

BIOLOGÍA DE LA POLINIZACIÓN DE *ERYSIMUM* ENDÉMICOS DE LA ALTA MONTAÑA DE SIERRA NEVADA: INTROGRESIÓN Y EXTINCIÓN SILENCIOSA

JOSÉ M. GÓMEZ¹, MOHAMED ABDELAZIZ², JUANDE FERNÁNDEZ-CARMONA¹,
A. JESÚS MUÑOZ-PAJARES² Y FRANCISCO PERFECTTI²

RESUMEN

El principal objetivo del presente trabajo es explorar la interacción entre plantas endémicas y polinizadores, y discutir las consecuencias que se derivan para la conservación de dichas plantas. Para ello, hemos estudiado durante tres años la interacción que cuatro especies de plantas del género *Erysimum*, dos de ellas endémicas del Parque Nacional de Sierra Nevada (*E. baeticum baeticum* y *E. nevadense*) y dos de amplio rango de distribución (*E. mediohispanicum* y *E. popovii*), mantienen con sus polinizadores. Las especies endémicas estudiadas en este proyecto fueron visitadas por un conjunto de polinizadores igual de diverso y generalista que las especies no endémicas. En general, el conjunto de polinizadores de cada una de las especies estudiadas estuvo compuesto por no menos de 100 especies. En todos los casos el gremio de polinizadores consistió en una mezcla de especies de insectos eficientes como vectores polínicos y especies de insectos poco eficientes. Todas las especies de plantas estudiadas se caracterizaron por tener un conjunto de polinizadores altamente variable en el espacio. Asimismo, observamos la existencia de una gran estructuración genética, ya que poblaciones de plantas cercanas difieren en su constitución genética de forma significativa. Estudios filogenéticos sugieren que las especies endémicas y no endémicas del Parque Nacional de Sierra Nevada forman parte de diferentes linajes dentro del género *Erysimum*. Cualquier contacto entre ellas en la naturaleza parece ser de carácter secundario. Asimismo, estas especies pueden hibridar fácilmente, y no parecen sufrir una intensa depresión por exogamia. Esto conlleva la posibilidad de que puedan darse fenómenos de introgresión genética de unas especies en otras, con el peligro de que algunas especies endémicas desaparezcan absorbidas genéticas por la expansión de especies no endémicas. Todas las especies estudiadas tienen su reproducción limitada por la llegada insuficiente de granos de polen (limitación de polen). Este fenómeno ha estado asociado en todos los casos a una depauperación del gremio de visitantes florales en abundancia, diversidad y presencia de polinizadores eficientes. Por lo tanto, pensamos que para disminuir el riesgo de extinción de las especies de plantas endémicas de Sierra Nevada, es necesario desarrollar planes de gestión integradores que contemplen también la protección y el manejo de las poblaciones de organismos mutualistas que benefician la reproducción de las plantas.

Palabras claves: *Erysimum*, alta montaña, endemidad, introgresión, extinción, polinización.

¹ Dpto. de Ecología, Universidad de Granada, E-18071 Granada.

² Dpto. de Genética, Universidad de Granada, E-18071 Granada.

SUMMARY

The main goal of this project was exploring the effect of endemism in the interaction between plants and their pollinators, and the consequences for the reproduction and genetic diversity and structure. We studied the interaction with pollinators in four co-generic species, two endemic to the Sierra Nevada National Park (*Erysimum baeticum baeticum* y *E. nevadense*) and two of wide distribution (*E. mediohispanicum* y *E. popovii*). We found that the diversity, identity and abundance of the pollinator assemblages did not differ between endemic and non endemic plants. In all cases, they were visited by a extremely high number (more than 100 spp) of generalist pollinators. Similarly, in all cases the pollinator assemblages were composed of efficient and non efficient pollen vectors. The four studied species were also characterized for having spatially varying pollinator assemblages. As a consequence of this variation in pollinators, we observed a significant spatial genetic structure in all studied species. Phylogenetic analysis shows that the four wallflower species co-occurring in Sierra Nevada belong to different lineages within the genus *Erysimum*. Some of these species, however, can hybridize easily, and they suffer low outbreeding depression. This phenomenon entails the possibility of genetic introgression and the genetic extinction of the endemic species as a consequence of the genetic invasion by the widely-distributed species. Finally, we found that the four species had their seed production limited by an adequate transfer of pollen grain (pollen limitation). In all cases, this pollen limitation was associated to the decrease in pollinator abundance and diversity, and to the absence of high efficient pollen vectors. In conclusion, the outcomes obtained in this project suggest that an efficient strategy of protecting the populations of the endemic wallflowers in the Sierra Nevada National Park requires the concomitant protection and managing of the populations of those mutualist insects that enhance the reproduction of the plants.

Key words: *Erysimum*, high-mountain ecology, endemism, introgression, extinction, pollination.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas montañosos son aquellos que se encuentran por encima de los 1000 m de altitud. El 27% de la superficie terrestre emergida se encuentra sobre los 1000 m, el 11% sobre los 2000 m, el 5% sobre los 3000 m y el 2% sobre los 4000 m (MESSERLI & IVES 1997). Estas zonas se caracterizan por fuertes pendientes y altitudes que individualmente, o en conjunto, limitan la utilización humana. A pesar del área reducida que ocupan y de la dureza de sus ambientes (exceso de lluvia, temperaturas relativamente bajas, aridez, alta radiación solar), las montañas son esenciales para el mantenimiento de las funciones ecológicas de los ecosistemas ubicados en tierras bajas, y de su conservación depende buena parte de la humanidad. Por ejemplo, las montañas proporcionan el agua dulce que consume la mitad de la humanidad y el abastecimiento de agua potable depende directamente de la integridad funcional de los ecosistemas de montañas (FLEURY 1999; FAO 2002;

KÖRNER & SPEHN 2002; KÖRNER 2004). Más aún, en las montañas se conserva la diversidad genética que contribuye a alimentar al planeta: de las 20 especies de plantas que alimentan al 80% de la humanidad, 14 de ellas se han originado o diversificado en ecosistemas de montaña (FLEURY 1999; FAO 2002; KÖRNER & SPEHN 2002). Además, los ecosistemas montañosos representan centros de biodiversidad mundiales (FAO 2002; KÖRNER & SPEHN 2002; KÖRNER 1999; 2004) y su conservación se ha convertido en una tarea prioritaria tal y como lo demuestra la celebración del Año Internacional de las Montañas en 2002 (FAO 2002; KÖRNER & SPEHN 2002). Las montañas son ecosistemas frágiles debido a la combinación de condiciones climáticas extremas con fuertes pendientes y suelos poco profundos y sujetos a erosión. Cambios en el uso del suelo, las presiones del cambio climático, el exceso de explotación y la degradación ambiental son los principales peligros que amenazan las montañas (BENISTON *et al.* 1997; FAO 2002; KÖRNER & SPEHN 2002).

Una de las características de este tipo de ecosistemas es la riqueza de especies animales y vegetales que poseen (KÖRNER & SPEHN 2002; KÖRNER 2004; MOLAU 2004). En estos ecosistemas se ha producido una gran diversificación específica como consecuencia del aislamiento geográfico de muchas montañas y de la gran variedad de hábitats que implican los cambios de las condiciones climáticas y ambientales a lo largo del gradiente altitudinal y/o topográfico. De hecho, 16 de los 25 centros de biodiversidad del mundo se encuentran en montañas (MYERS *et al.* 2000). El número de especies vegetales endémicas aumenta con la altitud en la mayoría de los ecosistemas estudiados (KESSLER 2000). Por ello, aparte de contener una gran cantidad de especies, las montañas también encierran un alto número de endemismos: el 7% de la flora de los Alpes o más del 20% de la flora de Sierra Nevada es endémica, mientras que recientes descubrimientos de especies nuevas de mamíferos endémicos de Asia han ocurrido en zonas de montaña. El difícil acceso a muchos ecosistemas de montaña ha hecho que se creen parques naturales y zonas de protección especiales para conservar la gran biodiversidad de estas zonas. No obstante, los cambios ambientales antes mencionados, sobre todo el cambio climático y el aumento de la presión humana, a través de prácticas inapropiadas de gestión de recursos o la rápida expansión de la industria del turismo, hacen que estas zonas estén amenazadas y a que se haya documentado una pérdida de biodiversidad en diferentes ecosistemas montañosos de todos los continentes durante las dos últimas décadas (MCDONALD *et al.* 2000; FOSTER 2001; KOZAK 2003; YANG & XU 2003; KLEIN *et al.* 2004).

La mayoría de las especies vegetales de alta montaña dependen en mayor o menor grado de la actividad de los polinizadores para llevar a buen término su reproducción sexual (BUCHMANN & NABHAN 1997). Por lo tanto, la interacción que mantienen con sus polinizadores es crucial para entender los patrones demográficos de reclutamiento y la dinámica poblacional de las especies vegetales. Desgraciadamente, el conocimiento existente sobre la biología reproductiva de las plantas altimontanas y la interacción que estas es-

pecies mantienen con los polinizadores es escaso e incompleto. Si a este desconocimiento unimos el hecho de que la mayoría de las especies de plantas estrictamente altimontanas son taxones endémicos, ya sea a nivel de especie, a nivel de subespecie o variedad o incluso a nivel de género (BLANCA *et al.* 2002), nos encontramos con el problema de que ignoramos un aspecto crucial de un grupo de taxones vegetales especialmente delicados. Estamos lejos aún de poder elaborar un esquema conceptual sobre el funcionamiento de las interacciones planta-polinizador en ambientes altimontanos, y las consecuencias que se derivan para la conservación de su flora amenazada.

Por una parte, bastantes estudios han mostrado que la diversidad, abundancia y actividad de insectos es menor en los ecosistemas de montaña que en los ecosistemas de zonas bajas (ARROYO *et al.* 1982, 1985; KEARNS 1992; KEARNS & INOUE 1994; GÓMEZ & ZAMORA 1999). Esto se ha comprobado para poblaciones diferentes de la misma especie (BINGHAM & ORTHNER 1998; GÓMEZ & ZAMORA 1999; TOTLAND 2001; BLIONIS & VOKOU 2001; MEDAN 2003), pares de subespecies distribuidas a distinta altitud (BLIONIS & VOKOU 2002), especies emparentadas (BLIONIS & VOKOU 2001) y comunidades (MCCALL & PRIMACK 1992). Las tasas de visita de polinizadores también son más bajas en especies alpinas con respecto a especies emparentadas de distribución más amplia (ERIKSEN *et al.* 1993; KASAGI & KUDO 2003). A esta escasez no sólo contribuye una disminución en la abundancia poblacional de los polinizadores, sino una alteración en su patrón de actividad diaria como consecuencia de las extremas y cambiantes condiciones climatológicas típicas de la alta montaña (MCCALL & PRIMACK 1992; BERGMAN *et al.* 1996). Esto genera una alta variabilidad espaciotemporal en la abundancia e identidad de los visitantes florales de plantas altimontanas (GÓMEZ & ZAMORA 1999).

No solamente la cantidad de polinizadores disminuye con la altitud, sino que también lo hace la calidad de los visitantes florales. Así, los visitantes florales más abundantes en zonas de alta montaña son moscas pertenecientes a familias muy poco eficientes como polinizadores tales

como Muscidae, Calliphoridae, Fannidae, Mycetophyllidae o Empididae (ARROYO *et al.* 1982; MCCALL & PRIMACK 1992; ELBERLING & OLESEN 1999; GÓMEZ & ZAMORA 1999; DUPONT *et al.* 2003). La polinización por hormigas, considerada muy poco eficiente (Peakall *et al.* 1991), también es predominante en montañas (GÓMEZ *et al.* 1996; PUTERBAUGH 1998). Es de destacar el caso de Sierra Nevada donde el principal polinizador de muchas especies alpinas como *Arenaria tetraquetra*, *Alyssum purpureum*, *Hormathophylla spinosa* o *Sedum anglicum* es una especie de hormiga, *Proformica longiseta* (GÓMEZ & ZAMORA 1992, 1999; GÓMEZ *et al.* 1996).

