

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Parasitología, Ecología y Genética  
(Área de Ecología)



**TESIS DOCTORAL / PhD THESIS**

---

Aplicabilidad del concepto de “código de barras de ADN” a la flora endémica de Canarias/ Applicability of the “DNA barcoding” concept to the endemic flora of the Canary Islands

**AUTORA:**  
**Ruth Jaén Molina**

**DIRECTOR:**  
**Juli Caujapé Castells**

**AÑO 2014**



## INFORME FAVORABLE DE LECTURA DEL DIRECTOR

## INFORME FAVORABLE DEL TUTOR

*A mis padres*

*A Ryan y Joaquim*

*A "pesqui"*

*Sitios queridos de las nueve musas  
en cuyos frondosísimos andenes  
paseó de su numen agitado  
el divino Cairasco tantas veces.  
¡Montaña de Doramas deliciosa!  
¿Quién robó la espesura de tus sienas?  
¿Qué hiciste de tu noble barbusano?  
Tu palo blanco ¿qué gusano aleve  
le consumió? Yo vi el honor y gloria  
de tus tilos caer sobre tus fuentes.....*

**(D. José Viera y Clavijo)**

## **AGRADECIMIENTOS**

Son tantos los que han colaborado en esta tesis, unos de una forma más directa y otros incluso sin saberlo, que casi por cada letra del abecedario tengo al menos un agradecimiento. El viaje para llegar hasta aquí ha sido largo, en ocasiones muy duro, pero realmente ha merecido la pena porque ha sido muy enriquecedor. A nivel profesional me ha permitido conocer a grandes expertos e investigadores de nuestra rica flora canaria y de la macaronésica, con los que he compartido experiencias e intereses y de los que he aprendido muchísimo. A nivel personal, me ha permitido conocer a grandes personas, algunas de las cuales se han convertido en grandes amigos. Por ello, a todas las personas e instituciones que han contribuido en esta tesis doctoral, sinceramente, ¡GRACIAS!

### **Agradecimientos de la *A* a la *Z*:**

Águedo Marrero, Alfredo Reyes y Arnoldo Santos, por su ayuda en la recolección de muestras, por compartir sus conocimientos taxonómicos sobre la flora canaria y/o macaronésica, por su amistad y cariño. Ángel Fernández (y su equipo de guardas, técnicos y compañeros del P.N. de Garajonay), Ángel Bañares (y sus inseparables Eduardo Carqué y Manolo Marrero en el P.N. del Teide) y Ángel Palomares (Gustavo Balsera y Aurelio Acebedo de su equipo en el P.N. de La Caldera de Taburiente) por su buena disposición en la recogida de muestras y por hacerme sentir tan bien acogida en los distintos parques nacionales canarios.

Bob Jansen (Dr. Robert K. Jansen y su grupo en la Universidad de Austin en Texas, especialmente a Romey, Christine, Katie, Bill, Theresa y Frances), por su generosidad en lo científico y en lo personal. Por poner, desde el primer momento, todos los medios posibles para hacer que mi estancia en Austin fuera fácil. Por darme la oportunidad de vivir una experiencia tan importante, para mí, tanto desde el punto de vista profesional como humano. Las palabras se quedan cortas para todo lo que tengo que agradecerle.

Compañeros en el Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”: biólogos, becarios, personal administrativo, jardineros (especialmente a Pepe Cruz, Antonio y Rafael), etc. A todos aquellos con los que, a lo largo de todos estos años, he compartido mucho, tanto fuera como dentro del laboratorio. Especialmente, a Magui por recoger muchas de las muestras de la RBGC analizadas en este trabajo (en algunos casos “haciendo virguerías”) y, a Carlos por ayudarme con los archivos para las estimaciones de PD con el programa PDA; al Cabildo Insular de Gran Canaria, primero por concederme varias becas de investigación y, posteriormente, por contratarme para desarrollar asistencias técnicas o para llevar a cabo actividades dentro de proyectos de investigación que han culminado en esta tesis.

**David Bramwell**, porque mientras fue director del Jardín Canario me permitió desarrollar prácticas cuando todavía era estudiante en la ULL y, luego, una vez licenciada desarrollar distintos proyectos de investigación; **David Padilla**, por ayudarme a “sobrevivir” en un caluroso mes de Julio, haciendo mucho más llevaderas las horas de teoría y prácticas del curso de postgrado “Filogenias y Genealogías de DNA: Reconstrucción y Aplicaciones” en la Universidad de Barcelona.

**Eugenio Reyes**, por tener siempre palabras de apoyo y ánimo. Por su interés en mi futuro profesional. Por sus continuos ofrecimientos para hacer de “canguro” de Joaquim.

**Fernando** (D. Fernando Martínez, mi profesor de biología en bachillerato) porque supo transmitirme tanto su pasión como su curiosidad por la biología, haciendo que quisiera seguir sus pasos y, que varios años más tarde me convirtiera en bióloga; **Francisco Javier Ortega**, porque siempre me ha servido de inspiración. Admiro su brillantez y su dedicación a la ciencia que le ha llevado a tener que renunciar a vivir en su tierra pero que le ha convertido en un referente internacional; **Fran Sosa**, por pasarme el testigo con el proyecto sobre el estudio de los taginastes. **Fundación Canaria Amurga-Maspalomas** por apoyar parte de esta investigación, especialmente a **Luis Azcona**, por su comprensión y ayuda con los trámites administrativos.

**Guadalupe Villamandos (Lupi)** por su amistad incondicional, por sus abrazos “curativos”, por haber estado y seguir estando. Prometo, a partir de ahora, ir a verte más.

**Heidi Meudt** (y su maravillosa familia) y **Helenita** (Helen Burns-Cortés) por su ayuda y su amistad durante mi estancia en Austin y por mantenerla, en la distancia, a lo largo de todos estos años. A **Heidi** además, quiero agradecerle que dedicara tiempo a leer algunos capítulos de esta tesis y, sus generosas y valiosas aportaciones.

**Iván** (mi gemelo), por ser esa parte de mí que, como dice mi amiga Nancy Segal, es indivisible por dos (“indivisible by two”).

**Juli Caujapé-Castells**, por su paciencia e implicación en esta tesis que parecía que nunca iba a terminar. Por poner todos los medios y facilidades, por su apoyo y confianza, que han sido indispensables no sólo para poder completar la tesis sino para mi formación como investigadora. Por ser un estímulo y un ejemplo de trabajo bien hecho. Por permitirme participar en tantos y tan interesantes proyectos. Gracias Juli, con todo mi cariño y admiración. Perdón por las comas de más, espero que esta tesis sea un punto y seguido; **José María Fernández-Palacios**, por aceptar sin dudar ser el tutor de esta tesis, por sus consejos, sugerencias y palabras estimulantes; **D. Jaime O’shanahan** por su cercanía y sensibilidad y porque su apoyo, en las negociaciones con el Cabildo, fue imprescindible para que mi viaje a EE. UU. fuera posible; **Julia Pérez de Paz** y **Rosi Febles** porque junto a ellas di mis primeros pasos en la investigación de la flora canaria y también gracias a ellas



pude “cruzar el charco”, lo que me permitió aprender técnicas moleculares nuevas y tener la fortuna de conocer a grandes investigadores de diferentes lugares del mundo.

**Leti** (Leticia Curbelo), porque siempre ha estado dispuesta a echarme una mano, por su alegría incluso después de muchas horas en el laboratorio y por su sincera amistad.

**Mark Carine**, por su cálida acogida en el Museo de Historia Natural de Londres (donde me encontré con muchos españoles y, especialmente con Estrella, que fue una compañera y “guía” fantástica), y por su buena predisposición para establecer colaboraciones; **Mariano Hernández**, por lo buen investigador y docente que es (consiguió que la genética me gustara aún más), por estar siempre dispuesto a ayudarme, por ejemplo, a entender “un poco mejor” los análisis de inferencia bayesiana; **Mary Jansen** (y su hijo Álex), por ser mi “segunda familia” durante los meses de estancia en la Universidad de Austin; **María Luisa** (madre e hija) por permitirme alargar las horas de redacción y trabajo sabiendo que Joaquim estaba feliz y en buenas manos.

**Nico** (Nicolás M. Suárez), por su ayuda en mis primeras secuenciaciones y por dar siempre en la clave para conseguir mejores resultados.

**Ofe** (Ofelia Díaz-Bethencourt), mi amiga del alma, mi compañera poeta, porque mis sueños también son sus sueños; **Ofelia** (Ofelia Salcedo) por su amistad nueva, por sus microcuentos, por “ponerme en valor” cuando más lo necesitaba.

**Pepe** (José Naranjo), por su ayuda con los mapas y los “problemas informáticos” y por su cariño durante todos estos años. **Pedro Sosa**, por abrirme las puertas de su Departamento de la Facultad de Ciencias del Mar en la ULPGC, y su siempre buena disposición; **Pestano** (Dr. José Pestano y su equipo de la Facultad de Medicina de la ULPGC), por hacerme sentir “parte de su equipo” durante el año en el casi semanalmente acudí a su laboratorio y, por darme todas las facilidades para usar su Servicio de Secuenciación. **Pepe Casanovas**, por ser uno de mis primeros acompañantes en el trabajo de campo en Tenerife y por ponerme en contacto con Efraín, con quien tuve la suerte de disfrutar de una fantástica jornada en el barranco del Infierno; **Pep Toni Roselló** (y su equipo Marcela, Jose y Albert), por su cariño en lo personal y por sus interesantes aportaciones en lo científico.

**Recolectores de muestras**, a todos aquellos que me han acompañado a recoger muestras en las distintas islas del archipiélago o que me han enviado material de hojas (especialmente a Águedo, Alfredo, Arnoldo, Pepe Naranjo, Tano, Isa, Magui, Marta, Óscar, Moisés, Feli, Stephan Scholz, Rüdiger Otto, Pedro Romero, Rubén Barone, Félix Medina, y un largo etc.)

**Sari** (Sara Mora), porque desde que empezamos a “aventurarnos” en busca de los taginastes hasta hoy, su amistad ha sido el mejor de los regalos. Tengo mucho que agradecerle, he aprendido mucho de ti. Gracias por tu sensibilidad, tu inteligencia, y tu contagiosa pasión por la naturaleza; **Susan** y **Shannon** (Jason, Anna y Liam) mi familia norteamericana, por estar siempre cerca a pesar de la distancia que nos separa.

Técnicos de los distintos ciclos formativos (especialmente Ruth, Yaiza y Dailos), por ayudarme a finalizar en “tiempo récord” las extracciones de ADN y la organización de muestras de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria.

Universitarios de estancia en el Departamento de Biodiversidad Molecular del Jardín Canario (Bea Rumeu, Darío Ojeda, Patricia Assunção, Luis Quijada, Mario Mairal, Jordi López-Pujol y Eduardo Fernández), por transmitirme su ilusión y sus ganas mientras desarrollaron parte de sus tesis o trabajos post-doctorales y, por permitirme colaborar en las publicaciones en las que culminaron muchos de sus esfuerzos de investigación.

Viera y Clavijo (D. José) por ser un canario con una lucidez, sensibilidad y curiosidad extraordinarias y dejarnos un legado impresionante sobre la historia natural de Canarias.

Wildpret de la Torre (D. Wolfredo), por su interés, amabilidad y cercanía cuando hemos coincidido en reuniones científicas, dentro y fuera del Jardín Canario.

Yessi (Yessica Jiménez) por ser una gran técnico de laboratorio y una mejor persona. Su alegría y su buena disposición para todo, fueron mi mejor ayuda en el procesamiento de muestras en el Servicio de Secuenciación de la Facultad de Medicina de la UPGC.

Finalmente, a mis padres por su amor incondicional que es esencial en mi vida. Por su apoyo y ayuda constante, desde que elegí estudiar Biología (aún sin estar muy convencidos de que fuera mi mejor opción) hasta hoy. Ayuda y apoyo que han multiplicado para hacerlos extensivos a Joaquim y Ryan. ¡Gracias por tanta generosidad! A mi madre por su especial sensibilidad, por su complicidad y cercanía (mi mejor abrigo), por su cuidado y cariño en todo lo que hace, por transmitirme su amor por la lectura. A mi padre por su esfuerzo para pagarme los estudios, por su humanidad, por transmitirme su amor por nuestra tierra y por lo que significa ser canario. A los dos, ¡eternamente gracias!

A mi familia (abuelos, tíos, primos), especialmente a la “bisa” Loli, porque su inagotable fuente de comidas y cariño llegaron durante mucho tiempo al piso de abajo como un “kit de salvamento”. A mis hermanos (y sus “piojos pegados”) y a mis sobrinos porque me siento afortunada de tenerles en mi vida. A mi sobrino “pesqui” porque me hubiese encantado poder celebrar este día con él. Hoy y siempre, ¡te echo tanto de menos!

A Ryan, por su infinita paciencia, su apoyo y amor incondicional y, especialmente por su buen humor y comprensión cuando yo más los necesitaba. A Joaquim por su curiosidad y por su maravillosa sonrisa, el mejor antídoto contra el cansancio y el desánimo. A los dos, por perdonarme las ausencias y las horas en el ordenador, por haberme apoyado, aún sin entender muy bien en qué consistía hacer una tesis. A “pisqui” por poner la guinda a nuestra pequeña familia.





# **ÍNDICE GENERAL**

---

**ÍNDICE GENERAL**  
**INDÍCE DE TABLAS Y FIGURAS**  
**ÍNDICE DE ANEXOS**  
**GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS**

	<i><u>Págs.</u></i>
<b>RESUMEN/ ABSTRACT</b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>1.1. LA TAXONOMÍA: DEFINICIÓN E HISTORIA</b>	7
1.1.1 LA TAXONOMÍA Y LOS CÓDIGOS DE NOMENCLATURA	21
<b>1.2. TAXONOMÍA Y BIODIVERSIDAD</b>	23
1.2.1 LA TAXONOMÍA Y SU PAPEL EN LA CONSERVACIÓN DE LAS ESPECIES: PASADO, PRESENTE Y FUTURO	25
<b>1.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y TAXONOMÍA</b>	28
1.3.1 LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS Y LA TAXONOMÍA	28
1.3.2 EL ROL DEL ADN EN LA IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS ESPECIES	30
1.3.3 ESTUDIOS MOLECULARES EN LA FLORA CANARIA	38
1.3.4 ESTUDIOS TAXONÓMICOS EN LA FLORA CANARIA	43
<b>1.4. DIVERSIDAD FILOGENÉTICA</b>	48
<b>1.5. BIBLIOGRAFÍA</b>	51
<b>2. OBJETIVOS</b>	61
<b>2.1 OBJETIVOS GENERALES</b>	62
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	63
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS (GENERALIDADES)</b>	65
<b>3.1. ELECCIÓN DE TAXONES</b>	66
<b>3.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES (HOJAS Y PLIEGOS)</b>	80
3.2.1 MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA LLEVAR A CABO LAS RECOLECCIONES DE MUESTRAS VEGETALES	82
3.2.2. NORMAS PRÁCTICAS PARA EL MUESTREO DE HOJAS	86
<b>3.3 EXTRACCIÓN DEL ADN VEGETAL</b>	88
<b>3.4. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LOS EXTRACTOS DE ADN</b>	93
<b>3.5 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL ADN</b>	96
<b>3.6. AMPLIFICACIÓN DEL ADN</b>	98
<b>3.7. SECUENCIACIÓN DEL ADN</b>	104
<b>3.8. REVISIÓN, EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS</b>	105
<b>3.9. OBTENCIÓN DE MATRICES DE SECUENCIAS ALINEADAS</b>	108
<b>3.10. BIBLIOGRAFÍA</b>	109

<b>4. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MOLECULAR EN AUSENCIA DE UN "BARCODING GAP": TESTANDO LAS REGIONES "CÓDIGO DE BARRAS" EN ELEMENTOS DE LA FLORA ENDÉMICA DE CANARIAS</b>	111
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	112
4.1.1. DEFINICIONES	118
4.1.2. CONSORCIO POR EL CÓDIGO DE BARRAS DE LA VIDA (CBOL)	119
4.1.3. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LAS REGIONES "CÓDIGO DE BARRAS MOLECULARES"	121
4.1.4. LAS REGIONES "CÓDIGO DE BARRAS" OFICIALES PARA PLANTAS TERRESTRES	122
4.1.5 HACIA UN "CÓDIGO DE BARRAS" DE LA FLORA CANARIA	127
4.1.5.1 Macaronesia y las islas Canarias: "Puntos calientes" de biodiversidad	127
4.1.5.2 Principales retos para la identificación molecular en plantas endémicas de entornos insulares oceánicos	133
<b>4.2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	137
4.2.1. ELECCIÓN Y MUESTREO DE TAXONES	137
4.2.2. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN	139
<b>4.3. ANÁLISIS DE DATOS</b>	140
4.3.1 DISTANCIAS GENÉTICAS	141
4.3.2 CARACTERES DIAGNÓSTICOS	142
<b>4.4. RESULTADOS</b>	143
4.4.1 ANÁLISIS DE DISTANCIAS- <i>p</i>	145
4.4.2 ANÁLISIS DE CARACTERES	147
4.4. 3 DISTANCIAS <i>vs</i> CARACTERES ( <i>rbcl+matK</i> )	148
4.4.4 <i>matK vs rbcl</i>	148
4.4.5 DETECCIÓN DE POSIBLES ESPECIES CRÍPTICAS	150
<b>4.5. DISCUSIÓN</b>	152
4.5.1 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN DE LA FLORA CANARIA	156
<b>4.6. BIBLIOGRAFÍA</b>	162
<b>5. LA DIVERSIDAD FILOGENÉTICA: UN NUEVO INSTRUMENTO PARA CONTRIBUIR A LA CONSERVACIÓN Y GESTIÓN DE LA FLORA DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE GRAN CANARIA</b>	174
<b>5.1. INTRODUCCIÓN</b>	175
5.1.1 LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE GRAN CANARIA (RBGC)	179
<b>5.2. OBJETIVOS</b>	189
<b>5.3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	190
5.3.1 ANÁLISIS DE DATOS. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS	194

5.3.1.1 Obtención de los listados de los taxones endémicos presentes en cada cuadrícula (1km <sup>2</sup> ) de la RBGC	194
5.3.1.2 Obtención del árbol de relaciones genéticas	197
5.3.1.3 Cálculo de los valores de diversidad filogenética por cuadrícula (1 km <sup>2</sup> ) de la RBGC	198
5.3.1.4 Análisis estadísticos	200
<b>5.4. RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	201
5.4.1 ÁRBOL DE RELACIONES GENÉTICAS	201
5.4.2 ESTIMACIONES DE DIVERSIDAD FILOGENÉTICA	204
5.4.3 ESTIMACIONES DE DIVERSIDAD TAXONÓMICA	205
5.4.4 COMPARACIÓN DE VALORES DE DIVERSIDAD FILOGENÉTICA CON VALORES DE DIVERSIDAD TAXONÓMICA	208
<b>5.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR</b>	210
5.5.1 DETECCIÓN DE ÁREAS "CALIENTES" DE ESPECIACIÓN EN LA RBGC	213
<b>5.6 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN Y LA GESTIÓN DE LA BIODIVERSIDAD VEGETAL DE LA RBGC</b>	217
<b>5.7. BIBLIOGRAFÍA</b>	226
<b>6. CONCLUSIONES GENERALES/ MAIN CONCLUSIONS</b>	230
<b>Conclusiones generales</b>	231
<b>Main conclusions</b>	235

**ANEXOS**



# ÍNDICE TABLAS Y FIGURAS

---

## ÍNDICE DE TABLAS

### Capítulo 1

**Tabla 1.1.** Marcadores moleculares empleados, en la última década, para el desarrollo de estudios filogenéticos que incluyen especies de géneros presentes en Canarias (ordenados alfabéticamente)

### Capítulo 3

**Tabla 3.1.** Tabla resumen de los taxones (y familias) analizados para cada aplicación desarrollada en los distintos capítulos de esta tesis. "c4" hace referencia al capítulo en el que se aplican las regiones "códigos de barras" para llevar a cabo la identificación molecular de un subconjunto de angiospermas endémicas canarias, mientras que "c5" hace referencia al capítulo en el que se llevó a cabo la estimación de la diversidad filogenética para la flora endémica de la parte terrestre de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria

**Tabla 3.2.** Componentes de la premezcla base para las reacciones de amplificación (condiciones estándar). El volumen final de la mezcla se ajusta a 25 $\mu$ L.

**Tabla 3.3.** Componentes de la premezcla para las reacciones de amplificación cuando utilizamos la "Master Mix" del *kit* de PCR "Reddy Mix" (Thermo Scientific).

**Tabla 3.4.** Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *rbcl*.

**Tabla 3.5** Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *matK*.

**Tabla 3.6** Temperatura de anillamiento utilizada para cada una de las parejas de cebadores que se emplearon en la amplificación de *rbcl* y *matK*.

### Capítulo 4

**Tabla 4.1.** Definición de algunos conceptos básicos

**Tabla 4.2.** Características diferenciales básicas entre los dos tipos fundamentales de islas (extracto del texto del proyecto "INSULARIDADES", inédito).

**Tabla 4.3.** Parejas de cebadores utilizados para amplificar y secuenciar las dos regiones "código de barras" moleculares de plantas terrestres (TA= temperatura de anillamiento).

**Tabla 4.4.** Valores promedio de los parámetros utilizados para evaluar la discriminación taxonómica de las secuencias de "código de barras" para las diferentes categorías de agrupación en los *test* de Kruskal-Wallis. Los números enteros entre paréntesis después de los nombres de los grupos corresponden a los tamaños muestrales. Los valores promedios apoyados de manera significativa por los *test* están separados por corchetes y/o paréntesis (nótese que, en algunos casos, los valores promedios de ciertas categorías están englobados en más de un grupo estadístico).

**Tabla 4.5.** Resumen de los porcentajes de éxito de discriminación (todos los taxones frente a sólo taxones insulares) proporcionados por *matK* y *rbcl* bajo un criterio basado en distancias (CR-1) o bajo un criterio basado en caracteres (CR-2), entre pares de especies con-específicas para casos taxonómicamente claros ("No-conflictivos") respecto a casos taxonómicamente conflictivos ("Conflictivos"). Los resultados para sólo los taxones de Canarias no se muestran porque el porcentaje de éxito de discriminación es el mismo (75,38%) con cualquiera de los criterios tanto para *matK*, como para la combinación *rbcl* + *matK*, aunque para *rbcl* por separado el criterio-2 resuelve mejor que criterio-1 (45,16% y 38,70%, respectivamente).

**Tabla 4.6.** Casos "conflictivos" (especies congénéricas y taxones infraespecíficos) analizados en este estudio junto a poblaciones "no conflictivas" que son morfológicamente indistinguibles pero para las que, al menos, una de las regiones "código de barras" sugiere que podrían ser taxones crípticos no detectados por la Taxonomía. La columna "Descripción de los casos" resume aspectos relevantes relativos a la identificación taxonómica de los taxones comparados, en base a los caracteres morfológicos disponibles. Las abreviaturas de las islas se corresponden con G: La Gomera, P: La Palma, T: Tenerife, C: Gran Canaria, F: Fuerteventura, M: Madeira y A: Azores. Las columnas *matK* y *rbcL* se corresponden con los "caracteres diagnóstico" obtenidos con cada una de estas regiones. En "Recomendaciones" se resumen las distintas posibilidades de actuación con respecto a la taxonomía del grupo en conflicto si las secuencias "código de barras" fueran las únicas variables disponibles: "Mantener separación" cuando los resultados apoyan la actual separación de las especies o taxones infraespecíficos comparados (debido a que las secuencias "códigos de barras" sólo son aplicables a nivel de especie, mantenemos la separación infraespecífica cuando no se detectan caracteres diagnóstico); "Revisar" cuando los resultados sugieren la posible existencia de taxones crípticos o la necesidad de realizar más estudios en las poblaciones con-específicas comparadas.

## ÍNDICE FIGURAS

### Capítulo 1

**Figura 1.1.** Representación hipotética de la topología de relaciones entre todas las especies de un territorio concreto (A) y de las distintas fracciones del árbol que ilustran las relaciones entre diferentes subgrupos de taxones (unidos por la línea sin puntear) presentes en dos áreas determinadas de ese territorio (B y C). Cada marca sobre las ramas indica un cambio de estado en los caracteres usados para construir esta representación. (Figura extraída a partir de Faith *et al.* 1992).

### Capítulo 3

**Figura 3.1.** Archipiélagos macaronésicos rodeados con un círculo amarillo (islas Canarias, Madeira y Azores) y otras zonas biogeográficas cercanas (África y Mediterráneo) dónde se han recolectado las muestras analizadas dentro de este proyecto de tesis doctoral. No se incluye el archipiélago macaronésico de Cabo Verde porque no se analizan muestras caboverdianas en esta tesis.

**Figura 3.2.** Organigrama general de los métodos desarrollados en esta tesis doctoral.

**Figura 3.3.** Bolsas de cierre hermético, etiquetadas con un código identificativo y conteniendo muestras de hojas y gel de sílice.

**Figura 3.4.** Gel de sílice (en bolsas de papel) para el secado rápido de las hojas. A la izquierda, bolsa con gel naranja seco. A la derecha, bolsas con gel que ha virado a verde debido a la acumulación de humedad.

**Figura 3.5.** Secado en estufa de muestras de hoja antes de depositarlas en las bolsas de cierre hermético y antes de la extracción de su ADN.

**Figura 3.6.** Ejemplo de pliegos testigo recogidos, montados y depositados en el herbario LPA.

**Figura 3.7 a)** Hojas de *Euphorbia canariensis* que habían sido previamente troceadas y secadas en estufa para finalmente completar su secado en gel de sílice. **b)** Hojas de *Dracaena draco* que han sido troceadas para facilitar su secado con el gel de sílice.

**Figura 3.8.** Recipiente con bolas de vidrio (varios tamaños) que como se muestra a la derecha, se introducen en los tubos de 2ml y base ancha para ayudar a que el material de hoja se pulverice mejor.

**Figura 3.9.** Homogeneizador automático con dos brazos de sujeción. A la derecha, detalle de los receptáculos donde se colocan los tubos conteniendo muestras que ya han sido pulverizadas.

**Figura 3.10.** Muestra de hojas convertidas en polvo fino tras su machacado en el homogeneizador automático.

**Figura 3.11.** Las muestras son sometidas a distintos pasos de agitación, centrifugación y adición de soluciones hasta la formación de varias fases dentro del tubo, quedando en la fase superior translúcida, el ADN. El color verde de la fase inferior es debido a los pigmentos fotosintéticos como la clorofila.

**Figura 3.12 a)** Presencia del pigmento hipericina que le da una coloración rojiza al sobrenadante recuperado para *Hypericum coadunatum*, y **b)** presencia de mucopolisacáridos que le dan una viscosidad muy alta al sobrenadante recuperado para *Aichryson punctatum*.

**Figura 3.13.** Preparación y carga de los extractos de ADN en el gel de agarosa para su electroforesis. **a)** Carga de muestras en cada uno de los pocillos del gel que ya se encuentra cubierto por tampón TBE 1X, en el interior de la cubeta de electroforesis. **b)** Soporte con los laterales sellados con cinta para contener la solución caliente de agarosa y tampón, hasta que se enfríe y solidifique. **c)** Papel de parafilm sobre el que se realiza la mezcla de 5  $\mu$ L de muestra con 3  $\mu$ L de tampón de carga, favoreciendo que las muestras se depositen en el fondo de los pocillos.

**Figura 3.14.** Gel de agarosa en el que aparecen muestras con un alto contenido de ADN (p. ej., carriles 2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 25, 26, 27, 29 ó 33) frente a muestras sin ADN (p. ej., carriles 13, 24, 34, 36 ó 37) o con un bajo contenido en ADN (p. ej., carriles 1, 5, 8 ó 38). La señal que aparece en la parte baja del gel se corresponde con el ARN, que por ser de menor tamaño molecular que el ADN, ha migrado más rápidamente a lo largo del gel.

**Figura 3.15.** Biofotómetro *NANODROP* ND-2000c y ordenador portátil conectado a él para la toma de datos.

**Figura 3.16.** Extractos de ADN con **a)** una coloración oscura debido a la oxidación de proteínas y **b)** con una textura viscosa por la presencia de mucopolisacáridos.

**Figura 3.17.** Gel de agarosa (1,8%) correspondiente a la electroforesis realizada con los productos amplificados para *rbcl* de algunos taxones de la RBGC. La muestra correspondiente a la cuarta posición, empezando por la derecha del gel, fue la única que no amplificó, por ello no se visualiza una banda. Las bandas correspondientes al marcador de tamaño (100bp *DNA Ladder* H3 RTU, *Genetics*) que nos sirve de referencia para determinar si la región amplificada coincide con el tamaño esperado, las visualizamos en la primera posición del gel empezando por la izquierda. En este caso, esperábamos unos amplicones de unos 700 pares de bases, que es el tamaño aproximado de la región *rbcl* en los grupos que estamos estudiando. Vemos como los productos resultantes de la amplificación de *rbcl* se alinean, según lo esperado, con la séptima banda del marcador de tamaño (7 x 100 pb).

**Figura 3.18.** Cromatograma de una de las secuencias obtenidas para la región *matK*, editado con el programa *BioEdit*. La zona inicial de picos distorsionados (50 pares de bases) tiene fondo oscuro y muestra claramente los problemas de lectura por saturación del secuenciador (ver texto). Aproximadamente después de los 50 primeros nucleótidos (zona de fondo blanco), los picos de colores correspondientes a cada base nitrogenada se definen mucho mejor, de forma que el secuenciador no comete apenas errores de asignación.

**Figura 3.19.** Imagen de la ventana del programa *Geneious* donde se muestra parte de uno de los alineamientos múltiples obtenidos con su herramienta de análisis MUSCLE.

#### **Capítulo 4**

**Figura 4.1.** Esquema de la ubicación de la región *rbcl* incluida en la secuencia de *Arabidopsis thaliana* (1.439 bp). Se muestra únicamente el fragmento (entre 1 y 743 bp) que queda entre las zonas de anclaje de los cebadores para su amplificación y secuenciación (extraído de la página web del CBOL). La designación de los cebadores F y R ("forward" o "reverse") varía en función de los autores que han diseñado cada uno de ellos.

**Figura 4.2.** Esquema de la ubicación de la región *matK* incluida en la secuencia de *Arabidopsis thaliana* (1.581 bp). Se muestra únicamente el fragmento (entre 173 y 1.132 bp) que queda entre las zonas de anclaje de los cebadores para su amplificación y secuenciación (extraído de la página web del CBOL). La designación de los cebadores F y R ("forward" o "reverse") varía en función de los autores que han diseñado cada uno de ellos.

**Figura 4.3.** Valores normalizados de distancias-*p* inter e intraespecíficas (*rbcl+matK*, *rbcl* y *matK*) mostrando que no se detecta un "DNA barcoding gap" (ambos tipos de distancias-*p* se solapan) entre todos los casos, taxonómicamente claros, comparados en este estudio. La media se muestra con una cruz, y la línea continua negra dentro del bloque corresponde a la mediana. Los valores extremos se marcan con un rombo.

**Figura 4.4.** Ejemplos de tipos de caracteres (diagnósticos y no diagnósticos) identificados al comparar secuencias de dos individuos (*n*<sub>1</sub> y *n*<sub>2</sub>) de dos especies con-genéricas diferentes (SP1 y SP2). Se señalan con flechas gruesas los caracteres diagnósticos (monomórficos o polimórficos). Algunos de los caracteres no-diagnóstico monomórficos se han agrupado con una llave, mientras que con una flecha más pequeña se señala el único carácter no diagnóstico polimórfico que se detectó en el alineamiento que se muestra.

**Figura 4.5.** Árbol consenso obtenido con 1000 réplicas de *bootstrap* para la relación entre las poblaciones de *Erica canariensis* (Canarias y Madeira) respecto a las poblaciones de *E. platycodon* de Canarias. En rojo se muestran las poblaciones de Madeira (*E. canariensis* y *E. maderensis*), en gris las de Tenerife (*E. canariensis* y *E. platycodon*) y, en negro las de La Gomera (*E. canariensis* y *E. platycodon*). Las ramas de los distintos clados del árbol resultante, muestran un trazo diferente dependiendo de la especie que agrupen. (Imagen extraída de Jaén-Molina *et al.* 2010)

#### **Capítulo 5**

**Figura 5.1.** El 46% de la superficie total de Gran Canaria que fue declarada Reserva de la Biosfera supone unas 100.459 hectáreas. En el mapa de la izquierda se representa la zonificación actual de la parte terrestre de la RBGC (Cabildo Insular de Gran Canaria 2008). En el mapa de la parte derecha se muestran los espacios protegidos incluidos en cada una de las mencionadas zonas. Se incluye una leyenda de colores tanto para el mapa de la izquierda como el de la derecha.

**Figura 5.2.** Distintas imágenes de la RNE de Guguy. A la izquierda la playa de Guguy y a la derecha acantilados donde nidifican las aves amenazadas.

**Figura 5.3.** La RNI de Inagua. A la derecha, paisaje del pinar de Inagua y a la izquierda detalle de la jarrilla de Inagua (*Helianthemum inaguae*) uno de los endemismos vegetales exclusivos de esta RNI.

**Figura 5.4.** Parque Natural de Tamadaba y pinos canarios (*Pinus canariensis*).

**Figura 5.5.** A la izquierda el pico picapinos (*Dendrocopos major thanneri*) y a la derecha el pinzón azul (*Fringilla teydea* subsp. *polatzeki*), ambas subespecies endémicas de Gran Canaria, que podemos encontrar en los pinares del Parque Natural de Pilancones (centro).

**Figura 5.6.** Parque Rural del Nublo y a la derecha, el endemismo conocido como rosalillo, *Dendriopoterium pulidoi*.

**Figura 5.7.** Panorámica de San Bartolomé de Tirajana.

**Figura 5.8.** Área terrestre de la RBGC (izquierda) y su compartimentación en cuadrículas de 1km<sup>2</sup> (derecha). Se muestra la codificación alfanumérica para las celdas 1x1 km dispuesta sobre la superficie terrestre de la RBGC (color verde). La compartimentación fue llevada a cabo por la asistencia técnica: "Listados de la distribución espacial de la flora endémica terrestre presente en la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria, en cuadrículas de 1x1 km (de la Cruz, 2012) en el marco del proyecto "Desarrollo de un código de barras molecular para la flora de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria" dirigido por personal del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo".

**Figura 5.9.** Esquema de los pasos seguidos para la recolección y conservación de muestras (1.1. hojas y 1.2. pliegos de herbario), protocolos de laboratorio (2.1 extracción de ADN, 2.2. cuantificación de los extractos de ADN, 2.3 amplificación de las regiones "código de barras") y para el análisis de datos (3.1. edición de las secuencias de ADN y alineamiento en matrices, 3.2. búsqueda de caracteres diagnóstico, 3.3. obtención del árbol de relaciones genéticas, 3.4 obtención del listado de taxones distribuidos por cuadrículas 1x1km de la RBGC y 3.5 cálculo de valores de diversidad filogenética para los endemismos vegetales terrestres de la RBGC). Todos estos pasos se detallan en los correspondientes apartados de este capítulo y en el capítulo 3 de esta tesis.

**Figura 5.10.** Fragmento de la "súper-matriz" que contiene las secuencias combinadas (*rbcl* + *matK*) y alineadas. Las columnas representan los nucleótidos de las secuencias de ADN mientras que las filas se corresponden con cada uno de los especímenes analizados. Los diferentes colores señalan partes de estas secuencias en las que se detectaron diferencias diagnósticas entre taxones o conjuntos de taxones.

**Figura 5.11.** "Súper-árbol" de relaciones filogenéticas (según *matK* y *rbcl*) obtenido para los taxones vegetales endémicos conocidos en la parte terrestre de la RBGC. Se muestra únicamente la estructura básica de la topología resultante, habiéndose agrupado los taxones y familias representadas en cinco grandes grupos (numerados del 1 al 5).

**Figura 5.12.** Detalle de los grupos 1, 3, 4 y 5 que constituyen la estructura básica de la topología del "súper árbol" de referencia. Para cada uno de ellos se indica el nombre de las familias a las que pertenecen los taxones que engloban. El grupo 1 agrupa a todas las monocotiledóneas incluidas en el análisis, mientras que los grupos 3, 4 y 5 agrupan a distintas familias de dicotiledóneas.

**Figura 5.13.** Fragmento del "súper-árbol" de referencia que representa al grupo 2 de la topología general resultante. Se indican las familias, géneros y taxones que quedan englobados en el mismo.

**Figura 5.14.** Mapa de colores de los valores de diversidad filogenética obtenidos para la biodiversidad vegetal de la parte terrestre de la RBGC. Las cuadrículas coloreadas de rojo oscuro representan zonas con mayores valores de PD y las de color amarillo claro, las de menor diversidad filogenética. Las cuadrículas con margen grueso se corresponden con las dos zonas consideradas como núcleo (RNE de GuGuy, al oeste y RNI de Inagua, en el centro), en la actual zonificación de la RBGC.

**Figura 5.15.** Mapa de colores de los valores de diversidad taxonómica obtenidos para la biodiversidad vegetal de la parte terrestre de la RBGC. Las cuadrículas rojo oscuro representan zonas con mayor diversidad taxonómica y las amarillo claro, las de menor diversidad taxonómica. Las cuadrículas con margen grueso se corresponden con las dos zonas consideradas como núcleo (RNE de GuGuy, al oeste y RNI de Inagua, en el centro), en la actual zonificación de la RBGC.

