributed across the National Park.

diversidad de linajes. Por ejemplo, las poblaciones del Tozal del Cartujo (no. 5) y Puntal de Trévez (no. 13) solo presentan dos haplotipos, pero de los dos linajes. Cuando tenemos en cuenta los resultados de diversidad haplotípica (número de haplotipos) y de la diversidad de linajes (número de linajes) en su conjunto, es difícil señalar ciertas poblaciones que muestren altos índices de diversidad para ambos (Figura 4). No obstante, la población que muestra haplotipos de los dos linajes y un alto número de haplotipos es la del Puntal de Vacares (no. 12). Esta especie también se ajusta a una tendencia generalizada a que ciertas poblaciones son especialmente ricas en diversidad genética, mientras que otras no albergan diversidad genética (no. 20, no. 24). Por ello, si conservamos la diversidad genética de ciertas poblaciones podríamos preservar más del 50% de la diversidad total de la especie.

Apis mellifera (Linnaeus, 1778) subsp. *iberiensis* (Engel, 1999)

Se trata de un taxon endémico de la Península Ibérica. Según algunos autores es un eslabón entre las abejas europeas pertenecientes a la subsp. *mellifera* y subespecies norteafricanas (ORNOSA & ORTIZ, 2004; aunque véase FRANCK *et al.*, 1998). Estudios previos han detectado tres linajes en las poblaciones de toda la Península Ibérica: linaje A, que es africano; linaje C, de Europa oriental; y linaje M, de Europa occidental. Un análisis reciente de la distribución de haplotipos mitocondriales de 27 poblaciones ibéricas arroja un resultado de un 61,67% del linaje africano, 1,67% del linaje de Europa oriental y 36,67% del linaje de Europa occidental (CÁNOVAS *et al.*, 2007; DE LA RUA *et al.*, 2009). En concreto, se ha descrito que en la provincia de Granada el linaje predomina



VARGAS, P. Y COLS.

«En búsqueda de áreas de diversidad genética en Sierra Nevada: análisis de plantas y abejas»

minante sería el africano (linaje A, sublinaje AI), que tendría una presencia de un 80%. Dado que el PNSN está tan próximo a África, pero las cotas de estudio son elevadas y coinciden en condiciones climáticas con regiones norteñas de la Península Ibérica, la cuestión es si las poblaciones del PNSN están formadas por individuos del linaje europeo, del africano o de ambos.

Se analizaron 30 muestras (individuos) de seis poblaciones distantes para analizar los niveles de diversidad genética (Figura 5). El muestreo de poblaciones fue menor que el inicialmente previsto. En cualquier caso se amplió el muestreo con dos poblaciones tomadas fuera del PNSN donde hay predominancia del linaje europeo de *Apis mellifera* (Guadalajara) y del linaje africano (Almería) para obtener información sobre el origen de los linajes haplotípicos. El espaciador mitocondrial COI-COII proporcionó un tamaño de 563 bp.

Un total de 21 haplotipos fueron detectados en las poblaciones de *Apis mellifera* subsp. *iberiensis*. La relación evolutiva entre los haplotipos tiene una estructura principalmente lineal, si bien se distinguen tres grupos de haplotipos (azul, verde y rojo) (Figura 5). El grupo azul (13 haplotipos) y el grupo verde (tres haplotipos) están separados del rojo por más de 10 haplotipos extintos o no encontrados (*missing*). Por tanto, el grupo rojo es el más separado con respecto a los otros dos. Al estar separados ambos grupos por tantas mutaciones nucleotídicas deducimos la presencia de los dos linajes (africano y europeo) en las poblaciones del PNSN. Estos resultados coinciden con los dos linajes, africano (A) y europeo occidental (M), descritos para esta zona de la Península Ibérica (véase más arriba; DE LA RUA *et al.*, 2009). De hecho, haplotipos del grupo azul se han encontrado en las muestras de Almería empleadas como grupo externo y haplotipos del grupo rojo