Esta escasez e impredecibilidad espacio-temporal de polinizadores eficientes en zonas alpinas puede tener varias consecuencias ecológicas. Así, una consecuencia inmediata es que la reproducción y producción de semillas de las plantas que habitan estos ecosistemas esté altamente limitada por la disponibilidad de polen (*pollen limitation*). De hecho, una limitación de polen significativa ha sido demostrada en un número notable de plantas alpinas, como por ejemplo *Arenaria capillaris* (CAMPBELL 1987), *Cerastium arvense* (CAMPBELL 1987), *Crocus vernus* (TOTLAND *et al.* 1998), *Gentiana newberryi* (SPIRA & POLLAK 1986), *Ipomopsis aggregata* (HAINSWORTH *et al.* 1985), *Leontodon autumnalis* var. *taraxaci* (TOTLAND 1997), *Myrosmodes cochlerare* (BERRY & CALVO 1991), *Phyllodoce aleutica* (KASAGI & KUDO 2003), *Phyllodoce caerulea* (KASAGI & KUDO 2003), *Polemonium pulcherrimum* (CAMPBELL 1987), *Polemonium viscosum* (GALEN 1985), *Ranunculu sacris* (TOTLAND 1994), *Rhododendron aureum* (KUDO 1993), *Saxifraga oppositifolia* (STENSTRÖM & MOLAU 1992) y *Veronicacuscikii* (CAMPBELL 1987). La limitación de polen tiene potenciales consecuencias ecológicas y genéticas para la persistencia de la especie puesto que impone un límite al reclutamiento de nuevos individuos (BURD 1994; ASHMAN *et al.* 2004) y puede, por tanto, contribuir a la rareza de las especies y acentuar su grado de amenaza (WILCOCK & NEILAND 2002), además de reducir la diversidad genética de las poblaciones en las que dicha limitación de polen impone la reproducción autógena como seguro reproductivo (EKERT *et al.* 2009).

Consecuencias para la conservación de las plantas altimontanas y sus polinizadores

Derivado de todo lo expuesto anteriormente, es de suponer que las plantas altimontanas estén polinizadas por un espectro depauperado de polinizadores. De hecho, diversos estudios han mostrado la existencia de una asociación positiva entre la frecuencia de endemismos en un ecosistema y la proporción de especies vegetales con sistemas de polinización especializado (STUESSY *et al.* 1997). Es vital conocer la estructura, funcionamiento y grado de ajuste ecológico y genético de los sistemas de polinización exhibidos por las plantas altimontanas para poder predecir sus respuesta frente a posibles amenazas. Algunos autores sugieren que las plantas con sistemas de polinización muy especializados son especialmente vulnerables a la fragmentación y otras formas de perturbación del hábitat (BOND 1994). Por el contrario, otros investigadores sostienen que la fragmentación y deterioro del hábitat no altera el éxito reproductivo de las plantas especializadas más que el de las generalistas, ya que las interacciones planta-polinizador son mayoritariamente asimétricas, por lo que ambos tipos de plantas están visitadas predominantemente por el mismo tipo de polinizador (AIZEN *et al.* 2002 y ASHWORTH *et al.* 2004). Sin embargo, cualquier cambio en la composición del espectro de polinizadores, su abundancia o comportamiento como consecuencia de alteraciones en el hábitat es muy probable que tenga un efecto en variables reproductivas de la planta como el número de granos de polen exportado-recibido o la calidad de los cruces entre individuos (AIZEN Y FEINSINGER 1994; MURCIA 1996; AGUILAR & GALETTO 2004). Obviamente, estos cambios afectarán en mayor medida a aquellas especies de plantas con sistemas de polinización altamente especializados, pudiendo ocasionar una reducción sustancial en la calidad y cantidad de descendencia producida y constituyendo un primer paso para que se produzca el colapso demográfico de sus poblaciones (AIZEN *et al.* 2002).

En segundo lugar, la biología de la polinización juega un papel central en la conservación de las

plantas amenazadas. Para poder desarrollar estrategias adecuadas de conservación, gestión y restauración de cualquier especie vegetal es imprescindible comprender correctamente su biología reproductiva (PÉREZ DE PAZ 2002). En concreto, el sistema reproductivo, o sea, la capacidad o incapacidad de producir semillas por autofecundación, y la diversidad, abundancia y calidad de los polinizadores determinan en qué medida una especie vegetal se ve afectada por la limitación de polen. A su vez, el grado de limitación de polen influye en el éxito reproductor y, por tanto, en la persistencia potencial de la especie. En plantas autoincompatibles, la producción de semillas dependerá de que existan polinizadores que aporten polen en cantidad y calidad suficientes. Muchas especies raras son exógamas y tienen una dependencia de los polinizadores para la producción de semillas, lo cual las hace vulnerables a perturbaciones que afecten adversamente a la interacción con los polinizadores (KRUEBERG & RABINOWITZ 1985; TEPEDINO 2000). Además, algunos autores sugieren que las plantas con sistemas de polinización muy especializados son especialmente vulnerables a la fragmentación y otras formas de perturbación del hábitat (BOND 1994).

Por otro lado, un sistema sexual autocompatible reduce la dependencia con respecto a los polinizadores pero también tiene consecuencias de relevancia para la conservación. Si la autofecundación no es obligada, ésta suele conllevar depresión endogámica (KELLER & WALLER 2002). Si la autofecundación es obligada, es posible que la endogamia repetida haya purgado el lastre genético y no se observe depresión endogámica (BYERS & WALLER 1999); por el contrario, puede existir depresión exogámica por el cruzamiento con plantas de poblaciones distintas (PARKER 1992; FISCHER & MATTHIES 1997). Por tanto, la biología reproductora de una especie tiene consecuencias para su diversidad genética y, tanto en casos de dependencia como de independencia de los polinizadores, consecuencias importantes para la conservación. En unos casos será beneficioso el favorecer la fecundación cruzada (COLLING *et al.* 2004) mientras que en otros dicha medida puede ser

perjudicial (PARKER 1992). Sólo la elucidación de los mecanismos reproductivos permitirá decidir la gestión adecuada.

Para poder predecir con cierta confianza las consecuencias que una alteración de hábitat pueden tener en las interacciones entre las plantas altimontanas y sus polinizadores, es necesario saber el grado de peculiaridad de dichos sistemas de polinización. Para ello, es imprescindible comparar rigurosamente el sistema de polinización de especies altimontanas con el sistema de polinización exhibido por especies que coexisten en el mismo hábitat pero no son estrictamente altimontanas, y por tanto no comparten la misma historia ecológica y evolutiva (MURRAY *et al.* 2002; BUCKLEY & NELLY 2003; LAVERGNE *et al.* 2004).

En este trabajo se utiliza como sistema de estudio dos especies endémicas del Parque Nacional de Sierra Nevada (*Erysimum nevadense* y *E. baeticum baeticum*) y dos especies de amplia distribución (*E. mediohispanicum* y *E. popovi*) (Fig. 1). *E. nevadense* es un endemismo de Sierra Nevada y posiblemente Sierra de Gádor, presente en hábitats de matorral de alta montaña, entre los 1700 y los 2800 m de altitud (NIETO FELINER 1993). *E. baeticum baeticum* es un endemismo de la parte almeriense de Sierra Nevada (NIETO FELINER 1993). *E. mediohispanicum* también aparece en sistemas montañosos, aunque ocupa un rango altitudinal entre los 600 y 2300 m y tiene una distribución geográfica más amplia, que comprende las submesetas Norte y Sur de la península Ibérica y algunas de las sierras béticas, mientras *E. popovi* se distribuye por todas las sierras béticas (NIETO FELINER 1993). Ambas especies coexisten en Sierra Nevada. En este sistema montañoso, *E. nevadense* y *E. baeticum baeticum* habitan por encima de los 2300 metros de altitud, usualmente por encima del límite forestal y sobre suelos ácidos. Por el contrario, *E. mediohispanicum* y *E. popovi* se distribuyen en Sierra Nevada en zonas subalpinas desde los 1600 metros hasta los 2250 metros de altitud aproximadamente, siempre sobre suelos básicos. Las áreas de distribución de ambos pares de especies contactan en una estrecha franja donde ambas litologías conec-

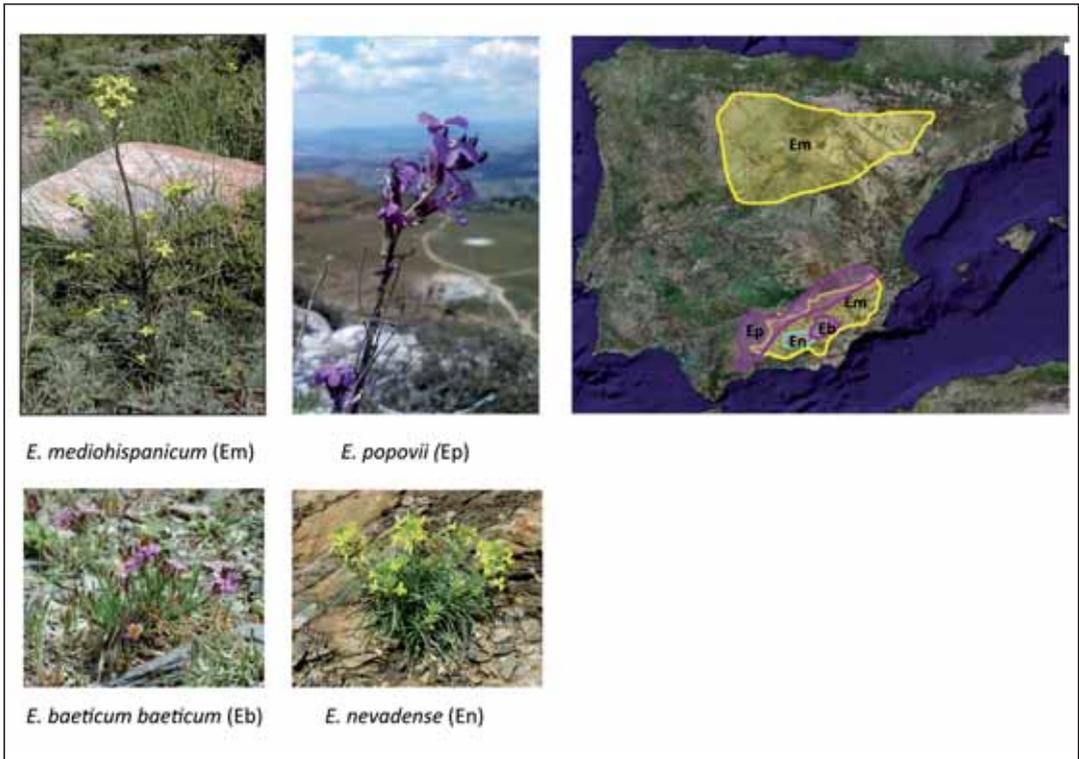


Figura 1. Imagen de las cuatro especies de *Erysimum* estudiadas, y representación aproximada de sus respectivas áreas de distribución.

Figure 1. The four *Erysimum* studied in Sierra Nevada Protected Area and their distribution areas.

tan. En estas zonas, es fácil encontrar poblaciones de ambas especies separadas entre sí no más de 1 kilómetro. Los objetivos principales de este estudio son (1) determinar el grado de relación filogenética entre las especies endémicas y no endémicas, con el objeto de explorar la posibilidad de que la coexistencia entre ellas sea fruto de una evolución común o un contacto secundario; (2) cuantificar la diferencia entre especies endémicas de la identidad y diversidad de sus visitantes florales; (3) determinar experimentalmente la diferencia entre especies endémicas y no endémicas en la limitación que sufren en su producción de semillas para escasez de llegada de polen; y (4) determinar el sistema reproductivo y las posibilidades de hibridación entre especies endémicas y no endémicas.

MÉTODOS

Diseño general del muestreo

Para el presente estudio muestreamos dos poblaciones de cada una de las especies endémicas (*E. nevadense* y *E. baeticum*), ocho poblaciones de *E. mediohispanicum* situadas todas ellas en el macizo de Sierra Nevada y 30 poblaciones de *E. popovii* localizadas en el macizo de Sierra Nevada y sierras aledañas. El estudio se llevó a cabo durante el período 2007-2010. Cada población fue georeferenciada al inicio del estudio, para poder determinar su posición y la distancia geográfica entre ellas. En cada población marcamos cada año de estudio entre 30 y 90 plantas, usando etiquetas de aluminio adheridas a la roseta basal, un método usado con éxito durante los últimos

10 años. Las plantas marcadas fueron usadas para determinar su fenotipo y poder llevar a cabo el protocolo de muestreo y censo de visitantes florales.

Relación de parentesco entre las especies de *Erysimum* del Parque Nacional de Sierra Nevada

Recolectamos tejido fresco de entre cinco y 15 individuos por población, que fue inmediatamente desecado y mantenido en silica gel hasta el momento de proceder a la extracción de su ADN. Dicho ADN fue extraído mediante el kit GenE-lute Plant Genomic DNAMiniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA) usando como mínimo 60 mg de tejido previamente pulverizado con nitrógeno líquido. Fueron tres los marcadores amplificados: dos de ellos plasmidiales, *ndhF* (aproximadamente 2000 bp) y *trnT-L* (aproximadamente 1300 bp), y una región nuclear, ITS1-5.8S-ITS2 (aproximadamente 750 bp). Para amplificar la región *ndhF* se usaron los cebadores *ndhF5* y *ndhF2100* (OLMSTEAD & SWEERE, 1994); para amplificar la región *trnT-L*, usamos los cebadores *tabA* and *tabD* (TABERLET *et al.* 1991); mientras que para la amplificación de la región ITSs-5.8S se usaron los cebadores ITS1, ITS2, ITS3 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990).