**Figura 5.16.** Comparación entre la representación gráfica de la diversidad taxonómica (izquierda) y la diversidad filogenética (derecha), considerando las especies vegetales endémicas de la RBGC (cuadrículas de 1 km<sup>2</sup>). En ambos mapas de colores, el rojo oscuro señala las áreas de mayor diversidad y el amarillo más claro las de menor diversidad. Las cuadrículas con margen grueso se corresponden con las dos zonas consideradas como núcleo (RNE de GuGuy, al oeste y RNI de Inagua, en el centro), en la actual zonificación de la RBGC. Se indica el promedio estandarizado de los valores de TD y PD según los *test* de Mann-Whitney.

**Figura 5.17.** Ejemplos de representantes de los tres géneros en los que las secuencias "código de barras moleculares" no discriminaron entre algunos taxones con-genéricos. a) *Sonchus acaulis*, b) *Argyranthemum lidii*, y c) *Micromeria pineolens*.

**Figura 5.18.** Ejemplos de géneros poco representados en la RBGC y para los que las secuencias "código de barras moleculares" discriminaron entre algunos de sus taxones con-genéricos. a) *Teline rosmarinifolia* y b) *Hypericum coadunatum*

**Figura 5.19.** Ejemplos de taxones de géneros que han sufrido radiación y para los que las secuencias "código de barras moleculares" lograron discriminar respecto a sus congéneres: a) *Aichryson punctatum*, b) *Aichryson parlatorei*, c) *Aeonium simsii* y d) *Aeonium simsii*.

**Figura 5.20.** Cuadrículas de la parte terrestre de la RBGC para las que se ha detectado la presencia de linajes evolutivamente más activos (coloreadas en rojo) y que por lo tanto son "crisoles evolutivos" y merecen especial atención conservacionista.

**Figura 5.21.** Comparación entre la representación gráfica de las áreas dentro de la RBGC que hemos denominado como "crisoles evolutivos" (izquierda) y las áreas que representan "santuarios evolutivos" (derecha) y que se corresponden con cuadrículas con máximos valores de diversidad filogenética (rojo oscuro). Las cuadrículas con margen grueso se corresponden con las dos zonas consideradas como núcleo (RNE de GuGuy, al oeste y RNI de Inagua, en el centro), en la actual zonificación de la RBGC.

**Figura 5.22.** Comparación entre la zonificación actual de la RBGC y las estimaciones de diversidad filogenética y diversidad taxonómica de la flora canaria endémica conocida en cada cuadrícula de 1 km<sup>2</sup> (con máxima fiabilidad geográfica). En la representación de la zonificación actual (izquierda), las dos zonas núcleo (GuGuy e Inagua) se han señalado con diferentes tonos de verde, mientras que, en las representaciones de la diversidad filogenética (centro) y taxonómica (derecha), las cuadrículas con mayor diversidad son las rojo oscuro y, las de menor diversidad, son las amarillo claro.

**Figura 5.23.** Zonificación actual de la RBG (izquierda) y valores promedio resultantes de los *test* de Kruskal-Wallis para las estimaciones de TD (centro) y PD (derecha) de la flora canaria endémica por km<sup>2</sup>. Se indican los valores promedio obtenidos para cada zona núcleo por separado (distintas tonalidades de verde) y para las zonas de amortiguación (naranja) y transición (rojo).

**Figura 5.24.** Mapa de la zonificación actual de la RBG (izquierda) dónde se indica con círculos azules las cuadrículas que forman parte de la zona de transición y que por poseer valores de PD muy altos (marcados con círculos rojos en el mapa de colores correspondiente a la diversidad filogenética, derecha) deberían ser incluidas en una zona de amortiguación más amplia que la actual.

**Figura 5.25.** *Test* de Kruskal-Wallis considerando otra hipotética "zona núcleo" en las cuadrículas marcadas con azul oscuro (ver texto). Nótese en las agrupaciones significativas por zonas (enmarcadas) que las tres zonas núcleo de esta propuesta hipotética serían las que concentrarían los mayores "valores naturales" filogenético-florísticos, lo cual refuerza el papel de este parámetro como indicador preferente.

**Figura 5.26.** Zonificación actual (arriba a la izquierda) en contraposición a la zonificación hipotética de la RBGC, propuesta en base a los valores de PD discutidos y presentados en este capítulo, y que incluye una posible "nueva zona núcleo" marcada en azul oscuro (arriba a la derecha). El gráfico de dispersión de los valores de PD y TD ilustra la importancia de estas cuadrículas de la zonificación hipotética (marcadas en azul) para que las zonas núcleo alberguen también los "valores naturales" asociados a la riqueza filogenética endémica del territorio de la RBGC.



# ÍNDICE ANEXOS

---

## ANEXOS

### Capítulo 4

**Anexo I: Tabla S1.** Taxones muestreados para este estudio con los números de entrada a *GenBank* para las secuencias generadas *de novo* (ver Demiurge, *D-DNASE* 89 y *D-DNASE* 90), los códigos del Banco de ADN de la Flora Canaria (*DNA bank-JBCVCSIC*), las localidades donde se recolectó el material vegetal (las siglas corresponden a las islas G: la Gomera, P: La Palma, T: Tenerife, C: Gran Canaria, F: Fuerteventura; M: Madeira y Az: Azores). Se indican los códigos de los pliegos depositados en los herbarios LPA (JBCVCSIC) y ORT (JAO). Los géneros que han radiado en Macaronesia (siete o más especies con-genéricas) están marcados con el superíndice +, y las especies taxonómicamente conflictivas con el superíndice \*.

**Anexo II: Tabla S2.** Secuencias *rbcl* y *matK* que fueron descargadas desde *GenBank* para este estudio. Se indican los números de entrada o "accesion numbers", el nombre de los taxones y su distribución (poblaciones macaronésicas o no).

**Anexo III: Tabla S3.** Distancias genéticas (distancias-*p*) entre las especies comparadas dentro de este capítulo de tesis y calculadas con la aplicación DNADISTv. 3.5c (Felsenstein, 1993) del programa *BioEdit* (Hall, 1999-2004).

**Anexo IV: Tabla S4.** Número total de especies por género presentes en Canarias (según el listado de Arechavaleta *et al.* coord. 2010) Se indica el total de especies endémicas y nativas distribuidas en Canarias respecto al número de especies endémicas y nativas analizadas dentro del capítulo 4 de esta tesis doctoral.

**Anexo V:** Artículo Jaén-Molina *et al.* 2014 (*Molecular Ecology Resources*)

**Anexo VI:** Artículo Jaén-Molina *et al.* 2010 (*Proyectos de investigación en parques nacionales 2006-2009*)

### Capítulo 5

**Anexo VII:** Listado de taxones incluidos y excluidos en el capítulo 5 de esta tesis doctoral.

**Anexo VIII: Tabla S5.** Codificación de los taxones endémicos de Canarias presentes en la RBGC y considerados en este capítulo de tesis

**Anexo VII: Tabla S6.** Taxones analizados dentro del capítulo 5 de esta tesis doctoral y muestreados en la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (RBGC). Se indica el código de la alícuota de ADN depositada en el banco de ADN de la Flora Canaria (*Vial Code*) así como la localidad (municipio) donde fue recolectada. Los taxones del Anexo VII que representan sinonimias no han sido incluidos en esta tabla.

# **GLOSARIO**

---

## GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNcp:</b>	Genoma cloroplástico
<b>ADNn:</b>	Genoma nuclear
<b>ADNmt:</b>	Genoma mitocondrial
<b>AFLP:</b>	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>APG:</b>	Grupo para las filogenias de angiospermas ( <i>Angiosperm Phylogeny Group</i> )
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico
<b>bp:</b>	pares de bases ( <i>base pairs</i> )
<b>BLAST:</b>	Herramienta para alineamientos ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
<b>BSA:</b>	Albúmina de Suero de Bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CBOL:</b>	Consortio del "código de barras" de la Vida ( <i>Consortium of Barcoding of Life</i> )
<b>CI:</b>	Índice de Consistencia ( <i>Consistency Index</i> )
<b>HI:</b>	Índice de Homoplasia ( <i>Homoplasy Index</i> )
<b>RI:</b>	Índice de Retención ( <i>Retention Index</i> )
<b>COI:</b>	Citocromo C oxidasa I ( <i>Cytochrome c Oxidase I</i> )
<b>CR-1:</b>	Criterio basado en distancias- <i>p</i>
<b>CR-2:</b>	Criterio basado en caracteres con valor diagnóstico
<b>CSIC:</b>	Centro Superior de Investigaciones Científicas
<b>CTAB:</b>	Bromuro de Cetiltrimetilamonio ( <i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> )
<b>dNTP:</b>	Deoxinucleótidos ( <b>A</b> denina, <b>T</b> imina, <b>C</b> itosina y <b>G</b> uanina)
<b>EDTA:</b>	Ácido EtilenDiaminoTetraAcético
<b>EtBr</b>	Bromuro de Etidio ( <i>Ethidium Bromide</i> )
<b>ETS:</b>	Espaciadores Transcritos Externos
<b>IBSICA:</b>	Proyecto de Estrategias de Diversidad Biológica para Islas y Áreas Costeras
<b>ITS:</b>	Espaciadores Transcritos Internos ( <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
<b>ISSR:</b>	Inter-microsatélites ( <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> )
<b>JBCVC:</b>	Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"
<b>LPA:</b>	Herbario del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"
<b>MaB:</b>	Programa "Hombre y la Biosfera" ( <i>Man and Biosphere</i> )

<b>Mg:</b>	Magnesio
<b>MP:</b>	<b>M</b> áxima <b>P</b> arsimonia
<b>ORT:</b>	Herbario del Jardín de Aclimatación de La Orotava
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa ( <i><b>P</b>olymerase <b>C</b>hain <b>R</b>eaction</i> )
<b>PD:</b>	Diversidad Filogenética ( <i><b>P</b>hylogenetic <b>D</b>iversity</i> )
<b>PWG:</b>	Grupo de trabajo de plantas ( <i><b>P</b>lant <b>W</b>orking <b>G</b>roup</i> )
<b>PN:</b>	<b>P</b> arque <b>N</b> atural
<b>PR:</b>	<b>P</b> arque <b>R</b> ural
<b>RBGC:</b>	<b>R</b> eserva de la <b>B</b> iosfera de <b>G</b> ran <b>C</b> anaria
<b>RNE:</b>	<b>R</b> eserva <b>N</b> atural <b>E</b> special
<b>RNI:</b>	<b>R</b> eserva <b>N</b> atural <b>I</b> ntegral
<b>SIG:</b>	<b>S</b> istemas de <b>I</b> nformación <b>G</b> eográfica
<b>Taq:</b>	ADN polimerasa ( <i><b>T</b>ermophilus <b>a</b>quaticus <b>D</b>NA polymerase</i> )
<b>TD:</b>	Diversidad taxonómica ( <i><b>T</b>axonomic <b>D</b>iversity</i> )
<b>TE:</b>	Tampón <b>T</b> ris- <b>E</b> DTA
<b>UNESCO:</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura ( <i><b>U</b>nited <b>N</b>ations <b>E</b>ducational, <b>S</b>cientific and <b>C</b>ultural <b>O</b>rganization</i> )
<b>UTO:</b>	<b>U</b> nidades <b>T</b> axonómicas <b>O</b> perativas
<b>UTOM:</b>	<b>U</b> nidades <b>T</b> axonómicas <b>O</b> perativas <b>M</b> oleculares

## **RESUMEN/ ABSTRACT**

---

## RESUMEN

En el desarrollo de esta tesis doctoral se ha testado, en primer lugar, la aplicabilidad de las regiones del ADN cloroplástico reconocidas oficialmente como "código de barras universales" de plantas terrestres ("Plant Working Group" del Consorcio para el Código de Barras de La Vida, en adelante CBOL PWG), en la identificación molecular de un subconjunto de angiospermas endémicas de Canarias (23 familias, 35 géneros, 45 especies, 12 subespecies y 3 variedades).

La identificación molecular de la flora canaria representa un reto para el concepto de "código de barras", entre otras causas, por la abundancia de linajes que han experimentado espectaculares radiaciones morfológicas pero cuyo polimorfismo molecular es, en el mejor de los casos, moderado o bajo. La viabilidad de utilizar "identificadores moleculares" como complemento a las variables morfológicas en la caracterización taxonómica de la flora endémica canaria, se evaluó examinando el porcentaje de éxito de las mencionadas regiones "código de barras" (*rbcl* y *matk*) en la discriminación de casos en los que no existía conflicto taxonómico (especies con-genéricas que son identificadas sin ambigüedades por las variables morfológicas que utiliza la Taxonomía). Para ello, se emplearon dos criterios de discriminación: uno basado en distancias- $p$  (según la publicación del CBOL PWG en 2009) y, otro basado en caracteres con valor diagnóstico (detección de al menos un nucleótido o *indel* exclusivo en las secuencias de una de las especies comparadas). El porcentaje de éxito en la discriminación utilizando un criterio basado en caracteres fue del 82%, mientras que el obtenido con el criterio basado en distancias fue en torno al 80%. Ambos porcentajes superan a la mayoría de los alcanzados (con un criterio basado en distancia), en otras floras donde la incidencia de la radiación no es tan relevante.

Este elevado porcentaje de éxito, junto a los siguientes resultados: (1) el criterio basado en distancias fue incapaz de discriminar entre comparaciones con-genéricas y con-específicas, y (2) únicamente el criterio basado en caracteres pudo resolver ciertos casos, apoyan que la estrategia más eficiente para la discriminación de las angiospermas endémicas canarias (y, posiblemente, de representantes de la flora de otros enclaves insulares oceánicos similares) debe sustentarse en un criterio basado en caracteres diagnóstico. Además, el hecho de que en algunos casos taxonómicamente claros las secuencias "código de barras" no lograran discriminar entre algunas de las especies con-genéricas comparadas (p. ej., en géneros como *Argyranthemum*, *Micromeria* o *Sonchus*), indica la necesaria complementariedad de las variables morfológicas y moleculares para la caracterización taxonómica de la flora canaria endémica.

Por otro lado, se comprobó que estas regiones "código de barras" revelaban potenciales especies crípticas no detectadas por la morfología en algunos grupos de nuestra muestra de la flora canaria, y se proponen recomendaciones "taxonómicas" para esos grupos en cuestión. También, se determinó que la existencia de un "DNA barcoding gap" (clara separación entre los promedios de las distancias- $p$  intra- e interespecíficas) no es un requisito necesario para lograr la caracterización molecular correcta de los endemismos vegetales canarios.

En la segunda parte de esta tesis, se han secuenciado las regiones *rbcl* y *matK* de los endemismos vegetales conocidos en la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (RBGC), para estimar la diversidad filogenética (PD) en cada kilómetro cuadrado de su parte terrestre, que ocupa el 46% de la superficie de Gran Canaria actualmente emergida. La alta diversidad florística, ecológica y geográfica de este territorio le confieren una importancia vital para el estudio de los mecanismos y procesos evolutivos que han dado forma a la biodiversidad vegetal de Gran Canaria y, para su conservación.

Se compararon los valores de PD y diversidad taxonómica (TD) obtenidos en cada una de las cuadrículas de 1 km<sup>2</sup> en las que se dividió la RBGC para comprobar: i) si la distribución de los valores de ambos indicadores era similar, y ii) si alguno de los dos índices resolvía con mayor detalle la riqueza de la biodiversidad florística por cuadrícula de este territorio. Nuestros resultados muestran que las cuadrículas con los valores más elevados de PD y TD no están dentro de ninguna de las dos zonas núcleo de la zonificación actual de la RBGC.

La conservación de los procesos evolutivos ha sido reconocida como una de las máximas prioridades para preservar la biodiversidad frente a la incertidumbre que plantean los cambios globales actuales. Por ello, se propone una modificación de la zonificación actual de la RBGC, en la que las cuadrículas con los valores más elevados de PD quedarían comprendidas en una tercera zona núcleo y en una zona de amortiguación ampliada. De esta forma, se garantizaría que los más destacables valores taxonómicos y filogenéticos asociados a la flora endémica de la RBGC se beneficiarían de una mayor protección, con respecto a la que tienen en la actualidad.

En suma, esta investigación sienta las bases tanto para la construcción de una base de datos molecular de referencia para facilitar una identificación rápida y rigurosa de las angiospermas endémicas de Canarias, como para la estimación de la diversidad filogenética de la flora endémica de este archipiélago.

Ambas actuaciones ya se están desarrollando como parte de las misiones del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"-Unidad Asociada al CSIC (Consejería de Medio Ambiente y Emergencias del Cabildo de Gran Canaria).



La metodología presentada en esta tesis doctoral permitirá elaborar censos de biodiversidad más completos y precisos que contribuyan a conservar y gestionar la rica biodiversidad endémica vegetal canaria. Si se dan las circunstancias de financiación adecuadas, podrá ser extrapolada a cualquier otro territorio, incluyendo *hotspots* insulares oceánicos que comparten problemas de conservación y gestión de la biodiversidad con Canarias.

## ABSTRACT

In the development of this PhD. thesis, we first tested the applicability of the two chloroplast DNA regions officially recognized as "universal barcodes" for terrestrial plants ("Plant Working Group" of the Consortium for the Barcode of life, hereinafter CBOL PWG) in the molecular identification of a subset of Canarian endemic angiosperms (23 families, 35 genera, 45 species, 12 subspecies and 3 varieties).

The molecular identification of the Canarian flora represents a challenge to the concept of "DNA barcode", among other reasons, by the abundance of lineages that have undergone dramatic morphological radiation but whose molecular polymorphism is, in the best case, moderate or low. The feasibility of using "molecular identifiers" in addition to the morphological variables in the taxonomic characterization of the Canarian endemic flora was assessed by examining the percentage of success of these "DNA barcode" regions (*rbcl* and *matk*) in the discrimination of cases with no taxonomic conflict (congeneric species unambiguously identified by morphology-based taxonomy). With this objective, two criteria for discrimination were used: one based on  $p$ -distances (following the publication of CBOL PWG in 2009), and other based on diagnostic characters (i.e. at least one exclusive nucleotide or indel is detected in the sequences of one of the species compared). The rate of discrimination success using a "character-based" criterion was 82%, while that obtained with the "distance-based" approach was about 80%. Both rates are higher than most of those retrieved with a "distance-based" criterion in other floras where the incidence of radiation is not as relevant.

This high success percentage, along with (1) the inability of a "distance-based" criterion to discriminate between congeneric and conspecific comparisons, and (ii) the fact that only the "character-based" discrimination criterion resolved some cases that the "distance-based" criterion did not, further support that the most efficient strategy for the discrimination of the Canarian endemic angiosperms (and possibly representatives of the flora of other similar oceanic island enclaves) must be based on a "character-based" discrimination criterion.

In addition, the fact that in taxonomically non-conflictive cases, the DNA barcode sequences could not discriminate between some of the congeneric species compared (e.g., from the genera *Argyranthemum*, *Micromeria* or *Sonchus*), indicates the necessary complementarity of morphological and molecular variables for the taxonomic characterization of the Canarian endemic flora.

Furthermore, the "DNA barcode" regions revealed potential cryptic species overlooked by morphology in some groups of our sample, and we offer "taxonomic" suggestions for these cases. Our research also allows us to contend that the existence of a "DNA barcoding gap" (clear separation between the average of intra- and interspecific  $p$ -distances) seems not to be a necessary requisite for the correct molecular characterization of the Canarian flora.

In the second part of this thesis, we have sequenced the regions *rbcl* and *matK* for the endemic land plant species known in the Biosphere Reserve of Gran Canaria (RBGC) to estimate the phylogenetic diversity (PD) for each square kilometer of this territory, whose terrestrial part occupies 46% of the presently emerged area of the island. The high floristic, ecological and geographical diversity of this region, give to it a vital importance for the study of the mechanisms and evolutionary processes that have shaped plant biodiversity of Gran Canaria, and to its conservation. The values of PD and taxonomic diversity (TD) obtained for each quadrat of 1 km<sup>2</sup> within the RBGC, were compared to test: i) if the distribution of the values of both indicators was similar and, ii) if any of the two indexes resolved better the floristic richness of the plant biodiversity, by quadrat of this territory.

Our results show that the quadrats with higher values of PD and TD are not within the current central zones of the RBGC. The conservation of evolutionary processes has been recognized as one of the top priorities for preserving biodiversity in the face of uncertainty posed by current global changes. Therefore, we propose a modification of the current RBGC's zonification, where the quadrats with the highest values of PD would be included in a third central zone and an extended buffer zone. Such proposal would ensure that the most significant taxonomic and phylogenetic values associated with the RBGC's endemic flora would benefit from more protection than at present.

In summary, this research provides the basis for both the construction of a molecular database of reference to facilitate the rapid and thorough identification of endemic angiosperms of the Canaries, and for the estimation of the phylogenetic diversity of the endemic flora of this archipelago.

Both actions are already under way as part of the missions of the Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"- Unidad Asociada CSIC of the Cabildo de Gran Canaria.

The methodology presented in this thesis will allow the development of more complete and accurate biodiversity surveys for the conservation and management of the Canarian endemic plant biodiversity. If adequate financial circumstances are given, this methodology may be extrapolated to any other territory, including oceanic insular hotspots that share problems of biodiversity conservation and management with the Canary Islands.



# Capítulo 1. Introducción

---



**Láminas flora canaria** (de izquierda a derecha):  
*Lotus kunkelii* (M.A. Kunkel), *Euphorbia bravoana* (E.R. Sventenius) y *Sventenia bupleuroides* (M.A. Kunkel).  
Extraídas de <http://www.jardincanario.org/flora-de-gran-canaria>.

**Fotos:** (de izquierda a derecha y desde esquina superior)  
*Vieraea laevigata*, *Pericallis webbii*, *Gonospermum oshanahanii*, *Lavandula bramwellii*, *Echium wildpretii* y *Crambe santosii*.  
Ruth Jaén Molina y extraídas de <http://www.plantasdemitierra.blogspot.com>

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. LA TAXONOMÍA: DEFINICIÓN E HISTORIA.**

La TAXONOMÍA es la ciencia que se ocupa de la clasificación de los seres vivos, clasificación que tiene como fin ordenar, jerarquizar y nombrar a los organismos vivos. El término "Taxonomía" fue empleado por primera vez por el biólogo suizo Augustin Pyrame de Candolle a comienzos del siglo XIX, pero se trata de un vocablo de origen griego que significa "ordenación". La Taxonomía forma parte de la Sistemática, que está dedicada al análisis de las relaciones de parentesco entre los organismos vivos. Mientras que la Taxonomía se ocupa de asignar los nombres de los taxones (de acuerdo a los principios de la nomenclatura) y de elaborar las claves dicotómicas de identificación, la Sistemática tiene el cometido de crear los sistemas de clasificación en series jerárquicas, enfatizando en sus relaciones filogenéticas (Lincoln *et al.* 1998).

En consecuencia, las clasificaciones modernas consideran (además de factores bióticos y espaciales) las relaciones filogenéticas y evolutivas, que aportan un componente histórico que, a su vez, propone hipótesis demostrables para explicar los cambios que surgen en la biodiversidad.

La SISTEMÁTICA es, por tanto, la rama de la Biología que se ocupa de establecer las relaciones de parentesco o filogenéticas de los organismos, asumiendo como principio que todos los organismos del planeta tenemos un antecesor común, y que por consiguiente, los organismos más emparentados tendrán más similitudes entre sí que los que estén menos emparentados. Para establecer el grado de similitud o rango de parentesco que existe entre dos organismos, la Sistemática se vale de caracteres

(Hennig 1966; Wiley 1981; Judd 2002). Para que un carácter sea útil en Sistemática es fundamental que exista variación de ese carácter, denominándose "estados del carácter" a las diferentes formas en las que un carácter puede presentarse en los organismos estudiados (Melic & Ribera 1996). Los caracteres seleccionados pueden ser binarios y definirse con dos únicos estados ("presencia" o "ausencia") o pueden ser más complejos y definirse como varios estados ("flores blancas", "flores azules", "flores con líneas azuladas"). Así, a diferencia de otras metodologías (p. ej., en la elaboración de claves dicotómicas) donde únicamente se estudian aquellos estados alternativos que separan a las especies comparadas, en la Sistemática cladista (Hennig 1950) se estudian todos los estados de los caracteres, en todas las especies que los presentes.

A lo largo de la historia de la Taxonomía, se han empleado distintas reglas técnicas dentro de los diferentes sistemas de clasificación para establecer, por ejemplo el número de categorías taxonómicas o la forma de designar a dichas categorías. Todas estas normas están recogidas en los "Códigos Internacionales de Nomenclatura", como los Códigos de Nomenclatura Botánica, Zoológica y Bacteriológica (McNeill *et al.* 2012; Lapage *et al.* 1992).

La NOMENCLATURA es la subdisciplina que se ocupa de reglamentar, entre otros, los preceptos que debe cumplir un nombre para que sea considerado como válido o "correcto" para nombrar a un taxón (Greuter *et al.* 2000; Judd *et al.* 2002).

Algunas de estas reglas son:

1. Se le debe haber otorgado un nombre en latín según su categoría taxonómica,

2. Debe haber sido descrito y estar asociado a un ejemplar "tipo" (que es diferente según se trate de especies y taxones inferiores o de si se trata de taxones superiores), y
3. Debe estar publicado en una revista científica.

Los mencionados "tipos" representaban la forma más común del grupo, o la forma que "mejor refleja" las características que lo definen, y es sobre el que se ha realizado la descripción de la especie y el que valida el nombre científico que se da a dicha especie la primera vez que se publica (Greuter *et al.* 2000). El "tipo" es el espécimen concreto sobre el cual el autor define un taxón y sobre el que su nombre está basado, por lo tanto, actúa como referencia para el nombre pero no para el taxón. Cuando se trata de una planta, el "especimen tipo" se conserva normalmente en un herbario oficial, pero también puede estar en museos, jardines botánicos, universidades y otros centros de investigación, de forma que debe poder ser consultado siempre que sea necesario, por lo que debe estar perfectamente registrado y localizable.

En la tipificación de taxones de categoría superior a especie, el nombre "tipo" del género se corresponderá con el nombre de la primera especie sobre la cual se basó la descripción original que validaba dicho nombre. De forma análoga, el "tipo" del nombre de una familia se corresponderá con el nombre del primer género que fue publicado, y sobre el cual fue basada la descripción original válida de esa familia.

La categoría fundamental dentro de los sistemas de clasificación es la de especie, aunque es un concepto que ha sido intensamente debatido tanto por la Sistemática



como por la Biología evolutiva, como ocurre con el término especiación (King 1993, Lambert & Spencer 1995, Hull 1997, Howard & Berlocher 1998, Levin 2000, Wheeler & Meier 2000).

Son muchos los autores que, atendiendo a distintos criterios, han tratado de definir el concepto de especie: *biológica* (Dobzhansky 1935 y 1937, Mayr 1942 y 1963), *ecológica* (Van Valen 1976), *morfológica* (Cronquist 1978), *evolutiva* (Simpson & Gaylord 1961; Wiley 1978 y 1981) o *filogenética* (Cracraft 1983; Mishler & Brandon 1987; Nixon & Wheeler 1990) siendo todas ellas definiciones con limitaciones para ser aplicadas de forma general. Así por ejemplo, el concepto “biológico” de especie (grupo natural de individuos reproductivamente aislados) definido por Mayr en 1942, 1963, 1970 y 1992 (y, posteriormente, apoyado por numerosos autores especialmente dentro de las publicaciones zoológicas) no puede ser aplicado en muchos casos, porque la hibridación es un proceso muy común tanto en plantas como en animales (Mallet 2005 y 2007).

En muchas ocasiones, las segundas generaciones de las plantas híbridas son fértiles y se establecen como unidades genéticas y evolutivas independientes, por ejemplo, los híbridos en el género *Tolpis* presentes en Macaronesia (Crawford *et al.* 2013), los híbridos entre algunas especies canarias del género *Argyranthemum* (Brochman *et al.* 2000) ó los híbridos entre *Phoenix canariensis* (palmera canaria) y *P. dactylifera* (palmera datilera introducida en las islas Canarias) que no solamente son fértiles sino que se han extendido ampliamente por toda Canarias (Sosa *et al.* 2009).

El concepto “biológico” de especie tampoco sería adecuado para clasificar a especies ampliamente distribuidas, que abarcan en su rango de distribución lugares

muy alejados entre sí (incluso distintos continentes) pero, que por no intercambiar material genético entre ellas, no constituyen especies distintas (por ejemplo, especie de dragos (*Dracaena draco*) que se distribuyen tanto en el norte de África como en Canarias, Bramwell 1985; Marrero *et al.* 1998).

El concepto de "especie morfológica" es probablemente el que más críticas ha recibido, ya que, únicamente tiene en cuenta características morfológicas afines para agrupar a los individuos de una misma especie.

Uno de los grandes problemas de los caracteres morfológicos es que no siempre permiten diferenciar a las especies. De hecho, las denominadas especies crípticas (ver definición detallada de este término en Tabla 4.1, cap. 4) son casi idénticas morfológicamente. También puede ocurrir lo contrario, es decir, que poblaciones de una misma especie presenten diferencias morfológicas debido a, por ejemplo, las variaciones entre los individuos que la conforman o, a clinas inducidas por el ambiente. Por estas razones, los sistemáticos de plantas no suelen definir a las especies como comunidades reproductivas y han abandonado el concepto biológico de especie para centrarse en las poblaciones o grupos de individuos de una misma especie, que ocupan una región geográfica más o menos bien definida y que interactúan entre sí (Davis & Heywood 1963; Raven 1976; Donoghue 1985; Mishler & Brandon 1987; Nixon & Wheeler 1990; Kornet 1993; Baum & Shaw 1995).

Pero también, hay dificultades para establecer los límites de las poblaciones que pueden variar en tamaño (de un individuo a millones de ellos), en tiempo de supervivencia (menos de un año hasta miles de años), estar aisladas, o recibir constantemente inmigrantes (por lo que también cambian sus niveles de diversidad

genética en el tiempo). Cuando existen grupos de poblaciones que difieren morfológicamente entre sí, se subdivide a la especie en razas. Según Templeton (1989), una subespecie (o raza) es un linaje evolutivo particular dentro de una especie. La diferenciación genética entre subespecies (razas) se debe a barreras que han persistido por largos períodos de tiempo e impiden el intercambio de genes, por lo tanto, poseen continuidad histórica.

Por otro lado, Lewontin *et al.* (2003) definen una raza geográfica como una población local fenotípicamente diferenciada dentro de una misma especie, capaz de intercambiar genes con otras razas de la misma especie. Debido a que, prácticamente todas las poblaciones difieren entre sí en la frecuencia de algunos de sus genes, el concepto de raza no es de gran utilidad operativa en Biología.

A finales del siglo XIX y principios del XX algunos autores (G. Roudy, P. Ascherson, P. Graebner y H. Engler) sitúan la categoría taxonómica de raza entre la de subespecie y variedad, mientras que otros como J. Briquet emplearon el término de raza como sinónimo del término variedad en especies cultivadas. En el Congreso Internacional de Botánica de 1905, celebrado en Viena, se desaconsejó el uso de raza como categoría taxonómica, de forma que en la actualidad los términos que se emplean para designar categorías infra-específicas son los de variedad y forma.

A su vez, existe una jerarquía para agrupar a los taxones en categorías superiores a la de especie, nos referimos a: géneros, familias, órdenes, clases, filos o división y reinos. Como se recoge en Greene (1983), ya en 1583, el italiano Andreas Caesalpinus apuntó algunas de las características que un buen sistema de

clasificación taxonómica debía tener: ser sencillo de usar y memorizar, ser sólido, predictivo y riguroso.

Sin duda alguna, fue el naturalista Carl von Linné, quien impulsó el avance más importante de la Taxonomía, primero con la publicación en 1735 de su obra *Systema naturae* ("Sistema natural, en tres reinos de la naturaleza, según clases, órdenes, géneros y especies, con características, diferencias, sinónimos, lugares) y, posteriormente, en 1753, con su obra *Species Plantarum* ("Las Especies de Plantas"). Entre las numerosas descripciones de plantas que Linné incluye en su obra, se encuentran unas cuarenta especies endémicas de Canarias, a pesar de que Linné no visitó las islas (González 2001). En ambos trabajos, Linné expuso sus ideas para nombrar y agrupar a todos los organismos vivos de forma que se reflejaran sus similitudes morfológicas. La segunda de estas obras está centrada en la clasificación de las plantas, por lo que fue a partir de su publicación cuando se consideró el inicio oficial de la aplicación de la nomenclatura botánica moderna.

Linné fue uno de los primeros naturalistas en enfatizar el uso de caracteres morfológicos compartidos entre organismos para clasificarlos de forma que, a su vez, tenía en cuenta sus similitudes genéticas y, por lo tanto, también evolutivas. Como se reconoce ampliamente, su sistema binomial sirvió para definir las bases del sistema de clasificación biológica que se utiliza hoy en día. Antes de su propuesta de la nomenclatura binomial, muchos de los nombres que se daban a las especies eran largos y complejos, de ahí que uno de los grandes aciertos de Linné fue el de establecer un nombre corto para cada especie, más fácil de recordar. Otro de sus grandes logros fue establecer las categorías taxonómicas y definir un esquema

jerárquico de clasificación (Anderson 1997), donde las especies muy similares morfológicamente se agrupaban en un mismo "género" (categoría taxonómica definida por Joseph Pitton de Tournefort en 1764). De hecho, Feuillée, uno de los primeros científicos que estudió la flora canaria (González 2001), empleó el método de Tournefort para clasificar las aproximadamente 30 plantas canarias que describe en el diario sobre su paso por las islas Canarias (El Hierro y Tenerife, entre 1706 y 1724). Muy pronto, éste método de clasificación fue reemplazado por el método de Linneo.

Linneo se dio cuenta de que las especies se agrupaban de forma diferente si se elegían caracteres diferentes, como delatan las siguientes palabras: "los caracteres no hacen al género, el género nos da sus caracteres". De este modo, Linneo destacó la importancia de saber elegir los caracteres que debían ser considerados para poder agrupar a las especies en "grupos naturales", por ejemplo, un mismo género. Teniendo en cuenta esta observación, Linneo y otros autores posteriores, al llevar a cabo actualizaciones del sistema de clasificación, consideraron que los caracteres que definían a los géneros debían estar presentes en todos sus miembros y ser reconocibles de *visu*.

Con Michel Adanson y su obra *Families des Plantes* (1763-64) comienzan los sistemas de clasificación natural basados en la semejanza de la morfología. Para Adanson "todos los caracteres deben ser tenidos en cuenta en la clasificación y todos ellos han de tener la misma importancia en la elaboración del sistema". Sin embargo, el propio Linneo, Adanson y otros autores se encontraron con una variabilidad mucho mayor de la esperada, al profundizar en el uso de los caracteres morfológicos para la

descripción exacta de los taxones. La indiscutible evidencia de que los caracteres variaban dentro de los grupos "naturales" (incluso dentro de la misma especie) llevó a estos investigadores a concluir que no existían caracteres fundamentales para definir a un grupo. De hecho, para definir un "grupo natural" se exigía de forma imperativa que la mayoría de los caracteres considerados estuvieran presentes en cada especie incluida en dicho grupo. Así, un único individuo de la especie no era ya suficiente para conocer los caracteres de toda la especie. Todo esto llevó a que se empezara a tener en cuenta un conjunto de individuos (aquellos que presentaban variaciones respecto al espécimen tipo o de referencia) para definir a las especies (Adanson 1763-1764).

Posteriormente, Antoine-Laurent de Jussieu (1789) publicó su gran obra *Genera plantarum* ("Los géneros de las plantas ordenadas en familias naturales, de acuerdo al método usado en los jardines reales de París desde el año 1774") que incluía aspectos para la clasificación taxonómica de las plantas que sentaron las bases de la Sistemática moderna, y que sirvió de referencia para los trabajos de otros importantes botánicos como Cuvier y de Candolle. Su "Principio de subordinación de caracteres" (es decir, preponderancia de unos caracteres sobre otros) le llevó a establecer un sistema de agrupación en especies, géneros y familias, agrupando a estas últimas en clases. En base a la presencia o ausencia de cotiledones, establece tres grupos principales: acotiledóneas ("sin cotiledones"), monocotiledóneas ("un cotiledón") y dicotiledóneas ("dos cotiledones"). Posteriormente, los límites de las familias existentes en su *Genera plantarum* fueron modificados, y se agregaron nuevas categorías como las de orden, entre familia y clase, y las de filo y reino, por

encima de la clase (Jussieu 1789). Augustin Pyrame de Candolle consideró como carácter taxonómico fundamental la complejidad del aparato vegetativo, dividiendo a las plantas en vasculares y celulares (*Théorie élémentaire de la Botanique*, 1813).

Su hijo, Alphonse de Candolle, con la contribución de varios autores finalizó (en 1873) la edición del tratado de Botánica iniciado por su padre en 1824: "*Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*", en cuyos 17 volúmenes se tratan todas las familias conocidas (incluyendo descripciones de algunas plantas endémicas de las islas Canarias), y cuyo sistema de clasificación desplazó completamente al de Linneo. Alexander von Humboldt también se une a este grupo de naturalistas que, a través de sus numerosos viajes (en 1799, hace una breve visita a Tenerife), logra tener una visión más amplia del mundo y en 1805 da vida a "una nueva ciencia": la Fitogeografía o Geobotánica.

Robert Brown, el descubridor del núcleo celular (1831) y el primero en notar también la falta de envolturas carpelares en las semillas de gimnospermas, desarrolló una clasificación (que aún se mantiene en la actualidad) basada en las diferencias entre angiospermas y gimnospermas, que incluyó en su *Botanicarum facile princeps* (1827). Propuso que órdenes reconocidos entonces (familias actuales) podían ser agrupados en categorías mayores (equivalentes a los órdenes actuales).