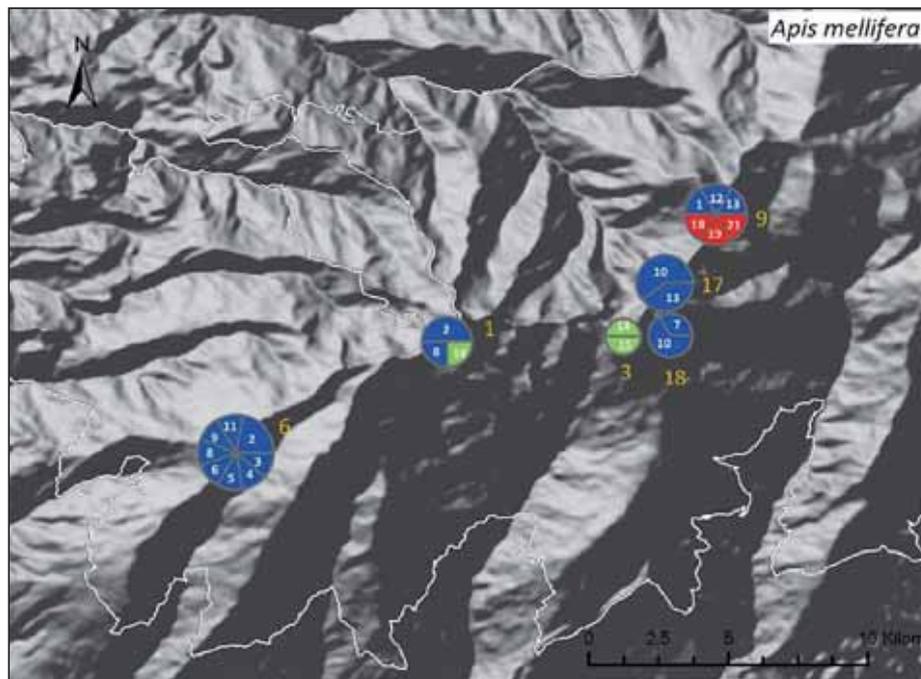
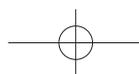


Figura 5. Distribución geográfica de los 19 haplotipos y linajes (en azul, rojo y verde) de *Apis mellifera iberiensis*. Obsérvese la estructuración geográfica de la diversidad genética basada en seis poblaciones: El Caballo (no. 6), Veleta (no. 1), Mulhacén (no. 3), Tajos del Goterón (no. 17), Laguna Hondera (no. 18) y Pico del Cuervo-Puntal de Vacares (no. 9).

Figure 5. Geographical distribution of the 19 haplotypes and three lineages (blue, red and green) of *Apis mellifera iberiensis*. Notice the geographical structure of the genetic diversity for six populations: El Caballo (no. 6), Veleta (no. 1), Mulhacén (no. 3), Tajos del Goterón (no. 17), Laguna Hondera (no. 18) and Pico del Cuervo-Puntal de Vacares (no. 9).



Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012

en las muestras de Guadalajara. Además, el patrón encontrado de sublinajes (azul y verde) coincide con los dos sublinajes (AI y AIII) detectados con anterioridad para Granada (DE LA RUA *et al.*, 2009). Este encuentro de tres linajes ha enriquecido de manera muy significativa la diversidad genética de *Apis mellifera* en Sierra Nevada. Además, el linaje azul es especialmente rico en esta sierra (13 haplotipos).

La distribución de la diversidad genética de haplotipos y linajes es también muy rica para esta especie. Las dos poblaciones de los extremos este (Pico del Cuervo/Puntal de Vacares, no. 9) y oeste (El Caballo, no. 6) son las más ricas en número de haplotipos con seis y ocho respectivamente (Figura 5). Las demás poblaciones contienen 2-3 haplotipos, si bien se dispuso de un menor número de individuos de alguna población (Figura 5). También encontramos cierta estructuración geográfica, con el linaje rojo solo en el noreste, el verde solo en el centro y el azul a lo largo de toda la Sierra. Por tanto la población con mayor número de haplotipos y linajes se localizó en el Pico del Cuervo/Puntal de Vacares, que además no está lejos de otra localidad con haplotipos del linaje verde (Mulhacén, no. 3). Por tanto se ha localizado una región (Mulhacén-Puntal de Vacares) con más de la mitad (14) de los haplotipos encontrados y de los tres linajes.

DISCUSIÓN

Utilidad de las herramientas genéticas en conservación

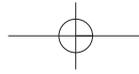
Las principales aproximaciones que se han empleado hasta la fecha para identificar áreas de máximo interés en Sierra Nevada se han basado en la riqueza de hábitats y de número de especies. El presente estudio representa un nuevo enfoque en el que se localizan áreas que albergan una elevada diversidad genética. Se trata, por tanto, de un enfoque complementario a los anteriores y de especial interés en ambientes de alta montaña, donde los hábitats son similares, las comunidades de roquedo y pedreras son dominantes y muy sensibles ante el cambio climático.