Las reacciones de PCR fueron realizadas siguiendo el protocolo descrito en ABDELAZIZ *et al.* (2011) para cada uno de los marcadores usados. Los productos de dichas reacciones fueron mezclados con 0.15 volúmenes de acetato sódico 3 mol/L, pH 4.6 y 3 volúmenes al 95% de etanol para su purificación mediante centrifugación a 4°C. El ADN purificado fue secuenciado por Macrogen (Corea) usando cebadores internos para los marcadores que requirieron de ello: *ndhF* (*ndhF-599*, *ndhF-989-R* y *ndhF-1354*) y *trnT-L* regions (*tabB* y *tabC*).

Los cromatogramas resultantes de las secuenciaciones fueron analizados mediante los programas Finch TV v1.4.0 (Geospiza, Seattle, USA) y BioEdit v7.0.5.3 (HALL 1999; LARKIN *et al.* 2007), alineando junto a las especies estudiadas las secuencias correspondientes a los marcadores

que nosotros usamos de *Arabidopsis thaliana*, obtenida de GenBank, y *Moricandia moricandioides*, como grupos externos (outgroups).

Las secuencias de los tres marcadores usados en el estudio fueron concatenadas individualmente y alineadas usando ClustalW (THOMPSON *et al.* 1994) incluido como herramienta en BioEdit (Hall, 1999; LARKIN *et al.* 2007). De los alineamientos resultantes se eliminó una región de indels en la posición 2880 a 3300 después de revisar el alineamiento a mano y usando el servidor GBLOCKS (http://molevol.cmima.csic.es/castre_sana/Gblocks_server.html; CASTRESANA 2000).

Las relaciones fueron analizadas mediante inferencia bayesiana (YANG & RANNALA 1997) usando el programa MrBayes v3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK 2003) y asumiendo el modelo GTR, que fue el modelo evolutivo que mejor se adecuó a las tres secuencias concatenadas usando el programa MrModel-Test v2.3 (NYLANDER 2004) atendiendo al criterio de información de Akaike (AIC) (AKAIKE 1974; POSADA & CRANDALL 1998). Para dichos análisis se usó MrBayes en el servidor online Bioportal de la Universidad de Oslo (<http://www.bioportal.uio.no/>). Los análisis se realizaron para cuatro millones de generaciones MCMC, siendo muestreadas con una frecuencia de cada 100 generaciones. Después de comprobar la convergencia de las dos carreras independientes se eliminó el primer 25% de los árboles generados usando el programa Tracer v1.4 (RAMBAUT & DRUMMOND 2007). El árbol consenso obtenido fue visualizado y editado usando MEGA v4.0.2 (TAMURA *et al.* 2007).

Determinación de la abundancia, diversidad y estabilidad espacio-temporal del conjunto de polinizadores

El conjunto de polinizadores de las cuatro especies estudiadas fue determinado mediante censos periódicos en al menos dos poblaciones por especie. Los censos consistieron en conteos de cinco minutos de duración realizados a cada una de las plantas marcadas y repartidos a lo largo de todo el período de floración. Los censos se realizaron entre las 11:00 y las 17:00 y bajo condicio-

nes climatológicas adecuadas: días soleados con nulo o poco viento y con una temperatura no inferior a los 18-20 °C. Durante los censos se anotaron las visitas florales observadas, a lo que se ha denominado contactos y se controló la duración de los mismos como estima del esfuerzo de muestreo. Estos conteos se efectuaron desde una distancia prudencial para evitar la alteración del comportamiento normal de los insectos. Estos censos permitieron además hallar la tasa de visita de cada especie de insecto. Aquellos insectos que no pudimos identificar en el campo, fueron recolectados para su posterior identificación por parte de los especialistas pertinentes.

En las especies de amplia distribución, *Erysimum mediohispanicum* y *E. popovii*, determinamos además la variación geográfica en el conjunto de sus visitantes florales. Para ello, replicamos el muestreo en ocho poblaciones de *Erysimum mediohispanicum* dentro del macizo de Sierra Nevada y en 30 poblaciones de *Erysimum popovii* distribuidas en cuatro zonas distintas, el Parque Nacional de Sierra Nevada, el Mencil de Granada, el Parque Natural de la Sierra Mágina y el Parque Natural del Jabalcuz de Jaén. Los muestreos se hicieron entre el año 2005 y el año 2009, para poder abarcar toda la extensión espacial propuesta.

La abundancia de polinizadores se estimó como número de visitas por minuto de censo (polinizadores $\text{minuto}^{-1} \text{ flor}^{-1}$). La diversidad se calculó para las especies de polinizadores y para sus grupos funcionales. Se usaron dos índices distintos, uno de riqueza y otro de diversidad: 1) Riqueza observada (S_{obs}), es decir el número de especies o de grupos funcionales observados en cada población. 2) Diversidad de especies y grupos funcionales de los polinizadores se calculó mediante el índice Hurlbert's PIE, que es la probabilidad de que dos individuos muestreados al azar en una comunidad pertenezcan a dos especies diferentes (Probabilidad de Encuentro Interespecífico). El valor del índice Hurlbert's PIE varía entre 0 y 1 e indica la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar sean de distinta especie. 3) Riqueza observada rarefactada a 193 contactos (S_{obs} rarefactado), para ello se utilizaron curvas de rarefacción (GOTELLI & COLWELL 2001). 4) Diversidad de especies y grupos

funcionales de polinizadores también fue rarefactada a 193 contactos por población. La rarefacción consiste en derivar expresiones que nos darán las medias y varianzas esperadas para un número determinado de individuos en una población. De esta forma, los datos de comunidades con un mayor número de contactos observados son rarefactados en a los resultados esperados si se hubiesen observado un menor número de contactos. Tras 1000 iteraciones el programa genera un intervalo de confianza del 95%, lo que nos permitió estimar si existen diferencias significativas entre las distintas poblaciones en riqueza y diversidad de especies y grupos funcionales como si sólo hubiésemos observado 193 contactos por población, que es el número de contactos contabilizados en la población con menor número de contactos. Para el cálculo de ambos índices y de las curvas de rarefacción se utilizó el programa EcoSim (GOTELLI & ENTSMINGER 2000). Estos cálculos se realizaron tanto por población como para el total de la especie. La diferencia entre poblaciones y especies en la identidad de los visitantes florales se exploró estimando las distancias de disimilitud entre ellas. Usamos la distancia de Bray-Curtis.

Los visitantes florales se agruparon en grupos funcionales en función de su similitud en comportamiento, tamaño, espectro trófico y modo de pecoreo. Los grupos funcionales considerados fueron: 1) Abejas grandes: abejas con una longitud de cuerpo de 10 mm o más; 2) Abejas pequeñas: abejas con una longitud de cuerpo inferior a 10 mm; 3) Bombílidos de trompa larga; 4) Hormigas: hormigas obreras colectoras de néctar; 5) Sírfidos: que engloba tanto a Syrphidae recolectores de néctar y polen tanto como Bombyliidae de trompa corta; 6) Escarabajos: recolectores de polen y/o néctar; 7) Mariposas: recolectoras de néctar; 8) Otros: pequeñas moscas recolectoras de néctar, avispas, chinches y saltamontes, principalmente ninfas. Esta clasificación permite hacer distinciones basadas en la taxonomía, tamaño, hábitos alimentarios y comportamiento (GÓMEZ *et al.* 2007). Esto nos permitió estudiar las variables que explican la abundancia de los distintos grupos funcionales en las poblaciones.

Diferencias interespecíficas en la limitación de polen

En cada población se asignarán 30 plantas a un tratamiento de polinización suplementaria con polen de otros individuos. A lo largo del periodo de floración se recogerá polen fresco de una mezcla de cinco individuos y se aplicará con un pincel a las flores receptoras de cada individuo marcado. Para evitar artefactos en la interpretación se polinizarán de este modo todas las flores de cada individuo (ZIMMERMAN & PYKE 1988). Un grupo similar de plantas servirá como control. Estimaremos la producción de semillas de cada individuo de cada tratamiento, como una estima de la eficacia biológica femenina. Debido a que las especies objeto de estudio son monocárpicas, la mayoría de las estimas usadas se referirán a la eficacia global de los individuos. Por la facilidad de cuantificación, y por lo extendido de su uso en trabajos de ecología evolutiva de plantas, usaremos principalmente una estima de la eficacia femenina, cuantificada como el número de semillas dispersadas cada año por cada planta marcada. Además, para determinar en qué fase del ciclo reproductivo se producen los episodios selectivos más intensos, dividiremos la eficacia global en componentes secuenciales. En particular consideraremos los siguientes componentes de la eficacia femenina: proporción de flores que pasan a fruto, número de óvulos por fruto, proporción de óvulos que producen semillas, y proporción de semillas que germinan y producen plántulas. Estos componentes son multiplicativos ($W(z) = \prod W_k(z)$; CAMPBELL 1991).

Contactos secundarios y fenómenos de introgresión

En septiembre de 2009 transplantamos 60 rosetas de segundo año de una especie de amplia distribución, *E. mediohispanicum*, y otras tantas rosetas de la especie endémica *E. nevadense*. Dichas rosetas fueron transplantadas a macetas de 11x11x15 cm en su propio sustrato y llevadas a un jardín común de la Universidad de Granada a unos 700 m de altitud aproximadamente. Estas plantas se mantuvieron en condiciones de jardín

común. Sobrevivieron 30 plantas de *E. mediohispanicum* y 14 de *E. nevadense*, que empezaron a florecer en mayo de 2010. En dicho momento fueron trasladadas a un invernadero para evitar la interacción con polinizadores. Sobre dichas plantas se llevaron a cabo los siguientes tratamientos: autogamia espontánea (AS), consistente en la no manipulación de la flor; autogamia facilitada (FS), en la que se emasculaban las flores y se añadía todo el polen de las anteras estirpadas; alo-gamia próxima (OC), en cuyo caso se emasculaba la flor previamente a la madurez de los estambres y se añadía polen de un individuo procedente de la misma población; alo-gamia lejana (FO), en los que se emasculaba la flor y se le añadía polen de un individuo procedente de otra población; y por último cruces híbridos (HC), en los que sobre flores emasculadas de cada especie se añadía polen de la otra especie. Todos los cruces se identificaron con hilos de colores anudados sin hacer presión sobre el pedicelo de la flor. En total se realizaron 1.275 cruces, habiéndose usado una media de 29 ± 17 flores por planta; siendo las medias por tratamiento de: 9.6 ± 7.3 en AS, 10.4 ± 6.1 en FS, 2.5 ± 1.9 en CO, 2.2 ± 2.0 en DO, y 4.3 ± 3.3 en HO. Las plantas se mantuvieron en el invernadero hasta la madurez de los frutos. Después de ello los frutos fueron recolectados y se contó: el número de frutos producidos y el número de abortos de frutos, el número de óvulos total por fruto, el número de óvulo fertilizado por planta, semillas abortadas y semillas producidas por fruto. Para cada tratamiento y planta se seleccionaron, cuando fue posible, 15 semillas (11.1 ± 4.8) que fueron sembradas aleatoriamente en invernadero con el fin de estimar tasas de germinación y supervivencia asociadas a cada uno de los tratamientos y madres. La germinación fue cuantificada cada dos semanas durante el primer mes y posteriormente cada mes, a la vez que la supervivencia.

Con estos componentes de éxito reproductivo se calcularon: el éxito pre-dispersivo de cada tratamiento por planta, que es el éxito acumulado de la tasa de fructificación, y producción de semillas; a la vez que una éxito acumulado que añade al anterior los componentes postdispersivos como son la tasa de germinación y supervivencia.

RESULTADOS

Parentesco filogenético entre las especies de *Erysimum* del Parque Nacional de Sierra Nevada

El análisis filogenético de las especies de *Erysimum* de la península Ibérica produce resultados interesantes. Como vemos en la Figura 2, los cuatro taxones que habitan el Parque Nacional de Sierra Nevada no forman un grupo monofilético. Así, *E. nevadense* está más relacionado con las poblaciones de *E. rondae* que aparecen en las Sierras de Tejeda y Almjara en Málaga, y todos ellos forman un linaje junto con algunos taxones del grupo *duriaei* (*E. sepikiae* del Pirineo, *E. gorbeanum* del Sistema Ibérico y *E. duriaei* de la Cordillera Cantábrica), una de las dos poblaciones de *E. mexmuelleri* de Sierra de Gredos y las dos poblaciones estudiadas de *Erysimum baeticum* de Sierra Nevada. Así mismo, nuestro análisis filogenético sugiere que estas poblaciones de *E. baeticum*, englobadas bajo la subespecie *baeticum*, forman un linaje diferente de la otra subespecie de *E. baeticum* que habita la Sierra de Baza en Granada, la subespecie *E. baeticum bastetanum*.