Posteriormente, Stephan Endlicher estableció en su *Genera Plantarum* (1836-1840) una clasificación en la que las dicotiledóneas son divididas en cuatro grupos (polipétalas, apétalas, aclamídeas y monopétalas), mientras que Adolphe Theodore Brongniart clasificó a las monocotiledóneas, según la presencia o ausencia de endospermo en la semilla (*Enumeration des genres de plantes* 1843). Así, pues

podemos decir que este fue un período de importantes descubrimientos en el campo de la Botánica con significativas repercusiones en la Taxonomía Vegetal.

“El origen de las especies”, obra escrita por Charles Darwin en 1859, marca un nuevo período en la historia de la Biología, pues nunca antes se habían introducido conceptos evolutivos en las clasificaciones de los seres vivos. Los sistemáticos comenzaron a ordenar secuencialmente a los grupos naturales de plantas, de forma que primero se encontraban los grupos más simples (formados por organismos que se asemejan más entre sí y que por lo tanto, compartían un ancestro común cercano) y, después los más complejos (grupos con menos rasgos en común, descendientes de ancestros más lejanos). Por lo tanto, el grado de similitud morfológica entre los organismos quedaba reflejado en la topología del árbol de parentesco, según los ancestros comunes. A estos primeros sistemas de clasificación se les llamó filogenéticos, aunque en realidad estaban constituidos por una combinación entre los rasgos naturales contemplados por el sistema de Linneo y rasgos filogenéticos.

Posteriormente, August Eichler modificó los sistemas de clasificación previos, de forma que, situó dentro de las Fanerógamas a las gimnospermas como basales a las angiospermas y dentro de estas últimas, a las monocotiledóneas precediendo a las dicotiledóneas. Otro sistema de clasificación de plantas relevante durante el siglo XX, fue el sistema de Adolf Engler. Este sistema, fue el primero considerado como “filogenético” y, es probablemente el más ampliamente adoptado en la actualidad, siendo el sistema seguido en muchos de los grandes herbarios del mundo porque está basado principalmente en rasgos morfológicos, fáciles de visualizar con la ayuda de una lupa o un microscopio. Richard Wettstein en su “Tratado de Botánica



Sistemática" (1924), tomó en cuenta algunos aspectos del sistema de Engler (flores unisexuales como primitivas y flores con perianto como derivadas) y además, incorporó información filogenética para considerar a las dicotiledóneas como primitivas y las monocotiledóneas como derivadas.

Por su parte, Charles Bessey, crea un sistema (*Outlines of Plant Phyla*, 1911) que se asemeja al de Engler en los grupos inferiores, aunque difiere de este último en la subdivisión de las dicotiledóneas, más similar al sistema seguido por autores como De Candolle ó Bentham. El sistema de Bessey más actual (*The phylogenetic taxonomy of flowering plants*, 1915) sigue una serie de principios que reflejan su creencia de que hay diferentes grados de evolución (desde lo más primitivo hasta lo más desarrollado) en plantas. Considera que la evolución no es siempre ascendente y que no ocurre al mismo tiempo ni en el mismo sentido (de menos a más complejo) en todas las partes del organismo. Asimismo, cree en la consistencia de la evolución, es decir, una vez tienen lugar los fenómenos de progreso (desarrollo) o retroceso (degradación), se mantienen (heredan) hasta el final de ese *phylum*.

En 1966, Armen Takhtajan publica su obra: *A system and phylogeny of flowering plants*. En ella, explica en detalle un sistema evolutivo de clasificación de las plantas con flor, que posteriormente vuelve a publicar con algunas modificaciones como: *Flowering plants: origin and dispersal* (1969). El sistema de Takhtajan está basado en numerosos principios filogenéticos y refleja las relaciones evolutivas de una forma más acertada que muchos otros. Considera las angiospermas como monofiléticas y a las monocotiledóneas como derivadas. Este sistema se suele comparar con el de Cronquist, porque ambos admiten grupos parafiléticos.

El sistema de Cronquist para la clasificación de plantas con flor (*An Integrated System of Classification of Flowering Plants* 1981 y *The Evolution and Classification of Flowering Plants* 1988) está basado principalmente en la morfología y, aunque no acepta los superórdenes de Takhtajan, los dos sistemas se basan prácticamente en los mismos conceptos. Aunque esta clasificación fue muy popular en la década de los 80, la llegada de los análisis moleculares (a partir de la década de los 90) ha provocado una modificación drástica del árbol filogenético de las angiospermas (sistema APG III 2009), que hoy en día es muy diferente del propuesto “tradicionalmente” por Cronquist y otros autores.

El sistema publicado por Dahlgren (1980) también coincide en muchos aspectos con los de Takhtajan y Cronquist. La diferencia principal es que no incluye subclases sino superórdenes. Rolf Dahlgren representa su nueva clasificación de las angiospermas (Dahlgren *et al.* 1985) como un árbol filogenético tridimensional en el cual los organismos vivos podían representarse por un corte de un plano de ese árbol (“Dahlgrenograma”) y las ramas ancestrales representaban taxones desconocidos, muchos de ellos extintos. Acepta como improbable que muchos grupos de angiospermas actuales sean ancestros de otros grupos vivos en la actualidad, por lo que las considera como un grupo que ha retenido una gran proporción de caracteres ancestrales. Los caracteres que utiliza en su clasificación van desde caracteres anatómicos y químicos, hasta caracteres que tienen que ver con el desarrollo.

Los botánicos W. Zimmermann y W. H. Wagner, junto con el biólogo W. Hennig tuvieron un papel clave en la conversión de los sistemas de clasificación, pues aportaron una perspectiva filogenética, para que éstos reflejaran la historia evolutiva

de los organismos. La obra de Hennig "Elementos de una sistemática filogenética" (1966) es especialmente relevante en la Sistemática actual, pues dio origen a la escuela cladista, en la que se fundamentan muchos de los sistemas modernos de clasificación biológica. En el cladismo (Hennig 1966; Wiley *et al.* 1991; Kitching *et al.* 1998) se concibe a los taxones como "clados" o ramas de un árbol filogenético, de forma que los organismos (previamente asignados a una categoría taxonómica) se agrupan según si derivan de un ancestro común (grupos monofiléticos) o no (grupos parafiléticos). Una vez se resuelve el árbol filogenético y se conoce la historia evolutiva del grupo de especies de interés, la Sistemática se encarga de estudiar las relaciones de parentesco, permitiendo clasificar a los organismos a partir de una jerarquía de inclusión (es decir, cada grupo abarca a otros que quedarían por debajo en la escala jerárquica, a la vez, que estarían subordinados a otros que ocuparían un rango mayor en dicha escala). Todas estas aportaciones a las clasificaciones, han hecho que en la actualidad se haya pasado de agrupar a los organismos según su morfología a hacerlo según las similitudes de sus secuencias de ADN.

La DETERMINACIÓN es una subdisciplina de la Taxonomía, también denominada "Identificación", pues persigue asignar un organismo desconocido a uno de los taxones conocidos del sistema de clasificación dado (Simpson *et al.* 2010), a través de los caracteres diagnósticos del organismo incógnita (que son los que determinarán su inclusión en uno u otro taxón).

Lamarck realizó la mayor recopilación botánica de su época en Francia, que publicó en 1778 bajo el título *Flore Française*. En ella, empleó claves dicotómicas para la identificación de las especies y sugirió que los caracteres utilizados por los científicos

para dividir los taxones no tenían que ser necesariamente los mismos que los que se utilizaran para diagnosticarlos. Promovió el empleo de las claves de identificación dicotómicas, que concibió como guías para permitir a los usuarios, no expertos, identificar con mayor sencillez, a un organismo dado, mediante caracteres fácilmente visibles. Este era un sistema más intuitivo que los sistemas de clasificación empleados hasta ese momento.

Normalmente, las claves de identificación se elaboran para una región geográfica dada [p. ej., "Flora Iberica" de plantas vasculares de la Península Ibérica e islas Baleares, Castroviejo, S. (coord. gen.). 1986-2012; "Flora de Andalucía Oriental", Blanca *et al.* (eds.) 2011; "Flora de Andalucía Occidental", Valdés Castrillón *et al.* (eds.) 1987 ó "Flora of Madeira", Press & Short (eds.) 2001], ya que sería inútil consignar en ellas, la información sobre taxones que no se encuentran en la región en la que se encontró el organismo a determinar

Todo lo expuesto anteriormente nos lleva a concluir que solamente después de dar nombres a los organismos y agruparlos en categorías reconocibles podemos empezar a clasificar, estudiar y comprender la biodiversidad.

La existencia de un sistema jerárquico de clasificación de organismos universalmente reconocido es, probablemente, uno de los mayores logros que se ha alcanzado en beneficio de la biodiversidad.

### **1.1.1 LA TAXONOMÍA Y LOS CÓDIGOS DE NOMENCLATURA.**

Durante las décadas posteriores a la edición de los volúmenes de Linneo se asignaron los nombres para muchos animales y plantas, lo que provocó mucha

confusión nomenclatural porque se dieron situaciones como que a un mismo taxón se le asignaron nombres diferentes ("sinonimias").

Esta situación provocó la redacción de reglas para establecer los nombres válidos, tanto de las plantas (*Teoría Elemental de la Botánica*, 1813) como de los animales (*Strickland Code*, 1842). En 1930 se establece el *Código Internacional de Nomenclatura Botánica* o ICBN (*International Code of Botanical Nomenclature*), que trata sobre la nomenclatura de plantas y hongos, en el que se dejan sin efecto los nombres publicados para las plantas antes del año 1753 (cuando se publicó *Species Plantarum* de Linneo).

En 2011 (Congreso internacional de Botánica, Melbourne, <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>) se cambia el nombre del ICBN por el de ICN (*International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants*), para de esta manera reflejar que el código recoge normas para la nomenclatura de hongos y algas, además de las plantas terrestres.

De forma parecida, el que originalmente fuera el *Código Strickland* (1842), fue renombrado en 1901 como *Código Internacional de Nomenclatura Zoológica* (<http://iczn.org/iczn/index.jsp>) o ICZN, con el objetivo de obtener un solo nombre válido para cada taxón dentro de los animales. Con el tiempo han ido surgiendo otros códigos de nomenclatura como el *Código Internacional de Bacterias* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8817/>) o ICNB (*International Code of Nomenclature of Bacteria*), publicado en 1958 e incluso en la actualidad se debate sobre formalizar la nomenclatura de los genes y proteínas (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/guidelines.html>).

## 1.2. TAXONOMÍA Y BIODIVERSIDAD

El concepto de biodiversidad fue acuñado en 1985 por Edward O. Wilson, en el Foro Nacional sobre la Diversidad Biológica de Estados Unidos, cuyas conclusiones fueron publicadas bajo el título de "Biodiversidad" (Wilson 1988). Al definir el concepto de especie como un elemento genético más o menos aislado que evoluciona por sí mismo, Wilson permitió entender la biodiversidad desde una visión menos estática, que la que se había ido manejando según el concepto clásico. Así, a la biodiversidad no hay que entenderla como un conjunto de especies aisladas unas de otras, sino como una compleja red de interacciones entre las comunidades de seres vivos y el ambiente que las rodea (biodiversidad ecológica).

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (<http://www.cbd.int/doc/>), en su Artículo 2, define a la biodiversidad o diversidad biológica como "la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otros, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos procesos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas".

Tradicionalmente, la diversidad biológica se ha dividido en tres niveles, dentro de los cuales puede ser cuantificada y evaluada de diferentes formas: genético (dentro de cada especie), taxonómico (entre especies) y ecológico (entre ecosistemas). Por tanto, para medir la biodiversidad de especies en una región determinada (p. ej., un país, un archipiélago o un río) podemos simplemente realizar un conteo del número total de especies diferentes presentes en esa área dada. También, se puede

establecer la biodiversidad genética o diversidad a nivel genético de las especies de esa región o área determinada. Es decir, se puede cuantificar la variabilidad genética o el polimorfismo entre los genes de diferentes especies, entre poblaciones distintas dentro de una misma especie (variabilidad intraespecífica) o entre poblaciones de distintas especies (variabilidad interespecífica).

Si pretendemos tener una medida más precisa de la diversidad taxonómica de una región, habría que tener en cuenta las relaciones entre los grupos taxonómicos presentes en dicha región. Así, un área conteniendo especies pertenecientes a diferentes géneros y familias tendría mayor diversidad taxonómica que áreas en las que se distribuyeran sólo especies con-genéricas. Otra forma de cuantificar la biodiversidad tiene que ver con la abundancia de especies por unidad de área (p. ej., de 1km<sup>2</sup> ó de 100km<sup>2</sup>), de forma que sabemos que en los bosques húmedos tropicales hay mayor biodiversidad que en la tundra o que en los desiertos (Jablonski *et al.* 2006). La biodiversidad entre ecosistemas es variable.

Puesto que todas las disciplinas de la Biología dependen de la asignación correcta y sin ambigüedades de cada organismo a una Unidad Taxonómica Operativa (UTO de aquí en adelante), la identificación taxonómica se hace indispensable para llevar a cabo cualquier investigación de la diversidad biológica.

Además, las amenazas globales sobre la biodiversidad del planeta (especialmente en la última década) son cada vez más acuciantes, y hacen urgente la necesidad de avanzar en la localización, descripción y clasificación de los seres vivos; es muy probable que en la próxima década muchas de las especies endémicas desaparezcan o se conviertan en inaccesibles para la Ciencia. Todos estos motivos indican que la

necesidad de llevar a cabo esfuerzos científicos a nivel taxonómico tal vez sea aún mayor que en el pasado.

### **1.2.1 LA TAXONOMÍA Y SU PAPEL EN LA CONSERVACIÓN DE LAS ESPECIES: PASADO, PRESENTE Y FUTURO.**

La acuciante necesidad de preservar el legado natural de nuestro planeta llevó a la Convención sobre Diversidad Biológica de la ONU a acordar, entre otros objetivos, que debía mitigarse el actual ritmo de extinción de las especies antes del año 2010, declarado como el Año Internacional de la Biodiversidad ([http://ec.europa.eu/environment/biodiversity/international/pdf/brochure\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/environment/biodiversity/international/pdf/brochure_es.pdf)). Esta iniciativa fue adoptada para llamar la atención sobre la grave situación que padecen los diferentes ecosistemas del planeta (desarrollo económico insostenible en áreas de alta riqueza biológica o devastación de áreas que se habían mantenido hasta recientemente vírgenes) y sobre la considerable reducción en el número de especies, que está teniendo lugar como consecuencia de los cambios globales.

Puesto que la dramática pérdida de biodiversidad actual conlleva la disminución de la diversidad ecológica y genética del planeta, se priorizan los esfuerzos de "Conservación" donde se contemplan estudios científicos multidisciplinarios. Las amenazas y los procesos erosivos que están afectando a las poblaciones naturales sólo pueden ser comprendidos, anticipados y mitigados a la luz de la multidisciplinariedad. Sin embargo, uno de los graves problemas con los que todavía nos encontramos para conservar las especies tiene que ver con la delimitación de las mismas y, también, con el hecho de que ya no es posible conservar todas las



especies, ni todos los hábitats. Los recursos dedicados a la conservación son limitados, por lo cual los especialistas deben estimar en qué hábitats y en qué especies focalizar los presupuestos asignados, y generar modelos predictivos acerca del futuro de la biodiversidad.

En ese sentido, la Taxonomía juega un papel preciso en lo que respecta a la definición de especie y de especiación pues, sin duda, la elección de una clasificación u otra de las especies puede afectar enormemente las prioridades de conservación de cada hábitat. Se ha visto que los inventarios biológicos de las regiones, se ven afectados a diferentes niveles, en función del concepto de especie empleado en su elaboración (Gaston 1996). Conceptos de especie divergentes plantean problemas en los estudios de biodiversidad, por lo que es importante, asegurarnos de que se ha aplicado el mismo concepto de especie, para un taxón superior dado, cuando se hacen comparaciones de números de especies presentes en diferentes áreas (Heywood 2004).

Por encima de estas consideraciones, debemos tener en cuenta que las especies actuales también están sometidas a procesos evolutivos, por lo que es probable que algunas de ellas, en el futuro, den lugar a nuevas especies o se extingan.

Por otro lado, las áreas que se establezcan como prioritarias para la conservación podrán variar, dependiendo del punto de vista desde el que hagamos el análisis (diversidad genética, filogenética, rareza, ecología, etc.).

En todas estas dimensiones, el taxónomo debe jugar un papel fundamental para señalar las lagunas de nuestro conocimiento, las prioridades de conservación, y las

futuras direcciones de investigación. Wheeler (2008) propone la utilización de una "aproximación conceptual" para realizar un análisis a largo plazo de la biodiversidad.

En las últimas décadas, existía un consenso sobre la prioridad de la Biología Sistemática (esto es, nombrar y describir todas las especies del planeta en la medida que fuera posible), y se estableció un sistema de clasificación y unos plazos para la descripción de las especies y el análisis de sus relaciones evolutivas (*Systematics Agenda* 2000). No obstante, a pesar de que en la actualidad ya han sido descritas más de un millón de especies, éstas solamente representan alrededor de un 15% de las que se estima que habitan el planeta (Wilson 2003), lo que muestra que nuestro conocimiento de la diversidad biológica a nivel de géneros y especies es francamente deficiente (Blaxter 2003). Como hemos ido señalando, esta situación se debe principalmente a las dificultades de elaborar censos de los organismos, cuando el concepto básico en el que se fundamentan (el de "especie") presenta muchas definiciones que en ocasiones entran en conflicto y, en otros casos, simplemente no son válidas (Adams 2001; Blaxter *et al.* 2005).

Otro gran problema que padece la Taxonomía es la poca adecuación de los instrumentos metodológicos que utiliza la Biología comparada para diferenciar y describir las especies. En efecto, aunque existiera una definición de especie que fuera aplicable en todos los casos posibles, los caracteres morfológicos (que son los únicos que la Taxonomía clásica utiliza para la caracterización de los organismos vivos), presentan, en ocasiones, limitaciones intrínsecas que disminuyen su valor taxonómico y, que hacen que la clasificación taxonómica no sea posible sin incurrir en ambigüedades.

### **1.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y TAXONOMÍA.**

#### **1.3.1 LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS Y LA TAXONOMÍA.**

Las variables morfológicas han sido, hasta hace poco tiempo, las únicas que se consideraban válidas para establecer Unidades Taxonómicas Operativas (UTO) en la mayoría de linajes de plantas. El principal problema de estas variables es que están muy influenciadas por el ambiente, es decir, su rango de variación puede estar condicionado por factores externos. El ambiente influye notablemente en el desarrollo de las plantas, de forma que muchas veces cambios en el tamaño de sus hojas o la longitud de sus tallos no se deben a mutaciones genéticas (variación heredable), sino que se trata de adaptaciones ambientales (ecotipos o variantes inducidas por el ambiente) que en ocasiones provocan confusiones taxonómicas. Otra de las limitaciones, esta vez extrínseca, de los caracteres morfológicos es que su importancia depende en gran medida de la subjetividad del taxónomo, lo que frecuentemente genera controversias que no hacen posible la identificación de las UTO (Caujapé-Castells 2006).

Por todo esto, la búsqueda de marcadores alternativos que mitiguen y/o complementen algunas de las limitaciones inherentes a la identificación taxonómica mediante variables solamente morfológicas es fundamental para poder delimitar mejor y más rápidamente las unidades de conservación.

En resumen, si comparamos los marcadores moleculares con los morfológicos nos encontramos con ciertas ventajas de los primeros sobre los segundos, como se recoge en Caujapé-Castells *et al.* 2011:

1) los caracteres morfológicos sufren variaciones a veces enormes durante su ciclo vital (p. ej., en el caso de los árboles, las plántulas difieren muchísimo morfológicamente del ejemplar en estado adulto) lo que hace que (especialmente en invertebrados) diferentes estadios vitales de una misma especie hayan sido erróneamente asignados a diferentes especies. Por el contrario, los caracteres moleculares utilizados en Sistemática permanecen invariables a lo largo del desarrollo.

2) Algunos caracteres morfológicos son adaptativos (por ejemplo el tamaño de las hojas, que depende de las condiciones en las que se desarrolle la planta). La eventual confusión de esta variabilidad ambiental con variabilidad heredable puede desembocar en la definición de "especies" sin ninguna base biológica, algo que no ocurriría con los caracteres moleculares utilizados en sistemática, que no están sujetos a influencias medioambientales (Judd *et al.* 2007).

3) Los caracteres morfológicos son a menudo difíciles de analizar estadísticamente, porque están influidos por multitud de genes cuya contribución al fenotipo desconocemos (Doebly *et al.* 1990, Koornneef *et al.* 2004), mientras que los caracteres moleculares utilizados en sistemática son discretos y homologables en todos los organismos, garantizándose la total homología de las comparaciones.

4) Cuando hay pocos caracteres morfológicos para la discriminación taxonómica, estos generan problemas en lugar de consenso. Las variables moleculares aportan otra fuente de caracteres que pueden contribuir a disipar dudas taxonómicas.

### **1.3.2 EL ROL DEL ADN EN LA IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS ESPECIES.**

Los avances científico-técnicos de los últimos tiempos han permitido incorporar nuevas variables cuya aplicación (aunque no exenta de dificultades) supera al menos las cuatro limitaciones de las variables morfológicas anteriormente mencionadas y puede, por ello, complementar de forma conveniente la aproximación clásica a la Taxonomía. Como toda disciplina científica, la Taxonomía afronta problemas cuya solución debe buscarse en la colaboración con otras ramas de la ciencia que tienen que ver con la biodiversidad. Los marcadores moleculares han ofrecido hasta ahora una herramienta que se ha mostrado muy útil para resolver muchos de estos problemas. La constante aparición de nuevos marcadores hipervariables y genéticamente conocidos está consolidando una fructífera alianza entre la Taxonomía clásica y la Genética molecular (Caujapé-Castells *et al.* 2006).

La Sistemática molecular se centra en los cambios presentes en las secuencias de ADN y que son compartidos por un subconjunto de taxones (las sinapomorfías), ya que su número y calidad indica el grado de parentesco entre cada uno de los taxones objeto de estudio. Por lo tanto, la Sistemática molecular utiliza la información que contiene el ADN para inferir relaciones de parentesco entre los organismos. Esta disciplina ha tenido un desarrollo espectacular desde sus inicios en la década de los 90, de forma que los datos moleculares han revolucionado el trabajo en Sistemática (ver por ejemplo APG III 1998, 2003 y 2009).

Pero la Sistemática también tiene sus limitaciones; entre ellas, destacan las planteadas por dos procesos que dificultan la interpretación y el análisis de la información filogenética: las reversiones y las convergencias (Arendt & Reznick

2008). En las reversiones, un estado derivado del carácter vuelve a un estado ancestral (por ejemplo: leñoso -> herbáceo -> leñoso), lo que puede llevar a confusión, y provocar que una especie se considere como ancestral cuando en realidad es derivada. Así, por ejemplo en el género *Echium* (Böhle *et al.* 1996), vemos como el carácter ancestral leñoso pudo haber sufrido una reversión (las especies continentales africanas más cercanas pertenecen al género *Lobostemon*, que es en su totalidad leñoso) al pasar a un estado derivado herbáceo en el Mediterráneo (p. ej., *E. sabulicolum*, *E. arenarium*, *E. italicum* o *E. albicans*) para nuevamente volver al estado ancestral en Macaronesia (García-Maroto *et al.* 2009), dónde las especies son fundamentalmente leñosas, (p. ej., *E. acanthocarpum*, *E. bethencourtii*, *E. decaisnei*, *E. hierrense*, *E. sventenii* o *E. webii* en Canarias; *E. candicans* y *E. nervosum* en Madeira; *E. hypertropicum* y *E. vulcanorum* en Cabo Verde).

En las convergencias, dos especies son similares, no porque estén emparentadas sino por eventos de mutaciones independientes o por adaptaciones a un mismo ambiente. Es decir, dos especies que no comparten un ancestro común, presentan estructuras (estados de caracteres) similares debido a procesos evolutivos distintos, como respuesta a, por ejemplo, condiciones ambientales semejantes (Hedges & Sibley 1994, Bull *et al.* 1997, McCracken *et al.* 1999, Wiens *et al.* 2003). Un modelo claro de convergencia evolutiva en plantas es el que se observa entre los cardones (p. ej., *Euphorbia canariensis*, islas Canarias) y especies de cactus de otras partes del mundo (p. ej., *Stenocereus thurberi* de Arizona, EE.UU.), que no guardan relación entre sí pero que son morfológicamente muy similares. Esto es debido a los

mecanismos de adaptación que desarrollan las plantas xerófitas para sobrevivir en ambientes áridos.

Los primeros trabajos que utilizaban datos moleculares como caracteres para la Biología Sistemática (Hedges & Maxson 1996, Givnish & Sytsma 1997) aseguraban que estos datos son más adecuados que los morfológicos para reflejar la verdadera filogenia de los organismos. La hipótesis subyacente a esta afirmación era que los datos moleculares estaban menos sujetos a convergencia evolutiva y paralelismo que los caracteres morfológicos, ya que reflejaban cambios a nivel del genoma. No obstante, posteriores trabajos han mostrado que los datos moleculares están en realidad sujetos a algunos problemas análogos a los que plantea el uso de los datos morfológicos, aunque hay algunas diferencias entre ambos tipos de marcadores que hacen que las secuencias de ADN puedan representar una gran ayuda para la Taxonomía clásica.

La mayor ventaja de la mayoría de las secuencias de ADN utilizadas en Sistemática es que son ortólogas (es decir, derivan de una molécula ancestral común a través de eventos de especiación), por lo cual reflejan un mismo origen evolutivo, son directamente comparables y pueden utilizarse sin ambigüedades para establecer las Unidades Taxonómicas Operativas Moleculares (UTOM).

Aunque es cierto que las UTOM no siempre corresponderán a UTO, sí ofrecen una serie de ventajas analíticas, entre las cuales cabe destacar (Bramwell & Caujapé-Castells 2008):

- (a) la simplicidad técnica de caracterización, basada en la extracción de ADN, su amplificación y subsiguiente secuenciación, y

(b) el hecho de que taxones morfológicamente conflictivos, dudosos o crípticos puedan identificarse sin necesidad de disponer de los organismos enteros o de medidas poblacionales.

Además, hay muchos más datos moleculares que datos morfológicos disponibles, y su análisis e interpretación son también más directos, pues una "adenina" será siempre una "adenina", mientras que por ejemplo "un tipo morfológico de hoja" puede estar influido por variaciones de muchos genes diferentes, tener un rango de variabilidad muy amplio en especies diferentes, e incluso diferir entre individuos de un mismo taxón, probablemente por variaciones en los distintos genes que determinan ese aspecto de la morfología.

El contenido informativo del ADN permite hacer algunas analogías entre los genomas de los organismos y los códigos de barras que se utilizan para identificar los productos en venta en un supermercado, en el sentido de que en este último, las barras y espacios entre ellas representan pequeñas cadenas de caracteres, que permiten reconocer rápidamente un artículo de forma única, global y no ambigua, y así poder realizar inventarios o consultar sus características asociadas. De la misma forma, los "códigos de barras de la vida", están basados en una región o varias regiones de ADN y la lectura de su secuencia de bases constituyen los caracteres de referencia (caracteres exclusivos) que deberían contribuir a identificar al taxón al cual pertenece el espécimen analizado (Hebert *et al.* 2003, Tautz *et al.* 2003). El mayor inconveniente que puede conllevar el uso del término "código de barras" para hacer



referencia a la biodiversidad es que los códigos de barras asociados a bienes materiales son una manera artificial de asignar identidades a los productos en venta, lo que podría llevar a pensar que los “códigos de barras de la vida” son también definidos, de forma artificial, por los investigadores para asignar identidades taxonómicas. Sin embargo, este no es el caso de “los códigos de barras moleculares” que son cambios que ocurren por procesos naturales y que hacen que existan nucleótidos exclusivos diferentes en las secuencias de ADN de unos taxones respecto a otros. De la misma forma que en medicina forense o en estudios de paternidad se puede establecer la identidad individual a partir de estudios genéticos basados en secuencias del ADN, Hebert *et al.* (2003a y b) propusieron que ciertas regiones de la secuencia del ADN fueran utilizadas para delimitar la pertenencia de un organismo determinado a un grupo o a una categoría taxonómica.

Esencialmente, un “código de barras molecular” consiste en el uso de una o varias secuencias cortas y estandarizadas del genoma (Kress *et al.* 2005; Savolainen *et al.* 2005) como complemento a la Taxonomía para ayudar a caracterizar, distinguir o identificar especies, para detectar especies nuevas para la ciencia, e incluso para asignar individuos (o partes de individuos no identificadas) a sus especies correctas.

Es importante señalar que estas regiones “códigos de barras moleculares” o “códigos de barras” no permiten describir especies nuevas. Su papel no es construir una Taxonomía basada en el ADN, sino constituirse en una herramienta válida para (i) la rápida identificación de especies previamente descritas, reguladas y referenciadas por taxónomos, y/o (ii) complementar a la Taxonomía cuando no existen caracteres morfológicos diagnósticos o cuando los caracteres morfológicos disponibles son

ambiguos. De hecho, las regiones "código de barras" son especialmente útiles cuando las variables morfológicas no son concluyentes ni accesibles. De lo contrario, el análisis de los caracteres morfológicos visibles resuelve las dudas taxonómicas de forma más inmediata que lo que supone generar y comparar secuencias de ADN.

Por lo tanto, en unos casos los caracteres morfológicos por sí solos serán suficientes para diferenciar taxones, en otros lo serán sólo los moleculares y, en otros casos, será la combinación de ambos lo que permita la discriminación y clasificación de los taxones en cuestión. Así pues, como señala Weber (2003) la Sistemática molecular (caracteres moleculares) y la Taxonomía (caracteres morfológicos) son dos disciplinas independientes e igualmente potentes que ahora es posible combinar en un sistema de mutua elucidación. La morfología debe servir también como herramienta para reconocer las carencias (debilidades) en las clasificaciones moleculares, y *viceversa*. La comparación de los datos obtenidos por ambas disciplinas permitirá confirmar identidades y relaciones establecidas en previos estudios o, por lo contrario, poner éstas en cuestión.

La mayor dificultad que plantea el uso de "códigos de barras moleculares" con finalidad taxonómica radica en saber si la variabilidad que detectemos en los UTOM puede considerarse interespecífica (y usarse para definir UTO) o intraespecífica (y, por tanto, considerarse taxonómicamente irrelevante) (Caujapé-Castells *et al.* 2006). Los niveles de variabilidad intraespecífica van a depender en muchos casos del linaje al que pertenezcan los organismos en cuestión (como se muestra en detalle en el capítulo 4, hemos detectado una alta variabilidad infra-específica en especies de los géneros como *Erica*, *Ilex* y *Myrica*).

No obstante, los "códigos de barras" están asociados a secuencias de ADN, que ofrecen la ventaja ya comentada de la ortología. Por tanto, permiten la evaluación consistente de su variabilidad, pues podemos garantizar que comparamos las mismas regiones en todos los organismos (lo cual no es posible afirmar con los caracteres morfológicos). Consecuentemente, uno de los problemas fundamentales que las variables moleculares pueden contribuir a resolver de manera satisfactoria se refiere a delimitar la cantidad de variabilidad, taxonómicamente relevante, en casos donde la morfología no ofrece dudas acerca de la identidad específica (de aquí en adelante, casos taxonómicamente claros, Tabla 4.1, definiciones). Por otro lado, son particularmente significativas las comparaciones de casos taxonómicamente claros, con casos en los que tal identidad está sujeta a controversia (de aquí en adelante, casos taxonómicamente conflictivos, Tabla 4.1, definiciones). Las comparaciones de poblaciones con-específicas (según la Taxonomía actual) en casos taxonómicamente claros nos permitirán detectar la existencia de posibles especies crípticas (ver cap. 4), donde la diferenciación genética detectada es mucho mayor que la esperada, es decir, poblaciones que morfológicamente son tan parecidas entre sí que han sido consideradas como parte de una única especie pero que, según los marcadores moleculares, podrían ser consideradas diferentes taxones.

El caso contrario también puede darse, por ejemplo, las especies agamospérmicas (Saltar *et al.* 1996) tienden a constituir subpoblaciones con diferencias morfológicas marcadas y, por lo tanto, muchas veces son reconocidas como entidades taxonómicas diferentes cuando molecularmente se trata de subpoblaciones clonales (por ejemplo, las especies de zarzas del género *Rubus*, forman un gran complejo agámico, pero su

tratamiento taxonómico ha sufrido numerosas variaciones; Weber 1996 & Evans *et al.* 1998). Otro ejemplo, es el de los grupos que han experimentado radiaciones (*Aeonium, Convolvulus, Echium, Micromeria, Sonchus*, etc.) cuyo origen reciente hace que una misma especie haya ocupado distintos nichos ecológicos (dentro de una misma isla o en islas distintas) y que en cada uno de ellos presente características morfológicas distintas.

Por todos estos motivos, y remarcando que el papel de los taxónomos es fundamental para resolver y dar validez a las clasificaciones taxonómicas, hay también que destacar que las técnicas moleculares pueden permitir identificar especies taxonómicamente claras a partir de fragmentos de especímenes irreconocibles por su morfología, ayudar a detectar posibles especies cripticas, o clarificar algunas situaciones conflictivas, señalando casos en los que podría ser necesaria una revisión taxonómica. Por lo tanto, podemos afirmar que las secuencias de ADN permiten resolver algunos de los problemas con los que nos encontramos en la conservación de la biodiversidad y que afectan en primera instancia a la delimitación de los taxones. No podemos olvidar que las especies son el referente científico más utilizado para caracterizar la biodiversidad y el primero para definir políticas de conservación de la misma (Crisci 2006). Por ello, para llevar a cabo cualquier investigación sobre la biodiversidad es indispensable poder realizar una identificación correcta y sin ambigüedades de las unidades biológicas que la conforman. Cualquier error en este sentido puede afectar enormemente la elección de prioridades de conservación.

### 1.3.3 ESTUDIOS MOLECULARES EN LA FLORA CANARIA.

Desde principios de los 90 hasta la actualidad, se han generado numerosas filogenias que incluyen muchas de las especies vegetales emblemáticas, endémicas y no endémicas de Canarias (*Echium*, *Sonchus*, *Pericallis*, *Bencomia*, *Argyranthemum*, *Crambe*, *Euphorbia*, *Aeonium*, *Tolpis*, *Sideritis*, *Lavatera*, *Convolvulus*, *Lotus*, etc.). En un primer momento, abundaban los estudios filogenéticos que estaban basados únicamente en la región *ITS* del ADNn (Böhle *et al.* 1996; Kim *et al.* 1999; Susanna *et al.*; Panero *et al.*; Helfgott *et al.* 2000; Francisco-Ortega *et al.* 1997, 2001 y 2002; Molero *et al.* 2002; Pelsner *et al.* 2002; Garcia-Jacas *et al.*; Mort *et al.* 2002; Moore *et al.* 2002; Martins *et al.* 2003; Valcárcet *et al.* 2003, etc.), pero en la última década, la tendencia ha sido combinar la región *ITS* con otras del ADN cloroplástico o con otro tipo de marcadores como *ISSR*, *ETS* o *AFLPs* (Tabla 1.1). Incluso, a lo largo de los años, se ha ido profundizando y mejorando el conocimiento de algunos grupos como *Cistus*, *Ilex*, *Micromeria*, *Echium* o *Lotus*, no sólo incrementándose el número de especies para completar sus filogenias sino, también, al irse aplicando más y distintos marcadores moleculares, combinándose la información aportada por cada uno de ellos (p. ej., regiones del ADN cloroplástico analizadas conjuntamente con regiones del ADN nuclear)

Todos estos estudios han permitido importantes avances en el conocimiento de la flora silvestre de las islas Canarias, al abarcar géneros muy emblemáticos de la misma, y tanto grupos que han radiado en las islas, como de grupos de evolución incipiente.

**Tabla 1.1.** Marcadores moleculares empleados, durante la última década, en el desarrollo de estudios filogenéticos que incluyen especies de géneros presentes en Canarias (ordenados alfabéticamente).