En definitiva, nuestro enfoque propone las siguientes consideraciones a ser estudiadas para una gestión y conservación más precisas de la flora y fauna de montaña:

- (1) Las técnicas de *barcoding* sirven para proporcionar un elevado número de marcadores moleculares y unas regiones de DNA de gran confianza evolutiva, por lo que confieren una herramienta de conservación muy valiosa para detectar la "criptodiversidad" (o biodiversidad escondida) dentro de una misma especie.
- (2) Las tres plantas endémicas de Sierra Nevada estudiadas (*Chaenorhinum glareosum*, *Linaria glacialis* y *Linaria nevadensis*) tienen unos niveles de diversidad genética muy alta (en comparación con otras especies de los mismos géneros fuera de Sierra Nevada). Ello nos permite ser optimistas en cuanto al patrimonio genético de las especies.
- (3) Las dos especies de más amplia distribución (*Apis mellifera iberiensis* y *Antirrhinum hispanicum*) también presentan elevados niveles de diversidad, si bien esta puede ser debida a antiguos contactos entre diferentes linajes ibéricos.
- (4) La combinación de plantas y sus polinizadores no solo ha permitido demarcar áreas de interés, sino también valorar la importancia ecológica de organismos interdependientes e imprescindibles para el funcionamiento de los ecosistemas.
- (5) El análisis conjunto de varias especies permite encontrar áreas más consistentes que por separado. Sería deseable seguir estudiando la diversidad genética de otras especies de distintos tipos de organismos para poder señalar las áreas de máximo interés biológico en Sierra Nevada.

Áreas de mayor diversidad

Diferentes poblaciones han mostrado diferentes niveles de diversidad genética para cada especie. Este resultado implica de por sí que no hay áreas que alberguen la máxima diversidad genética para todas las especies. Tampoco se han obser-



VARGAS, P. Y COLS.

«En búsqueda de áreas de diversidad genética en Sierra Nevada: análisis de plantas y abejas»

vado máximos niveles de diversidad genética en regiones amplias de Sierra Nevada (suma de áreas del este, oeste, norte o sur del PNSN) para ninguna de las especies. Sin embargo, al combinar los resultados genéticos de las especies de plantas (*Chaenorhinum glareosum*, *Linaria glacialis* y *Linaria nevadensis*) y de abeja (*Apis mellifera*) sobre las que se hicieron los estudios extensivos en toda Sierra Nevada podemos demarcar localidades que aportan una diversidad genética alta, media y baja (Figura 6). El criterio para proponer estas áreas se basa en el mínimo número de poblaciones que alberguen una diversidad igual o superior al 50 % de cada especie en Sierra Nevada. Para ello se ha considerado tanto la diversidad de haplotipos como de linajes haplotípicos. Una vez localizadas estas áreas para cada especie, se han combinado los mínimos números de poblaciones necesarios para albergar una diversidad igual o superior al 50% para dos o más especies.

En concreto, las siguientes poblaciones suponen una diversidad genética igual o superior al 50% del total de cada especie: para *Chaenorhinum glareosum* la suma de las diversidades ge-

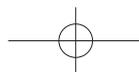
néticas de las poblaciones del Tozal del Cartujo y Puntal de Vacares; para *Linaria glacialis* la suma de las del Mulhacén y El Caballo; para *Linaria nevadensis* la suma de las de Pico del Cuervo, Puntal de Vacares y Acucaderos; y para *Apis mellifera iberiensis* la suma de las de El Caballo y Pico del Cuervo.

En la Figura 6 se muestran las áreas con distintos niveles de diversidad genética: máxima cuando hay dos áreas de diversidad máxima para dos especies (en rojo), media cuando hay una sola área de diversidad máxima de una especie (en naranja) y baja cuando las poblaciones no albergan una diversidad genética elevada de ninguna especie (en verde). Esta síntesis de la diversidad genética a lo largo de Sierra Nevada indica que tres áreas (poblaciones) deben ser señaladas como las más ricas: El Caballo, Puntal de Vacares y Pico del Cuervo. Resulta de interés señalar que las tres áreas no coinciden necesariamente con áreas de máxima diversidad estimada por el número de especies de angiospermas, tales como El Veleta o la Hoya de la Mora.