De hecho, la subespecie *E. baeticum bastetanum* forma un linaje con la población nevadense de *E. popovii*, junto con la otra población de esta especie, la población nevadense de *E. mediohispanicum*, y la población de la Sierra de Gádor en Almería de este último taxón (Fig. 2). De todas formas, a pesar de la cercanía geográfica entre las poblaciones nevadense de *E. popovii* y *E. mediohispanicum*, no son taxones hermanos.

Estos análisis sugieren que las cuatro especies del Parque Nacional de Sierra Nevada no forman un linaje único, sino que tienen orígenes diferentes. Por ello, cualquier contacto que se dé entre ellos es secundario.

Diferencia en el conjunto de polinizadores entre las especies de estudio

Las flores de las cuatro especies de *Erysimum* en conjunto fueron visitadas por unas 500 especies

de insectos pertenecientes a 99 familias. Encontramos diferencias en el número de insectos que visitaron las flores de las cuatro especies estudiadas. En general, la fauna de polinizadores fue menos diversa en las especies endémicas (106 especies de insectos en *E. nevadense* y 33 especies en *E. baeticum*) que en las especies de amplia distribución (191 especies de visitantes flores en *E. mediohispanicum* y 165 especies en *E. popovii*).

También hubo diferencias entre especies en la composición específica de insectos visitantes florales. Así, como se observa en la Figura 3, la proporción de visitas efectuadas por himenópteros fue mayor en las dos especies de plantas no endémicas que en las endémicas. En estas últimas, coleópteros y dípteros efectuaron proporcionalmente más visitas. Cuando bajamos a nivel taxonómico de familia, encontramos que los insectos más frecuentes en las flores de *E. baeticum* pertenecían a las familias Melyridae (12% del total de visitas), Muscidae (12%) y Formicidae (9%), seguido por Halictidae, Bombyliidae y Pieridae (6% cada una). En *E. nevadense*, las familias más abundantes fueron Melyridae (9%), Andrenidae (7%), Syrphidae, Formicidae, Muscidae y Anthomyiidae (6% cada una). En *E. mediohispanicum* las familias más abundantes fueron Melyridae, Bombyliidae y Halictidae (7% cada una) seguidas de Syrphidae, Andrenidae y Apidae (6% cada una). Finalmente, en *E. popovii* los insectos más abundantes pertenecían a las familias Halictidae (11%), Formicidae (9%), Bombyliidae, Pieridae y Melyridae (7% cada una) y Andrenidae, Syrphidae y Anthophoridae (6% cada una). En resumen, como vemos de estos datos, parece que las flores de las dos especies de *Erysimum* endémicas están primordialmente visitadas por hormigas, pequeños escarabajos y moscas, mientras que las flores de las dos especies de plantas no endémicas son visitadas con más frecuencia por abejas grandes, bombílidos, y sírfidos. Estos últimos son polinizadores más eficientes que los primeros. Así, cuando agrupamos por grupos funcionales, encontramos que las abejas grandes y los bombílidos efectúan más del 50% de las visitas a flores de *E. popovii* y *E. mediohispanicum*, mientras que las moscas, escarabajos y hormigas efectúan más de la mitad de las visitas a flores de *E. baeticum* y *E. nevadense*.

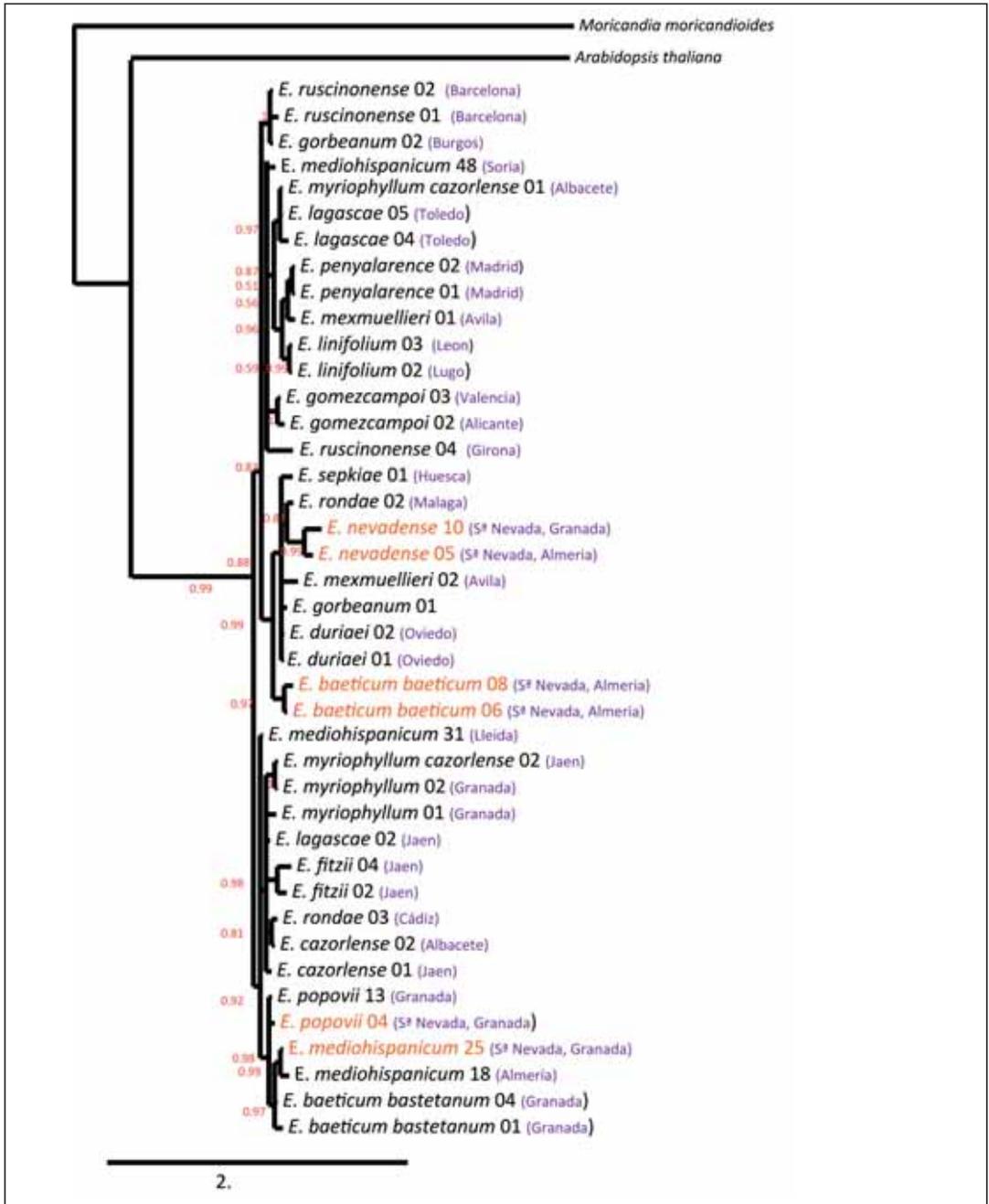


Figura 2. Relaciones filogenéticas entre los taxones ibéricos del género *Erysimum*, obtenidas mediante un marcador nuclear (ITS1-2) y dos marcadores cloroplastidiales (trnF-L, nadF). En rojo se han destacado los taxones que habitan el Parque Nacional de Sierra Nevada.

Figure 2. Phylogenetic relationships amongst iberian *Erysimum* species obtained using a nuclear (ITS1-2) and two chloroplastidial (trnF-L, nadF) markers. In red the species inhabiting the Sierra Nevada Protected Area.

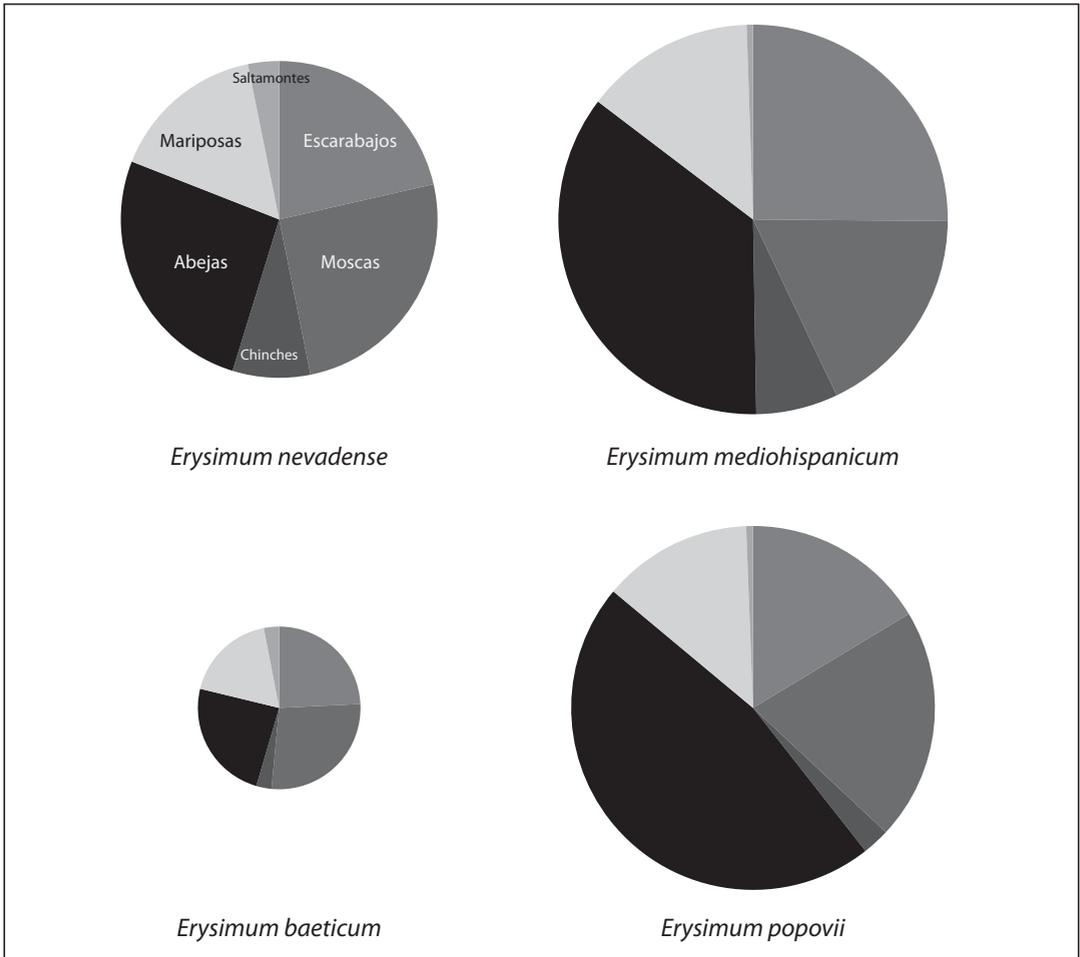


Figura 3. Diferencia en el tipo de visitante floral (a nivel de orden taxonómico) que acude a las flores de las especies de *Erysimum* que habitan el Parque Nacional de Sierra Nevada. El tamaño del círculo está relacionado con el número de especies de insectos observados en las flores de cada planta.

Figure 3. Differences between *Erysimum* species in floral visitors (at taxonomic order). Circle size is proportional to the number of insects visiting the flowers of each plant species.

Variación entre poblaciones en el conjunto de polinizadores

Además de la variación entre especies, hemos encontrado también una variación significativa entre poblaciones. Así, para *E. popovii*, el análisis multivariante de varianza con permutaciones dio resultados significativos para los dos índices de disimilitud usados, aplicados a la composición específica total de polinizadores (Bray-Curtis: $p=0.0047$; Morisita-Horn: $p=0.0423$). Con respecto

a los grupos funcionales, también han resultado significativas las diferencias entre zonas y usando los dos índices (Bray-Curtis: $p=0.0014$; Morisita-Horn: $p=0.0024$). Esto nos indica que las diferencias en composición de polinizadores entre las zonas de muestreos son mayores que las que cabría esperar si las poblaciones hubiesen sido agrupadas al azar en lugar de por criterios geográficos. Además las diferencias entre zonas fueron significativas en la riqueza específica, S_{obs} (ANOVA: $p=0.0024$). Pero no hay diferencias ni

en la abundancia, densidad de contactos (ANOVA: $p=0.251$), ni en la diversidad de polinizadores estimado con el índice Hurlbet's PIE (ANOVA: 0.775) entre las distintas zonas (Tabla 1).

También observamos variación espacial en los grupos funcionales. Como se observa en la figura 4, hay poblaciones donde la abundancia relativa de bombílidos es mayor, y en otras donde la abundancia de abejas grandes de trompa larga (antofóridos principalmente) es mayor. Parece que en el Parque Nacional de

Sierra Nevada sobreabundan las abejas grandes y medianas y los bombílidos.