<b>GÉNERO (FAMILIA)</b>	<b>MARCADOR</b>	<b>REFERENCIA</b>	<b>FECHA</b>
<i>Aeonium</i> (Crassulaceae)	ITS	Mort <i>et al.</i>	2007
<i>Aichryson</i> (Crassulaceae)	ITS+ADNcp	Fairfield <i>et al.</i>	2004
<i>Androcymbium</i> (Colchicaceae)	ADNcp	del Hoyo <i>et al.</i>	2009
<i>Andryala</i> (Asteraceae)	ITS+ADNcp	Fehrer <i>et al.</i>	2007
<i>Artemisia</i> (Asteraceae)	ITS	Sanz <i>et al.</i>	2008
<i>Bystropogon</i> (Lamiaceae)	ITS+ADNcp	Trusty <i>et al.</i>	2004 y 2005
<i>Canarina</i> (Campanulaceae)	ITS+ADNcp	Roquet <i>et al.</i>	2008
<i>Cheirolophus</i> (Asteraceae)	ITS+ETS	Garnatje <i>et al.</i>	2007
<i>Cheirolophus</i> (Asteraceae)	ITS+ETS	Vitales <i>et al.</i>	2014
<i>Cistus</i> (Cistaceae)	ITS+ADNcp	Guzmán & Vargas	2005 y 2010
<i>Cistus</i> (Cistaceae)	ADNcp	Fdez-Mazuecos & Vargas	2011
<i>Convolvulus</i> (Convolvulaceae)	ITS	Carine <i>et al.</i>	2004
<i>Descurainia</i> (Brassicaceae)	ITS	Goodson <i>et al.</i>	2006
<i>Echium</i> (Boraginaceae)	D6-desaturase	García-Maroto <i>et al.</i>	2009
<i>Echium</i> (Boraginaceae)	ADNcp	Mansion <i>et al.</i>	2009
<i>Erysimum</i> (Brassicaceae)	ITS	Moazzeni <i>et al.</i>	2014
<i>Euphorbia</i> (Euphorbiaceae)	ITS+ADNcp	Zimmerman	2010
<i>Festuca</i> (Poaceae)	ITS	Catalán <i>et al.</i>	2004
<i>Festuca</i> (Poaceae)	ITS+ADNcp	Inda <i>et al.</i>	2008
<i>Helichrysum</i> (Asteraceae)	ITS/ ITS+ETS	Galbany-Casals <i>et al.</i>	2004/ 2009
<i>Hypericum</i> (Hypericaceae)	ITS+AFLP	Dlugosch & Parker	2007
<i>Ilex</i> (Aquifoliaceae)	ITS/ ITS+ADNcp	Manen <i>et al.</i>	2004/2010
<i>Isoplexis</i> (Scrophulariaceae)	ITS+ADNcp	Bräuchler <i>et al.</i>	2004
<i>Laurus</i> (Lauraceae)	ADNcp	Rodríguez-Sánchez <i>et al.</i>	2009
<i>Lavatera</i> (Malvaceae)	ITS+ADNcp	Escobar-García <i>et al.</i>	2009
<i>Limonium</i> (Plumbaginaceae)	ADNcp	Lledó <i>et al.</i>	2005
<i>Lotus</i> (Fabaceae)	ITS	Allan <i>et al.</i> / Degtjareva <i>et al.</i>	2004/ 2008
<i>Lotus</i> (Fabaceae)	CYB6+ITS+ADNcp	Ojeda <i>et al.</i>	2012
<i>Matthiola</i> (Brassicaceae)	ITS	Jaén-Molina <i>et al.</i>	2009
<i>Micomeria</i> (Lamiaceae)	ADNcp/ITS+ADNcp	Bräuchler <i>et al.</i>	2005/ 2010
<i>Myrica-Morella</i> (Myricaceae)	ITS+ADNcp	Huguet <i>et al.</i>	2005
<i>Olea</i> (Oleaceae)	ITS+ADNcp	Besnard <i>et al.</i>	2009
<i>Pericallis-Senecio</i> (Asteraceae)	ITS/ ITS+ADNcp	Pelser <i>et al.</i>	2002 y 2010
<i>Reseda</i> (Resedaceae)	ITS+ADNcp	Martín-Bravo <i>et al.</i>	2007
<i>Rhamnus</i> (Rhamnaceae)	ITS+ADNcp	Bolmgren & Oxelman	2004
<i>Rumex</i> (Polygonaceae)	ITS&AFLP	Talavera <i>et al.</i>	2011
<i>Ruta</i> (Rutaceae)	ADNcp	Salvo <i>et al.</i>	2008
<i>Salvia</i> (Lamiaceae)	ADNcp	Walker <i>et al.</i>	2004
Senecioneae (Asteraceae)	ITS+ADNcp/ITS+ETS	Pelser <i>et al.</i>	2007/ 2010
<i>Sideritis</i> (Lamiaceae)	ITS+ADNcp	Barber <i>et al.</i>	2007
Sonchinea alianza (Asteraceae)	ITS+ADNcp	Lee <i>et al.</i>	2005
Sonchinea subtribu (Asteraceae)	ITS+ADNcp	Kim <i>et al.</i>	2007
<i>Tolpis</i> (Asteraceae)	ISSR	Archibald <i>et al.</i>	2006
<i>Tolpis</i> (Asteraceae)	ETS	Gruenstaeudl <i>et al.</i>	2013

De forma resumida y siguiendo a Caujapé-Castells (2011), los estudios moleculares realizados con elementos de la flora endémica canaria permiten apuntar que:

1) Aunque hay muchas razones que podían sugerir que el origen de la flora canaria está en el continente africano (la proximidad geográfica, la existencia de vientos alisios y saharianos que podían haber transportado propágulos desde el Noroeste africano a las islas Canarias, etc.), las filogenias moleculares apuntan que sólo el 25% de los géneros canarios estudiados con perspectivas moleculares tienen su origen en el Norte de África. En cambio, los datos moleculares apoyan que el 35% de los ancestros más cercanos a las especies canarias estudiadas tienen el Mediterráneo, como lugar de origen más probable (Carine *et al.* 2004). Con las limitaciones que impone la probable influencia de la extinción en muchos de estos grupos y defectos de muestreo (Caujapé-Castells 2011), parece ser que factores que no tienen que ver ni con la proximidad al continente ni con el régimen de vientos, determinaron el origen del 40% restante de nuestra flora.

2) La existencia de numerosos "montes submarinos" y *guyots* que en el pasado estuvieron emergidos, seguramente contribuyó a la dispersión de la fauna y flora desde el continente hacia las islas (Fernández-Palacios 2009), y podría llevar a pensar que la colonización de las islas se debió a múltiples introducciones. Sin embargo, las filogenias moleculares señalan que la mayor parte de los géneros llegaron a las islas vía un evento de colonización (Caujapé-Castells 2011).

3) Por otro lado, los datos moleculares también sugieren que un importante porcentaje (18%) de endemismos canarios tienen su origen en las propias islas

Canarias y en otros archipiélagos macaronésicos, resaltando el importante papel de la dispersión inter-islas e intra-archipiélago en la generación de la flora canaria actual.

4) Las filogenias moleculares de linajes endémicos canarios, han permitido detectar un fenómeno que se ha denominado "efecto "boomerang" o "retro-colonización", por el cual se cree que las islas Canarias no han sido únicamente receptoras de biodiversidad procedente del continente, sino que también, han sido dadoras de biodiversidad. Los "westerlies" (Rognon & Coudé-Gausson 1996), vientos dominantes en el Pleistoceno, y que soplaban desde el oeste (Canarias) hacia el este (África), pudieron permitir que especies vegetales que habían llegado a Canarias, retornaran de nuevo a su lugar de origen (procesos de retro-colonización)

5) Por último, hay evidencias moleculares, que apoyan que las especies distribuidas en las islas más orientales (Fuerteventura, Lanzarote y, Gran Canaria), son genéticamente más similares a sus congéneres del oeste de África, que a las especies de las islas más occidentales. Una explicación a este hecho es la hipótesis del "singameon surfista" (Caujapé-Castells 2010), por la cual se considera que las especies que colonizaron las islas más occidentales, tienen menor variabilidad genética (según datos aloenzimáticos, Caujapé-Castells & Pérez de Paz 2009) porque se encuentran más alejadas del punto de origen del evento de colonización.

Según esta hipótesis las islas orientales (Fuerteventura, Lanzarote y Gran Canaria) tienen mayores niveles de diversidad genética debido a que estas islas funcionan como sumideros de colonización y en ellos se dan fenómenos de *genetic swamping* o mezcla genética. Los "singameones" (*sensu* Grant 1957) son conjuntos de organismos cercanos filogenéticamente, con una elevada compatibilidad reproductiva



y que por estar en zonas ecológicamente similares, intercambian genes entre sí. La teoría del singameon surfista, se cumpliría especialmente para Fuerteventura y Lanzarote, pues son las islas más próximas al continente, y también las más bajas, planas y uniformes, por lo que prácticamente no presentan barreras al flujo génico entre sus elementos vegetales y los del noroeste de África.

Por todo lo expuesto, no cabe duda de que los estudios moleculares han permitido entender y conocer más ampliamente los procesos de especiación que han dado lugar a la flora canaria actual, pero aún quedan muchas cuestiones y grupos pendientes de resolver. Una de las principales limitaciones de los datos moleculares generados sobre la flora canaria es que como ya vimos, la mayoría están basados en la región *ITS*, que ha mostrado poca capacidad de resolución para muchos de los linajes estudiados (Böhle *et al.* 1996; Allan *et al.* 2003, Francisco-Ortega *et al.* 2002).

Por ello, consideramos que una de las prioridades en el estudio sistemático molecular de la flora canaria debe ser aplicar, como se ha empezado a hacer en los últimos años (ver Tabla 1.1), otras regiones más discriminantes que permitan clarificar o refinar las relaciones de los linajes canarios aún no resueltas. Otro de los retos es lograr tener representantes de los congéneres continentales más próximos (NW de África), pues éstos están casi siempre ausentes en las filogenias publicadas. Por ello, detectar lagunas existentes en el conocimiento actual de nuestra flora (para cada disciplina y por linaje) es fundamental para poder ir completando y uniformizando los datos disponibles. Así, una vez, que se logre estandarizar la información multidisciplinar generada, de forma que se puedan complementar, por ejemplo, datos filogenéticos, con datos de genética de poblaciones y con datos de

biología reproductiva (Caujapé-Castells 2011), se dará un salto cuantitativo y cualitativo muy importante en el conocimiento actual de la flora canaria.

#### **1.3.4 ESTUDIOS TAXONÓMICOS EN LA FLORA CANARIA.**

Dentro de las numerosas expediciones al Nuevo Mundo y otros territorios poco conocidos, realizadas durante el siglo XVIII, destacan además de las inglesas, las expediciones españolas llevadas a cabo por: José Celestino Mutis a Nueva Granada (entre los años 1782 y 1808) y José Mariano Mociño y Martín de Sesse a México, California, Centroamérica y las Antillas (entre los años 1787 y 1803). Estas exploraciones no sólo aportaron plantas vivas y semillas sino también materiales para incrementar las colecciones de los herbarios, estimulando el desarrollo de publicaciones sobre la flora descrita y recolectada. Así, en 1757, se editó la *Histoire naturelle du Senegal*, elaborada por Adanson y en 1775, Forsskal (discípulo de Linneo), elaboró la *Flora aegyptiaco-arabica* sobre la flora de Yemen y del Sur de Egipto; en 1885 y en 1889 se editó la *Flora Mexicana* y *Plantae Novae Hispaniae*, respectivamente, basadas en los trabajos de Mociño y de Sesse; y posteriormente, en 1954, se comenzó a editar la *Flora de Nueva Granada* elaborada por Mutis sobre la Flora de Colombia. En 1767, se publica *Principios de Botánica*, escrita por M. Barnades, siendo la primera obra que en España, introduce los métodos de clasificación botánica según la nomenclatura binomial de Linneo. A.J. Cavanilles, que fue director del Real Jardín Botánico de Madrid, elaboró *Icones Plantarum* (1791-1806), obra que incluía unas setecientas descripciones de plantas de la Península Ibérica acompañadas por láminas dibujadas por el mismo autor (Herrera Piqué 2006).

Aunque el descubrimiento del Nuevo Mundo absorbió todo el interés de botánicos y naturalistas, las expediciones y herborizaciones de Joseph Banks, Francis Masson y William Aiton a las islas de Azores, Madeira y Canarias durante los años 1777-1778 dan un gran impulso al estudio de la flora canaria. Entre los años 1772 y 1783, D. José Viera y Clavijo, considerado como primer naturalista isleño, publica su *Noticia de la Historia General de las Islas Canarias*. Posteriormente, en 1799, escribió su obra más importante *Diccionario de Historia Natural de las Islas Canarias*, donde recopila una ingente documentación sobre el archipiélago canario, convirtiéndose en un valiosísimo texto de referencia, desde su publicación hasta la actualidad. En lo que respecta a la sección dedicada a la botánica, en dicha obra se recogen la denominación latina, el nombre castellano y la denominación que se le daba en Canarias de ciento cuarenta especies vegetales. Además, junto a las descripciones que hace de las plantas, aporta información sobre sus propiedades medicinales, artesanales e industriales (Herrera Piqué 2006). Para elaborar este "Diccionario" Viera y Clavijo toma como referencia las obras de Plukenet (realiza el primer listado botánico de endemismos canarios), Tournefort (botánico francés más importante de su época), Linneo (padre e hijo), Lamarck (describe, junto con Poiret, varias especies canarias en su *Encyclopédie Méthodique*), Masson y Cavanilles (Herrera Piqué 2006).

En 1789 Aiton (en colaboración con Solander y Dryander) publica *Hortus Kewensis* que incluye la descripción de unas veinticinco plantas endémicas canarias. Son tres científicos europeos los que impulsaron el estudio de la flora de Canarias durante el siglo XVIII: Louis Feuillé, Carl von Linneo y Joseph Banks. Feuillé es considerado como el padre de la botánica descriptiva en Canarias (Herrera Piquer 2006), ya que

describió y clasificó cerca de una treintena de las especies vegetales que observó en su primer viaje realizado al archipiélago canario y que recogió en su diario: "Voyage aux Isles Canaries ou Journal des Observations Physiques, Mathematiques, Botaniques et historiques" (1724). Después de Feuillé, Adanson fue el primer naturalista que visitó las islas Canarias, lo hizo en 1749, herborizando algunas plantas en Tenerife. Por su parte, J. Banks como director del Royal Botanical de Graden de Kew, envió a F. Masson al archipiélago canario con la misión de recolectar planta viva y semillas, lo que le llevó a hacer un gran acopio de colecciones de la flora canaria.

Posteriormente, desde 1815 hasta comienzos del siglo XX llegan a las islas importantes nombres para la botánica canaria como son: Augusto Broussonet, Christen Smith, Leopold von Buch, Antonio José Cavanilles, Joseph Bormüller, Phillip Barker Webb, Sabino Berthelot, Ramón Masferrer, Herman Christ, Carl Bolle, Rev. R.P. Murray, Charles Joseph Pitard y Louis Proust, entre otros. Todos ellos realizaron relevantes investigaciones sobre nuestra flora, así por ejemplo, Broussonet colabora con Humboldt para la descripción de de los pisos de vegetación de Tenerife (Herrera Piquer 2006); Smith y Buch, realizan la primera expedición a Canarias con fines investigadores sin estar ligada a proyectos oficiales. Aunque Smith no publicó ningún trabajo sobre sus observaciones durante la visita a las distintas islas del archipiélago, si nos dejó su "Diario" del viaje que realizaron en 1815 (Fundación Canaria Orotava de Historia de La Ciencia 2005), mientras que Buch (1819) escribió el primer catálogo de plantas de las islas (*Compendio General de las islas Canarias*), entre 1836-1850; Webb y Berthelot escribieron *Histoire Naturelle des Illes Canaries*, y en 1908, Pitard y Proust, publican de *Flore des Iles Canaries*. A mediados del siglo, O. Buchard publica

su *Contribución a la ecología y la biología de las plantas de las islas Canarias* (1929) y R. Lloyd Praeger escribe la monografía *Crassulaceae Endémicas de Canarias* (1932). Finalmente, L. Ortuño y F. Ceballos (que publican en 1951, *Vegetación Forestal de las islas Canarias Occidentales*), K. Lems (que publica en 1960, *Floristic Botany of the Canary Islands*), G. Kunkel y E. R. Sventenius, cubren un largo período de estudios sobre la flora canaria. Günther Kunkel estudió más de un centenar de taxones endémicos, descubriendo varias especies nuevas para la ciencia (Naranjo Rodríguez 2005) y fue además el responsable de la primera revista especializada en temas botánicos de Canarias: *Cuadernos de Botánica Canaria* (1967-1977) con títulos como: "Plantas vasculares nuevas para la flora de Gran Canaria" (1967) ó "Gran Canaria, Tenerife y La Gomera: Notas florísticas y adiciones" (1976). También es de destacar la amplia producción de su mujer Mary Anne Kunkel, que publicó más de 1.500 dibujos e ilustraciones sobre especies botánicas, muchos de ellos incluidos en el *Diccionario Botánico Canario. Manual Etimológico* (1986).

Por su parte, D. Eric R. Sventenius que fue el primer director del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" realiza una labor extraordinaria entre los años 1943 y 1973, que culmina con 22 publicaciones científicas (19 como único autor y 3 en colaboración) y descubriendo más de un centenar de especies (González 2001, Santos 2010). En sus primeras publicaciones (1946) describe algunas especies como *Centaurea junoniana*, *C. ghomeryta*, *C. tagananensis* ó *Monanthes niphophila* y *M. dasphylla*, siendo a partir de sus publicaciones de 1948 con descripciones de nuevas especies, cuando se las empieza a dedicar a botánicos ilustres que le precedieron en el estudio de la flora canaria, a compañeros de expedición y/o amigos y, a

personalidades de las islas que le dieron su apoyo (Santos 2010). Su obra más completa fue *Additamentum ad Floram Canariense* que publicó en 1960, dónde incluyó las descripciones en latín de un gran número de taxones canarios acompañadas de láminas realizadas por el propio Sventenius, con gran precisión y maestría (como la de *Euphorbia bravoana*, que aparece en la portada de este cap.). En 1972 publicó junto con Kunkel "Los Tiles de Moya: Enumeración florística y datos sobre el futuro parque natural".

Posteriormente, D. David Bramwell, desde la dirección del Jardín Botánico "Viera y Clavijo" que asumió tras el fallecimiento de E.R. Sventenius, ha realizado una gran labor de divulgación de la flora canaria con la publicación de "Flores Silvestres de las islas Canarias" (Bramwell & Bramwell 1974) y contribuido enormemente a su conocimiento con el descubrimiento de más de 50 taxones canarios y unas 30 especies híbridas.

Otros botánicos que destacan durante las últimas décadas en el estudio taxonómico de la flora canaria son:

Águedo Marrero, que como *curator* del Herbario del Jardín Botánico "Viera y Clavijo" desde el año 1985, ha sido el responsable de la recolección de muchos de los 60.000 pliegos que conforman la colección de este herbario y, de la conservación, etiquetado y clasificación de los mismos. En su haber cuenta con la descripción de unas 20 especies nuevas y es también autor de numerosos artículos científicos y de divulgación.

Arnoldo Santos, jefe de la Unidad Botánica del ICIA y responsable científico del Jardín de Aclimatación de La Orotava desde 1974 hasta el año 2013 y Alfredo Reyes-

Betancort que es en la actualidad director del Jardín de Aclimatación de La Orotava y anteriormente fue colaborador científico del ICIA (2004-2013). Tanto, Santos como Reyes-Betancort han realizado una labor importantísima en dicho jardín botánico y han hecho importantes contribuciones taxonómicas y corológicas sobre la flora canaria y macaronésica. Ambos son autores de numerosos artículos de investigación publicados en revistas nacionales e internacionales de gran impacto científico, entre los que se incluyen descripciones de numerosas especies nuevas para la ciencia.

Además, hay que resaltar la labor realizada desde las universidades canarias en el estudio taxonómico de nuestra flora, destacando entre otros:

D. Wolfredo Wildpret de la Torre (Catedrático de Botánica y profesor emérito de la ULL); D. Marcelino del Arco Aguilar (Catedrático de Botánica de la Facultad de Biología de la ULL); D. Juan Ramón Acebes Ginovés (Profesor Titular de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la ULL) y D. Pedro Luis Pérez de Paz (Catedrático de Botánica de la Facultad de Farmacia de la ULL).

#### **1.4. DIVERSIDAD FILOGENÉTICA**

Como ya vimos en el apartado 1.2., tradicionalmente, a la diversidad biológica se la ha dividido en tres niveles: genético, taxonómico y ecológico, de forma que para estudiarla, podemos simplemente realizar un conteo del número total de géneros o especies presentes en un área, hacer un cálculo de la abundancia relativa de especies dentro de un ecosistema o establecer el polimorfismo de los individuos de una población en base a la frecuencia alélica (variación) de sus genes.

La Diversidad Filogenética (PD, de aquí en adelante por sus siglas del inglés

*Phylogenetic Diversity*) es una medida de la diversidad relativamente reciente que, en los últimos años, ha ido cogiendo fuerza porque proporciona una visión unificada de los tres niveles tradicionales de diversidad. Así, siguiendo la definición original (ver debajo), la PD utiliza una expresión de la diversidad genética (diferenciación entre las regiones del ADN seleccionadas) como base para estimar tanto la diversidad de especies (divergencia evolutiva representada en árboles relacionales), como la diversidad de los ecosistemas que integran el territorio de estudio. Por lo tanto, una de las ventajas de la PD es que permite inferir relaciones entre los taxones que se encuentran presentes en un territorio, cuyo papel es de suma importancia en el mantenimiento de las redes de interacciones que sustentan los ecosistemas.

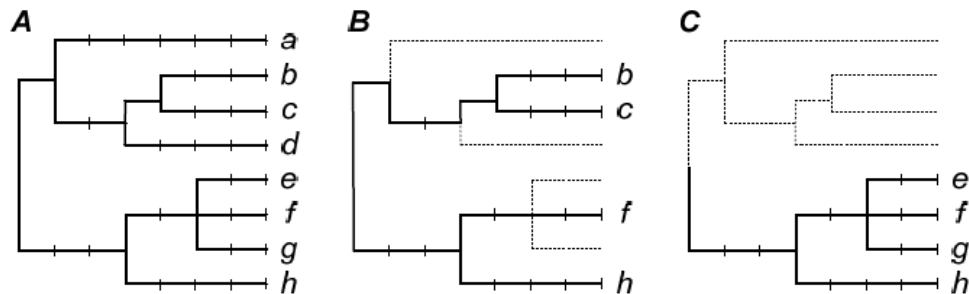
Como se ha avanzado, la PD es un concepto desarrollado a partir de los trabajos de May (1990), Vane-Wright *et al.* (1991) y Faith (1992) que busca incorporar el valor de la historia evolutiva de las especies en las evaluaciones de la diversidad del territorio donde se encuentran. Por lo tanto, la PD es una medida que no sólo hace referencia a la diferenciación genética entre las especies que habitan en un territorio determinado, sino que nos permite inferir además aspectos evolutivos y ecológicos junto a los patrones de diversidad.

El parámetro matemático definido por Faith (1992) es el más ampliamente utilizado para medir la PD y consiste en "la suma total mínima de todas las longitudes de las ramas de una topología de relaciones genéticas, que se requieren para abarcar un conjunto dado de taxones". Atendiendo a esta definición, es claro que la PD permite cuantificar el grado de separación evolutiva entre las especies distribuidas en diferentes unidades de un territorio, en virtud de la relación directa entre la longitud



de las ramas que separan a los diferentes taxones representados en un árbol de relaciones genéticas y el número de cambios evolutivos entre ellos.

A modo de ejemplo, imaginemos que la topología de relaciones genéticas que se representa como **A** en la Figura 1.1 abarca a todas las especies de un territorio concreto y que queremos estimar la riqueza filogenética de las especies presentes en dos áreas determinadas de ese territorio (**B** y **C**). En esta topología de relaciones genéticas hipotética, la fracción que ilustra las relaciones del subgrupo de taxones (*b*, *c*, *f* y *h*) presentes en el área **B**, es más representativa de la biodiversidad global del territorio **A** que la fracción contenida en el subgrupo de taxones (*e*, *f*, *g* y *h*) distribuidos en el área **C**. Así, el valor de PD para el área **B** es mayor, debido a que la suma de la longitud de las ramas que hay que “recorrer” en la topología de relaciones genéticas global para conectar a todo el subconjunto de taxones presentes en el área **B** es mayor que para el área **C**.



**Figura 1.1.** Representación hipotética de la topología de relaciones entre todas las especies de un territorio concreto (A) y de las distintas fracciones del árbol que ilustran las relaciones entre diferentes subgrupos de taxones (unidos por la línea sin puntear) presentes en dos áreas determinadas de ese territorio (B y C). Cada marca sobre las ramas indica un cambio de estado en los caracteres usados para construir esta representación. (Figura extraída a partir de Faith 1992).

La PD utiliza la separación entre las especies representadas en una topología de relaciones genéticas entre taxones, para asignar una medida a la biodiversidad contenida en un territorio dado. Por lo tanto, este indicador aporta información comparativa que, en conjunción con la diversidad taxonómica y otros parámetros de interés, puede proporcionarnos un criterio para determinar, por encima del nivel de población y especie, la relevancia de las distintas áreas dentro de la RBGC para su conservación o para la estructuración de su biodiversidad en el espacio (ver por ejemplo Forest *et al.* 2007).

## 1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Acebes Ginovés JR, Arco Aguilar M del, García Gallo A, *et al.* (2004) Pteridophyta, Spermatophyta. En: Izquierdo I, Martín JL, Zurita N & Arechavaleta M (eds.) *Lista de especies silvestres de Canarias (hongos, plantas y animales terrestres)*. Gobierno de Canarias, La Laguna, 96–143.
- Adanson M (1763-1764) *Familles des Plantes*. Vincent, París.
- Adams BJ (2001) The species delimitation uncertainty principle. *Journal of Nematology* 33, 153-160.
- Aiton W (1789) *Hortus Kewensis, or a catalogue of the plants cultivated in the Royal Botanic Gardens at Kew*, Londres.
- Allan GJ, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, *et al.* (2004) Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: Loteae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32, 123-138.
- Anderson MJ (1997) *Carl Linnaeus: father of classification*. Enslow Publishers, USA.
- Andersson LJ, Rova HE (1999) The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubiodeae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 214, 161-186.
- Andrus N, Trusty J, Santos-Guerra A, *et al.* (2004). Using molecular phylogenies to test phytogeographical links between East/South Africa, Southern Arabia and the Macaronesian islands: a review, and the case of *Vierea* and *Pulicaria* section *Vieraeopsis* (Asteraceae). *Taxon* 53, 333-346.
- APG (1998) An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Missouri Botanical Garden Press 85(4), 531–553.

- APG II (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141(4), 399–436.
- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161(2), 399–436.
- Arendt J, Reznick D (2008) Convergence and parallelism reconsidered: what have we learned about the genetics of adaptation? *Trends in Ecology and Evolution* 23, 26–32.
- Barber JC, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, *et al.* (2002) Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23, 293–306.
- Barber JC, Finch CC, Francisco-Ortega J, *et al.* (2007) Hybridization in Macaronesian *Sideritis* (Lamiaceae): evidence from incongruence of multiple independent nuclear and chloroplast sequence datasets. *Taxon* 56, 74–88.
- Barnades M (1767) Principios de Botanica. Imprenta de Antonio Perez de Soto, Madrid.
- Baum D, Shaw KL (1995) Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics. En: Hoch PC & Stephenson AG (eds.) *Genealogical Perspectives on the Species Problem*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 53, 289–303.
- Bessey CE (1911) *Outlines of Plant Phyla*. Publisher unknown
- Bessey CE (1915) The Phylogenetic Taxonomy of Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 2, 109–164.
- Blanca L, Cabezudo G, Cueto B, *et al.* (2011) *Flora vascular de Andalucía Oriental*. Universidades de Almería, Granada, Jaén y Málaga, Granada, pp. 1754.
- Blaxter M (2003) Counting angels with DNA. *Nature* 421, 122–124.
- Blaxter ML, Floyd R (2003) Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 268–269.
- Blaxter M, Mann J, Chapman T, *et al.* (2005) Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 360(1462), 1935–43.
- Blaxter ML (2004) The Promise Of A DNA Taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* (359), 669–679.
- Böhle UR, Hilger HH, Martin WF (1996) Island Colonization and Evolution of the Insular Woody Habit in *Echium* L. (Boraginaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21), 11740–11745.
- Bramwell D (1985) Contribución a la biogeografía de las islas Canarias. *Botánica Macaronésica* 14, 3–34.
- Bramwell D, Caujapé-Castells J (2008) *La flora canaria en el siglo XXI*. Anuario de Estudios Atlánticos 2(54), 509–531. Cabildo de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, España.

- Bräuchler C, Meimberg H & Heubl G (2010) Molecular phylogeny of Menthinae (Labiatae, Nepetoideae, Mentheae) – Taxonomy, biogeography and conflicts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55, 501–523.
- Brochmann C, Borgen L, Stabbetorp OE (2000) Multiple diploid hybrid speciation of the Canary Island endemic *Argyranthemum sundingii*. *Plant Systematics and Evolution* 220, 77–92.
- von Buch L (1819) Allgemeine Uebersicht der Flora auf den Canarischen Inseln, Berlín.
- Buchard O (1929) Beitrage zur Ókologie und Biologie der Kanarenpflanzen. *Bibliotheca Botanica* 98.
- Bull JJ, Badgett MR, Wichman HA, *et al.* (1997) Exceptional convergent evolution in a virus. *Genetics* 147, 1497–1507
- de Candolle AP (1813) Théorie élémentaire de la botanique, ou Exposition du principe de la classification naturelle et de l'art de décrire et d'étudier les végétaux. Déterville, París.
- Carine MA, Russell SJ, Santos-Guerra A, *et al.* (2004) Relationships of the Macaronesian and Mediterranean floras: molecular evidence for multiple colonizations into Macaronesia and back-colonization of the continent in *Convolvulus* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 91, 1070-1085.
- Carvalho JA, Culham A (1998) Conservation status and preliminary results on the phylogenetics of *Isoplexis* (Lindl.) Benth. (Scrophulariaceae), an endemic Macaronesian genus. *Boletim do Museo Municipal do Funchal Suplemento* 5, 109-127.
- Castroviejo S (coord. gen.) (1986-2012) *Flora ibérica* 1-8, 10-15, 17-18, 21. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Catalán P, Torrecilla P, Lopez-Rodriguez J.A, *et al.* (2004) Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe Loliinae and allies (Poeae, Pooideae) inferred from *ITS* and *trnL- $\Psi$*  sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31, 517-541.
- Caujapé-Castells J (2006) Brújula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones. *Exegen ediciones*, Las Palmas de Gran Canaria, Spain. Available from <http://www.bioclimac.com/mbdna/index.php/editionsapricing/brujuladegeneticade-poblaciones>.
- Caujapé-Castells J, Jansen RK, Pedrola-Monfort J, *et al.* (1999) Chloroplast DNA restriction site phylogeny of the genus *Androcymbium* (Colchicaceae). *Systematic Botany* 24, 581-597.
- Caujapé-Castells J, Jaén Molina R, Cabrera-García N (2006) El Banco de ADN de La Flora Canaria: Creación, Progresos y Líneas Futuras de Desarrollo. *Botánica Macaronésica* 26, 3–16.
- Caujapé-Castells J, Jaén-Molina R, Cabrera N, Curbelo L (2011) Manual del Banco de ADN de la Flora Canaria. Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN, Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"-Unidad Asociada- CSIC, Cabildo de Gran Canaria. (<http://www.bioclimac.com/mbdna/index.php/dnabank/documentation/dna-bank-lab-manual> )
- Cavanilles AJ (1791-1806) *Icones Plantarum*, Madrid.

- Ceballos L, Ortuño F (1951) *Estudio sobre la flora y vegetación forestal de las Canarias occidentales*. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias, Madrid, pp. 465.
- Clement JS, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, *et al.* (1997) Relationships of the Canary Islands endemic species of *Silene* (Caryophyllaceae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany* 84, (Supplement), 182.
- Cracraft J (1983) Species concepts and speciation analysis. En: Johnston RF (ed.) *Current Ornithology*, Plenum Press, New York, pp. 159-187.
- Crawford D, Menezes de Sequeira M, Mort M, *et al.* (2013) Breeding Systems and Hybrid Fertility in *Tolpis* (Asteraceae) in the Macaronesian Archipelagos: Comparisons of Lineages in the Canaries, Azores, and Madeira. Botany 2013, Systematics Section/American Society of Plant Taxonomists, Abstract ID: 409, New Orleans.
- Crisci JV (2006) Espejos de nuestra época: biodiversidad, sistemática y educación. *Gayana Botanica* 63, 106-114.
- Cronquist A (1978) Once again, what is a species? En: Romberger JA (ed.), *Biosystematics in agriculture*, Alleheld Osmun, Montclair, NJ, pp. 3-20.
- Cronquist A (1981) *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York.
- Cronquist A (1988) *The Evolution and Classification of Flowering Plants* (2ª ed.), The New York Botanical Garden, New York.
- Cubas P, Pardo C, Tahiri H (2002) Molecular approach to the phylogeny and systematics of *Cytisus* (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (*ITS* region) and cpDNA (*trnL-trnF* intergenic spacer). *Plant Systematics and Evolution* 233, 223-242.
- Cuénoud PM, Martinez AD, Loizeau PA, *et al.* (2000) Molecular phylogeny and biogeography of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae). *Annals of Botany* 85, 111-122.
- Dahlgren RMT (1980) A revised system of classification of angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society* 80 (2), 91-124.
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PE (1985) *The families of the monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy*. Springer, New York.
- Darwin C (1859) On the origin of species by means of natural selection. Murray, London.
- Davis PH, Heywood VH (1963) *Principles of angiosperm taxonomy*. Oliver & Boyd (eds.) Edinburgo, xx, pp. 556.
- Degtjareva GV, Kramina TE, Sokoloff DD, *et al.* (2008) New data on *nrITS* phylogeny of *Lotus* (Leguminosae, Loteae). *Wulfenia* 15, 35-49.
- Dobzhansky T (1935) A critique of the species concept in biology, *Philosophy of Science* 2, 344-355.
- Dobzhansky T (1937) *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Doebley J, Durbin M, Golenberg EM, *et al.* (1990) Evolutionary analysis of the large subunit of carboxylase (*rbcl*) nucleotide sequence among the grasses (Gramineae) *Evolution* 44, 1097-1108.

- Donoghue MJ (1985) A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *The Bryologist* 88, 172-181.
- Escobar García P, Schönswetter P, Fuertes Aguilar J, *et al.* (2009). Five molecular markers reveal extensive homoplasy and reticulate evolution in the Malva alliance (Malvaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50, 226–239.
- Faith DP (1992) Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 61, 1–10.
- Forest F, Grenyer R, Rouget M, *et al.* (2007) Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. *Nature* 445, 757–760.
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Hines A, *et al.* (1997) Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 84, 1595-1613.
- Francisco-Ortega J, Barber JC, Santos-Guerra A, *et al.* (2001a). Origin and evolution of the endemic genera of *Gonosperminae* (Asteraceae: *Anthemideae*) from the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 88, 161-169.
- Francisco-Ortega J, Fuertes-Aguilar J, Kim SC, *et al.* (2002) Phylogeny of the Macaronesian endemic *Crambe* section *Dendrocrambe* (Brassicaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 89, 1984–1990.
- Feuillé L (1724) Voyage aux Isles Canaries ou Journal des Observations Physiques, Mathématiques, Botaniques et historiques. París.
- Fernández-Palacios JM (2009) Theory of Island Biogeography. En: Gillespie RM & Clague D (eds.) *Encyclopedia of Islands*, University of California Press, pp. 486-490.
- Fuertes-Aguilar JM, Ray F, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, *et al.* (2002) Molecular evidence from chloroplast and nuclear markers for multiple colonizations of *Lavatera* (Malvaceae) in the Canary Islands. *Systematic Botany* 27, 74-83.
- Galbany-Casals M, García-Jacas N, Sáez L, *et al.* (2009) Systematics, biogeography, and character evolution in Mediterranean, Asiatic, and Macaronesian *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae) inferred from nuclear phylogenetic analyses *International Journal of Plant Sciences* 170(3), 365–380.
- García-Maroto F, Mañas-Fernández A, Garrido-Cárdenas JA, *et al.* (2009)  $\Delta^6$ -Desaturase sequence evidence for explosive Pliocene radiations within the adaptive radiation of Macaronesian *Echium* (Boraginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52, 563-574.
- Gaston KJ (1996). Species richness: measure and measurement. En: Gaston KJ (ed.) *Biodiversity: A biology of numbers and difference*, Oxford, Blackwell Science, pp. 77-113.
- Givnish TJ, Sytsma KJ (1997) Homoplasy in molecular vs. morphological data: the likelihood of correct phylogenetic inference. En: Givnish TJ & Sytsma KJ (eds.) *Molecular evolution and adaptive radiation*. Cambridge Univ. Press, New York, pp. 55–101.
- González AG (2001) *La Botánica, Sventenius y yo*. Centro de la Cultura Popular Canaria, Tenerife.

- Goodson BE, Santos-Guerra A, Jansen RK (2006) Molecular systematics of *Descurainia* (Brassicaceae) in the Canary Islands: biogeographical and taxonomic implications. *Taxon* 55, 671-682.
- Grant V (1957) The plant species in theory and practice. En: Mayr E (ed.) *The species problem*, American Association for the Advancement of Science, Washington, USA.
- Greene EL (1983) A study of certain epochs in the development of the science of botany. En: Egerton FN (ed.) *Landmarks of Botanical History*, Stanford, CA, USA
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, *et al.* (2003a) Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences SerB* 270, 313-321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard J (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*, 7 (Suppl. 1), S96-S99.
- Hedges SB, Sibley CG (1994) Molecules vs. morphology in avian evolution: the case of the pelecaniform birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9861-9865.
- Hedges SB, Maxson LR (1996) Molecules and morphology in amniote phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6, 312-314.
- Helfgott DM, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, *et al.* (2000) Biogeography and breeding system evolution of the woody *Bencomia* alliance (Rosaceae) in Macaronesia based on *ITS* sequence data. *Systematic Botany* 25, 82-97.
- Hennig W (1950) *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik*. Deutscher Zentralverlag, Berlín.
- Hennig (1960) *Elementos de una sistemática filogenética*. Editorial Universitaria Buenos Aires, Argentina.
- Hennig W (1966) *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana, USA.
- Herrera Piqué A (2006) Pasión y aventura en la ciencia de las luces. Tomo I. Introducción a la exploración científica de las Hespérides 1700-1850. Departamento de ediciones de la Consejería de Cultura y Patrimonio Histórico del Cabildo de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria.
- Heywood VH (2004) Modern Approaches to Floristics and Their Impact on the Region of SW Asia. *Turkish Journal of Botany* 28, 7-16.
- Howard DJ, Berlocher SH (1998) *Endless forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, Nueva York.
- Hull DL (1997) The ideal species concept-and why we can't get it. En: Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR (eds.) *Species: the units of biodiversity*. Chapman & Hall, London, pp. 357-380.
- Jablonski D, Roy K, Valentine JW (2006) Out of the tropics: Evolutionary dynamics of the latitudinal diversity gradient. *Science* 314(5796), 102-106.
- Jaén-Molina R, Caujapé-Castells J, Reyes-Betancort JA, *et al.* (2009) Molecular phylogeny of *Matthiola* R. Br. (Brassicaceae) inferred from *ITS* sequences, with special emphasis on the Macaronesian endemics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53, 972-981.

- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, *et al.* (2002) *Plant systematics: a phylogenetic approach* (2ª ed.), Sinauer Associates, USA.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, *et al.* (2007) *Plant systematics: a phylogenetic approach* (3ª ed.), Sinauer Associates, USA.
- de Jussieu AL (1789) *Genera Plantarum secundum ordines naturales disposita, juxta methodum in horto regio Parisiensi exaratum, anno M. DCC. LXXIV.* Hérisnant & Barrois, París.
- Kim SC, Crawford DJ, Francisco-Ortega J, *et al.* (1996) A common origin for woody *Sonchus* and five related genera in the Macaronesian islands: Molecular evidence for extensive radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 7743-7748.
- King M (1993) *Species evolution: The role of chromosome change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kitching IJ, Forey PL, Humphries CJ, *et al.* (1998) *Cladistics. The Theory and Practice of Parsimony Analysis* (2ª ed.), Oxford, Oxford University Press, UK.
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D (2004) Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* 55, 141-172.
- Kornet DJ (1993) The composite species concept En: *Reconstructing species: Demarcations in genealogical networks.* Unpublished PhD dissertation, Institute for Theoretical Biology, Rijksherbarium, Leiden.
- Kunkel G (1967a) Plantas vasculares nuevas para la flora de Gran Canaria. *Cuadernos de Botánica Canaria* 1(1), 3-23.
- Kunkel G (1976) Gran Canaria, Tenerife y La Gomera: Notas florísticas y adiciones. *Cuadernos de Botánica Canaria* 26-27, 75-81.
- Kunkel G, Sventenius ERS (1972) Los Tiles de Moya: Enumeración florística y datos sobre el futuro parque natural. *Cuadernos de Botánica Canaria* 14-15, 71-89
- Kunkel G (1986) *Diccionario Botánico Canario. Manual Etimológico* (dibujos de Mary Anne Kunkel), Edirca, Prisma Canario, pp. 280.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, *et al.* (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 8369-8374.
- Lambert DM, Spencer HG (1995) *Speciation and the Recognition Concept: Theory and Application.* Johns Hopkins University Press, Baltimore, UK.
- Lems K (1960) Floristic Botany of the Canary Islands. *Sarracenia* 5, 1-94.
- Levin DA (2000) *The Origin, Expansion, and Demise of Plant Species.* Oxford University Press, Nueva York.
- Levin RA, Myers NR, Bohs L (2006) Phylogenetic relationships among the "spiny solanums" (*Solanum* subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae). *American Journal of Botany* 93, 157-169.
- Lewontin RC, Rose S, Kamin LJ (2003) *No está en los genes: racismo, genética e ideología.* Editorial Crítica, pp. 360.
- Lincoln R, Boxshall G, Clark P (1998) *A dictionary of ecology, evolution and systematic.* (2ª ed.), Cambridge University Press, Cambridge.



- Mallet J (1995) The species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology and Evolution* 10(7), 294-299.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* 20, 229–237.
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature* 446, 279–283.
- Marrero A, Almeida RS, González-Martín M (1998) A new species of the wild dragon tree, *Dracaena* (Dracaenaceae) from Gran Canaria and its taxonomic and biogeographic implications. *Botanical Journal of Linnean Society* 128, 291-314.
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia University Press, New York.
- Mayr E (1963) *Animal species and evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Mayr E (1970) *Populations, species, and evolution: an abridgment of Animal species and evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Mayr E (1992) A Local Flora and the Biological Species Concept. *American Journal of Botany* (79), 222-238.
- May RM (1990) Taxonomy as destiny. *Nature* 347, 129–130.
- McCracken KG, Harshman J, McClellan DA, *et al.* (1999). Data set incongruence and correlated character evolution: an example of functional convergence in the hind-limbs of stiff tail diving ducks. *Systematic Biology* 48, 683–714.
- Melic A, Ribera I (1996) *La cronodiversidad biológica*. Monográfico Paleontología B (16), 189-206. Sociedad Entomológica Aragonesa, Zaragoza, pp. 206.
- Mishler BD, Brandon RN (1987) Individuality, Pluralism, and the Phylogenetic Species Concept. *Biology and Philosophy* 2, 397-414.
- Mort ME, Soltis DE, Soltis PS, *et al.* (2002) Phylogenetics and Evolution of the Macaronesian Clade of Crassulaceae Inferred from Nuclear and Chloroplast Sequence Data. *Systematic Botany* 27, 271-288.
- Molero J, Garnatje T, Rovira A, *et al.* (2002) Karyological evolution and molecular phylogeny in Macaronesian dendroid spurges (*Euphorbia* subsect. *Pachycladae*). *Plant Systematics and Evolution* 231, 109-132.
- Naranjo Rodríguez, R (2005) Kunkel: mucho más que un nombre para la flora canaria. *Rincones del Atlántico* 2, pp. 208-211.
- Nixon KC, Wheeler QD (1990) An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6, 211-223.
- Panero JL, Francisco-Ortega J, Jansen RK (1999) Molecular evidence for multiple origins of woodiness and a New World biogeographic connection of the Macaronesian Island endemic *Pericallis* (Asteraceae: Senecioneae). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 13886-13891.
- Percy DM, Cronq Q (2002). Different fates of island brooms: contrasting evolution in *Adenocarpus*, *Genista* and *Teline* (Genisteae, Fabaceae) in the Canary Islands and Madeira. *American Journal of Botany* 89 (5), 854-864.

- Pelser PB, Kennedy AH, Tepe EJ, *et al.* (2010) Patterns and causes of incongruence between plastid and nuclear Senecioneae (Asteraceae) phylogenies. *American Journal of Botany* 97, 856–873.
- Pitard J, Proust L (1908) Les îles Canaries: flore de l'archipel. *Librairie des sciences naturelles* Paul Klincksieck, París.
- Poiret JLM (1816). Encyclopédie méthodique. *Botanique*. (Suppl. 4), 472-473. Chez Mme. veuve Agasse, Imprimeur-Libraire, París.
- Praeger LR (1932) An account of the Sempervivum group. *The Royal Horticultural Society*, London.
- Press JR, Short MJ (2001) Flora of Madeira. *The Natural History Museum*. Intercept Limited. Andover, UK, pp. 574.
- Raven PH (1976) Systematics and plant population biology. *Systematic Botany* 1, 284-316
- Rognon P, Coude´-Gaussen G (1996) Paleoclimates off North West Africa. *Quaternary Research* 46, 118–126
- Saltar A, Richards AJ, Kirschner J, *et al.* (1996) Apomixis and taxonomy: an introduction. *Folia Geobotanica* 31(3), 281–282.
- Santos A (2010) Eric Ragnar Sventenius(1910-2010), primer centenario. Rincones del Atlántico, número 6.
- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, *et al.* (2005) Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 360, 1850–1811.
- Simpson GG (1943) Criteria for genera, species and subspecies in zoology and paleontology, *Annals New York Academy of Science* 44, 145-178.
- Simpson GG (1961) *Principles of animal taxonomy*. Columbia University Press, New York.
- Simpson MG (2010) *Plant Systematics* (2ª ed.), Elsevier-Academic Press, Burlington, MA.
- Sosa PA, González MA, Moreno C, Clarke JB (2009). Hybridization and Introgression Between the Endemic *Phoenix canariensis* and the Introduced *P. dactylifera* in the Canary Islands. *Open Forest Science Journal* 2, 78-85.
- Susanna A, Garcia-Jacas N (2009) Cheirolophus Cass. (Asteraceae); The tribe Cardueae. En: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF & Bayer RJ (eds.) *Systematics, evolution, and biogeography of the Compositae*. IAPT, Vienna, pp. 293–313.
- Takhtajan A (1966-1967) *A system and phylogeny of flowering plants*. Nauska, Leningrad, Moscú.
- Takhtajan A (1969) *Flowering plants: origin and dispersal*. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- Tautz DP, Arctander A, Minelli RH, *et al.* (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18(2), 70-74.
- Templeton AR (1989) Speciation and its Consequences. En: Otte D & Endler JA (eds.) *The Meaning of Species and Speciation: A Genetic Perspective*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 3-27.

- Thiv M, Struwe L, Kadereit J W (1999) The phylogenetic relationships and evolution of the Canary laurel forest endemic *Ixanthus viscosus* (Aiton) Griseb. (Gentianaceae): evidence from *matK* and ITS sequences, and floral morphology and anatomy. *Plant Systematics and Evolution* 218, 299-317.
- Trusty J, Olmstead RG, Bogler DJ, *et al.* (2004) Using molecular data to test a biogeographic connection of the Macaronesian genus *Bystropogon* (Lamiaceae) to the New World: a case of conflicting phylogenies. *Systematic Botany*.
- Valdés B, Talavera S, Fernández Galiano E (1987) *Flora Vascular de Andalucía Occidental*. Ketres. Barcelona.
- Van Valen L (1976) Ecological species, multispecies and oaks. *Taxon* 25, 233–239
- Viera y Clavijo J (1799) Diccionario de Historia Natural de las Islas Canarias o índice alfabético descriptivo de sus tres reinos animal, vegetal y mineral. Las Palmas, 1866.
- Webb PB, Berthelot S (1836-1850) Histoire Naturelle des Illes Canaries. III. *Botanique*, 2. Phytographia canariensis, París.
- Weber A (2003) What is morphology and why is it time for its renaissance in plant systematic? En: Stuessy TF, Mayer V & Hörandl E. (eds.) *Deep Morphology: Toward a Renaissance of Morphology in Plant Systematics*. Gantner, Vaduz, Liechtenstein
- Wettstein R (1924) Tratado de Botánica Sistemática (*Handbuch der systematischen Botanik* (3ª ed.), pp. 1901-08.
- Wheeler QD, Meier R (2000) Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate. Columbia University Press. New York.
- Wheeler QD (ed.) (2008) *The New Taxonomy*. The Systematics Association Special Volume Series 76. CRC Press, New York, pp. 237.
- Wiens JJ, Chippindale PT, Hillis DM (2003) When are phylogenetic analyses misled by convergence? A case study in Texas cave salamanders. *Systematic Biology* 52, 501–514
- Wiley EO (1978) The Evolutionary Species Concept Reconsidered. *Systematic Zoology* 27(1), 17-26.
- Wilson EO (1988) The current state of biological diversity. En: Wilson EO (ed.), *Biodiversity*, National Academy Press, Washington, DC, pp. 521.
- Wilson EO (2003) The encyclopedia of life. *Trends in Ecology and Evolution* 18(2), 77-80.



## ***Capítulo 2.*** Objetivos

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GENERALES

Disponer de nuevas herramientas que nos permitan identificar correctamente la biodiversidad es de suma importancia para proporcionar otro tipo de datos esenciales que apoyen los esfuerzos científicos para la conservación de las especies. La finalidad de este trabajo de investigación es testar la viabilidad de utilizar “identificadores moleculares” como complemento a las variables morfológicas en la caracterización taxonómica de la flora endémica de las islas Canarias.

Para ello, en primer lugar, analizamos el poder discriminante de las dos regiones del ADN cloroplástico, que se utilizan actualmente como “código de barras” de plantas terrestres (*rbcL* y *matK*), en una amplia muestra de la flora angiospérmica canaria para responder a las siguientes preguntas claves:

- (i) ¿Es la flora canaria susceptible de ser identificada por estas dos regiones del ADN cloroplástico con suficiente porcentaje de éxito?
- (ii) ¿Pueden las regiones “código de barras” actuales clarificar alguno de los casos donde los caracteres morfológicos han sido hasta ahora elusivos o conflictivos?
- (iii) ¿Sugiere la información molecular la existencia de especies crípticas no detectadas por la morfología?
- (iv) ¿Es factible aplicar la información obtenida de las secuencias del ADN en la gestión de la biodiversidad en el territorio?

Esta investigación representa el primer estudio de las regiones “código de barras moleculares” para plantas terrestres en la rica (pero frágil) biodiversidad vegetal endémica de un archipiélago oceánico como Canarias, por lo que puede ser un modelo de referencia para las floras de otros enclaves con características similares. Además, la utilización de las secuencias del ADNcp en estrategias de conservación puede abrir nuevas posibilidades para contribuir a la gestión de esta tan exuberante y diversa flora, en un territorio de la complejidad geográfica de las islas Canarias.

Todos los objetivos de esta investigación se relacionan con competencias directas de la Consejería de Medio Ambiente y Emergencias del Cabildo de Gran Canaria, institución a la que pertenece el Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada CSIC. En este sentido, la tesis se enmarca en los esfuerzos de este centro para aplicar resultados de la investigación científico-técnica multidisciplinaria a la conservación y gestión de la singular biodiversidad vegetal terrestre de Gran Canaria y de Canarias, en coordinación con todo el personal técnico de la citada Consejería.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Testar el porcentaje de éxito en la discriminación de las regiones *rbcl* y *matK*.
  - En dos tipos de situaciones taxonómicas:
    - a) casos en los que se incluyen especies congénicas que son identificadas sin ambigüedades por la Taxonomía clásica (casos taxonómicamente claros).
    - b) casos en los que se incluyen especies cuya diferenciación taxonómica respecto de otros congéneres, mediante caracteres morfológicos, ha sido elusiva o conflictiva (casos taxonómicamente conflictivos).

Algunos de los casos escogidos representan también taxones geopolíticos (Karl & Bowen 1999) que nos permitirán evaluar en qué casos el efecto isla ha sido predominante y en cuáles las entidades infraespecíficas serían válidas o podrían tener que ser elevadas a especies, según las secuencias de ADN utilizadas.

- Bajo dos criterios de discriminación:

- a) basado en distancias- $p$  (según CBOL PWG 2009) y,
- b) basado en caracteres con valor diagnóstico.

(ii) Examinar la posible existencia de especies crípticas en la flora de Canarias y, en su caso, valorar la necesidad de ampliar el conocimiento taxonómico de los grupos afectados.

(iii) Poner a punto una metodología pionera para una rápida y rigurosa identificación molecular de las especies (especialmente de aquellas en las que la morfología es poco concluyente) con objeto de poder tener censos de biodiversidad más completos y precisos para diseñar mejores medidas de conservación.

(iv) Estimar valores de diversidad filogenética (PD, Faith *et al.* 2004, 2005; Forest *et al.* 2008) de la flora endémica de Canarias que se distribuye en la parte terrestre de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria, basándonos en las regiones *rbcl* y *matK*.

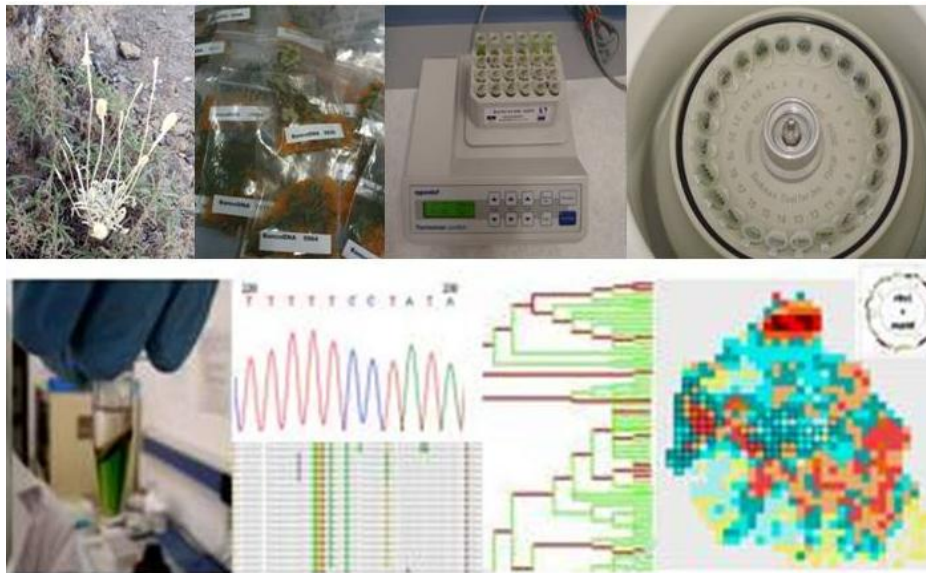
(v) Extraer directrices que contribuyan a la conservación y gestión de la biodiversidad de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria.





## Capítulo 3. Material y Métodos

---



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS (GENERALIDADES)**

Los protocolos experimentales y analíticos descritos en este capítulo abarcan desde el muestreo de especímenes a la generación de las matrices de secuencias alineadas, y son comunes a todas las partes de la tesis. Decidimos centralizar la descripción de estos aspectos en esta sección para evitar repeticiones en los distintos capítulos. Así, las secciones de Material y Métodos que aparecen en cada uno de los capítulos temáticos, se limitan a describir en detalle las metodologías de análisis específicas e hipótesis testadas para conseguir sus objetivos específicos, partiendo de las correspondientes matrices de secuencias alineadas, cuya obtención describimos aquí.

#### **3.1 ELECCIÓN DE TAXONES**

Aunque para cada uno de los estudios realizados dentro de esta tesis doctoral se realizó un muestreo específico, siempre se recolectaron muestras de taxones representativos de la flora canaria, que constituían en cada caso un subconjunto suficiente para lograr los objetivos planteados en el correspondiente apartado de esta investigación.

Además, como se explica detalladamente en el capítulo 4, para algunas comparaciones se consideró conveniente incluir en los análisis poblaciones de taxones presentes en el Mediterráneo y otros archipiélagos de Macaronesia (Fig. 3.1).

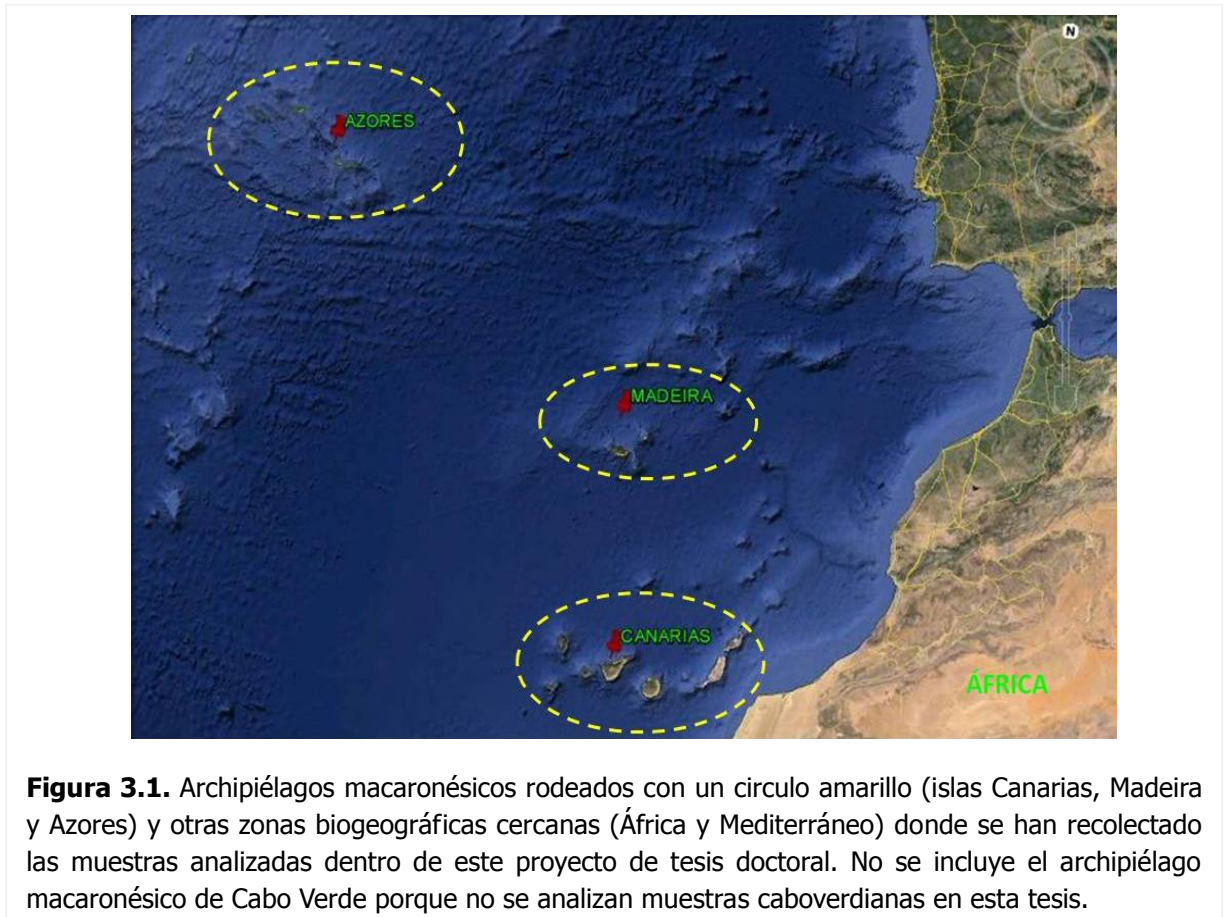
En la Tabla 3.1, se muestran de forma resumida cada uno de los taxones (géneros, especies, subespecies y variedades) de angiospermas analizados, por cada aplicación desarrollada, dentro de cada uno de los distintos capítulos de esta tesis:

a) para testar la aplicabilidad de las regiones "código de barras" en la flora canaria endémica. Los estudios están centrados de forma general en todas las angiospermas muestreadas, pero también, de forma particular, se evaluó específicamente la capacidad discriminatoria de dichas regiones en los árboles endémicos de Canarias, por ser éstos, elementos con unas características singulares, como ya se explica en el correspondiente apartado (cap. 4).

b) los taxones utilizados para estimar la diversidad filogenética asociada a la flora endémica canaria que se distribuye en el territorio de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria, en adelante RBGC (cap. 5).

Los detalles concretos sobre la recolección y depósito de estos especímenes (hojas, pliego testigo, alícuotas de ADN) en las instalaciones del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"-Unidad Asociada CSIC (en adelante, JBCVCSIC), se indican en las correspondientes Tablas (S1 y 5.1) en los capítulos 4 y 5. Para el capítulo 4, muchos de los taxones estudiados se distribuyen en La Gomera, porque fueron recolectados y analizados como parte de un proyecto del Organismo Autónomo de Parques Nacionales centrado en la flora del P. N. de Garajonay, mientras que para el capítulo 5, la mayoría de las muestras se recolectaron en Gran Canaria, porque los análisis se realizaron con muestras de la Reserva de la Biosfera de dicha isla.

Para algunos casos (por ejemplo, al comparar taxones que desde un punto de vista de la Taxonomía clásica pueden considerarse como conflictivos), se incluyeron además de poblaciones canarias, algunas poblaciones de Madeira, de Azores y de zonas no pertenecientes a Macaronesia (linajes ampliamente distribuidos que fueron considerados como grupos externos para algunas comparaciones), con el objetivo de evaluar las diferencias entre los porcentajes de discriminación alcanzados en cada comparación. La información relativa a estos taxones no canarios, cuyas secuencias se descargaron de la base de datos *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), se detalla en la Tabla S2.



La falta de resolución detectada en nuestras pruebas preliminares con las regiones *matK* y *rbcL* (Jaén-Molina *et al.* 2010) y la generalizada falta de resolución a nivel específico en las filogenias de linajes canarios basadas en marcadores de secuencias (Doebley *et al.* 1990, Soltis *et al.* 1993, Kim *et al.* 1999; Crawford & Mort 2004), nos hacían esperar bajos niveles de polimorfismo intraespecífico para los endemismos de la flora canaria que íbamos a analizar. Por ello, no llevamos a cabo muestreos poblacionales o taxonómicos exhaustivos.

Las secuencias del gen *rbcL* aunque han sido una herramienta valiosísima en la generación de datos filogenéticos para plantas, especialmente a nivel genérico o superior (Palmer *et al.* 1986 y 1989, Clegg & Zurawski 1991, Chase *et al.* 1993), muestran importantes limitaciones para resolver relaciones filogenéticas entre géneros y taxones estrechamente relacionados (Doebley *et al.* 1990, Gaut *et al.* 1992, Kim *et al.* 1992, Soltis *et al.* 1993).

Por su parte, *matK* (gen de la única maturasa plastidial de las plantas superiores; Vogel *et al.* 1997, Wanke *et al.* 2006) posee una mayor tasa de cambio en comparación con otros genes cloroplásticos (Wanke *et al.* 2007), siendo, en general, más discriminante a niveles taxonómicos de especie o superiores (Dong *et al.* 2012 y esta tesis). No obstante, siguiendo la tendencia general en plantas, la región *matK* tampoco muestra un alto grado de polimorfismo a niveles taxonómicos inferiores al de especie. Es importante recordar que la discriminación a niveles inferiores al de especie no es relevante para el cometido de los “códigos de barras de ADN” o “DNA barcoding”.

**Tabla 3.1.** Tabla resumen de los taxones (y familias) analizados para cada aplicación desarrollada en los distintos capítulos de esta tesis. "c4" hace referencia al capítulo en el que se aplican las regiones "códigos de barras" para llevar a cabo la identificación molecular de un subconjunto de angiospermas endémicas canarias, mientras que "c5" hace referencia al capítulo en el que se llevó a cabo la estimación de la diversidad filogenética para la flora endémica de la parte terrestre de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria.

N	Taxones investigados en esta tesis	Familia	c4	c5
<b>Taxones canarios</b>				
1	<i>Adenocarpus foliolosus</i> ([Dryand. in] Aiton) DC. var. <i>foliolosus</i>	Fabaceae	x	X
2	<i>Aeonium arboreum</i> (L.) Webb & Berthel.	Crassulaceae	x	X
3	<i>Aeonium manriqueorum</i> (Bolle)	Crassulaceae	x	X
4	<i>Aeonium percarneum</i> (R.P.Murr.) (Pit.& Proust)	Crassulaceae	x	X
5	<i>Aeonium simsii</i> (Sweet) (Stearn)	Crassulaceae	x	X
6	<i>Aeonium undulatum</i> (Webb & Berthel.)	Crassulaceae	x	X
7	<i>Aeonium virgineum</i> (Webb ex Christ)	Crassulaceae	x	X
8	<i>Aichryson laxum</i> (Haw.) (Bramw.)	Crassulaceae	x	X
9	<i>Aichryson pachycaulon</i> (Bolle)	Crassulaceae	x	X
10	<i>Aichryson parlatorei</i> (Bolle)	Crassulaceae	x	X
11	<i>Aichryson porphyrogennetos</i> (Bolle)	Crassulaceae	x	X
12	<i>Aichryson punctatum</i> (C. Sm. ex Buch) Webb & Berthel.	Crassulaceae	x	X
13	<i>Allagopappus dichotomus</i> (L.f.) (Cass. in F. Cuvier)	Asteraceae	x	X
14	<i>Allagopappus viscosissimus</i> (Bolle)	Asteraceae	x	X
15	<i>Andryala pinnatifida</i> Aiton	Asteraceae	x	X
16	<i>Andryala pinnatifida preauxiana</i> (Sch. Bip.) G. Kunkel	Asteraceae	x	X
17	<i>Apollonias barbujana</i> (Cav.) Bornm.	Lauraceae	x	
18	<i>Apollonias ceballosii</i> Svent.	Lauraceae	x	
19	<i>Arbutus canariensis</i> Veill.	Ericaceae	x	X
20	<i>Argyranthemum adauctum</i> (Link) Humphries	Asteraceae	x	X
21	<i>Argyranthemum adauctum canariense</i> (Sch. Bip.) Humphries	Asteraceae	x	X
22	<i>Argyranthemum adauctum gracile</i> (Sch. Bip.) Humphries	Asteraceae	x	X
23	<i>Argyranthemum escarrei</i> (Svent.) Humphries	Asteraceae	x	X
24	<i>Argyranthemum broussonetii</i> (Pers.) Humphries ssp. <i>broussonetii</i>	Asteraceae	x	
25	<i>Argyranthemum broussonetii</i> ssp. <i>gomerensis</i> Humphries	Asteraceae	x	
26	<i>Argyranthemum callichryssum</i> (Svent.) Humphries	Asteraceae	x	
27	<i>Argyranthemum filifolium</i> (Sch. Bip.) Humphries	Asteraceae	x	X
28	<i>Argyranthemum frutescens</i> (L.) Sch. Bip ssp. <i>pumilum</i> Humphries	Asteraceae	x	X
29	<i>Argyranthemum lidii</i> Humphries	Asteraceae	x	X
30	<i>Artemisia thuscula</i> Cav.	Asteraceae	x	X
31	<i>Artemisia ramosa</i> C. Sm. in Buch	Asteraceae	x	X

**Tabla 3.1 (continuación-I)**

<b>N</b>	<b>Taxones investigados en esta tesis</b>	<b>Familia</b>	<b>c4</b>	<b>c5</b>
32	<i>Asparagus arborescens</i> Willd.	Asparagaceae	x	X
33	<i>Asparagus fallax</i> Svent.	Asparagaceae	x	
34	<i>Asparagus plocamoides</i> Webb ex Svent.	Asparagaceae	x	X
35	<i>Asparagus umbellatus</i> Link ssp. <i>umbellatus</i>	Asparagaceae	x	X
36	<i>Asteriscus graveolens</i> (Forssk.) Less. NS C	Asteraceae	x	X
37	<i>Asteriscus graveolens stenophyllus</i> (Link) Greuter	Asteraceae	x	X
38	<i>Babcockia platylepis</i> (Webb) Boulos	Asteraceae	x	X
39	<i>Bencomia brachystachya</i> Svent. ex Nordborg	Rosaceae	x	X
40	<i>Bencomia exstipulata</i> Svent.	Rosaceae	x	
41	<i>Bencomia sphaerocarpa</i> Svent.	Rosaceae	x	
42	<i>Bencomia caudata</i> (Aiton) Webb & Berthel.	Rosaceae	x	
43	<i>Bethencourtia rupicola</i> (B. Nord.) B. Nord.	Asteraceae	x	
44	<i>Bosea yervamora</i> L.	Amaranthaceae	x	X
45	<i>Bryonia verrucosa</i> Dryand.	Cucurbitaceae	x	X
46	<i>Bupleurum salicifolium</i> R. Br. in Buch	Apiaceae	x	X
47	<i>Bupleurum salicifolium aciphyllum</i> (Webb ex Parl.) Sund & Kunkel	Apiaceae	x	X
48	<i>Bystropogon canariensis</i> (L.) L`Hér.	Lamiaceae	x	X
49	<i>Bystropogon origanifolius</i> L'Hér. var. <i>origanifolius</i>	Lamiaceae	x	X
50	<i>Bystropogon origanifolius</i> L'Hér. var. <i>palmensis</i>	Lamiaceae	x	
51	<i>Camptoloma canariense</i> (Webb & Berthel.) Hilliard	Scrophulariaceae	x	X
52	<i>Campylanthus salsoloides</i> (L. f.) Roth	Scrophulariaceae	x	X
53	<i>Canarina canariensis</i> (L.) Vatke	Campanulaceae	x	X
54	<i>Carduus baeocephalus</i> Webb	Asteraceae	x	
55	<i>Carduus clavulatus</i> Link	Asteraceae	x	X
56	<i>Carex canariensis</i> Kük.	Cyperaceae		X
57	<i>Carex perraudieriana</i> Gay ex Bornm.	Cyperaceae	x	
58	<i>Carlina canariensis</i> Pit.	Asteraceae		X
59	<i>Carlina texedae</i> Marrero Rodr.	Asteraceae		X
60	<i>Ceballosia fruticosa</i> (L. f.) G. Kunkel	Boraginaceae		X
61	<i>Ceropegia fusca</i> Haw.	Asclepidaceae		X
62	<i>Chamaecytisus proliferus</i> (L.f.) Link ssp. <i>angustifolius</i> (Kuntze)	Fabaceae	x	X
63	<i>Cheirolophus arbutifolius</i> (Svent.) G. Kunkel	Asteraceae		X
64	<i>Cheirolophus falcisectus</i> Montelongo & Moraleda	Asteraceae		X
65	<i>Chrysoprenanthes pendula</i> (Sch. Bip.) Bramwell	Asteraceae		X
66	<i>Cistus chinamadensis</i> ssp. <i>gomerensis</i> Bañares & P. Romero	Cistaceae	x	
67	<i>Cistus chinamadensis</i> Bañares & P. Romero ssp. <i>chinamadensis</i>	Cistaceae	x	
68	<i>Cistus ocreatus</i> C. Sm. in L. von Buch	Cistaceae		X



**Tabla 3.1 (continuación-II)**

<b>N</b>	<b>Taxones investigados en esta tesis</b>	<b>Familia</b>	<b>c4</b>	<b>c5</b>
69	<i>Cistus horrens</i> Demoly	Cistaceae		X
70	<i>Convolvulus canariensis</i> L.	Convolvulaceae		X
71	<i>Convolvulus caput-medusae</i> Lowe	Convolvulaceae		X
72	<i>Convolvulus floridus</i> L.	Convolvulaceae		X
73	<i>Convolvulus glandulosus</i> (Webb) Hallier f.	Convolvulaceae		X
74	<i>Convolvulus perraudieri</i> Coss.	Convolvulaceae		X
75	<i>Convolvulus scoparius</i> L. f.	Convolvulaceae		X
76	<i>Crambe gomerae</i> Webb ex Christ ssp. <i>gomerae</i>	Brassicaceae	x	
77	<i>Crambe pritzelii</i> Bolle in A. Braun	Brassicaceae		X
78	<i>Crambe santosii</i> Bramwell	Brassicaceae	x	
79	<i>Crambe scoparia</i> Svent.	Brassicaceae		X
80	<i>Crambe tamadabensis</i> Prina & Marrero Rodr.	Brassicaceae		X
81	<i>Crambe wildpretii</i> Prina & Bramwell	Brassicaceae	x	
82	<i>Crambe sventenii</i> Pett. ex Barmwell & Sunding	Brassicaceae	x	
83	<i>Dactylis smithii</i> Link.	Poaceae		X
84	<i>Dendriopoterium menendezii</i> Svent.	Rosaceae		X
85	<i>Dendriopoterium pulidoi</i> Svent. ex Bramwell	Rosaceae		X
86	<i>Descurainia artemisioides</i> Svent.	Brassicaceae		X
87	<i>Descurainia preauxiana</i> (Webb) O. E. Schulz	Brassicaceae		X
88	<i>Dorycnium broussonetii</i> (Choisy ex Ser. in DC.) Webb & Berthel.	Fabaceae		X
89	<i>Dracaena draco</i> L. ssp. <i>draco</i>	Dracaenaceae		
90	<i>Dracaena tamaranae</i> Marrero Rodr., Almeida-Pérez & Gzlez-Martín	Dracaenaceae		X
91	<i>Dracunculus canariensis</i> Kunth	Araceae		X
92	<i>Echium bonnetii</i> Coincy	Boraginaceae		X
93	<i>Echium callithyrsum</i> Webb ex Bolle	Boraginaceae		X
94	<i>Echium decaisnei</i> Webb	Boraginaceae		X
95	<i>Echium onosmifolium</i> Webb	Boraginaceae		X
96	<i>Echium onosmifolium spectabile</i> G. Kunkel	Boraginaceae		X
97	<i>Echium strictum</i> L. f.	Boraginaceae		X
98	<i>Echium triste</i> Svent.	Ericaceae	x	X
99	<i>Erica platycodon</i> (Webb & Berthel.) Rivas-Mart. et al.	Ericaceae	x	
100	<i>Erucastrum canariense</i> Webb & Berthel.	Brassicaceae		X
101	<i>Erysimum albescens</i> (Webb & Berthel.) Bramwell	Brassicaceae		X
102	<i>Euphorbia aphylla</i> Brouss. ex Willd.	Euphorbiaceae		X
103	<i>Euphorbia canariensis</i> L.	Euphorbiaceae		X
104	<i>Euphorbia bourgeauana</i> Gay ex Boiss. in DC.	Euphorbiaceae	x	
105	<i>Euphorbia lambii</i> Svent.	Euphorbiaceae	x	