Figura 6. Áreas de diversidad genética obtenidas de la combinación de resultados de las tres especies de plantas y una de abeja empleadas. Se marca con círculos rojos las poblaciones que muestran diversidad máxima para dos especies, en naranja las que muestran diversidad máxima para solo una especie y en verde las que no albergan una diversidad genética elevada. Círculos con fondo blanco indican las poblaciones no utilizadas para este análisis.

Figure 6. Areas of genetic diversity based on the combination of results from three plant and one bee species. Red circles indicate populations with the highest diversity based on two species, orange circles for that based on one species and green circles with no species with the highest diversity. White circles indicate populations eventually not used for the analysis.





Proyectos de investigación en parques nacionales: 2009-2012

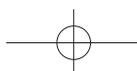
En definitiva, nuestros resultados no apuntan a regiones (conjuntos de áreas) dentro del PNSN con especial interés, sino a áreas más locales donde se encuentra gran diversidad genética. Ello nos sugiere que una política de microrreservas sería la estrategia más interesante a la hora de priorizar medios y esfuerzos. En concreto, una política de las microrreservas dentro de Sierra Nevada sobre la base de la diversidad de hábitats, número de especies y diversidad genética permitiría preservar el patrimonio de este Parque Nacional de una manera más eficiente y a un menor coste.

AGRADECIMIENTOS

Estamos agradecidos al Organismo Autónomo Parques Nacionales por la concesión del proyecto y el seguimiento del mismo. Asimismo la dirección, guardería y administración del Parque Nacional de Sierra Nevada nos proporcionaron todo tipo de apoyo logístico para llevar a cabo el proyecto. A título personal agradecemos los comentarios y ayuda de campo a los siguientes colegas: Javier Freijanes, Jesús Gómez, José María Gómez y Luis Santamaría.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLANCA, J., CABEZUDO, B., CUETO, M., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, C. & MORALES-TORRES, C. 2009. Flora vascular de Andalucía Oriental, 4 vols. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.
- BLANCA, J., CUETO, M., MARTÍNEZ-LIROLA & M.J., MOLERO-MESA, J. 1998. Threatened vascular flora of Sierra Nevada (Southern Spain). *Biological Conservation* 85: 269-285.
- BLANCO-PASTOR, J.L., VARGAS, P. & PFEIL, B.E. 2012. Coalescent simulations reveal hybridization and incomplete lineage sorting in Mediterranean *Linaria*. *PLoS ONE* 7: e39089.
- BLANCO-PASTOR, J.L., FERNÁNDEZ-MAZUECOS, M. & VARGAS, P. 2013. Past and future demographic dynamics of alpine species: limited genetic consequences despite dramatic range contraction in a plant from the Spanish Sierra Nevada. *Molecular Ecology*. 22: 000-000.
- CÁNOVAS, F., DE LA RÚA, P., SERRANO, J., & GALIÁN, J. 2007. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46: 24-30.
- CORNUET, J.M., GARNERY, L. & SOLIGNAC, M. 1991. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics* 128: 393-403.
- DE LA RÚA, P., MUÑOZ, I., PIÑERO, A., HERNÁNDEZ-GARCÍA R., CÁNOVAS, F., GALIÁN, J. & SERRANO, J. 2009. Historia evolutiva de la abeja ibérica. En: Adaptación y evolución. 150 años después del Origen de las Especies. Pp: 162-169. SESBE. Valencia.
- EBMER, A.W. 2003. Hymenopterologische Notizen aus Österreich 16 (Insecta: Hymenoptera: Apoidea). *Linzer biologische Beiträge* 35: 313-403.
- ESTOUP, A., SOLIGNAC, M., CORNUET, J.-M., GOUDET, J. & SCHOLL, A. 1996. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Molecular Ecology* 5: 19-31.
- FERNÁNDEZ-MAZUECOS, M. & VARGAS, P. 2011. Historical Isolation versus Recent Long-Distance Connections between Europe and Africa in Bifid Toadflaxes (*Linaria* sect. *Versicolores*). *PLOS ONE* 6(7): e22234.
- FRANCK, P., GARNEY, L., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.-M. 1998. The Origin of West European Subspecies of Honeybees (*Apis mellifera*): New Insights from Microsatellite and Mitochondrial Data. *Evolution* 52: 1119-1134.
- GIBSON, G. & DWORKIN, I. 2004. Uncovering cryptic genetic variation. *Nature Reviews Genetics* 5: 681-690.