También observamos diferencia espacial en el conjunto de polinizadores de *Erysimum mediohispanicum*. Lo que encontramos es que la identidad de los principales polinizadores varía entre poblaciones que están separadas entre sí no más de 1 km. Así, algunas poblaciones son visitadas preferentemente por abejas, mientras que otras son visitadas por bombílidos, otras son visitadas por abejas pequeñas y otras son visitadas por escarabajos (Figura 5). Es decir, existe un mosaico en el

Población	S _{obs}	Hurlbert PIE	Rarefactado S _{obs}	H. PIE rarefactado
Ep 01	21	0.8293	20.9	0.829
Ep 02	22	0.9361	21.9	0.936
Ep 03	13	0.7351	11.7	0.735
Ep 04	24	0.8171	22.2	0.817
Ep 05	22	0.8805	21.2	0.880
Ep 07	13	0.7821	12.9	0.782
Ep 08	20	0.9116	19.2	0.912
Ep 09	13	0.6187	12.4	0.619
Ep 10	23	0.8575	22.4	0.857
Ep 13	16	0.8492	15.9	0.849
Ep 14	32	0.9395	29.3	0.939
Ep 15	28	0.9421	27.3	0.942
Ep 16	18	0.9037	18.0	0.904
Ep 19	29	0.9159	28.0	0.916
Ep 20	25	0.8386	25.0	0.839
Ep 21	15	0.6657	13.1	0.666
Ep 22	16	0.8524	15.9	0.853
Ep 23	20	0.8668	18.7	0.867
Ep27	11	0.7938	10.6	0.794
Ep28	21	0.7866	20.4	0.787
Ep30	14	0.8378	13.2	0.838
Total	166	0.9481	63.3	0.948

Tabla 1. Variación espacial en la diversidad de visitantes flores de *Erysimum popovii*. Se muestra la riqueza observada (número de especies) de visitantes florales y el índice de Hurlbert PIE observado, así como los valores de ambos índices rarefactados a 100 insectos.

Table 1. Spatial variation in the diversity of *Erysimum popovii* floral visitors. It is shown both the observed and the rarefacted values of the Species Richness and Hurlbert PIE index.

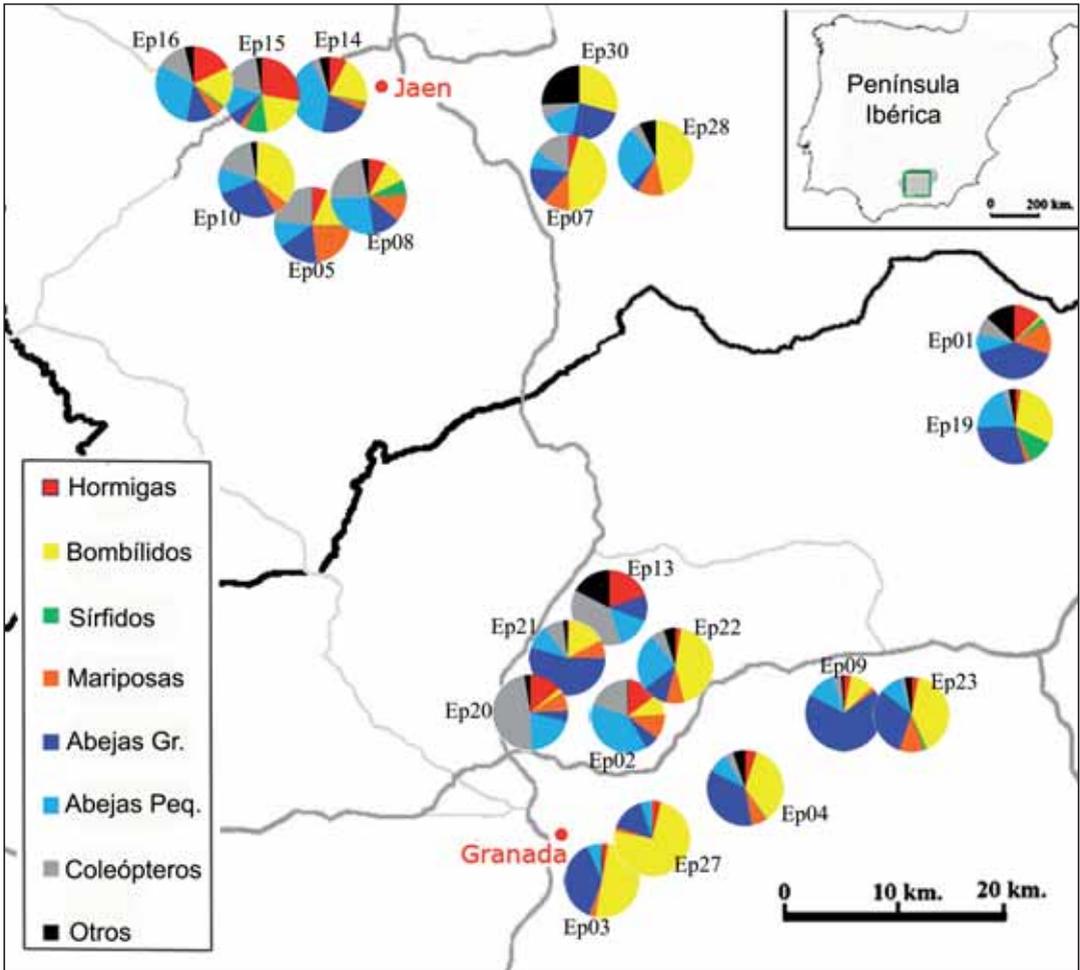


Figura 4. Variación espacial en los grupos funcionales de insectos que visitan las flores de *Erysimum popovii*.

Figure 4. Spatial variation in *Erysimum popovii* floral visitor functional groups.

conjunto de polinizadores de esta especie en el Parque Nacional de Sierra Nevada.

Limitación de polen en especies endémicas y no endémicas

Los resultados relativos a la limitación de polen son muy interesantes (Tabla 2). En primer lugar, nuestros resultados sugieren que el nivel de limitación de polen es análogo entre la especie en-

démica (*E. nevadense*) y las dos especies de amplia distribución.

Para *E. mediohispanicum*, encontramos que manifestaba limitación de polen en todo su ciclo reproductivo, aunque la limitación de polen ocurrió más intensamente durante las fases de fertilización de óvulos y producción de semillas que durante las fases de maduración de frutos o establecimiento de plántulas. Asimismo, encontramos una diferencia entre poblaciones signifi-

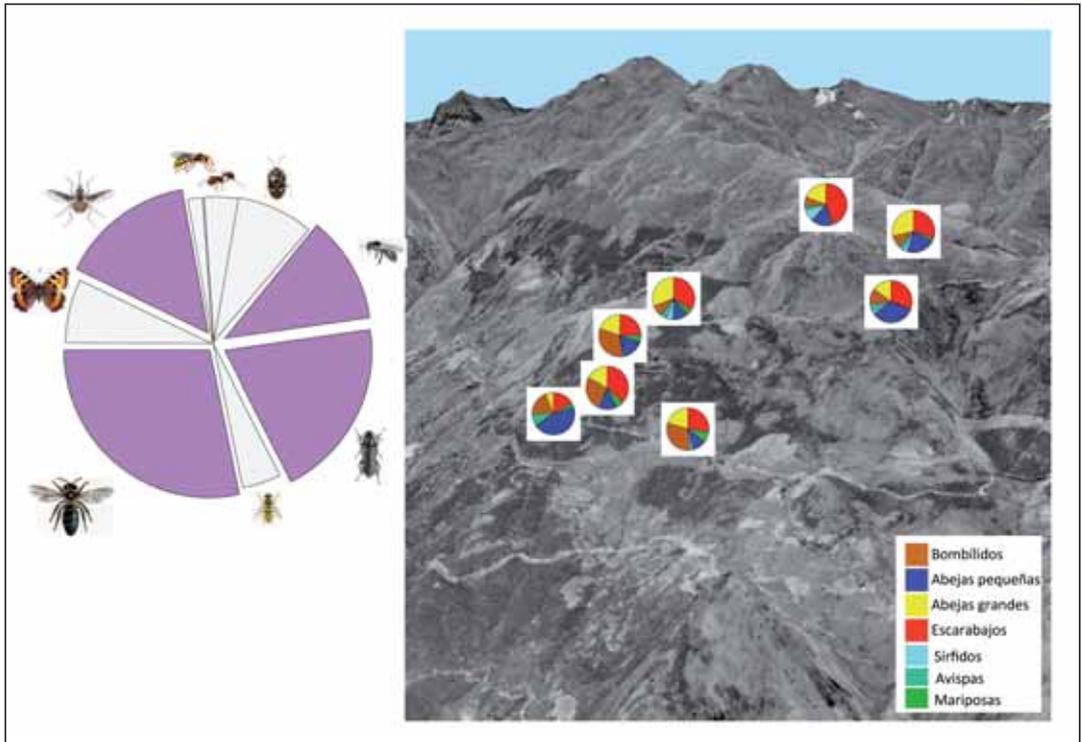


Figura 5. Variación espacial en los grupos funcionales de insectos que visitan las flores de *Erysimum mediohispanicum*.

Figure 5. Spatial variation in *Erysimum mediohispanicum* floral visitor functional groups.

Especie	Población	PL	Intervalo de confianza
<i>Erysimum mediohispanicum</i>			
<i>E. mediohispanicum</i>	Em08	0.16	[0.25, 0.82]
<i>E. mediohispanicum</i>	Em21	0.16	[-0.36, 0.24]
<i>E. mediohispanicum</i>	Em01	0.34	[0.54, 1.00]
<i>E. mediohispanicum</i>	Em22	-0.26	[-0.51, -0.04]
<i>E. mediohispanicum</i>	Em23	0.02	[-0.44, 0.28]
<i>E. mediohispanicum</i>	Em24	0.22	[0.13, 0.63]
<i>E. mediohispanicum</i>	Em25	0.5	[0.5, 0.84]
<i>E. mediohispanicum</i>	Em02	-0.14	[-0.25, 0.66]
<i>E. mediohispanicum</i>	Em17	0.39	[0.19, 1.06]
<i>Erysimum nevadense</i>			
<i>E. nevadense</i>	En11	0.46	[0.38, 1]
<i>E. nevadense</i>	En10	0.16	[-0.09, 1.46]

(Continúa)

Especie	Población	PL	Intervalo de confianza
<i>Erysimum popovii</i>			
<i>E. popovii</i>	Ep01	0.3	[0.19, 0.5]
<i>E. popovii</i>	Ep02	0.4	
<i>E. popovii</i>	Ep03	-0.89	[-0.89, 0.03]
<i>E. popovii</i>	Ep04	0.28	
<i>E. popovii</i>	Ep05	0.36	[0.29, 0.54]
<i>E. popovii</i>	Ep07	-0.25	
<i>E. popovii</i>	Ep08	0.45	[0.27, 0.67]
<i>E. popovii</i>	Ep09	0.14	[-0.07, 0.45]
<i>E. popovii</i>	Ep10	0.39	[0.3, 0.5]
<i>E. popovii</i>	Ep13	-0.15	[-0.02, 0.25]
<i>E. popovii</i>	Ep14	0.12	
<i>E. popovii</i>	Ep15	0.25	[0.05, 0.62]
<i>E. popovii</i>	Ep16	0.35	[0.21, 0.5]
<i>E. popovii</i>	Ep19	0.18	[0.04, 0.29]
<i>E. popovii</i>	Ep20	0.02	[-0.09, 0.19]
<i>E. popovii</i>	Ep21	0.22	[0.07, 0.31]
<i>E. popovii</i>	Ep22	0.17	[-0.01, 0.36]
<i>E. popovii</i>	Ep23	0.36	
<i>E. popovii</i>	Ep27	0.26	
<i>E. popovii</i>	Ep28	0.12	

Tabla 2. Limitación de polen en las tres especies de *Erysimum* estudiadas. Se muestran los valores del índice de PL por población, y el intervalo de confianza generado por bootstrapping. En negrita se muestran aquellas poblaciones donde la limitación de polen fue significativa.

Table 2. Pollen limitation in the three studied species. It is shown the PL index per population, and their confidence intervals generated by bootstrapping. In bold those significantly pollen-limited populations.

cativa en la intensidad de polen. No todas las poblaciones sufrieron limitación de polen con la misma intensidad. Lo más significativo quizás de este estudio es que encontramos que la intensidad de polen poblacional estuvo asociada a la abundancia, diversidad e identidad de los polinizadores locales. Así, la magnitud de la limitación de polen fue mucho mayor en poblaciones con pocos visitantes florales, con poca diversidad de polinizadores, o en aquellas donde los polinizadores menos eficientes, como por ejemplo los escarabajos, eran más abundantes (Fig. 6). Estos resultados sugieren que cualquier empobreci-

miento de la fauna local de polinizadores puede tener unas consecuencias negativas amplificadas sobre la reproducción de las especies de plantas con las que interaccionan.