**Tabla 3.1 (continuación-III)**

<b>N</b>	<b>Taxones investigados en esta tesis</b>	<b>Familia</b>	<b>c4</b>	<b>c5</b>
106	<i>Euphorbia mellifera</i> Aiton var. <i>canariensis</i> Boiss.	Euphorbiaceae	x	
107	<i>Ferula linkii</i> Webb	Apiaceae		X
108	<i>Festuca agustinii</i> Linding.	Poaceae	x	X
109	<i>Forsskaolea angustifolia</i> Retz.	Urticaceae		X
110	<i>Galium scabrum</i> L.	Rubiaceae	x	
111	<i>Geranium reuteri</i> Aedo & Muñoz-Garm.	Geraniaceae	x	X
112	<i>Gesnouinia arborea</i> (L.) Gaud.	Urticaceae		X
113	<i>Globularia ascanii</i> Bramwell & G. Kunkel	Asteraceae		X
114	<i>Globularia sarcophylla</i> Svent.	Asteraceae		X
115	<i>Gonospermum ferulaceum</i> (Webb) Febles	Asteraceae		X
116	<i>Gonospermum oshanahanii</i> (Marrero Rodr., Febles & Suárez) Febles	Asteraceae		X
117	<i>Gonospermum ptarmiciflorum</i> (Webb) Febles	Asteraceae		X
118	<i>Greenovia diplocycla</i> Webb ex Bolle	Crassulaceae	x	
119	<i>Greenovia aurea</i> (C. Sm. ex Hornem.) Webb & Berthel.	Crassulaceae	x	X
120	<i>Habenaria tridactylites</i> Lindl.	Orchidaceae		X
121	<i>Heberdenia excelsa</i> (Aiton) Banks ex DC.	Myrsinaceae	x	
122	<i>Helianthemum bystropogophyllum</i> Svent.	Cistaceae		X
123	<i>Helianthemum inaguae</i> Marrero Rodr., Gzlez-Martín & Gzlez-Artiles	Cistaceae		X
124	<i>Helianthemum tholiforme</i> Bramwell, J. Ortega & B. Navarro	Cistaceae		X
125	<i>Hypericum coadunatum</i> C. Sm. ex Link	Hypericaceae		X
126	<i>Hypericum reflexum</i> L. f.	Hypericaceae		X
127	<i>Ilex perado</i> Aiton ssp. <i>lopezilloi</i> (G. Kunkel) Hansen & Sunding	Aquifoliaceae	x	
128	<i>Ilex perado</i> ssp. <i>platyphylla</i> (Webb & Berthel.) Tutin	Aquifoliaceae	x	
129	<i>Ilex canariensis</i> Poir.	Aquifoliaceae	x	
130	<i>Isoplexis isabelliana</i> (Webb & Berthel.) Masf.	Scrophulariaceae		X
131	<i>Jasminum odoratissimum</i> L.	Oleaceae		
132	<i>Juniperus cedrus</i> Webb & Berthel.	Cupressaceae		X
133	<i>Juniperus turbinata</i> Guss. ssp. <i>canariensis</i>	Cupressaceae		
134	<i>Kickxia pendula</i> (G. Kunkel) G. Kunkel	Scrophulariaceae		X
135	<i>Kickxia scoparia</i> (Brouss. ex Spreng.) G. Kunkel & Sunding	Scrophulariaceae		X
136	<i>Kleinia neriifolia</i> Haw.	Asteraceae		X
137	<i>Laurus novocanariensis</i> Rivas-Mart. et al.	Lauraceae	x	
138	<i>Lavandula bramwellii</i> Upson & S. Andrews	Lamiaceae		X
139	<i>Lavandula minutolii</i> Bolle	Lamiaceae		X
140	<i>Lavandula canariensis</i> Mill.	Lamiaceae		X
141	<i>Lavatera acerifolia</i> Cav.	Malvaceae		X
142	<i>Limonium benmageci</i> Marrero Rodr. in Marrero Rodr. & Almeida	Plumbaginaceae		X

**Tabla 3.1 (continuación-IV)**

<b>N</b>	<b>Taxones investigados en esta tesis</b>	<b>Familia</b>	<b>c4</b>	<b>c5</b>
143	<i>Limonium dendroides</i> Svent.	Plumbaginaceae		X
144	<i>Limonium preauxii</i> (Webb & Berthel.) Kuntze	Plumbaginaceae		x
145	<i>Limonium vigaroense</i> Marrero Rodr. & Almeida	Plumbaginaceae		
146	<i>Lobularia canariensis</i> (DC.) L. Borgen	Brassicaceae		X
147	<i>Lobularia canariensis</i> (DC.) L. Borgen <i>canariensis</i>	Brassicaceae		X
148	<i>Lobularia canariensis</i> (DC.) L. Borgen ssp. <i>microsperma</i> L. Borgen	Brassicaceae		X
149	<i>Lolium canariense</i> Steud.	Poaceae	x	
150	<i>Lolium edwardii</i> H. Scholz <i>et al.</i>	Poaceae	x	
151	<i>Lotus callis-viridis</i> Bramwell & D. H. Davis	Fabaceae		X
152	<i>Lotus holosericeus</i> Webb & Berthel.	Fabaceae		X
153	<i>Lotus spartioides</i> Webb & Berthel.	Fabaceae		X
154	<i>Marcetella moquiniana</i> (Webb & Berthel.) Svent.	Rosaceae		
155	<i>Maytenus canariensis</i> (Loes.) Kunk. <i>et</i> Sund	Celastraceae		X
156	<i>Micromeria benthamii</i> Webb & Berthel.	Lamiaceae	x	X
157	<i>Micromeria helianthemifolia</i> Webb & Berthel.	Lamiaceae		X
158	<i>Micromeria lanata</i> (C. Sm. ex Link) Benth.	Lamiaceae		X
159	<i>Micromeria leucantha</i> Svent. ex P. Pérez	Lamiaceae		X
160	<i>Micromeria pineolens</i> Svent.	Lamiaceae		X
161	<i>Micromeria tenuis</i> (Link) Webb & Berthel.	Lamiaceae		X
162	<i>Micromeria tenuis</i> ssp. <i>linkii</i> (Webb & Berthel.) P. Pérez	Lamiaceae		X
163	<i>Micromeria varia</i> Benth.	Lamiaceae		X
164	<i>Micromeria varia</i> Benth. ssp. <i>canariensis</i> P. Pérez	Lamiaceae	x	X
165	<i>Micromeria varia</i> Benth. ssp. <i>gomerensis</i> P. Pérez	Lamiaceae	x	
166	<i>Micromeria varia</i> Benth. ssp. <i>meridialis</i> P. Pérez	Lamiaceae		X
167	<i>Micromeria varia</i> Benth. ssp. <i>rupestris</i> (Webb & Berthel.) P. Pérez	Lamiaceae	x	
168	<i>Monanthes brachycaulos</i> (Webb in Webb & Berthel.) Lowe	Crassulaceae		X
169	<i>Morella faya</i> (Aiton) Wilbur	Myricaceae	x	
170	<i>Morella rivas-martinezii</i> A. Santos & J. Herber	Myricaceae	x	
171	<i>Neochamaelea pulverulenta</i> (Vent.) Erdtman	Rutaceae		X
172	<i>Ocotea foetens</i> (Aiton) Baill.	Lauraceae	x	
173	<i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>cerasiformis</i> (Webb <i>et</i> Berth.) Kunk. <i>et</i> Sund.	Oleaceae		X
174	<i>Ononis angustissima</i> Lam.	Fabaceae		X
175	<i>Ononis angustissima</i> (Lam.) ssp. <i>angustissima</i>	Fabaceae		X
176	<i>Ononis angustissima</i> (Lam.) ssp. <i>longifolia</i> (Brouss. ex Willd)	Fabaceae		X
177	<i>Orchis canariensis</i> Lindl.	Orchidaceae		X
178	<i>Pancratium canariense</i> Ker-Gawl.	Amaryllidaceae		X
179	<i>Parolinia aridanae</i> A. Santos	Brassicaceae	x	

**Tabla 3.1 (continuación-V)**

<b>N</b>	<b>Taxones investigados en esta tesis</b>	<b>Familia</b>	<b>c4</b>	<b>c5</b>
180	<i>Parolinia filifolia</i> Svent. ex G. Kunkel	Brassicaceae	x	X
181	<i>Parolinia glabriuscula</i> Montelongo & Bramwell	Brassicaceae	x	
182	<i>Parolinia intermedia</i> Svent. & Bramwell	Brassicaceae	x	
183	<i>Parolinia ornata</i> Webb	Brassicaceae	x	X
184	<i>Parolinia platypetala</i> G. Kunkel	Brassicaceae	x	
185	<i>Parolinia schizogynoides</i> Svent.	Brassicaceae	x	
186	<i>Parolinia ornata</i> Webb	Caryophyllaceae		X
187	<i>Paronychia canariensis</i> (L. f.) Juss	Caryophyllaceae		X
188	<i>Paronychia capitata</i> (L.) Lam.	Caryophyllaceae		X
189	<i>Patellifolia webbiana</i> (Moq.) A. J. Scott, Ford-Lloyd & J. T. Williams	Amaranthaceae		X
190	<i>Pericallis hansenii</i> (G. Kunkel) Sunding	Asteraceae	x	
191	<i>Pericallis steetzii</i> (Bolle) B. Nord.	Asteraceae	x	
192	<i>Pericallis tussilaginis</i> (L`Hér.) D. Don in Sweet	Asteraceae		X
193	<i>Pericallis webbii</i>	Asteraceae		X
194	<i>Phagnalon umbelliforme</i> DC.	Asteraceae		X
195	<i>Phoenix canariensis</i> Chab	Arecaceae		X
196	<i>Picconia excelsa</i> (Aiton) DC.	Oleaceae	x	
197	<i>Pinus canariensis</i> Chr. Sm. ex DC.	Pinaceae		X
198	<i>Plantago arborescens</i> Poir.	Plantaginaceae		X
199	<i>Plantago asphodeloides</i> Svent.	Plantaginaceae		X
200	<i>Plantago webbii</i> Barnéoud	Plantaginaceae		X
201	<i>Pleiomeris canariensis</i> (Willd.) A. DC.	Myrsinaceae	x	
202	<i>Plocama pendula</i> Aiton	Rubiaceae		X
203	<i>Polycarpea aristata</i> (Aiton) DC.	Caryophyllaceae		X
204	<i>Polycarpea divaricata</i> (Aiton) Poir.	Caryophyllaceae	x	X
205	<i>Polycarpea filifolia</i> Webb ex Christ	Caryophyllaceae		X
206	<i>Polycarpea latifolia</i> Willd.	Caryophyllaceae	x	X
207	<i>Prunus lusitanica</i> L. ssp. <i>hixa</i> [Willd.] Franco	Rosaceae		
208	<i>Pterocephalus dumetorus</i> (Brouss. ex Willd.) Coult.	Dipsacaceae		X
209	<i>Reichardia ligulata</i> (Vent.) G. Kunkel & Sunding	Asteraceae		X
210	<i>Reichardia crystallina</i>	Asteraceae		X
210	<i>Reseda crystallina</i> Webb & Berthel.	Resedaceae		X
211	<i>Reseda scoparia</i> Brouss. ex Willd.	Resedaceae		X
212	<i>Rhamnus crenulata</i> Aiton	Rhamnaceae		
213	<i>Rhamnus integrifolia</i> DC.	Rhamnaceae		
214	<i>Rubia fruticosa</i> Aiton	Rubiaceae		X
215	<i>Rubia fruticosa</i> Aiton ssp. <i>melanocarpa</i> (Bornm.) Bramwell	Rubiaceae		X

**Tabla 3.1 (continuación-VI)**

<b>N</b>	<b>Taxones investigados en esta tesis</b>	<b>Familia</b>	<b>c4</b>	<b>c5</b>
216	<i>Rubus gr. bollei</i> Focke	Rosaceae	x	
217	<i>Rubus gr. ulmifolius</i> Schott	Rosaceae	x	
218	<i>Rubus palmensis</i> A. Hansen	Rosaceae	x	
219	<i>Rumex lunaria</i> L.	Polygonaceae		X
220	<i>Ruta microcarpa</i> Svent.	Rutaceae	x	
221	<i>Ruta oreojasme</i> Webb & Berthel.	Rutaceae	x	X
222	<i>Ruta pinnata</i> L.f.	Rutaceae	x	
223	<i>Sambucus nigra</i> L. ssp. <i>palmensis</i> (Link in Buch) Bolli	Sambucaceae	x	
224	<i>Salix canariensis</i> Chr. Sm. ex Link	Salicaceae		
225	<i>Salsola divaricata</i> Masson ex Link in Buch	Amaranthaceae		X
226	<i>Salvia canariensis</i> L.	Lamiaceae		X
227	<i>Schizogyne sericea</i> (L. f.) DC.	Asteraceae		X
228	<i>Scilla haemorrhoidalis</i> Webb & Berthel.	Asparagaceae		X
229	<i>Scrophularia calliantha</i> Webb & Berthel.	Scrophulariaceae		X
230	<i>Seseli webbii</i> Coss.	Apiaceae		X
231	<i>Sideritis dasygnaphala</i> (Webb & Berthel.) Clos emend. Svent.	Lamiaceae		X
232	<i>Sideritis gomerae</i> Bolle ssp. <i>gomerae</i>	Lamiaceae	x	X
233	<i>Sideritis guayedrae</i> Marrero Rodr.	Lamiaceae		X
234	<i>Sideritis lotsyi</i> (Pit.) Bornm.	Lamiaceae	x	X
235	<i>Sideritis sventenii</i> (G. Kunkel) Mend.-Heuer	Lamiaceae		
236	<i>Sideroxylon marmulano</i> Banks ex Lowe	Sapotaceae		X
237	<i>Silene bourgaei</i> Webb ex Christ.	Caryophyllaceae	x	
238	<i>Silene lagunensis</i> C.Sm. ex Link	Caryophyllaceae	x	
239	<i>Silene nocteolens</i> Webb & Berthel.	Caryophyllaceae	x	
240	<i>Silene tamaranae</i> Bramwell	Caryophyllaceae		X
241	<i>Solanum lidii</i> Sunding	Asteraceae		X
242	<i>Sonchus acaulis</i> Dum. Cours.	Asteraceae		X
243	<i>Sonchus brachylobus</i> Webb & Berthel.	Asteraceae		X
244	<i>Sonchus canariensis</i> (Sch. Bip.) Boulos	Asteraceae		X
245	<i>Sonchus congestus</i> Willd.	Asteraceae		X
246	<i>Sonchus gomerenis</i> Boulos	Asteraceae	x	
247	<i>Sonchus leptocephalus</i> Cass.	Asteraceae		X
248	<i>Sonchus wildpretii</i> U. Reifenb. & A. Reifenb.	Asteraceae	x	
249	<i>Sventenia bupleuroides</i> Font Quer	Asteraceae		X
250	<i>Tamarix canariensis</i> Willd.	Tamaricaceae		
251	<i>Teline microphylla</i> (DC.) P. E. Gibbs & Dingwall	Fabaceae		X
252	<i>Teline rosmarinifolia</i> Webb & Berthel.	Fabaceae	x	X

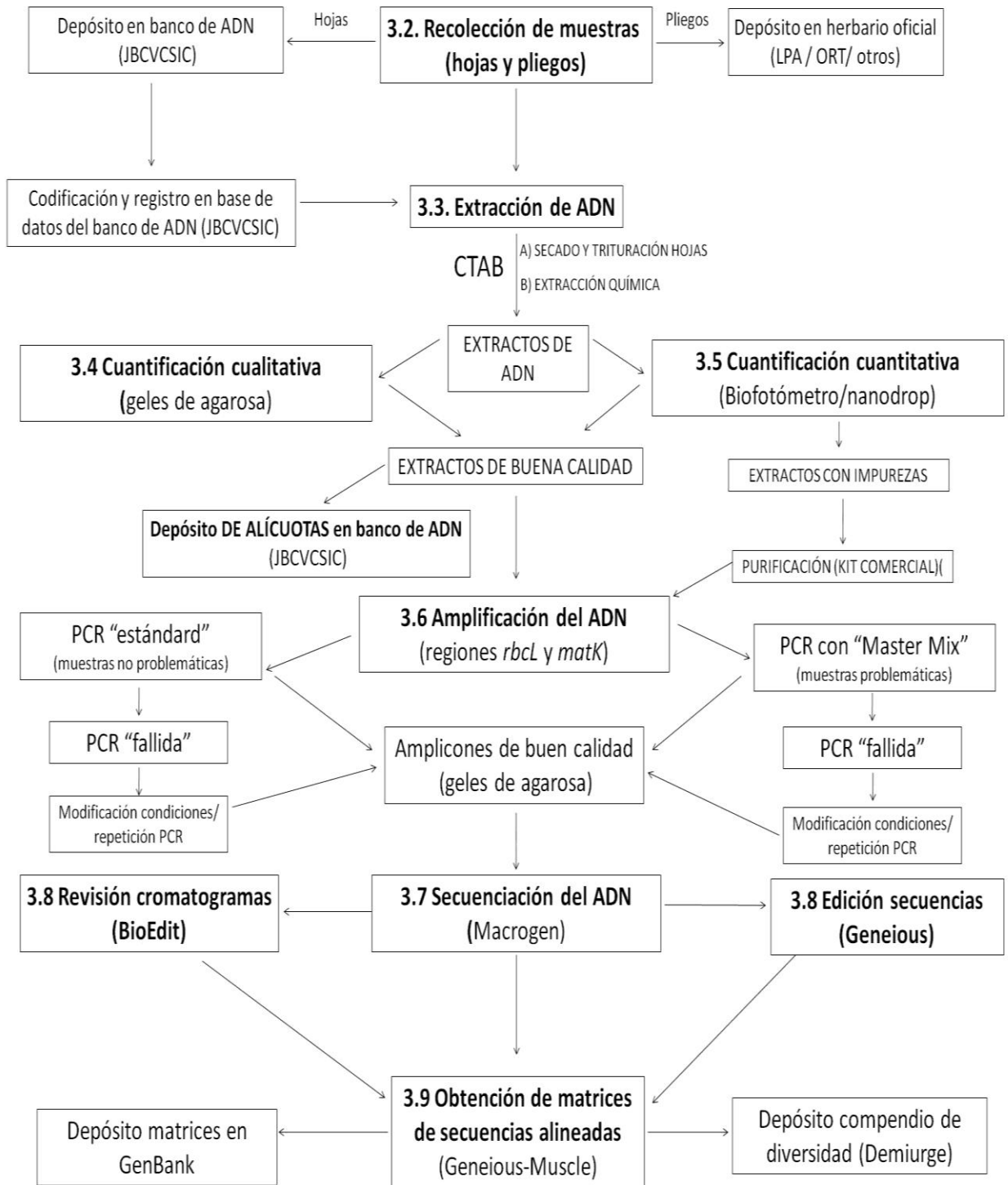
**Tabla 3.1 (continuación-VII)**

<b>N</b>	<b>Taxones investigados en esta tesis</b>	<b>Familia</b>	<b>c4</b>	<b>c5</b>
253	<i>Teline rosmarinifolia</i> ssp. <i>eurifolia</i> del Arco	Fabaceae		X
254	<i>Teline stenopetala</i> Webb & Berthel. ssp. <i>pauciovulata</i> (del Arco) d	Fabaceae	x	X
255	<i>Teline stenopetala</i> ssp. <i>microphylla</i> (Pit. & Proust) del Arco	Fabaceae	x	
256	<i>Teucrium heterophyllum</i> L `Hér.	Lamiaceae		X
257	<i>Teucrium heterophyllum</i> ssp. <i>brevipilosum</i> v. Gaisberg	Lamiaceae		X
258	<i>Todaroa aurea</i> Parl.	Apiaceae		X
259	<i>Todaroa montana</i> Webb ex Christ	Apiaceae		X
260	<i>Tolpis lagopoda</i> C. Sm. in Buch	Asteraceae		X
261	<i>Urtica stachyoides</i> Webb & Berthel	Urticaceae		X
262	<i>Viburnum rigidum</i> Vent.	Caprifoliaceae		x
263	<i>Vicia cirrhosa</i> C. Sm. ex Webb & Berthel.	Fabaceae		X
264	<i>Vicia filicaulis</i> Webb & Berthel.	Fabaceae		X
265	<i>Volutaria canariensis</i> Wagenitz	Asteraceae		X
266	<i>Viola riviniana</i> Rchb.	Violaceae	x	
267	<i>Visnea mocanera</i> L. f.	Theaceae		
	<b>Grupos externos</b>			x
268	<i>Diceratella elliptica</i> (DC.) Jonsell	Brassicaceae	x	
269	<i>Myrsine africana</i> L.	Myrsinaceae	x	
270	<i>Apollonias barbujana</i> Bornm.	Lauraceae	x	
271	<i>Erica canariensis</i> Rivas-Mart. <i>et al.</i>	Ericaceae	x	
272	<i>Euphorbia mellifera</i> Aiton var. <i>mellifera</i>	Euphorbiaceae	x	
273	<i>Heberdenia excelsa</i> (Aiton) Banks <i>ex DC.</i>	Myrsinaceae	x	
274	<i>Jasminum odoratissimum</i> L.	Oleaceae		
275	<i>Laurus azorica</i> (Seub.) Franco	Lauraceae		
276	<i>Laurus novocanariensis</i> Rivas-Mart. <i>et al.</i>	Lauraceae	x	
277	<i>Micromeria varia</i> Benth. ssp. <i>thymoides</i> (Sol. <i>ex Lowe</i> ) P. Pérez	Lamiaceae	x	
278	<i>Morella faya</i> . (Aiton) Wilbur	Myricaceae		
279	<i>Ocotea foetens</i> (Aiton) Baill.	Lauraceae	x	
280	<i>Persea indica</i> (L.) Spreng. Rkse.	Lauraceae		
281	<i>Picconia excelsa</i> (Aiton) DC.	Oleaceae	x	
282	<i>Prunus lusitanica</i> L. ssp. <i>hixa</i> [Willd.] Franco	Rosaceae		
283	<i>Rhamnus glandulosa</i> Aiton	Rhamnaceae		
284	<i>Rubus bollei</i> Focke	Rosaceae	x	
285	<i>Salix canariensis</i> Chr. Sm. <i>ex Link</i>	Salicaceae		
286	<i>Sideroxylon marmulano</i> Banks <i>ex Lowe</i>	Sapotaceae		
287	<i>Viola riviniana</i> Rchb.	Violaceae	x	
288	<i>Visnea mocanera</i> L. f.	Theaceae		

En el organigrama, de la Figura 3.2, se resumen los protocolos llevados a cabo para el procesamiento de muestras recolectadas y analizadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral, según los apartados correspondientes dentro de este capítulo que son: (3.2.) la recolección de muestras de hojas y pliegos de herbario y los métodos de conservación de las mismas; (3.3) la extracción de su ADN; (3.4) la comprobación de la calidad y concentración de los extractos; (3.5) el depósito de alícuotas de material genético en el banco de ADN de la flora canaria del JBCVCSIC; (3.6) la amplificación de las regiones "código de barras"; (3.7) la secuenciación de *rbcL* y *matK*; (3.8) la revisión y edición de las secuencias obtenidas y (3.9) la obtención de las matrices de secuencias (*rbcL* y *matK*) alineadas para su posterior análisis.

Los detalles de cada uno de los pasos seguidos en los distintos protocolos, las figuras explicativas y las tablas informativas que acompañan a cada protocolo se incluyen en los mencionados apartados.

Los distintos análisis realizados (análisis de distancias y caracteres, obtención de árboles de relaciones genéticas, análisis estadísticos) y sus resultados se explican y discuten en los capítulos correspondientes (cap. 4 acerca de la identificación taxonómica molecular en ausencia de un "barcoding gap": testando las regiones "código de barras" en elementos de la flora endémica de canarias, y cap. 5 para las estimaciones de diversidad filogenética asociada a la flora endémica canaria distribuidas en la Reserva de Biosfera de Gran Canaria, como un nuevo instrumento para contribuir a la conservación y gestión de su flora).



**Figura 3.2.** Organigrama general de los métodos desarrollados en esta tesis doctoral.



### **3.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES.**

Para llevar a cabo los distintos protocolos moleculares aplicados en el desarrollo de esta tesis doctoral, el ADN de las especies seleccionadas se extrajo a partir de hojas frescas de las muestras recolectadas. Aunque el ADN se puede extraer de cualquier tejido vegetal (flores, tallos, raíces e incluso semillas), realizamos la extracción a partir de las hojas por varios motivos:

1º) Las hojas se encuentran presentes, en la mayoría de las plantas, en cualquier época del año (a diferencia de las flores o frutos, que sólo están presentes durante los períodos de floración y/o fructificación, es decir durante unos pocos meses al año);

2º) Las hojas son más sencillas de muestrear que por ejemplo las raíces, para las que sería necesario desenterrar parte del ejemplar y, por lo tanto, también su muestreo sería "más invasivo y perjudicial" para la supervivencia de la planta.

3º) Para la extracción del ADN es necesario llevar a cabo la rotura de las paredes y membranas celulares del tejido que se va a utilizar, como paso previo a la rotura química de las estructuras celulares, por lo que el "machacado" de semillas o tallos hasta lograr un polvo fino, es mucho más complicado que el de hojas, ya que por ejemplo, la cubierta externa de las semillas es más resistente que la pared celular de las hojas, especialmente en especies que tienen semillas con una cubierta escarificada o resinosa como, por ejemplo, el cedro canario.

4º) Por último, como las dos regiones que vamos a analizar pertenecen al ADN cloroplástico, éste será más abundante en las partes vegetales más verdes (dicha coloración es debida a la clorofila contenida en los cloroplastos), es decir las hojas.

Por lo tanto, una vez decidido el material a recolectar, es importante que éste se recolecte en cantidad suficiente para poder realizar las extracciones, y que se conserve adecuadamente, tal y como se irá explicando en los párrafos siguientes.

No todas las técnicas moleculares requieren de la misma calidad ni concentración de ADN, por ello es importante conocer bien, antes de comenzar la recolección, los requisitos de la técnica que se va a emplear para llevar a cabo el estudio. En nuestro caso, vamos a necesitar bastante ADN de partida tanto para las amplificaciones como para las secuenciaciones y, éste además, debe de tener las menos impurezas posibles. Por ello, para facilitar la rápida deshidratación de las hojas (más adelante veremos la importancia de este paso) y, al mismo tiempo, preservarlas de posibles contaminaciones (p.ej, con hongos) las muestras de hoja se depositaron en el interior de bolsas de plástico con cierre hermético que contenían gel de sílice.

Debido a que el volumen de muestras a analizar era considerable, etiquetamos las bolsas (conteniendo las hojas) en su cara exterior, con un código identificativo para facilitar su organización y localización. Todas las muestras recolectadas para este proyecto de tesis (Tablas 5.1 y S1) están incluidas en las colecciones del banco de ADN del JBCVCSIC (hojas y alícuotas de ADN) y en los herbarios LPA y ORT (pliegos testigo).

Muchas de las pautas seguidas para la recolección y conservación de muestras se detallan en Caujapé-Castells (2006) y en Caujapé-Castells *et al.* (2011), ambos descargables gratuitamente desde la web del Departamento de Biodiversidad Molecular y banco de ADN del JBCVC-UA CSIC (<http://www.bioclimac.com/mbdna/>).

### 3.2.1 MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA LLEVAR A CABO LAS RECOLECCIONES DE MUESTRAS VEGETALES:

a) **bolsas de plástico con cierre hermético, adecuadamente etiquetadas** con un código exclusivo, visible en todo momento, para facilitar su ordenación tanto antes de depositar las hojas en ellas, como posteriormente (Fig. 3.3).



**Figura 3.3.** Bolsas de cierre hermético, etiquetadas con un código identificativo y conteniendo muestras de hojas y gel de sílice. (Foto: Ruth Jaén Molina)

Para ello, en la superficie externa de la bolsa se colocó una etiqueta con el “código” identificativo de la bolsa/ muestra, de modo que, al incluir las hojas en su interior, éste continuara siendo visible.

b) **gel de sílice para la desecación de las muestras.** A medida que se van recolectando las muestras, es conveniente ir añadiendo gel de sílice (directamente desde un bote o dentro de una bolsita de papel, ver Fig. 3.4), para ayudar al secado de las muestras hasta el momento de su procesamiento.



Si las muestras iban a ser trasladadas al laboratorio el mismo día o a los pocos días de su recolección, entonces se colocaban en una estufa (a 60°C desde 30 minutos a varias horas, dependiendo del tipo y estado de las hojas), antes de introducirlas en las bolsas herméticas que contenían el gel de sílice. Con este paso previo de secado en estufa (Fig. 3.5) aceleramos la deshidratación del material y, así, evitamos tener que hacer repetidos cambios del gel de sílice (según vaya virando por la acumulación de humedad) antes de que las muestras se sequen completamente. Todo esto, repercutió en tener que invertir menos tiempo en el secado de las muestras y, al mismo tiempo, en disminuir el riesgo de “perder” material y de contaminarlo, pues al tener que realizar la sustitución del gel virado por gel seco (sin utilizar) menos veces, también lo estaríamos manipulando, en menor medida.

**c) Prensa y periódico para poner las muestras que van a constituir el pliego de herbario.** Siempre que fue posible, se recolectaron plantas representativas de las diferentes morfologías y tamaños que se hallaban en la población para elaborar los pliegos “testigo” asociados a cada una de las poblaciones donde fueron recolectados, para permitir revisiones/ comprobaciones taxonómicas posteriores, en caso de que fuera necesario.

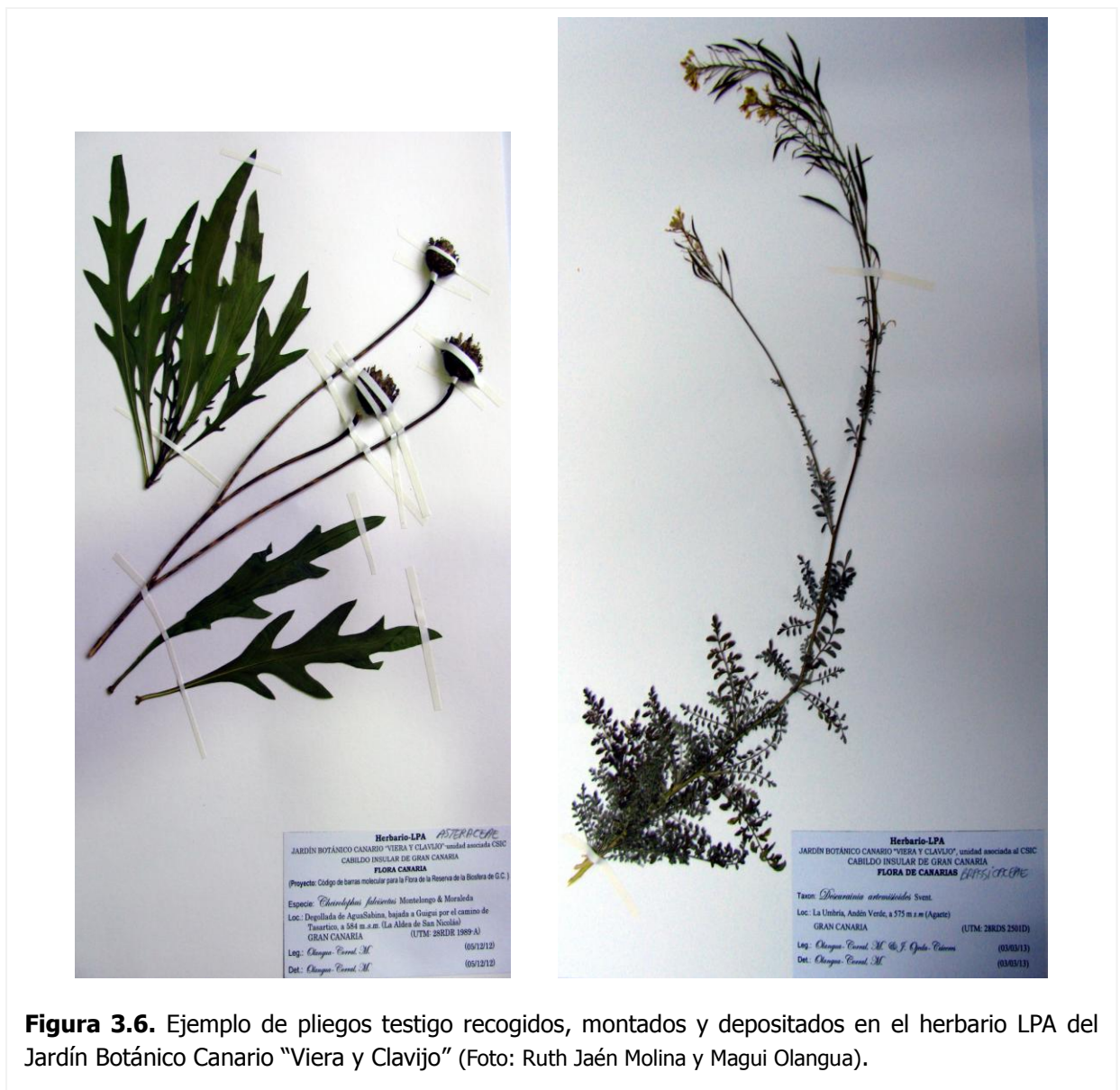


**Figura 3.5.** Secado en estufa de muestras de hoja antes de depositarlas en las bolsas de cierre hermético y de la extracción de su ADN. (Foto: Ruth Jaén Molina).

Cada pliego “testigo” con datos relevantes relacionados con la recolección del taxón al que representan (especie, fecha, localidad, altitud, recolector, etc.) fue depositado en un herbario oficial (Fig. 3.6).

En ocasiones, las plantas no estaban ni en flor ni en fruto, por lo que no fue posible recolectar los correspondientes pliegos de herbario en el momento de la recolección de las muestras de hoja.

Afortunadamente, para aquellos grupos donde se planteaban dudas a nivel de reconocimiento morfológico, sí se dispone del material para realizar las comprobaciones pertinentes.



**Figura 3.6.** Ejemplo de pliegos testigo recogidos, montados y depositados en el herbario LPA del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" (Foto: Ruth Jaén Molina y Magui Olangua).

**3.2.2 NORMAS PRÁCTICAS PARA EL MUESTREO DE HOJAS** (extraídas de Caujapé-Castells 2006 y Caujapé-Castells *et al.* 2011).

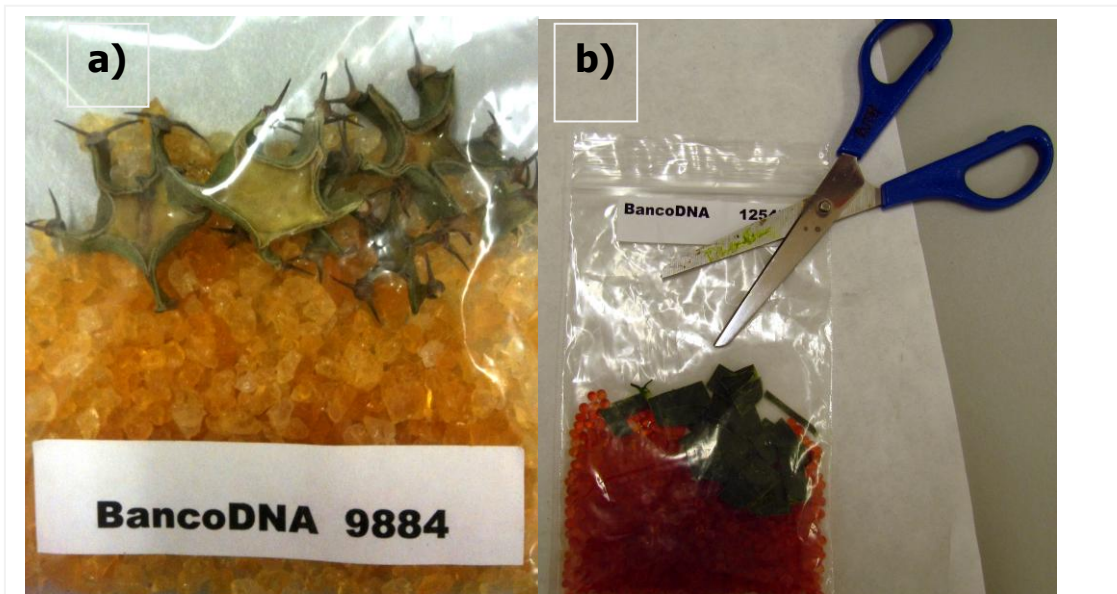
De forma general, se recolectaron entre 1 y 5 gramos de hojas pertenecientes a 1-3 individuos por población aunque, en ocasiones, se recogieron hojas de 5 ó más individuos. A la hora de seleccionarlos, se tuvo especial cuidado en que estuvieran separados unos de otros, dentro del espacio ocupado por la población, para así minimizar la posibilidad de que se tratara de individuos muy emparentados entre sí. Además de estas normas básicas para garantizar una óptima extracción del ADN vegetal y, posteriormente, una exitosa amplificación del ADN, se tuvieron en cuenta estos otros importantes aspectos que se detallan en Caujapé-Castells *et al.* 2006 y 2011 y, que tienen que ver con:

- a)** Recolectar hojas correspondientes a la especie diana y que no estén contaminadas por insectos, hongos ni otros organismos pequeños.
- b)** Recoger muestras para tener la máxima representatividad de la población, evitando no recolectar sólo las hojas más limpias de las plantas, ni únicamente las más sanas y vistosas.
- c)** Incluir en cada bolsa, las hojas de un único individuo/planta, pues lo contrario, implicaría analizar la variabilidad genética de varios individuos como si se tratara de una única muestra.
- d)** Recoger siempre hojas adultas que no hayan empezado la senescencia, para evitar metabolitos que puedan co-precipitar con el ADN durante el proceso de extracción, pues supondría una dificultad añadida para una amplificación exitosa del ADN.



e) Realizar un secado rápido de las hojas, antes de la extracción de su ADN, para evitar el estrés hídrico y la carencia de nutrientes que sufrirían las hojas en caso contrario y, que resultarían en la producción de compuestos fenólicos y radicales libres, que perjudicarían la calidad del ADN obtenido en la extracción (McKersie *et al.* 1988).

Por ello, se aconseja poner las hojas en gel de sílice y, en ocasiones, partir las hojas en varios trozos, aunque sea en detrimento de su integridad, para asegurarnos que se secan lo más rápido posible (Fig. 3.7 a y b).