VARGAS, P. Y COLS. «En búsqueda de áreas de diversidad genética en Sierra Nevada: análisis de plantas y abejas»

- GÓMEZ, J.M. & ZAMORA, R. 1999. Generalization vs. specialization in the pollination system of *Hor-matophylla spinosa* (Cruciferae). *Ecology* 80: 796-805.
- GÜEMES, J. 2009. *Antirrhinum* L. En: Castroviejo, S., Benedí, C., Rico, E., Güemes, J. y Perret, P. (eds.). Flora ibérica, plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. 13. Pp. 134-166. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- HAN, F., WALLBERG, A. & WEBSTER, M.T. 2012. From where did the Western honeybee (*Apis mel-lifera*) originate? *Ecology and Evolution* 2: 1949-1957.
- MELENDO, M., GIMÉNEZ, E., CANO, E., GÓMEZ-MERCADO, F. & VALLE, F. 2003. The endemic flora in the south of the Iberian Peninsula: taxonomic composition, biological spectrum, pollina-tion, reproductive mode and dispersal. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 198: 260-276.
- ORNOSA, C. & ORTIZ-SÁNCHEZ, F.J. 2004. Hymenoptera, Apoidea I. En: Fauna Ibérica, vol. 23. Ramos, M.A. et al., (eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Madrid. 556 pp.
- ORNOSA, C., ORTIZ-SÁNCHEZ, F.J. & TORRES, F. 2007. Catálogo de los Megachilidae del Medite-ráneo occidental (Hymenoptera, Apoidea). II. Lithurgini y Megachilini. *Graellsia* 63: 111-134.
- ORNOSA, C., TORRES, F. & ORTIZ-SÁNCHEZ, F.J. 2009. Claves y datos nuevos de las especies ibéri-cas del género *Stelis* Panzer, 1806 (Hymenoptera, Apoidea, Megachilidae, Anthidiini). *Graellsia* 65: 111-132.
- ORTIZ-SÁNCHEZ, F.J., ORNOSA, C. & TORRES, F. (en prensa). Los apoideos (Hymenoptera, Apo-i-dea) de Sierra Nevada. En: Tinaut, A., Tierno, J.M. y Ruano, F. (eds.). Insectos de Sierra Nevada: Bio-diversidad y Conservación. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla.
- ORTIZ-SÁNCHEZ, F.J., ORNOSA, C. & TORRES, F. 2012. Especies ibéricas de los géneros *Lithurgus* Berthold, 1827, *Creightonella* Cockerell, 1908 y *Chalicodoma* Lepeletier, 1841 (Hymenoptera, Mega-chilidae): claves de identificación y nuevos datos de distribución. *Graellsia* 68: 181-206.
- RORTAIS, A., ARNOLD, G., ALBURAKI, M., LEGOUT, H. & GARNERY, L. 2011. Review of the DraI COI-COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Conservation Ge-netics Resources* 3: 383-391.
- SÁEZ, L. & BERNAL, M. 2009. *Linaria* Mill. En: Benedí, C., Rico, E., Güemes, J. y Perret, P. (eds.). Flora ibérica, plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. 13. Pp. 232-324. CSIC, Madrid.
- VARGAS, P., CARRIÓ, E., GUZMÁN, B., AMAT, E. & GÜEMES, J. 2009. A geographical pattern of *An-tirrhinum* (Scrophulariaceae) speciation since the Pliocene based on plastid and nuclear DNA poly-morphism. *Journal of Biogeography* 36: 1297-1312.
- VARGAS, P., ORNOSA, C., ORTIZ-SÁNCHEZ, J. & ARROYO, J. 2010. Is the occluded corolla of *An-tirrhinum* bee-specialized? *Journal of Natural History* 44: 1427-1443.
- WARNCKE, K. 1991. Die Bienengattung *Osmia* Panzer, 1806, ihre Systematik in der Westpaläarktis und ihre Verbreitung in der Türkei. 10. Die Untergattung *Alcidamea* Cress. *Linzer biologische Bei-träge*, 23(2): 701-751.
- WARNCKE, K. 1992a. Die westmediterranen Arten der Bienen *Osmia* subg. *Hoplitis* Klug 1807. *Linzer Biologische Beiträge* 24: 103-121.
- ZANDEN, G. van der. 1991. Systematik und Verbreitung der paläarktischen Arten der Untergattung *Caerulosmia* van der Zanden 1989 (Hymenoptera, Apoidea, Megachilidae). *Linzer biologische Beiträge* 23: 37-78.