Para *E. popovii*, llevamos a cabo experimentos de limitación de polen en 21 poblaciones, dentro y fuera del Parque Nacional de Sierra Nevada. Nuestros resultados indican que la reproducción de *E. popovii* está limitada también por la cantidad de polen que reciben los estigmas, y este fenómeno ocurre en casi todas las poblaciones estudiadas (véase la figura 4). Asimismo, la limi-

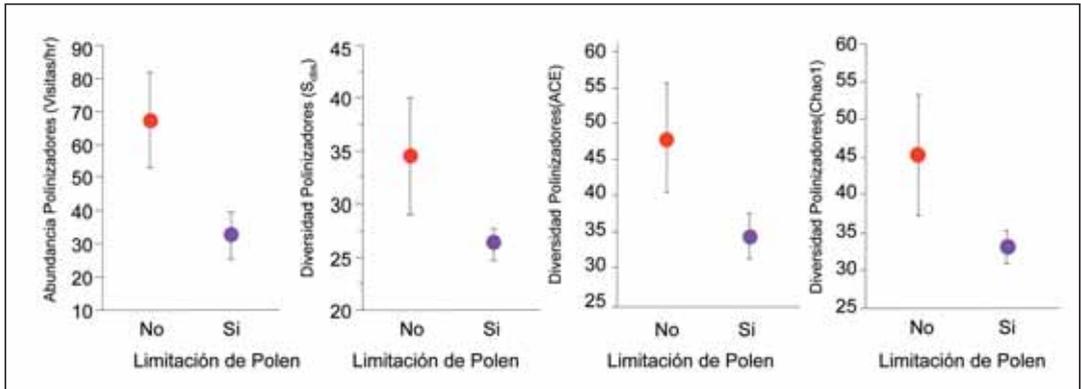


Figura 6. Diferencia en abundancia y diversidad de polinizadores en poblaciones de *Erysimum mediohispanicum* limitadas y no limitadas por la cantidad de polen que aterriza en los estigmas.

Figure 6. Differences in pollinator abundance and diversity between pollen-limited and non pollen-limited *E. mediohispanicum* populations.

tación de polen es aparente sólo durante la fase de producción de semillas, no siendo relevante durante la fase de emergencia y establecimiento de plántulas. También encontramos, como en el caso anterior, que la intensidad de limitación de polen estuvo relacionada con la abundancia de algunos visitantes florales específicos. Así, en aquellas poblaciones donde las moscas de la familia Bombyliidae fueron más frecuentes, la intensidad de limitación de polen fue menor. Por el contrario, insectos tradicionalmente considerados como polinizadores eficientes, como por ejemplo las abejas grandes o las mariposas, no tuvieron un efecto apreciable en la intensidad de limitación de polen que sufren sus plantas nutricias. También observamos que otros factores ajenos a la polinización, como la pluviosidad o la estructura del paisaje acompañante, tuvieron efectos en la intensidad de limitación de polen.

Contactos secundarios y fenómenos de introresión

Ambas especies estudiadas, *E. nevadense* y *E. mediohispanicum* vieron disminuido su éxito reproductivo como consecuencia de los cruces autógamos, ya fuesen estos espontáneos o facilitados (Fig. 7). Sin embargo, encontramos diferencias entre especies en relación al resto de cruces. Así, *E. nevadense* sufrió una depresión por alo-

gama mayor que la sufrida por *E. mediohispanicum*, ya que su éxito reproductivo mermó con mayor intensidad en los cruces alógamos con individuos de otras poblaciones (Fig. 7). Otro resultado interesante lo obtenemos en relación a los cruces híbridos. Como se observa en la Fig. 7, *E. mediohispanicum* polinizado con polen de *E. nevadense* no sufre apenas ninguna reducción en su éxito reproductivo. Por el contrario, la polinización de *E. nevadense* con polen proveniente de *E. mediohispanicum* sí conllevó una disminución en el éxito reproductivo de la especie receptora (Fig. 7). En cruces híbridos, parece que *E. nevadense* puede actuar mejor como padre que *E. mediohispanicum*.

DISCUSIÓN

Sistema de polinización generalista y limitación de polen

Las cuatro especies de plantas estudiadas, sean endémicas o no, se caracterizan por tener un sistema de polinización altamente generalista. Así, el número de visitantes florales de tres de dichas especies fue superior a 100 especies. Es verdad que no todos los visitantes florales se podrán comportar como polinizadores verdaderos. Pero la realidad es que las plantas no parecen poseer mecanismos morfológicos o químicos para detener la visita de los insectos menos eficientes a las flores. De todas

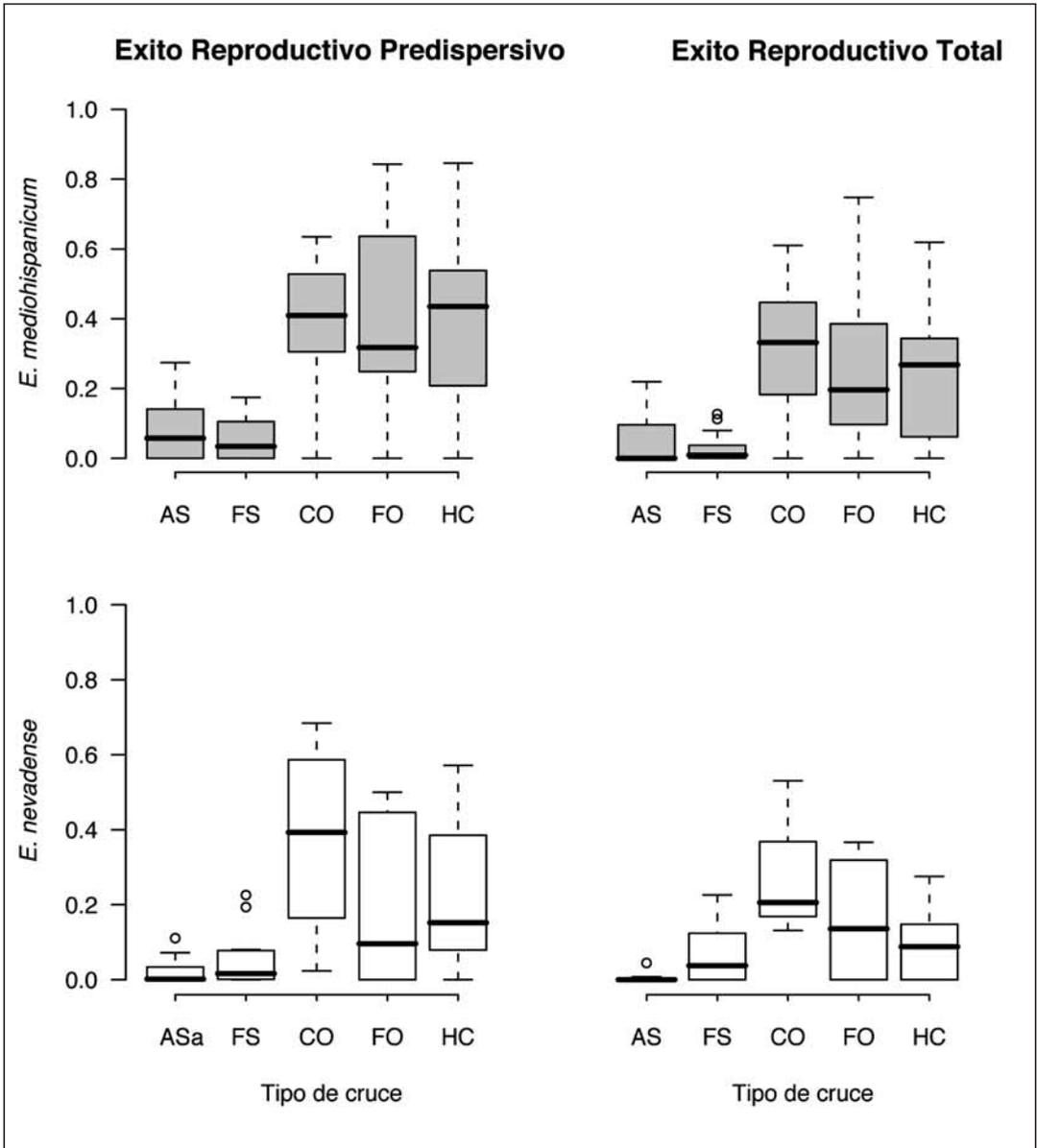


Figura 7. Efecto de diferentes cruces reproductivos en el éxito reproductivo de *Erysimum mediohispanicum* y *Erysimum nevadense*. AS = Autogamia espontánea, FA = Autogamia facilitada, CO = Alogamia intrapoblacional, FO = Alogamia interpoblacional, HC = Hibridación con polen de la otra especie.

Figure 7. *Erysimum mediohispanicum* and *E. nevadense* breeding system. AS= Spontaneous autogamy; FA= Facilitated autogamy; CO= Intrapopulation outcrossing; FO= Interpopulation outcrossing; HC=Interspecific hybridization.

formas, parece que las flores de las especies endémicas son visitadas por menos especies de insectos que las flores de las especies no endémicas. Esta diferencia en diversidad de visitantes florales puede ser quizás una consecuencia de la diferencia en el hábitat ocupado por cada especie de planta. Mientras que las dos especies no endémicas viven en zonas de media montaña en claros de bosques de quercíneas y pinos, las dos especies endémicas viven en pastos y laderas secas de alta montaña, por encima del límite forestal. Este tipo de hábitat se caracteriza por unas condiciones ambientales duras, donde las alteraciones térmicas son frecuentes y bruscas y el viento sopla constantemente. En este tipo de hábitat la diversidad de insectos es menor, lo que puede redundar en una menor oferta de polinizadores. A pesar de ello, las especies de *Erysimum* endémicas son visitadas por un alto número de insectos, y pueden también ser consideradas generalistas.

Todas las especies de plantas estudiadas se caracterizaron por tener un conjunto de polinizadores altamente variable en el espacio. Dentro del Parque Nacional de Sierra Nevada, poblaciones de plantas de la misma especie separadas tan sólo unos cientos de metros entre sí fueron polinizadas por insectos muy diferentes. En todos los casos el gremio de polinizadores estuvo compuesto por una mezcla de especies de insectos eficientes como vectores polínicos (abejas, mariposas, bombílidos) y especies de insectos poco eficientes (escarabajos, sírfidos, avispas, hormigas, chinches). En resumen, como vemos en estos datos, parece que las flores de las dos especies de *Erysimum* endémicas están primordialmente visitadas por hormigas, pequeños escarabajos y moscas, mientras que las flores de las dos especies de plantas no endémicas son visitadas con más frecuencia por abejas grandes, bombílidos y sírfidos. Estos últimos son polinizadores más eficientes que los primeros. Así, cuando agrupamos por grupos funcionales, encontramos que las abejas grandes y los bombílidos efectúan más del 50% de las visitas a flores de *E. popovii* y *E. mediodihspanicum*, mientras que las moscas, escarabajos y hormigas efectúan más de la mitad de las visitas a flores de *E. baeticum* y *E. nevadense*. Varias razones pueden explicar esta diferencia en la identidad de los principales visitantes florales, y

de nuevo pensamos que la principal está relacionada con la diferencia en el hábitat ocupado por cada especie de planta. En los hábitats alpinos los insectos más frecuentes son en general pequeños dípteros y escarabajos. Esto puede provocar que su presencia en las flores de especies generalistas, como las estudiadas aquí, sea proporcionalmente mayor que en zonas no alpinas. Es decir, las flores de las especies de *Erysimum* endémicas de las altas cumbres de Sierra Nevada están simplemente siendo visitadas por estos insectos más frecuentes en esas zonas.

Todas las especies estudiadas han mostrado una limitación en la producción de semilla producida por la llegada insuficiente de granos de polen (limitación de polen). Este fenómeno ha estado asociado en todos los casos a una depauperación del gremio de visitantes florales en abundancia, diversidad y presencia de polinizadores eficientes. Es curioso notar que el nivel de limitación de polen ha sido análogo en especies no endémicas y especies endémicas, a pesar de la diferencia en diversidad y composición de sus respectivos conjuntos de visitantes florales. Y en todos los casos la limitación por polen se ha manifestado en las fases predispersivas del ciclo vital de las plantas (producción de semillas) más que en las fases postdispersivas (establecimiento de plántulas), fenómeno indicativo de una limitación de polen cuantitativa. Este resultado sugiere que la abundancia de visitantes florales más que las eficiencias de dichos visitantes es el mecanismo que está detrás de la limitación de polen observada. Por lo tanto, pensamos que una gestión eficiente de los polinizadores, ya sea beneficiando su abundancia y diversidad mediante el manejo de hábitat o limitando la acción de los factores que acaban con sus poblaciones, es necesario para mantener las poblaciones de plantas estudiadas. En caso contrario, debido a una disminución paulatina en la producción de semillas, existe un alto riesgo de que las poblaciones de plantas más pequeñas acaben extinguiéndose dentro del Parque Nacional. La gestión de las poblaciones de plantas conlleva irremediablemente la gestión adecuada de todos sus organismos mutualistas.