**Figura 3.7a)** Hojas de *Euphorbia canariensis* que habían sido previamente troceadas y secadas en estufa para finalmente completar su secado en gel de sílice. **b)** Hojas de *Dracaena draco* que han sido troceadas para facilitar su secado con el gel de sílice. (Fotos: Ruth Jaén Molina)



### 3.3 EXTRACCIÓN DEL ADN VEGETAL

Las extracciones del ADN total, a partir de hojas frescas o deshidratadas en gel de sílice, se llevaron a cabo por el método CTAB 2X (Doyle & Doyle 1987; Palmer *et al.* 1988), con algunas modificaciones contempladas en Caujapé-Castells *et al.* (2011).

#### A) Machacado de material vegetal.

Tanto, si el material vegetal ha sido previamente secado en estufa como si éste ha sido deshidratado en gel de sílice, el machacado de las muestras de hoja lo realizamos con el homogeneizador automático o "Mixer Mill" (Retsch). Éste tiene la ventaja de que permite machacar 20 muestras al mismo tiempo. Para ello, colocamos entre 300mg y 500mg de hoja troceada, lo más seca posible, en el interior de un tubo de 2 ml de base ancha junto con varias bolitas de vidrio (Fig. 3.8).



Los tubos con el material vegetal y las bolitas de vidrio se colocan en receptáculos especiales, y éstos a su vez se enganchan en los brazos del homogeneizador automático (en orientación opuesta) de forma que queden perfectamente encajados en las piezas metálicas de los extremos (Fig. 3.9). Las muestras se machacaron

durante un promedio de 3 minutos a una frecuencia de 30 (estándar), salvo excepciones. Por ejemplo, las hojas de las especies del género *Aeonium* son más fibrosas y requieren de tiempos y frecuencias más altas para su total machacado.



Al terminar el proceso de machacado, las muestras de hoja deben convertirse en un polvo muy fino (Fig. 3.10), en caso de que no fuera así y aún quedaran trozos grandes de hoja, las muestras eran procesadas durante otros 3 minutos.



En resumen, podemos decir que hay varios factores (además de las particularidades químicas de cada especie) antes de la extracción del ADN que van a influir en que ésta sea exitosa o no y, que son:

- 1) Estado de desarrollo del tejido recolectado.
- 2) Método de deshidratación.
- 3) Duración y condiciones de almacenamiento de las muestras previas a la extracción.
- 4) Método de machacado de las muestras.

### **B) Extracción química del ADN vegetal.**

En el método de extracción empleado en esta investigación (CTAB 2x), tras realizarse la rotura mecánica de la pared celular (como vimos en el apartado A), se lleva a cabo la lisis química de las membranas celulares que protegen al ADN dentro de los diferentes orgánulos (núcleo, mitocondrias y cloroplastos). Este paso de lisis química lo realizamos tanto, por choque térmico (se somete a las muestras a una temperatura de 65 °C), como por la adición de diferentes soluciones. Posteriormente, se separó por centrifugación, el ADN (que queda en el sobrenadante) del resto de componentes celulares (Fig. 3.11) que, al ser más densos, quedan en fases inferiores de coloración más oscura (el verde es debido a los pigmentos fotosintéticos como la clorofila).

El CTAB o bromuro de cetiltrimetilamonio es una sal de amonio cuaternario con propiedades detergentes y que pertenece a los denominados *jabones invertidos*,

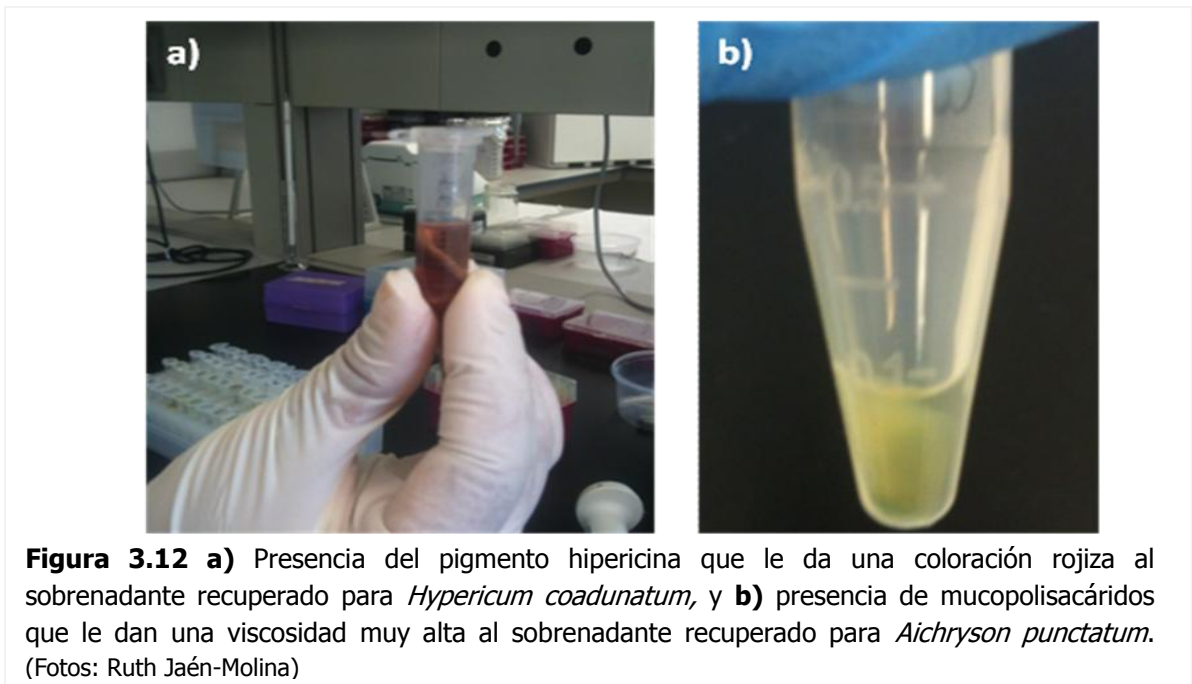
debido a que su actividad superficial se debe a la presencia de un ion positivo y no, a uno negativo, como sucede en los sulfatos de alquilo e hidrógeno, que son los detergentes habituales.



**Figura 3.11.** Las muestras son sometidas a distintos pasos de agitación, centrifugación y adición de soluciones hasta la formación de varias fases dentro del tubo, quedando en la fase superior translúcida, el ADN. El color verde de la fase inferior es debido a los pigmentos fotosintéticos como la clorofila. (Fotos: Ruth Jaén Molina y Beatriz Rumeu)

Junto con el CTAB se añade EDTA, un agente quelante cuya función es secuestrar los iones metálicos que puedan haber en la solución, evitando que se unan al ADN una vez que éste se libera. La adición de solventes como cloroformo y alcohol isoamílico (SEVAG) permitió la eliminación de proteínas y otros componentes secundarios como los fenoles. Posteriormente, se añadió etanol al 70% para favorecer la precipitación del ADN y la purificación de parte de los extractos, pues junto al etanol se eliminarán componentes secundarios, que al girar el tubo para desechar el sobrenadante, serán "arrastrados" también. Por último, el precipitado de ADN se resuspende en tampón TE (Tris-EDTA) para su conservación.

La extracción del ADN a partir de especies muy crasas (p. ej., de *Aeonium*, *Euphorbia*, *Carduus*, etc.) o de especies como *Hypericum coadunatum* (Guttiferae) o *Aichryson punctatum* (Crassulaceae), por su naturaleza química, daba lugar a sobrenadantes que contenían (además del ADN) abundantes componentes secundarios (Fig. 3.12 a y b).



Para eliminar o reducir esos componentes secundarios fue necesario realizar algunas modificaciones en el protocolo de extracción, a saber:

- 1) Secado en estufa más prolongado antes de la extracción del ADN.
- 2) Machacado de las muestras en mortero y junto a gel de sílice en polvo.
- 3) Disminución del material de hoja de partida (un menor volumen de muestra en el tubo aumentó el rendimiento de la extracción).
- 4) Aumento del tiempo de incubación/precipitación en pasos claves del protocolo (agitación con el CTAB, precipitación con isopropanol).

5) Aumento del volumen de las soluciones empleadas (p. ej., del SEVAG) y del número de repeticiones (p. ej., del lavado con Etanol).

### **3.4 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LOS EXTRACTOS DE ADN.**

Una vez finalizada la extracción del ADN, se comprobó la calidad de los extractos por electroforesis en geles de agarosa (Fig. 3.13).

El ADN es una molécula que en solución está cargada negativamente, por lo que cuando se la somete a un campo eléctrico migra hacia el ánodo con velocidad inversa a su tamaño (esto es, a mayor tamaño, menor velocidad de migración). En este principio se basa el método de electroforesis en gel de agarosa que nos permite visualizar las macromoléculas de ADN como bandas en el gel (después de la tinción con *SYBR Safe*), y tener así una aproximación de su concentración y su calidad (ADN degradado o no) en función de la intensidad de la tinción y el número de bandas (ver más abajo).

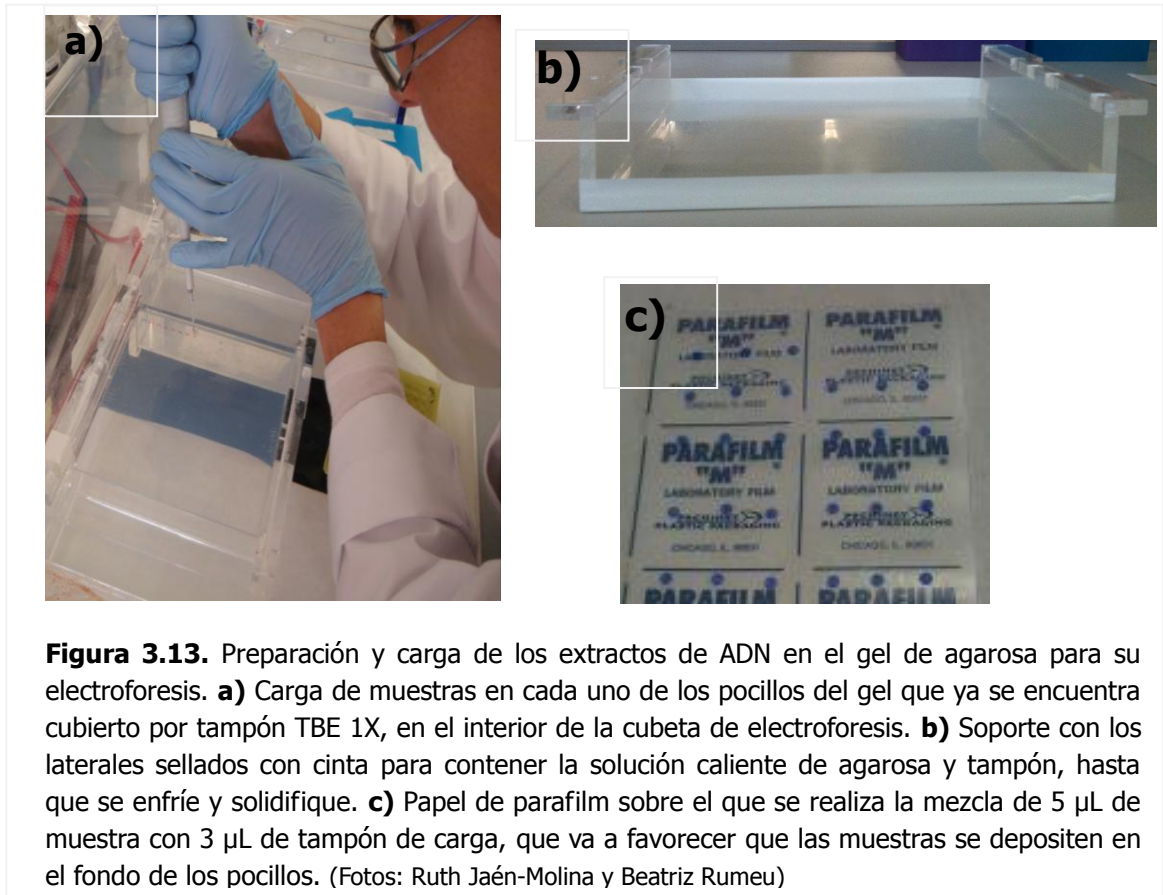
Para asegurarnos de que las moléculas de ADN total migraban lo suficiente para poder ser visualizadas, su electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1% y se prolongó durante 1h y 30 minutos a 90 mA.

La visualización de las bandas correspondiente a cada muestra de ADN cargada en el gel se realiza sobre una lámpara de luz UV, de forma que al incidir la luz sobre el gel teñido con soluciones como el *SYBR Safe* (Invitrogen), las moléculas de ADN emitirán fluorescencia

El *SyBR Safe* es un tinte que no posee efectos carcinógenos, lo cual le convierte en una alternativa mucho más segura que el bromuro de etidio (EtBr), agente

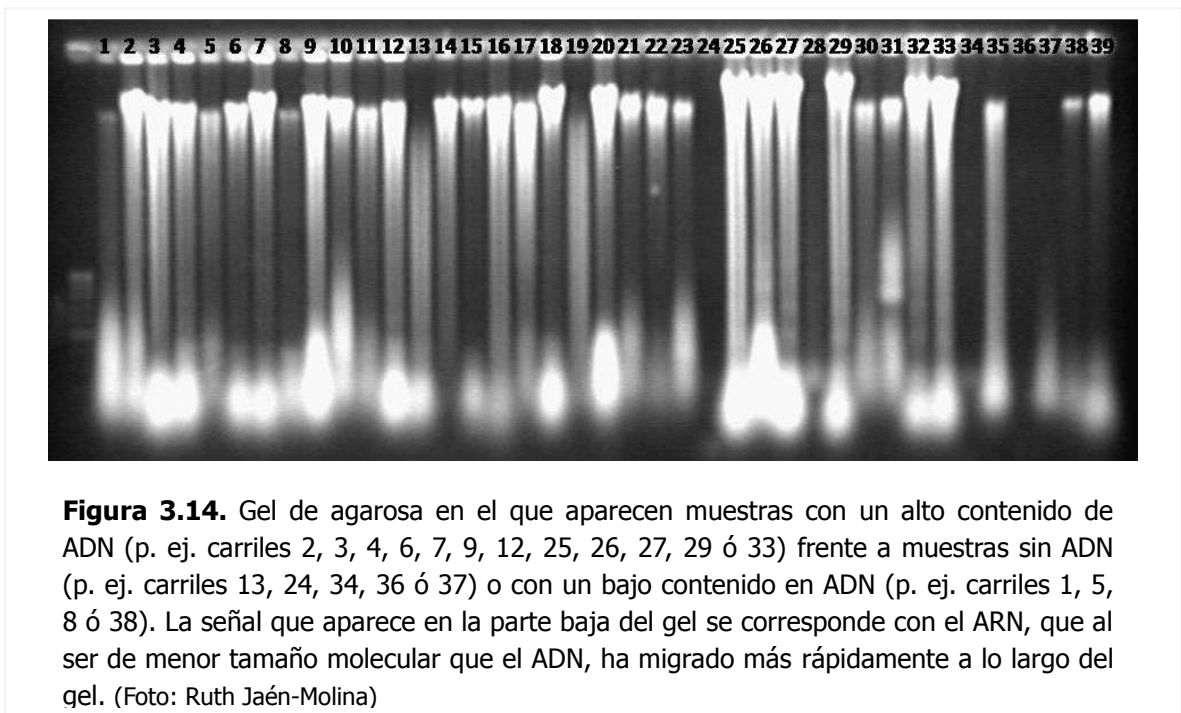
intercalante que se usaba frecuentemente en el pasado para visualizar ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular.

La visualización y el fotografiado de los geles de agarosa la realizamos con el equipo de imagen "Alphaimager".



La intensidad de la señal que cada muestra de ADN deja en el gel y la cantidad de bandas que visualicemos para cada una de ellas, nos permitieron evaluar cualitativamente la concentración y calidad de los extractos (Fig. 3.14). Se considera que una muestra de ADN es de alta concentración y calidad cuando aparece como una única banda intensamente teñida y próxima al origen de migración (los pocillos

de carga de las muestras), lo cual indica que el ADN extraído es de gran tamaño y está prácticamente intacto. Por el contrario, la presencia de varias bandas de diferentes tamaños a lo largo del carril de migración, o de un "smear" (esto es, un degradado difuso que delata la presencia de numerosos fragmentos de un gran rango de tamaños diferentes en el carril de migración) indicaría que ha habido degradación del ADN en el proceso de extracción.



Puesto que no aplicamos enzimas que fragmenten el ARN (*RNAsas*) después de la extracción del material genético, el ARN celular (que también se tiñe con *SYBRsafe* por ser un ácido nucleico) aparece en casi todos los carriles como una banda difusa y alejada del origen del carril de migración (parte baja del gel).

Aunque el rendimiento de las extracciones para la mayoría de las especies fue alto, hubo casos en los que fue necesario repetirlas, bien porque no se obtenía ADN al



final del proceso (no se observaba banda en el gel de calidad), o bien porque el ADN obtenido estaba en baja concentración (generando una banda de intensidad muy débil en el gel) y/o degradado ("smear").

### **3.5 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL ADN.**

La evaluación cuantitativa del ADN la realizamos mediante el biofotómetro *ND-2000c* (*NanoDrop*, Fig. 3.15) que, a diferencia de otros, requiere de mucho menor volumen de muestra (1-2  $\mu$ l, en lugar de 5  $\mu$ l) y no es necesario el uso de cubetas.

Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260nm (debido a la presencia de bases nitrogenadas aromáticas a lo largo de sus cadenas), y dado que 1 unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 $\mu$ g/ml de ADN bicatenario (que es el que se obtiene después de realizar la extracción), los biofotómetros pueden calcular de forma fiable la concentración del ADN midiendo la absorbancia a 260nm. Al realizar mediciones de absorbancia a 280nm (A280) y a 230nm (A230) podremos determinar la concentración de otros componentes (generalmente proteínas y/o fenoles), que hayan podido co-precipitar junto con el ADN durante la extracción. El ADN puro resuspendido con TE es incoloro. No obstante, si la cantidad de impurezas presentes en los extractos de ADN es alta, éstos tendrán una coloración variable (desde amarillenta a marrón oscura) o presentarán una textura mucilaginosa o gelatinosa (Fig. 3.16), en lugar de ser transparentes

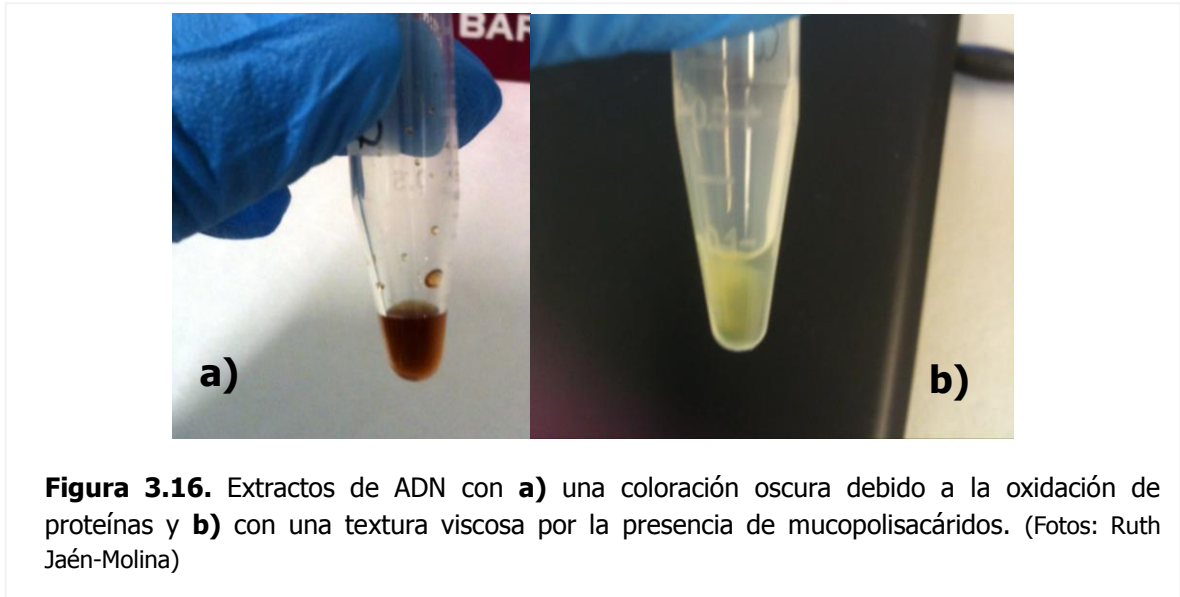


**Figura 3.15.** Biofotómetro *NanoDrop* 2000c y ordenador portátil conectado a él para la toma de datos. (Foto: Ruth Jaén-Molina)

Los ratios A260/A280 y A260/A230 nos indicarán la proporción de ADN en la solución respecto a las impurezas y, por lo tanto, nos darán el grado de pureza de las muestras. Las muestras que presentaron elevada presencia de contaminantes fueron purificadas en las columnas suministradas con el *kit* comercial *GenElute PCR Clean-Up* (Sigma-Aldrich), que tienen una membrana de celulosa donde el ADN queda retenido. Este *kit* tiene la ventaja de que no contiene resinas ni componentes tóxicos orgánicos como el fenol y/o el cloroformo que se utilizan con otros *kits*. Al finalizar la purificación, se recupera un ADN en menor concentración, pero siempre de mayor pureza.

Es importante conocer la concentración de ADN que hay en los extractos para poder ajustarla dentro del rango que garantiza la amplificación de las regiones seleccionadas (generalmente entre 20-50 ng/ $\mu$ L).

Además, deben eliminarse el máximo posible de impurezas, que a menudo interfieren en la amplificación del ADN, por ejemplo inhibiendo a la enzima polimerasa, sin cuya activación no es posible llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (en adelante PCR, por las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*).



### 3.6 AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Para poder llevar a cabo la secuenciación de cualquier región del ADN, es necesaria la generación anterior de múltiples copias de la región elegida, esto es, su amplificación, a través de una reacción de PCR.

Las amplificaciones de las regiones *rbcl* y *matK* se llevaron a cabo según las condiciones y los programas publicados por el PWG en la web del CBOL ([www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu)), con algunas modificaciones para *matK*, cuya amplificación y secuenciación resultaron ser más problemáticas (ver más abajo).

Las reacciones de amplificación se prepararon para un volumen final de 25µl, de forma que se ajustó la cantidad de ADN de partida para alcanzar una concentración entre 20-50ng/µl, con la menor cantidad posible de impurezas.

Los distintos componentes de la PCR (tampón 10X, Mg<sup>2+</sup>, nucleótidos, BSA y cebadores) se repartieron en alícuotas a la concentración de trabajo correspondiente, de forma que estaban listos para ser añadidos al tubo (normalmente de 1,5ml) en el que se prepara la premezcla de la reacción de PCR (ver Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Componentes de la premezcla base para las reacciones de amplificación (condiciones estándar). El volumen final de la mezcla se ajusta a 25µl.

<b>Producto</b>	<b>Volumen</b>
ADN (20-50 ng/µl)	1-2 µl
tampón 10X (con Mg <sup>2+</sup> )	2,50 µl
<i>dNTPs</i> (100 mM)	0,50 µl
Cebador <i>forward</i> (20 µM)	0,50 µl
Cebador <i>reverse</i> (20 µM)	0,50 µl
<i>BSA</i> (20 mg/ml)	1,00 µl
<i>Taq</i> Roche (5U/µl)	0,30 µl
H <sub>2</sub> Odd	X µl
<b>Volumen final</b>	<b>25, 00 µl</b>

Para esta premezcla se emplearon los nucleótidos (10mM) de la casa comercial Roche (Ref. 11969064001) y la *Taq* polimerasa (5U/µl) también de la casa comercial Roche (Ref. 03560597001) que incluía el tampón 10x con (100mM Tris-HCl, 15mM

MgCl<sub>2</sub>, 500mM KCL, pH 8.3) y la albúmina de suero de bovino (más conocida, por sus siglas en inglés, como *BSA*) de la casa comercial Sigma (Ref. B8667-5ML).

Únicamente para aquellas muestras que mostraron problemas de amplificación con las condiciones estándar (Tabla 3.2), se utilizó el *kit PCR Master Mix "Reddy Mix"* de Thermo Scientific (Ref. AB-0619-LD/B), ajustando las cantidades del resto de componentes de la premezcla o cóctel de reacción como se muestra en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Componentes de la premezcla para las reacciones de amplificación cuando utilizamos la "Master Mix" del *kit* de *PCR "Reddy Mix"* (Thermo Scientific).

<b>Producto</b>	<b>Volumen</b>
ADN (20-50 ng/ µl)	1, 00 µl
<i>Master mix</i>	23, 00 µl
Cebador <i>forward</i> (20 mM)	0, 25 µl
Cebador <i>reverse</i> (20 mM)	0, 25 µl
<i>BSA</i> (20 mg/µl)	0, 50 µl
<b>Volumen final</b>	25, 00 µl

Estas "Master Mix" tienen la ventaja de permitir preparar la mezcla de reacción de una forma más rápida y con menos riesgo de contaminación, que cuando se añaden con la pipeta los distintos componentes por separado. Su inconveniente principal es su elevado precio y su limitación más importante es que no permite el ajuste de la concentración de por ejemplo, el magnesio o la polimerasa, que puede ser clave en el éxito de la amplificación de algunas muestras.

El empleo de los cebadores propuestos por el PWG CBOL en 2009 nos permitió la amplificación y secuenciación de la región *rbcl* sin ninguna dificultad, con un porcentaje de éxito del 99% para todos los grupos taxonómicos analizados (Tabla 3.4). Sin embargo, para la amplificación de la región *matK*, los cebadores y las indicaciones recomendadas por el PWG no dieron buenos resultados para todos los grupos taxonómicos analizados dentro de esta tesis, por lo que fue necesaria la optimización de los protocolos e incluso el empleo de nuevos cebadores (Ford *et al.* 2009, Dunning & Savolainen 2010, Shaefer *et al.* 2011, Tabla 3.5).

**Tabla 3.4.** Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *rbcl*

Nombre	Secuencia 5´-3´
<i>rbc-F</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
<i>rbc-R</i>	GAAACGGTCTCTCCAACGCAT

Al comprobar que los cebadores para la amplificación de la región *matK* se comportaban como específicos de cada linaje, seleccionamos algunos de los 26 pares recomendados por Dunning y Savolainen (2010), para especies y géneros de las siguientes familias: Asteráceas, Cariofiláceas, Fabáceas o Labiadas, analizadas dentro de esta tesis. El empleo de estos cebadores junto con los desarrollados por H. Schaefer en 2011 (Tabla 3.5), mejoró notablemente el éxito en la amplificación y nos permitió obtener secuencias de la región *matK* para varias de las especies para las que anteriormente la amplificación había sido deficiente (p. ej., algunos géneros de Lauráceas). Los cebadores de Schaefer (2011) están basados en los diseñados por

Kim *et al.* (sin publicar) pero contienen una variación en el primer “reverse” que facilita el anclaje en la región complementaria del ADN.

**Tabla 3.5** Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *matK*

<b>Nombre</b>	<b>Secuencias 5´-3´</b>	<b>Referencias</b>
<b>matKXf</b>	TAATTTACGATCAATTCATTC	Ford <i>et al.</i> 2009
<b>matK5 R</b>	GTTCTAGCACAAGAAAGTCG	Ford <i>et al.</i> 2009
<b>matK3 F</b>	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	Kim (sin publicar)
<b>matK1R</b>	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	Kim (sin publicar)
<b>matK-f</b>	AATTTACGATCHATTCATTCMATWTCCC	Shaefer <i>et al.</i> 2011
<b>matK-R</b>	AGTTYTARCACAAGAAAGTCGAARTATATA	Shaefer <i>et al.</i> 2011
<b>matK1F</b>	ACTGTATCGCACTATGTATCA	Sang <i>et al.</i> 1997
<b>matK1R</b>	GAACTAGTCGGATGGAGTAG	Sang <i>et al.</i> 1997
<b>matK2.1af</b>	ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC	CBOL PWG 2009
<b>390F</b>	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	Cuénoud <i>et al.</i> 2002
<b>1326R</b>	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	Cuénoud <i>et al.</i> 2002
<b>NY552-R</b>	CTGGATYCAAGATGCTCCTT	D. Little (NYBG )
<b>NY1150-R</b>	GGTCTTTGAGAAGAACGGAGA	D. Little (NYBG )
<b>AST_F</b>	CCTTACCCAGCTCATCTGGAAAT	Dunning & Savolainen 2010
<b>AST_R</b>	CAAATAATATCCAAATACCAA	Dunning & Savolainen 2010
<b>CAR_</b>	CGAGACAAAGTTCTAGCCCAVG	Dunning & Savolainen 2010
<b>XXF</b>	TAATTTACGATCAATTCATTC	Dunning & Savolainen 2010
<b>FAB_F</b>	TTCAAACCCTTCGTTACTGGATVA	Dunning & Savolainen 2010
<b>FAB_R</b>	CTTTTGTGTTTACGAGCCAADG	Dunning & Savolainen 2010
<b>LAM_F</b>	TCATAATTTACGATCAATYC	Dunning & Savolainen 2010
<b>LAM_R</b>	GCACAAGAAAGTCGAAGTATATA	Dunning & Savolainen 2010

En algunos casos, el ADN amplificado no estaba en suficiente concentración para garantizar el éxito de las reacciones de secuenciación posteriores y, en otros casos, las secuencias obtenidas no tenían la calidad suficiente para poder ser leídas sin ambigüedades, especialmente en el caso de las secuencias “reverse” obtenidas para la región *matK*. Por lo tanto, esta región no sólo mostró más dificultades que *rbcl* en su amplificación, sino que también fue necesario modificar las condiciones y

cebadores empleados para obtener unas secuencias de buena calidad.

En todos los casos, se establecieron los mismos tiempos y temperaturas para llevar a cabo cada una de las reacciones de amplificación, únicamente variando, en los programas definidos en el termociclador, las temperaturas de anillamiento según la pareja de cebadores empleada (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6** Temperatura de anillamiento utilizada para cada una de las parejas de cebadores que se emplearon en la amplificación de *rbcl* y *matK*.

Región	Cebadores	TA
<i>rbcl</i>	<i>rbcl</i> -F <i>rbcl</i> -R	55°C
<i>matK</i>	<i>matK</i> -F <i>matK</i> -R	48°C
<i>matK</i>	AST-F AST-R	48°C
<i>matK</i>	<i>matK</i> -XF <i>matK</i> -5R	46°C
<i>matK</i>	3F_KIM 1R_KIM	58-55°C
<i>matK</i>	<i>matk</i> -1F <i>matk</i> -1R	53°C
<i>matK</i>	390-F 1326-R	48°C
<i>matK</i>	NY552-F NY1150-R	56°C

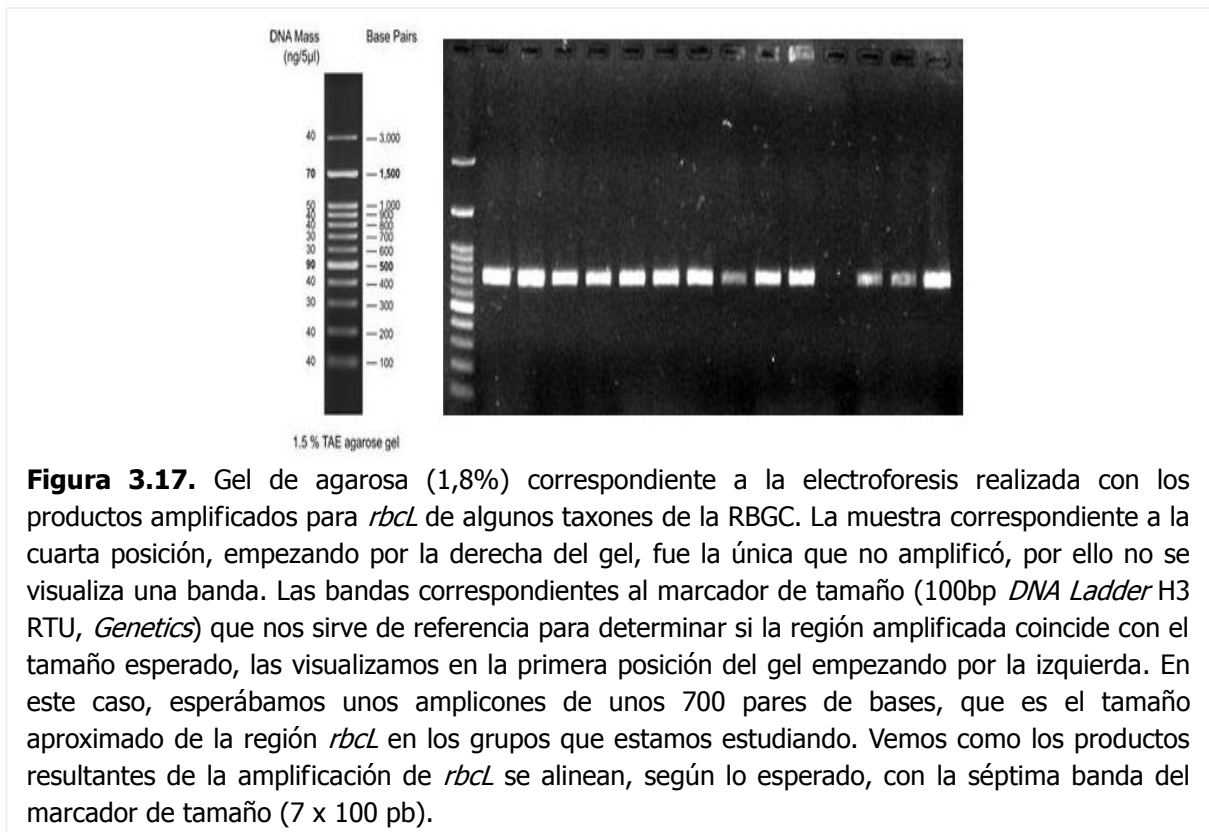
El programa básico definido en el termociclador fue:

- 94°C (Tª desnaturalización) durante 2 minutos, seguido de Repetición de los siguientes tres pasos, durante 30 ciclos:
- 94 °C durante 30 segundos
- TA correspondiente (según tabla 3.6) durante 1 minuto
- 72 °C durante 1 minuto, y finalmente, un paso de:
- 72°C (Tª elongación) durante 5 minutos.



### 3.7 SECUENCIACIÓN DEL ADN.

Los amplicones (esto es, los productos de PCR que se visualizaron como una única banda intensa en los geles, lo que delataba una amplificación exitosa) fueron enviados a *Macrogen Inc.* (Corea) para su secuenciación bidireccional (secuencias sentido y antisentido) en un secuenciador 3730XL ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU). Sólo aquellas muestras para las que se obtuvo una única banda intensa en los geles de agarosa y con el tamaño esperado según la región amplificada (Fig. 3.17), fueron incluidas en las placas y/o tubos para su posterior envío al servicio de secuenciación Macrogen en Corea.



Como hemos mencionado en el apartado anterior, los mismos cebadores que se utilizaron para la amplificación de las distintas regiones (*rbcl* y *matK*) fueron los

empleados en la secuenciación de las mismas. La única diferencia es que éstos se encontraban a una concentración mucho menor en las reacciones de secuenciación (10 pM) que en las reacciones de amplificación (20µM).

Para la preparación de las muestras y su envío al servicio de secuenciación, se siguieron los protocolos y recomendaciones indicadas en la página web de MacroGen (<http://dna.macrogen.com>), para así asegurarnos de que los amplicones y los cebadores correspondientes llegaban a su destino en condiciones óptimas.

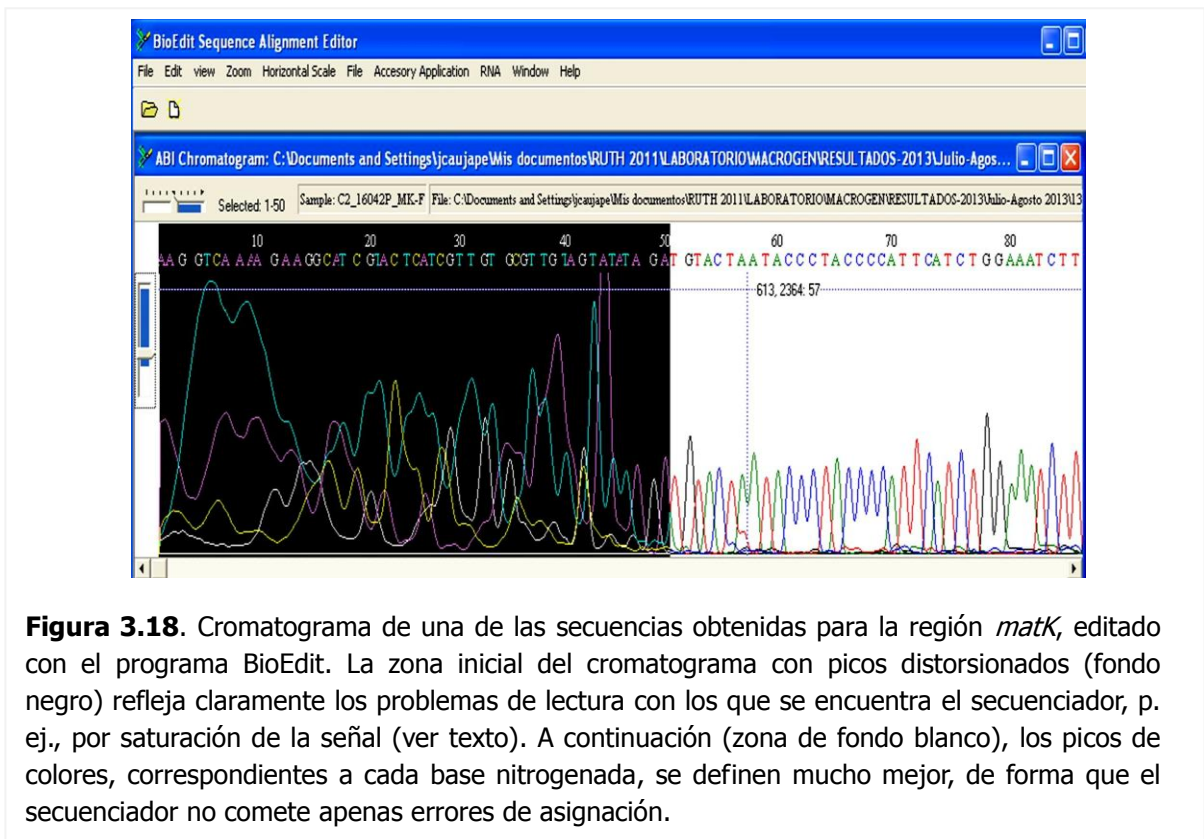
### **3.8 REVISIÓN, EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.**

Una vez obtenidas las secuencias, y como paso previo a su alineamiento, se realizaron búsquedas con el algoritmo *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), en *GenBank* (la más conocida base de datos de secuencias de ADN públicamente disponibles) para comprobar si las secuencias generadas eran similares o iguales a otras de la misma especie o género y, también para asegurarnos de que se correspondían con la región correcta, según nuestros datos.