Hemos comprobado que la producción de semillas de las plantas y la tasa de reclutamiento de

las poblaciones de *Erysimum* se relacionan muy intensamente con la diversidad de polinizadores que visitan sus flores. Existe una diversidad óptima, donde la reproducción de las plantas es máxima. Por debajo de esta diversidad, la producción de semillas cae estrepitosamente. De hecho, la reproducción de las plantas estudiadas está significativamente relacionadas con la diversidad de polinizadores que visitan sus flores. Por ello, una disminución antrópica de la diversidad y abundancia de polinizadores altimontanos nevadenses puede acarrear una cascada de efectos negativos que termine en una disminución de la producción de semillas y un incremento de la probabilidad de extinción de las poblaciones. Como caso de estudio concreto de aplicación de nuestro estudio, llevamos a cabo un muestreo en 41 poblaciones de *E. popovii*, algunas de ellas dentro de espacios protegidos y otras en zonas sin protección alguna. El resultado encontrado fue muy interesante. La diversidad y abundancia de polinizadores fue significativamente mayor en las poblaciones ubicadas dentro de espacios protegidos. Esto puede beneficiar a la producción de semillas de las plantas. Sin embargo, el daño por ungulados domésticos fue, contra todo pronóstico, mayor en zonas protegidas que en zonas sin protección. Como consecuencia, a pesar del beneficio que supone el aumento de polinizadores en zonas protegidas, si este beneficio no viene acompañado de una gestión integral de todos los factores que determinan el éxito reproductivo de las plantas, las consecuencias para la conservación de las plantas endémicas en los parques nacionales son impredecibles.

Introgresión y conservación de plantas montanas bajo un escenario de calentamiento global

Una consecuencia que queremos resaltar de nuestros experimentos está relacionada con el resultado proveniente del experimento de cruces dirigidos. Este muestra que la hibridación entre especies de amplia distribución y que habitan las zonas de baja y media montaña con especies endémicas de la alta montaña nevadense es posible. Más aún, parece que el flujo de polen es

principalmente desde las especies no endémicas a las especies endémicas. Este resultado sugiere la posibilidad de que se dé un fenómeno de introgresión de la especie no endémica en el pool genético de las especies endémicas.

Una especial amenaza que se cierne actualmente sobre los ecosistemas montanos en zonas mediterráneas es la potencial “mediterrización” de los pisos alpinos como consecuencia del calentamiento global. Este fenómeno se refiere al hecho de que, asociado a las subidas de las temperaturas como consecuencia del cambio climático, hay un desplazamiento altitudinal de las comunidades vegetales y animales. Especies que en la actualidad se distribuyen en un determinado rango altitudinal podrán en el futuro medrar a mayores altitudes, debido a que las condiciones ecológicas de estas zonas altas serán similares a las condiciones actuales en zonas más bajas. De hecho, el área de distribución óptima de las especies vegetales del Mediterráneo occidental ha subido durante el pasado siglo una media de 29 metros por década (LENOIR *et al.* 2008). Una consecuencia inmediata de esta elevación de especies de zonas bajas y su colonización de tierras altas es la aparición de nuevas interacciones entre especies que hasta la actualidad estaban separadas por sus diferentes requerimientos ecológicos (HÓDAR *et al.* 2004). Así, por ejemplo HÓDAR *et al.* (2003) y HÓDAR & ZAMORA (2004) han mostrado que el cambio climático ha provocado una elevación en el área de distribución de la procesionaria del pino. Como consecuencia de este cambio altitudinal, este insecto está ahora atacando poblaciones autóctonas de *Pinus sylvestris* subsp *nevadensis* que hasta hace poco tiempo estaban libres de esta plaga por habitar zonas altas por encima del área de distribución histórica del insecto. Estas nuevas interacciones pueden en muchos casos ser nefastas para alguno de los contendientes, provocando una dramática disminución en sus poblaciones que puede incluso acarrear la extinción (GÓNZALEZ-MEGÍAS *et al.* 2008).

Una consecuencia del calentamiento global en zonas de montaña que está pasando desapercibida es la derivada del hecho de que dicho calentamiento va a propiciar el contacto de especies

que están relacionadas taxonómicamente, que han compartido una larga historia evolutiva, pero que han permanecido ecológicamente separadas por habitar en diferentes franjas altitudinales. Cuando esto ocurre, se da la posibilidad de que ambos taxones hibriden, sobre todo si estas especies aún no se han diferenciado totalmente y no han generado barreras de entrecruzamiento severas. Bajo estas condiciones, se puede dar flujo génico entre individuos de diferentes especies, que conduce a la formación de híbridos y al posterior flujo de genes de una especie a la otra, un fenómeno denominado introgresión (ALLEN-DORF *et al.* 2001). En la actualidad estamos presenciando el contacto secundario por causas antropogénicas directas o indirectas en muchas zonas del planeta entre especies que han permanecido durante gran tiempo en alopatria (VILÁ *et al.* 2000). Así, la acción directa del hombre, en forma de movimiento accidental o intencionado de especies entre áreas geográficas separadas está originando la reunión de especies hermanas que han permanecido separadas durante algún tiempo (ALLEN-DORF *et al.* 2001). De una forma más sutil, los efectos a escala planetaria de la actividad humana, como el cambio climático o la modificación del hábitat, están originando alteraciones importantes en el área de distribución de muchas especies, lo que está conllevando su encuentro casual con especies hermanas de las que estaban separadas tan sólo por diferentes requerimientos ecológicos. Un caso clásico es la casi extinción del lobo rojo *Canis rufus* de los bosques templados del este de Norteamérica debido entre otras cosas a la introgresión con el coyote *Canis latrans*, que se ha extendido hacia el este durante los últimos doscientos años desde los espacios abiertos del Oeste siguiendo la estela de deforestación creada por los humanos (WAYNE & JENS 1991).

Las consecuencias de estos contactos secundarios son impredecibles, debido a la ausencia de datos empíricos (ALLEN-DORF *et al.* 2001). Los peligros derivados de la hibridación son mayores para especies endémicas de distribución restringida que entran en contacto con especies de amplia distribución, ya que dichas especies endémicas suelen caracterizarse por estar constituidas por pocas poblaciones con bajo número de efectivos donde

los fenómenos de endogamia, deriva genética y flujo génico interespecífico son más acusados (ELLSTRAND & ELAM 1993), y por tanto es más fácil la extinción de poblaciones pequeñas por hibridación e introgresión (SIMBERLOFF 1996, RHYMER & SIMBERLOFF 1996). En general, los biólogos de la conservación han infraestimado la severidad del problema, y no han prestado mucha atención a las posibles consecuencias de la introgresión entre taxones relacionados.

Este fenómeno es especialmente frecuente en la flora mediterránea, donde muchos grupos de especies representan linajes altamente diversificados en un tiempo reciente (VALENTE *et al.* 2010), y donde en algunos casos no se ha desarrollado un aislamiento reproductivo completo entre taxones hermanos. El Parque Nacional de Sierra Nevada es especialmente propenso a padecer problemas de conservación derivados de fenómenos de hibridación e introgresión. Esto es así porque su flora está constituida principalmente por especies de origen mediterráneo que se han adaptado a ambientes alpinos y altimontanos. Esto significa que estas especies comparten ancestros y están relacionadas con taxones vegetales que habitan las zonas de media o baja montaña, de clima mediterráneo. Existen además estudios que demuestran que muchas especies nevadenses están ascendiendo durante las últimas décadas y se espera que continúen haciéndolo. Todo esto crea el escenario apropiado para que se dé un contacto secundario entre especies relacionadas taxonómica y evolutivamente pero que habían permanecido separadas durante los últimos miles de años, con consecuencias difíciles de predecir. Nuestro estudio sugiere que este proceso puede estar ocurriendo ya en Sierra Nevada, donde especies de plantas endémicas que comparten polinizadores generalistas con plantas relacionadas no endémicas pueden estar hibridando. Y nuestros datos sugieren también que el flujo génico es más intenso desde la especie no endémica hacia la especie endémica que al contrario. Esta situación indica que la conservación de las especies endémicas de plantas que habitan la alta montaña Mediterránea se torna una tarea ardua donde es necesario tener un conocimiento profundo de su ecología y genética reproductiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELAZIZ, M., LORITE, J., MUÑOZ-PAJARES, A.J., HERRADOR, M.B., PERFECTTI, F. & GÓMEZ, JOSÉ M. 2011. Using complementary techniques to distinguish cryptic species: A new *Erysimum* (Brassicaceae) species from North Africa. *American Journal of Botany* 98: 1049–1060.
- AGUILAR, R. & GALETTO, L. 2004. Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Oecologia* 138: 513–520.
- AIZEN, M.A., ASHWORTH, L. & GALETTO, L. 2002. Reproductive success in fragmented habitats: do compatibility systems and pollination specialization matter? *Journal of Vegetation Science* 13: 885–892.
- AIZEN, M.A. & FEINSINGER, P. 1994. Forest Fragmentation, Pollination, and Plant Reproduction in a Chaco Dry Forest, Argentina. *Ecology* 75: 330–351.
- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716–723.
- ALLERNDORF, F.W., LEARY, R. F., SPRUELL, P. & WENBURG, J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends. Ecol. Evol.* 16: 615–622.
- ARROYO, M.T.K., ARMESTO, J.J. & PRIMACK, R.B. 1985. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. *Plant Systematics and Evolution* 149: 187–203.
- ARROYO, M.T.K., PRIMACK, R. & ARMESTO, J. 1982. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile. I. Pollination mechanisms and altitudinal variation. *American Journal of Botany* 69: 82–97.
- ASHMAN, T.-L., KNIGHT, T.M., STEETS, J.A., AMARASEKARE, P., BURD, M., CAMPBELL, D.R., DUDASH, MICHELE R., JOHNSTON, M.O., MAZER, S.J., MITCHELL, R.J., MORGAN, M.T. & WILSON, W.G. 2004. Pollen limitation of plant reproduction: Ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* 85: 2408–2421.
- ASHWORTH, L., AGUILAR, R., GALETTO, L. & AIZEN, M. A. 2004. Why do pollination generalist and specialist plant species show similar reproductive susceptibility to habitat fragmentation? *Journal of Ecology* 92: 717–719.
- BENISTON, M., DIAZ, H.F. & BRADLEY, R.S. 1997. Climatic change at high elevation sites: An overview. *Climatic Change* 36: 233–251.
- BERGMAN, P., MOLAU, U. & HOLMGREN, B. 1996. Micrometeorological impacts on insect activity and plant reproductive success in an alpine environment, Swedish Lapland. *Arctic and alpine research* 28: 196–202.
- BERRY, P.E. & CALVO, R.N. 1991. Pollinator limitation and position dependent fruit set in the high Andean orchid *Myrosmodes cochleare* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 174: 93–101.
- BINGHAM, R.A. & ORTHNER, A.R. 1998. Efficient pollination of alpine plants. *Nature* 391: 238–239.
- Falta Blanca et al. 2002
- BLIONIS, G.J. & VOKOU, D. 2001. Pollination ecology of *Campanula* species on Mt Olympos, Greece. *Ecography* 24: 287–297.
- BLIONIS, G.J. & VOKOU, D. 2002. Structural and functional divergence of *Campanula spatulata* subspecies on Mt Olympos (Greece). *Plant Systematics and Evolution* 232: 89–105.
- BOND, W.J. 1994. Do mutualisms matter? Assessing the impact of pollinator and disperser disruption on plant extinction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 344: 83–90.
- BUCHMANN, S.L. & NABHAN, G.P. 1997. *The Forgotten Pollinators*. Island Press, Washington.
- BUCKLEY, Y.M. & KELLY, C.K. 2003. Comparison of population structures and ecology of a congeneric pair of common and rare neotropical tree species. *Plant Ecology* 167: 45–56.

- BURD, M. 1994. Bateman's principle and plant reproduction: The role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review* 60: 83–139.
- BYERS, D.L. & WALLER, D.M. 1999. Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 479–513.
- CAMPBELL, D.R. 1987. Interpopulational variation in fruit production: The role of pollination-limitation in the Olympic Mountains. *American Journal of Botany* 74: 269–273.
- CAMPBELL, D.R. 1991. Effects of floral traits on sequential components of fitness in *Ipomopsis aggregata*. *The American Naturalist* 137: 713–737.
- CASTRESANA, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540–552.
- COLLING, G., RECKINGER, C. & MATTHIES, D. 2004. Effects of pollen quantity and quality on reproduction and offspring vigor in the rare plant *Scorzonera humilis* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 91: 1774–1782.
- DUPONT, Y.L., HANSEN, D.M. & OLESEN, J.M. 2003. Structure of a plant–flower visitor network in the high-altitude sub-alpine desert of Tenerife, Canary Islands. *Ecography* 26: 301–310.
- ECKERT, C.G., KALISZ, S., GEBER, M.A., SARGENT, R., ELLE, E., CHEPTOU, P.-O., GOODWILLIE, C., JOHNSTON, M.O., KELLY, J.K., MOELLER, D.A., PORCHER, E., REE, R.H., VALLEJO-MARÍN, M. & WINN, A.A. 2010. Plant mating systems in a changing world. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 35–43.
- ELBERLING, H. & OLESEN, J.M. 1999. The structure of a high latitude plant flower visitor system: The dominance of flies. *Ecography* 22: 314–323.
- ELLSTRAND, N.C. & ELAM, D. R. 1993. Population genetics consequences of small population size: implications for plant conservation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24: 217–242.
- ERIKSEN, B., MOLAU, U. & SVENSSON, M. 1993. Reproductive strategies in two arctic *Pedicularis* species (Scrophulariaceae). *Ecography* 16: 154–166.
- FAO. 2002. Año Internacional de las Montañas. Documento de Conceptos. Servicio de Publicaciones y Multimedia de la Dirección de Información de la FAO, Roma.
- FISCHER, M. & MATTHIES, D. 1997. Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany* 84: 1685–1692.
- FLEURY, J.M. 1999. Mountain Biodiversity at Risk. The International Development Research Centre Briefings.No. 2, (http://web.idrc.ca/es/ev-25646-201-1-DO_TOPIC.html).
- FOSTER, P. 2001. The potential negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth-Science Reviews* 55: 73–106.
- GALEN, C. 1985. Regulation of seed-set in *Polemonium viscosum*: Floral scents, pollination, and resources. *Ecology* 66: 792–797.
- GÓMEZ, J., BOSCH, J., PERFECTTI, F., FERNÁNDEZ, J. & ABDELAZIZ, M. 2007. Pollinator diversity affects plant reproduction and recruitment: the tradeoffs of generalization. *Oecologia* 153: 597–605.
- GÓMEZ, J.M. & ZAMORA, R. 1992. Pollination by ants: Consequences of the quantitative effects on a mutualistic system. *Oecologia* 91: 410–418.
- GÓMEZ, J.M. & ZAMORA, R. 1999. Generalization vs. specialization in the pollination system of *Hor-mathophylla spinosa* (Cruciferae). *Ecology* 80: 796–805.
- GÓMEZ, J.M., ZAMORA, R., HÓDAR, J.A. & GARCÍA, D. 1996. Experimental study of pollination by ants in Mediterranean high mountain and arid habitats. *Oecologia* 105: 236–242.
- GONZÁLEZ-MEGÍAS, A., GÓMEZ, J.M. & SÁNCHEZ-PIÑERO, F. 2008. Factors determining beetle richness and composition along an altitudinal gradient in the high mountains of the Sierra Nevada National Park (Spain). *Ecoscience* 15: 429–441
- GOTELLI, N.J., COLWELL, R.K. 2001. Quantifying biodiversity, procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letter* 4: 379–391.

- GOTELLI, N.J., ENTSMINGER, D.F. 2005. EcoSim, Null models software for ecology, v 7.72 Acquired Intelligence Inc.
- HAINSWORTH, F.R., WOLF, L.L. & MERCIER, T. 1985. Pollen limitation in a monocarpic species, *Ipomopsis aggregata*. *Journal of Ecology* 73: 263–270.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- HÓDAR, J.A., CASTRO, J. & ZAMORA, R. 2003. Pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* as a new threat for relict Mediterranean Scots pine forests under climatic warming. *Biological Conservation* 110: 123–129
- HÓDAR, J.A., ZAMORA, R., CASTRO, J. & BARAZA, E. 2004. Feast and famine: previous defoliation limiting survival of pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* in Scots pine *Pinus sylvestris*. *Acta Oecologica* 26: 203–210.
- HÓDAR, J.A. & ZAMORA, R. 2004. Herbivory and climatic warming: a Mediterranean outbreaking caterpillar attacks a relict, boreal pine species. *Biodiversity and Conservation* 13: 493–500.
- KASAGI, T. & KUDO, G. 2003. Variations in bumble bee preference and pollen limitation among neighboring populations: Comparisons between *Phyllodoce caerulea* and *Phyllodoce aleutica* (Ericaceae) along snowmelt gradients. *American Journal of Botany* 90: 1321–1327.
- KEARNS, C.A. 1992. Anthophilous fly distribution across an elevation gradient. *American Midland Naturalist* 127: 172–182
- KEARNS, C.A. & INOUE, DAVID W. 1994. Fly pollination of *Linum lewisii* (Linaceae). *American Journal of Botany* 81: 1091–1095.
- KELLER, L.F. & WALLER, D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 230–241.
- KESSLER, M. 2000. Elevational gradients in species richness and endemism of selected plant groups in the central Bolivian Andes. *Plant Ecology* 149: 181–193.
- KLEIN, J.A., HARTE, J. & ZHAO, X. 2004. Experimental warming causes large and rapid species loss, dampened by simulated grazing, on the Tibetan Plateau. *Ecology Letters* 7: 1170–1179.
- KÖRNER, C. 2003. *Alpine plant life: Functional plant ecology of high mountain ecosystems*. 2nd ed., Springer.
- KÖRNER, C. 2004. Mountain biodiversity, its causes and function. *Ambio Spec No* 13: 11–17.
- KÖRNER, C. & SPEHN, E.M. 2002. *Mountain Biodiversity: A Global Assessment*. 1.^a ed., CRC Press.
- KOZAK, J. 2003. Forest cover change in the Western Carpathians in the past 180 years. *Mountain Research and Development* 23: 369–375.
- KRUCKEBERG, A.R. & RABINOWITZ, D. 1985. Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 447–479.
- KUDO, G. 1993. Relationships between flowering time and fruit set of the entomophilous Alpine shrub, *Rhododendron aureum* (Ericaceae), inhabiting snow patches. *American Journal of Botany* 80: 1300–1304.
- LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J. & HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- LAVERGNE, S., THOMPSON, J.D., GARNIER, E. & DEBUSSCHE, M. 2004. The biology and ecology of narrow endemic and widespread plants: A comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *Oikos* 107: 505–518.
- LENOIR, J., GÉGOUT, J. C., MARQUET, P. A., DE RUFFRAY, P. & BRISSE H., 2008. A significant upward shift in plant species optimum elevation during the 20th Century. *Science* 320: 1768–1771.
- MACDONALD, D., CRABTREE, J., WIESINGER, G., DAX, T., STAMOU, N., FLEURY, P., GUTIERREZ LAZPITA, J. & GIBON, A. 2000. Agricultural abandonment in mountain areas of Europe: Environmental consequences and policy response. *Journal of Environmental Management* 59: 47–69.

- MCCALL, C. & PRIMACK, R.B. 1992. Influence of flower characteristics, weather, time of day, and season on insect visitation rates in three plant communities. *American Journal of Botany* 79: 434–442.
- MEDAN, D. 2003. Reproductive biology of the Andean shrub *Discaria nana* (Rhamnaceae). *Plant Biology* 5: 94–102.
- MESSERLI, B. & IVES, J.D. 1997. Mountains of the world: A global priority. Parthenon Pub. Group.
- MOLAU, ULF. 2004. Mountain biodiversity patterns at low and high latitudes. *Ambio Spec No* 13: 24–28.
- MURCIA, C. 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. *En: J. Schelhas & R. Greenberg (eds.) Forest Patches in Tropical Landscapes*. Island Press, Washington, p.19–36.
- MURRAY, B.R., THRALL, P.H., GILL, A.M. & NICOTRA, A.B. 2002. How plant life-history and ecological traits relate to species rarity and commonness at varying spatial scales. *Austral Ecology* 27: 291–310.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B. DA & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- NIETO FELINER, G. 1993. *Erysimum*. *En: Castroviejo et al. (eds) FLORA IBERICA (VOL. IV): CRUCIFERAE-MONOTROPACEAE*. 2.^a ed., CSIC, Madrid.
- NYLANDER, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- OLMSTEAD, R.G. & SWEERE, J.A. 1994. Combining data in phylogenetic systematics: An empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Systematic Biology* 43: 467–481.
- PARKER, M.A. 1992. Outbreeding depression in a selfing annual. *Evolution* 46: 837–841.
- PEAKALL, R., HANDEL, S. & BEATTIE, A. J. 1991. The evidence for, and importance of, ant pollination. *En: Huxley, C. R. & Cutler, D. F. (eds.) Ant-plant interactions*. Oxford University Press, Oxford, p.421–428.
- PEREZ DE PAZ, J. 2002. La biología reproductiva: Importancia y tipos de estudio. *En: Bañares Baudet, A. (ed.) Biología de la conservación de plantas amenazadas*. Ministerio Medio Ambiente, Madrid, p.71–132.
- POSADA, D. & CRANDALL, K.A. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics (Oxford, England)* 14: 817–818.
- PUTERBAUGH, M.N. 1998. The Roles of Ants as Flower Visitors: Experimental Analysis in Three Alpine Plant Species. *Oikos* 83: 36–46.
- RAMBAUT, A & DRUMMOND, A.J. 2007. Tracer v1.4. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics (Oxford, England)* 19: 1572–1574.
- RHYMER, J., & SIMBERLOFF, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:83–109.
- SIMBERLOFF, D. 1996. Hybridization between native and introduced wildlife species: importance for conservation. *Wildl. Biol.* 2: 143–150.
- SPIRA, T.P. & POLLAK, O.D. 1986. Comparative reproductive biology of Alpine biennial and perennial gentians (*Gentiana*: Gentianaceae) in California. *American Journal of Botany* 73: 39–47.
- STENSTRÖM, M. & MOLAU, ULF. 1992. Reproductive ecology of *Saxifraga oppositifolia*: Phenology, mating system, and reproductive success. *Arctic and Alpine Research* 24: 337–343.
- TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G. & BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.
- TEPEDINO, V. J. 2000. The reproductive biology of rare rangeland plants and their vulnerability to insecticides. *En: G.L. Cunningham & M.W. Sampson (eds.) Grasshopper integrated pest management handbook III*. USDA APHIS Tech. Bull. Washington, p.5: 1–10.

- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- TOTLAND, Ø. 1994. Intra-seasonal variation in pollination intensity and seed set in an Alpine population of *Ranunculus acris* in southwestern Norway. *Ecography* 17: 159–165.
- TOTLAND, Ø. 1997. Effects of flowering time and temperature on growth and reproduction in *Leontodon autumnalis* var. *taraxaci*, a late-flowering Alpine plant. *Arctic and Alpine Research* 29: 285–290.
- TOTLAND, Ø. 2001. Environment-dependent pollen limitation and selection on floral traits in an alpine species. *Ecology* 82: 2233–2244.
- TOTLAND, Ø., ANDERSEN, H.L., BJELLAND, T., DAHL, V., EIDE, W., HOUGE, S., PEDERSEN, T.R. & VIE, E.U. 1998. Variation in pollen limitation among plants and phenotypic selection on floral traits in an early-spring flowering herb. *Oikos* 82: 491–501.
- VALENTE, L.M., SAVOLAINEN, V. & VARGAS, P. 2010. Unparalleled rates of species diversification in Europe. *Proceedings of the Royal Society B* 277: 1489–1496
- VILÀ, M., WEBER, E., & D'ANTONIO, C.M. 2000. Conservation implications of invasion by plant hybridization. *Biol. Inv.* 2: 207–217.
- WAYNE, R.K. & JENKS, S.M. 1991. Mitochondrial DNA analysis implying extensive hybridization of the endangered red wolf *Canis rufus*. *Nature* 351, 565–568
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *En: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (eds.) PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, p.315–322.*
- WILCOCK, C. & NEILAND, R. 2002. Pollination failure in plants: Why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* 7: 270–277.
- YANG, X. & XU, M. 2003. Biodiversity conservation in Changbai Mountain Biosphere Reserve, North-eastern China: Status, problem, and strategy. *Biodiversity and Conservation* 12: 883–903.
- YANG, Z. & RANNALA, B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo Method. *Molecular Biology and Evolution* 14: 717–724.
- ZIMMERMAN, M. & PYKE, G.H. 1988. Reproduction in *Polemonium*: Assessing the Factors Limiting Seed Set. *The American Naturalist* 131: 723–738.