La edición de los cromatogramas es importantísima para detectar y, en su caso, paliar posibles errores en la lectura por parte del secuenciador de las bases nitrogenadas de la secuencia de ADN analizada. Por ello, con el programa *BIOEDIT* v.5.0.6 (Hall 2007) se revisaron de forma manual tanto las secuencias "forward" como las "reverse" antes de obtener la secuencia consenso, que contendrá las bases nitrogenadas comunes presentes, tanto en la secuencia "forward" como en la "reverse". Con las secuencias "consenso" obtenidas se generan las matrices para el total de taxones que se van a analizar y para cada región de ADN. Posteriormente

estas matrices son alineadas y/o combinadas, antes de su análisis.

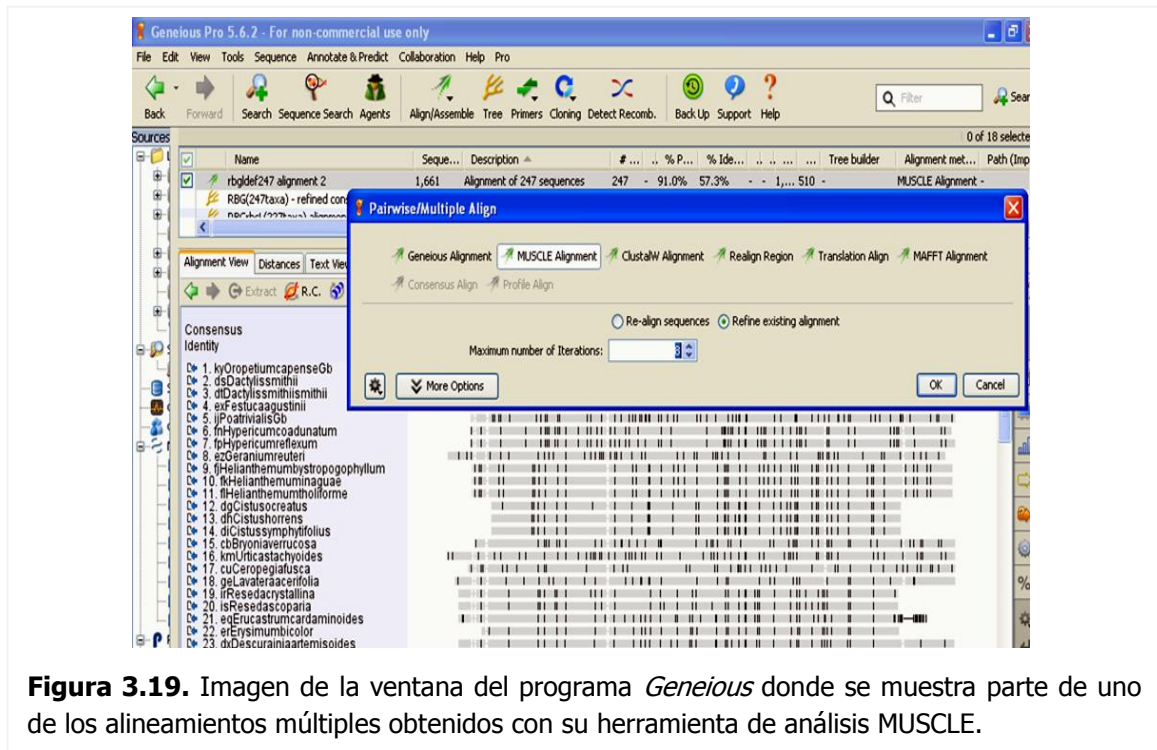
Las zonas del principio y del final de cada secuencia suelen ser las que generan mayores dificultades de asignación de bases, mientras los picos al principio de la secuencia aparecen más anchos y superpuestos entre sí por saturación de la reacción (Fig. 3.18, izquierda), los picos del final de la secuencia van perdiendo altura y anchura, por debilitamiento de la señal, hasta que desaparecen. Por estos motivos, se secuencia en los dos sentidos porque de esta forma se puede realizar la lectura de más nucleótidos, ya que zonas de picos “distorsionados” en una secuencia coincidirán con zonas “limpias” en la secuencia complementaria.



Aún así, aquellas zonas que se siguen sin poder leer bien fueron eliminadas (*trimmed*) antes de formar parte de la matriz de secuencias consenso.

Una vez que las secuencias “forward” y “reverse” para cada una de las muestras fueron revisadas y editadas, se generó la secuencia *contig* correspondiente (es decir, la secuencia consenso con el mínimo posible de ambigüedades o errores). Las secuencias *contig* pasaron a formar parte de la matriz a alinear.

El alineamiento de las matrices con las secuencias *contig* se realizó con las ocho iteraciones que vienen por defecto en el programa *MUSCLE* (Edgar 2004; Fig. 3.19), una de las herramientas para alineamientos múltiples implementada en *Geneious* v5.4 (Drummond *et al.* 2011).



**Figura 3.19.** Imagen de la ventana del programa *Geneious* donde se muestra parte de uno de los alineamientos múltiples obtenidos con su herramienta de análisis *MUSCLE*.

A continuación, se revisó el alineamiento generado automáticamente por este software, para asegurarnos de que la asignación de *indels* (esto es, zonas de las secuencias dónde ha habido una *inserción* o *delección*) había sido correcta para, en caso contrario, hacer los ajustes manuales pertinentes.

### 3.9 OBTENCIÓN DE MATRICES DE SECUENCIAS ALINEADAS

Con todas las secuencias *contig* alineadas para cada una de las regiones “código de barras” oficiales (*rbcl* y *matK*) se crearon sendas “supermatrices” en diferentes formatos compatibles con distintos programas de análisis filogenéticos, como por ejemplo, el formato *FASTA* (reconocible por programas como *Geneious*, *BIOEDIT*, *Clustal*, *BLAST* etc.) o el formato *NEXUS* (reconocible por el programa PAUP y otros).

Estas “supermatrices” están depositadas en los ordenadores del Departamento de Biodiversidad Molecular y banco de ADN del JBCVCSIC para su uso en las tareas de este centro relacionadas con la conservación y gestión de la biodiversidad vegetal canaria.

Además, las matrices de secuencias generadas *de novo* (después de haber sido alineadas) se han depositado en compendios de diversidad genética del sistema de información *Demiurge*, que les asignó los siguientes códigos y *URLs* exclusivos:

Para la región *matK*, D-DNASE-89: <http://www.demiurgeproject.org/matrixdigests/D-DNASE-89>), y para la región *rbcl*, D-DNASE-90: [http://www.demiurge-project.org/matrix\\_digests/D-DNASE-90](http://www.demiurge-project.org/matrix_digests/D-DNASE-90)).

Se pueden obtener más detalles de las muestras, la metodología, los programas utilizados para el análisis de datos y de los resultados obtenidos por cada aplicación mencionada en este apartado general de material y métodos, en la sección correspondiente de cada capítulo.

### 3.10 BIBLIOGRAFÍA

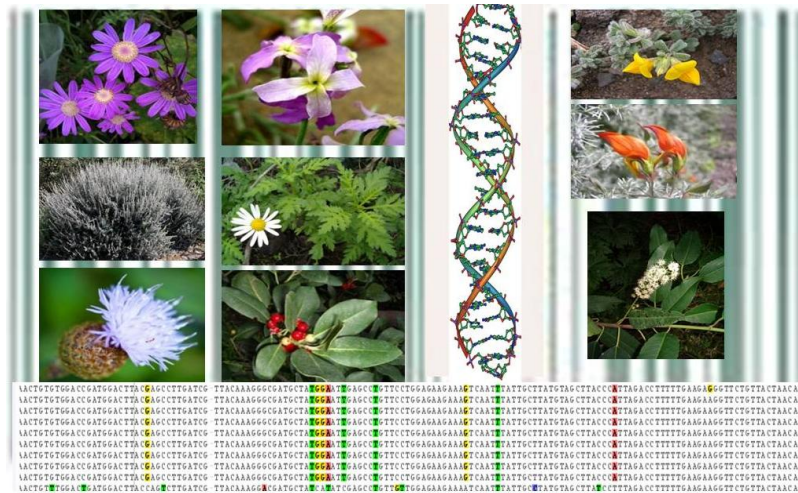
- Caujapé-Castells J, Jaén Molina R, Cabrera-García N (2006) El Banco de ADN de La Flora Canaria: Creación, Progresos y Líneas Futuras de Desarrollo. *Botánica Macaronésica* 26, 3–16.
- Caujapé-Castells J, Jaén-Molina R, Cabrera N, Curbelo L (2011) Manual del Banco de ADN de la Flora Canaria. Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN, Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"-UA CSIC, Cabildo de Gran Canaria. Available from <http://www.bioclimac.com/mbdna/index.php/dna-bank/documentation/dna-bank-lab-manual> )
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106, 12794-12797.
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, *et al.* (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80, 528-580.
- Clegg MT, Zurawski G (1991) Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. En: Soltis DE, *et al.* (eds.) *Molecular systematics of plants*. Chapman & Hall, New York, pp. 1–13.
- Cuénod P, Savolainen V, Chatrou LW, *et al.* (2002) Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear *18S* rDNA and plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany* 89, 132-144.
- Crawford DJ, Mort ME (2004) Single-locus molecular markers for inferring relationships at lower taxonomic levels: observations and comments. *Taxon* 53, 631-635.
- Doebley J, Durbin M, Golenberg EM, *et al.* (1990) Evolutionary analysis of the large subunit of carboxylase (*rbcl*) nucleotide sequence among the grasses (Gramineae) *Evolution* 44, 1097-1108.
- Dong W, Liu J, Yu J, *et al.* (2012) Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PLoS ONE* 7(4), e35071.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19, 11–15.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, *et al.* (2011) Geneious Pro 5.6.2. Available from <http://www.geneious.com/>.
- Dunning LT, Savolainen V (2010) Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164, 1-9.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Resources* 32, (5), 1792–1797. Available from <http://www.drive5.com/muscle>.
- Ford CS, Ayres KL, Toomey N, *et al.* (2009) Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159, 1-11.
- Gaut BS, Muse SV, Clark W, *et al.* (1992) Relative substitution at the *rbcl* locus in monocotyledonous plants. *Journal of Molecular Evolution* 35, 292–303.

- Hall T (2007) BioEdit, version 7.0.9. CA: Computer Program and documentation, Carlsbad, *Ibis Biosciences*. Available from <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
- Jaén-Molina R, Marrero-Rodríguez A, Reyes-Betancort JA, *et al.* (2010) La flora endémica del Parque Nacional de Garajonay bajo la perspectiva molecular: las secuencias de ADN como herramienta en la identificación taxonómica. En: Ramírez Sanz L & Asensio Nistal B (eds.) *Proyectos de investigación en parques nacionales: 2006-2009*, pp. 249-273. Organismos de Parques Nacionales, España.
- Kim KJ, Jansen RK, Wallace RS, *et al.* (1992) Phylogenetic implications of *rbcL* sequence variation in the Asteraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79, 428-445.
- Kim SC, Crawford DJ, Jansen RK, *et al.* (1999) The use of a non-coding region of chloroplast DNA in phylogenetic studies of the subtribe Sonchinae (Asteraceae:Lactuceae). *Plant Systematics and Evolution* 215, 85-99.
- McKersie BD, Senaratna T, Walker MA, *et al.* (1988) Deterioration of the membrane during aging in plants: evidence for free radical mediation. En: Noodeon LD & Leopold AC (eds.) *Senescence and aging in plants*, Academic Press, San Diego, pp. 441-464.
- Palmer JD (1986) Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. En: *Plant Molecular Biology: Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 168-186.
- Palmer JD, Jansen RK, Michaels HJ, *et al.* (1988) Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75, 1180-1206.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA Phylogeny, Reticulate Evolution, and Biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) *American Journal of Botany* 84, 1120-1136.
- Schaefer H, Moura M, Belo Maciel MG, *et al.* (2011) The Linnean shortfall in oceanic island biogeography: a case study in Azores. *Journal of Biogeography* 38, 1345-1355.
- Soltis DE, Morgan DR, Grable A, *et al.* (1993) Molecular systematics of Saxifragaceae *sensu stricto*. *American Journal of Botany* 80, 1056-1081.
- Vogel J, Hübschmann T, Börner T, *et al.* (1997). Splicing and intron-internal RNA editing of *trnK-matK* transcripts in barley plastids: support for *MatK* as an essential splice factor. *Journal of Molecular Biology* 270, 179-187
- Wanke S, Samain MS, Vanderschaeve L, *et al.* (2006) Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the *trnK/matK* region (cpDNA). *Plant Biology* 8, 93-102.
- Wanke S, Jaramillo MA, Borsch T, *et al.* (2007) Evolution of the Piperales- *matk* and *trnk* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42, 477-497.





## Capítulo 4. “Barcoding” angiospermas endémicas de las islas Canarias.



El contenido de este capítulo forma parte del artículo publicado como capítulo en el libro “*Proyectos de investigación en parques nacionales. 2006-2009*” (Jaén-Molina *et al.* 2010), y del artículo publicado en *Molecular Ecology Resources* (Jaén-Molina *et al.* 2014), ambos incluidos como Anexos (versión digital) de esta tesis.

## **4. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MOLECULAR EN AUSENCIA DE UN "BARCODING GAP": TESTANDO LAS REGIONES "CÓDIGO DE BARRAS" EN ELEMENTOS DE LA FLORA ENDÉMICA DE CANARIAS.**

### **4.1 INTRODUCCIÓN**

Proporcionar un marco universal para el uso rutinario de datos de secuencias de ADN en la identificación de especies es importante desde una amplia gama de perspectivas biológicas, que abarcan (i) la rápida asignación de especímenes (o sus partes) a sus especies correctas cuando los rasgos morfológicos no son suficientes (Kress *et al.* 2005, Savolainen *et al.* 2005), (ii) la identificación de posibles especies crípticas no detectadas por la morfología (Hebert *et al.* 2003, 2004, Ragupathy *et al.* 2009, Gao *et al.* 2011), (iii) la asistencia a la Taxonomía clásica en la elaboración de los censos de la biodiversidad vegetal (Hajibabaei *et al.* 2007, Lahaye *et al.* 2008, de Vere *et al.* 2012), y (iv) la aplicación de estos datos para las estrategias de conservación y gestión (Hollingsworth 2008, Kress *et al.* 2009, Bruni *et al.* 2012). Éstas y otras áreas distintas de interés han favorecido el uso de los "códigos de barras moleculares" para la identificación taxonómica a nivel de especie (es decir, la utilización de secuencias de ADN cortas y estandarizadas para "etiquetar" a las especies, Barret & Hebert 2005).

La búsqueda de "códigos de barras" de ADN eficientes en animales ha sido mucho más sencilla y rápida, pues pronto la aplicación de la región COI (citocromo C oxidasa I) fue muy exitosa en una amplia gama de taxones (Smith *et al.* 2008, Hebert *et al.* 2010). Sin embargo, debido a que esta región muestra una tasa de sustitución muy baja en plantas, en su lugar se han tenido que buscar otras regiones (Fazekas *et al.*

2009 y 2010, Chen *et al.* 2010, Hollingsworth *et al.* 2011, Li *et al.* 2011). Aunque algunos investigadores (como Ausubel 2009) sugirieron que la estandarización de una única secuencia era la mejor vía de producir una gran base de datos de secuencias de plantas que sirviera de referencia para la identificación de especies, tampoco descartaron la opción de que finalmente un solo marcador no fuera suficiente para distinguir diferentes especies de plantas.

De hecho, desde el principio, debido a las dificultades existentes para encontrar una o varias regiones del ADN en plantas que cumpliera todos los requisitos que debía de satisfacer para poder ser considerada como potencial "código de barras" (cap. 2), muchos investigadores aceptaron que se requerían múltiples regiones para obtener una adecuada discriminación de las especies (Chase *et al.* 2007, Kress & Erickson 2007, Lahaye *et al.* 2008, Hollingsworth *et al.* 2009, Burgess *et al.* 2011, de Mattia *et al.* 2011, Li *et al.* 2011).

Tras comparar los resultados de amplificación y secuenciación obtenidos, en distintos laboratorios de diferentes instituciones internacionales, se propusieron varias combinaciones de marcadores del ADN plastidial como candidatas a funcionar como "códigos de barras" en plantas (CBOL PWG 2009; Hollingsworth *et al.* 2009). Algunas de las regiones seleccionadas (*rpoC1*, *rpoB*, *matK*, *trnH-psbA*, *rbcl*, *atpF-H* y *psbKI*) se correspondían con regiones que habían sido extensamente utilizadas como marcadores moleculares en plantas, y para las que existían protocolos y cebadores para su amplificación. Pero no todas ellas mostraron buenos valores de discriminación interespecífica, por lo que finalmente, tras la evaluación de 12 regiones candidatas, algunos miembros del PWG recomendaron la combinación *rbcl+matK* (dos *locus* del

ADN cloroplástico) como "código de barras" de ADN universal para plantas terrestres (CBOL PWG 2009).

La existencia de un "barcoding gap" (es decir, una clara separación entre los promedios de las distancias- $p$  intraespecíficas con respecto a las distancias interespecíficas) es común en animales y ha dado lugar a altas tasas de éxito de discriminación de especies en estos organismos. Algunos autores han utilizado un "barcoding gap" para distinguir grupos de plantas por encima del nivel específico o del nivel genérico (por ejemplo de Vere *et al.* 2012 o Zhang *et al.* 2013). No obstante, la detección de un "barcoding gap" entre especies con-genéricas no es nada frecuente en vegetales (pero ver Leavitt *et al.* 2013 para especies de la familia de líquenes *Parmeliae*). Además, se ha comprobado que su detección no conlleva necesariamente la discriminación entre las especies comparadas (ver por ejemplo Pettengill & Neel 2010, Jiang *et al.* 2011, Yang *et al.* 2012, Ashfaq *et al.* 2013). Fazekas *et al.* (2009) encontraron que el grado de solapamiento entre las distancias intra- e interespecíficas es generalmente mucho mayor en plantas que en animales y, sugirieron que cuanto mayor sea el solapamiento entre las distancias, tanto más reducida será la capacidad para discriminar las especies.

En plantas, el poder discriminatorio de la combinación de las secuencias *rbcl* + *matK* es de aproximadamente el 72% (CBOL PWG 2009; Hollingsworth *et al.* 2011), una tasa de éxito muy inferior a las superiores al 90%, que se dan generalmente, en animales, hongos y algas rojas (Hebert *et al.* 2010, Ran *et al.* 2010, Buchheim *et al.* 2011, Assunção *et al.* 2012). En consecuencia, muchos de los esfuerzos liderados por los miembros del PWG están siendo encaminados hacia la búsqueda de otras regiones de

secuencias de ADN (Little 2007, Hollingsworth *et al.* 2011, Li *et al.* 2011) que complementen a las regiones "códigos de barras oficiales" e incrementen el porcentaje de discriminación alcanzado hasta el momento.

En general, se considera que la utilización de regiones del ADN cloroplástico en estudios moleculares tiene varias ventajas, como que se dispone de cebadores casi universales para la mayoría de las angiospermas y que el riesgo de muestrear varias copias en un mismo individuo es bajo, pues son más frecuentes las secuencias de copia única que las de múltiples copias, siendo éstas uno de los principales obstáculos en el uso de secuencias del ADN nuclear (Buckler *et al.* 1997, Álvarez *et al.* 2003, Bailey *et al.* 2003).

Sin embargo, la introgresión interespecífica es un fenómeno bien conocido y frecuente en el ADN del cloroplasto (Kron *et al.* 1993, Hansen *et al.* 2003, Hoban *et al.* 2009). Además, como ya vimos, la hibridación que afecta al ADN nuclear también ha sido observada en plantas, por ello, se considera que estos dos procesos pueden ser responsables, en parte, de la falta de discriminación en aproximadamente el 30% de las especies de plantas terrestres estudiadas por el PWG (CBOL PWG 2009).

La radiación (ver definición Tabla 4.1) es un reto para la identificación molecular ya que las diferencias morfológicas a menudo visibles no están acompañados por niveles comparables de polimorfismo molecular, es decir, de niveles de diversidad genética que permita diferenciarlos. Del mismo modo, la hibridación (ver definición Tabla 4.1) juega un papel importante en la evolución de las plantas y de los animales (Harrison 1990; Arnold 2006), pero las regiones "códigos de barras" para plantas pueden fracasar en la detección de especies de origen híbrido porque el ADNcp es de herencia uniparental,

por lo que los marcadores plastidiales no detectan diferencias entre las especies madres ancestrales y sus descendientes. Como vimos en el apartado 1.3, la radiación adaptativa y la hibridación tienen una incidencia mayor en islas oceánicas que en otros enclaves, por lo que la aplicación de los "códigos de barras moleculares" puede ser más dificultosa en las floras de estos enclaves (Whittaker & Fernández-Palacios 2007, Losos & Ricklefs 2009, Caujapé-Castells 2011).

Además, la variación escasa o inexistente en la secuencia de las regiones de "código de barras" entre diferentes especies biológicas puede incluso dar lugar a "falsos negativos" (Wiemers & Fiedler 2007). En consecuencia, las floras insulares oceánicas son importantes y difíciles modelos de prueba para la aplicación de los "códigos de barras" moleculares en plantas terrestres.

Las islas Canarias son un archipiélago oceánico español, conformado en la actualidad por siete islas principales situadas a aproximadamente a 100 kilómetros del NW de África y, que cuenta con el mayor número de especies vegetales endémicas por unidad de superficie en comparación con cualquier área continental o insular similar en el cuadrante norte de África y Europa (Martín-Esquivel *et al.* 2005). La flora canaria es muy diversa, con un total de 364 géneros que comprenden alrededor de 1.475 especies, subespecies y variedades nativas de las que más del 40% constituyen la flora endémica de este archipiélago (Santos 2001).

Se estima que hay 23 géneros exclusivos de Canarias, que abarcan dependiendo de los autores entre 592 (Moreno Saiz 2011), 623 (Acebes-Ginovés *et al.* 2004, Rivas-Martinez 2009, Arechavaleta *et al.* coord. 2010) ó 680 endemismos vegetales (Reyes-Betancort *et al.* 2008).

Al igual que en otros muchos archipiélagos oceánicos del mundo, un porcentaje considerable de la flora endémica de Canarias pertenece a linajes caracterizados por espectaculares radiaciones morfológicas (Bramwell, 1975), cuyo polimorfismo molecular es, en el mejor de los casos, moderado o bajo, como por ejemplo: *Argyranthemum* (Francisco-Ortega *et al.* 1996), *Aeonium* (Mort *et al.* 2002), *Convolvulus* (Carine *et al.* 2004), *Sideritis* (Barber *et al.* 2007), *Sonchus* (Kim *et al.* 2007) y *Echium* (García-Maroto *et al.* 2009), entre otros.

Hay que destacar que esa especiación gradual y continua ha hecho que en únicamente 10 géneros (275 taxones endémicos no híbridos) se represente el 44 % del total de los endemismos canarios (Rivas-Martínez 2009).

Además, han sido denunciados ejemplos de hibridación interespecífica para una amplia representación de la flora endémica de Canarias, por ejemplo, en *Micromeria* (Pérez de Paz 1978), *Argyranthemum* (Brochmann 1984), *Aeonium* (Bañares 1990), *Sideritis* (Marrero 1992), *Sonchus* (Kim *et al.* 1996), *Rubus* (Alice *et al.* 2001), *Ilex* (Manen 2004), *Pericallis* (Van Hengstum *et al.* 2012) o *Echium* y las alianzas de *Bencomia* y *Gonospermum* (Francisco-Ortega *et al.* 2001).

Se ha observado que plantas de islas oceánicas, frecuentemente, exhiben débiles barreras reproductivas que facilitan la hibridación, posiblemente, debido a la baja diferenciación genética entre especies con radiación reciente (Nieto Feliner 2013).

Así, hay muchos taxones endémicos canarios para los que esperaríamos niveles de discriminación específica bajos y que, por ello, suponen un reto para los "códigos de barras".

#### 4.1.1 DEFINICIONES

Para facilitar la lectura y comprensión de alguno de los términos y conceptos que se mencionan y aplican a lo largo de los distintos capítulos de esta tesis, en la siguiente tabla se incluye una breve definición de conceptos básicos.

**Tabla 4.1.** Definición de algunos conceptos básicos empleados en este capítulo de tesis.

CONCEPTO	DEFINICIÓN
Casos taxonómicamente claros	Especies congénicas que son identificadas sin ambigüedades por la Taxonomía clásica (es decir, basándose en caracteres morfológicos).
Casos taxonómicamente conflictivos	Aquellas especies cuya diferenciación taxonómica respecto de otros congéneres, ha sido elusiva o conflictiva mediante caracteres morfológicos, por diversos motivos.
Especies potencialmente crípticas	Poblaciones conespecíficas sin conflicto taxonómico, que son indistinguibles morfológicamente, pero para las que las regiones "código de barras" detectan un número sustancialmente elevado de caracteres moleculares diagnósticos.
Distancias- $p$	Proporción de diferencias nucleotídicas detectadas entre dos secuencias alineadas, excluyendo inserciones y deleciones ( <i>indels</i> ).
Caracteres diagnóstico	Posiciones en un alineamiento de secuencias de ADN (incluyendo <i>indels</i> ) que son exclusivas de los individuos de una especie y, que por tanto, permiten la discriminación entre sus secuencias y las de otras especies congénicas.
Caracteres polimórficos	Posiciones variables en un alineamiento de secuencias de ADN que son compartidas por los individuos de dos o más especies y, por lo tanto, no permiten la discriminación entre especies.
Criterio 1 de discriminación	Se basa en caracteres diagnósticos. El éxito en la discriminación viene determinado por la detección de al menos un nucleótido exclusivo en las secuencias de una de las especies comparadas.
Criterio 2 de discriminación	Se basa en las distancias- $p$ detectadas entre las secuencias comparadas. Se considera que la discriminación taxonómica tiene éxito cuando la mayor distancia- $p$ intraespecífica es menor que la menor distancia- $p$ interespecífica (NOTA: éste fue el criterio utilizado por el CBOL PWG, en su publicación del 2009).
DNA <i>barcoding gap</i>	Se da cuando existe una clara separación entre los promedios de las distancias- $p$ intraespecíficas con respecto a las distancias interespecíficas.
Hibridación	Proceso que da lugar a descendencia por fertilización cruzada entre individuos que pertenecen a diferentes especies o poblaciones, distinguibles en base a uno o más caracteres hereditarios.
Radiación	Rápida evolución de la diversidad fenotípica dentro de un linaje, con o sin el estímulo de la selección natural.



#### 4.1.2 CONSORCIO POR EL "CÓDIGO DE BARRAS DE LA VIDA" (CBOL)

La problemática taxonómica que afecta a algunas angiospermas endémicas de Canarias, junto al hecho de que el Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN (JBCVCSIC) es desde 2005 una de las instituciones participantes del Consorcio por el "Código de Barras de la Vida", han motivado esta investigación. No debemos olvidar que sólo a través de una identificación correcta y sin ambigüedades de las unidades biológicas que conforman la biodiversidad, se podrán elaborar censos más completos y precisos que a su vez permitan diseñar mejores estrategias científicas de conservación.

El *Consortium of Barcoding of Life* (<http://www.barcodeoflife.org/>) es una iniciativa internacional que pretende utilizar la información molecular para la identificación taxonómica a nivel de especie de todos los organismos vivos del planeta. La idea de utilizar secuencias cortas y estandarizadas como herramienta molecular que permitiera identificar a las especies fue postulada, inicialmente en 2003, por el Dr. Paul Hebert, de la Universidad de Guelph (Ontario, Canadá) en trabajos con invertebrados (Hebert *et al.* 2003 y 2004). El CBOL se creó en 2004 con el apoyo de la Fundación Alfred P. Sloan (aunque su secretariado reside en el Museo de Historia Natural de la Smithsonian Institution de Washington), y celebró su primera reunión científica en el Museo de Historia Natural de Londres en Febrero del 2005 (Savolainen *et al.* 2005), y la segunda en una Conferencia en Taipei en el 2007 (*Sciencedaily* 2007).

La implementación de un "Código de Barras de la Vida" exige un riguroso trabajo de investigación, ya que primero es necesario testar diferentes regiones del ADN para detectar cual ó cuales son más adecuadas para identificar a los organismos.

Después, se debe verificar que la secuencia elegida es capaz de discriminar a todos los organismos vivos, es decir, que no coincide con la de ningún otro organismo para esa misma región del genoma. Y, finalmente es fundamental construir una gran base de datos de referencia con las secuencias "código de barras" asociadas a taxones, que han sido correctamente identificados por expertos.

Para lograr este objetivo tan ambicioso de describir todas las especies del planeta, el CBOL ha logrado implicar a más de 170 instituciones y más de 50 países colaboradores, entre ellos:

- Jardines Botánicos, Museos de Historia Natural, Herbarios y Zoológicos.
- Universidades (departamentos de biología y biología molecular)
- Organizaciones de investigación dedicadas a la biodiversidad y conservación y varias organizaciones no gubernamentales (ONG).
- Agencias gubernamentales o no gubernamentales y otras organizaciones que basan su actividad en la información taxonómica.
- Compañías biotecnológicas privadas.

El JBCVCSIC (Cabildo de Gran Canaria), fue el primer centro de investigación español en formar parte del CBOL y es, hasta hoy, el único representante de nuestro país en el consorcio.

Finalmente, iniciativas *online* como "Encyclopedia of Life" (EOL; <http://www.eol.org>), "Tree of Life" (<http://www.tolweb.org/tree/>) o "Barcode of Life Database" (BOLD; <http://www.barcodinglife.org/>) han sido importantísimos como apoyos colaborativos a la iniciativa por el "Código de Barras de la Vida".

### **4.1.3 CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LAS REGIONES "CÓDIGO DE BARRAS MOLECULARES"**

En Febrero de 2005, una comisión de expertos se reunió en el Jardín Botánico de Kew y acordó que los tres criterios básicos (Caujapé-Castells *et al.* 2011) que debían satisfacer las regiones potencialmente candidatas a funcionar como "códigos de barras moleculares" eran:

1) Presentar considerable variabilidad y divergencia entre especies.

Puesto que la identificación que se pretende es a nivel específico, el rango de variabilidad de las secuencias escogidas debía ser lo suficientemente elevado como para discriminar a este nivel de la jerarquía biológica. No obstante, teniendo en cuenta que era más que posible que las secuencias escogidas (especialmente las del ADN nuclear) presentaran diferentes grados de variabilidad intraespecífica en diferentes linajes, sería necesario secuenciar varios individuos por especie, para establecer el rango de variabilidad que delimitara el umbral entre individuos con-específicos e individuos de diferentes especies.

2) Tener una secuencia relativamente corta

En muchos casos, los especímenes secuenciados son organismos muertos o partes de organismos conservados en colecciones de museo o pliegos de herbario. Estas muestras son valiosísimas, porque muchas de ellas contienen los tipos a partir de los que fueron definidas las especies. No obstante, por su antigüedad (pueden tener más de 100 años) y su estado de conservación (que puede haber sido inadecuado en términos de temperatura, humedad o exposición a agentes químicos), pueden estar

muy deterioradas. Si el ADN de estas muestras está degradado y utilizáramos regiones de secuencia larga, entonces se correría el riesgo de que estuvieran fragmentadas, en cuyo caso se dispondría de información incompleta. Por el contrario, un amplicón (la región amplificada) pequeño y con elevado número de copias en el genoma asegura un mayor éxito de las amplificaciones, porque se incrementa la probabilidad de que la secuencia deseada haya sido preservada (Deguilloux *et al.* 2002). La longitud idónea de las regiones a seleccionar se estableció en, aproximadamente, 700 pares de bases (bp).

### 3) Disponer de secuencias flanqueantes conservadas

Aunque pueden existir regiones de interés potencial para ciertos géneros o especies, la idea del "código de barras" se refiere a todos los organismos, y solamente si existen cebadores universales podremos estandarizar los datos y garantizar comparaciones adecuadas.

#### **4.1.4 LAS REGIONES "CÓDIGO DE BARRAS" OFICIALES PARA PLANTAS TERRESTRES**

En los animales, la aplicación de la citocromo C oxidasa I (COI) ha tenido un gran éxito en una amplia gama de grupos taxonómicos como mariposas, pájaros, arañas, peces, lepidópteros y anfibios, entre otros (Hebert *et al.* 2003b, Hebert *et al.* 2004, Barrett & Hebert *et al.* 2005, Ward *et al.* 2005, Hajibabaei *et al.* 2007, Smith *et al.* 2008, Hebert *et al.* 2010). Por el contrario, la búsqueda de "códigos de barras de ADN" eficientes en plantas ha sido mucho más ardua y aún continúa (Fazekas *et al.* 2009,

2010). La baja tasa de sustitución de nucleótidos en el genoma mitocondrial de plantas hace que la región COI, no sea aplicable como "código de barras universal" en plantas (Fazekas *et al.* 2008) y que, en su lugar, se hayan buscado marcadores de otros orgánulos celulares (plastos y núcleo). La mayoría de las regiones que se probaron pertenecían al ADNcp, porque el genoma del cloroplasto es relativamente abundante (por lo que, su extracción como componente del ADN total de la planta, es relativamente sencilla), contiene principalmente genes de copia única, tiene una tasa de sustitución de nucleótidos conservadora y, se dispone de amplia información molecular sobre este genoma. Por todo ello, se consideró que el ADNcp es muy adecuado para estudios evolutivos y filogenéticos, en particular, por encima del nivel de especie.

Se evaluaron 12 regiones como potenciales "códigos de barras" de plantas, como por ejemplo, la región *ITS* (ADN nuclear) y la región *trnH-psbA* (ADN cloroplástico) propuestas por el grupo de investigación de John W. Kress (Kress *et al.* 2005) y otras como *rpoB*, *rpoC*, *rbcl* ó *matK* incluidas en estudios desarrollados en diferentes grupos vegetales (Cowan *et al.* 2006, Chase *et al.* 2007, Little & Stevenson 2007, Kress & Erickson 2007, Fazekas *et al.* 2008, Lahaye *et al.* 2008, Ford *et al.* 2009, Seberg & Petersen 2009).

Finalmente, atendiendo a criterios de universalidad, calidad de secuencias y discriminación entre especies, como ya hemos mencionado, el "Plant Working Group" del CBOL recomendó (en 2009) la combinación de dos regiones del ADN cloroplástico (*rbcl* y *matK*) como "código de barras molecular" universal para las plantas terrestres.

De todas las regiones analizadas, *matK* fue la que mostró valores más altos de discriminación taxonómica y *rbcl* la que proporcionó mejores resultados en la

amplificación y secuenciación. Entre las otras regiones probadas, *trnH-psbA* es la que presenta los valores más altos de discriminación a nivel específico (69%), por lo cual se propuso que ésta debía ser la región alternativa a usar cuando la combinación *rbcl+matK* no lograba discriminar. En los análisis efectuados por el CBOL PWG (2009), el poder discriminatorio de las dos regiones "código de barras" del ADN plastidial fue de aproximadamente un 72%, muy lejos de los porcentajes de éxito obtenidos en animales (ya mencionados) y, también en hongos y algas rojas (Ran *et al.* 2010, Buchheim *et al.* 2011, Assunção *et al.* 2012), que son (aunque variables) generalmente, mucho más altos (más del 90%).

La falta de discriminación en el casi 30% de las especies de plantas terrestres estudiadas por el CBOL PWG (2009), puede ser explicada por:

- (i) ser taxones incluidos en géneros muy ricos en especies,
- (ii) ser especies estrechamente relacionadas entre sí y, que por lo tanto, pertenecen a linajes de evolución reciente (grupos con fenómenos de radiación adaptativa), o
- (iii) pertenecer a especies en las que se dan procesos tales como la hibridación y/o la introgresión (Hansen *et al.* 2003, Hoban *et al.* 2009).

En la actualidad se siguen explorando regiones alternativas que puedan complementar a la combinación de las dos regiones oficiales (*rbcl+matK*) para alcanzar una mayor discriminación taxonómica. Por lo tanto, no podemos descartar que en el futuro se seleccione alguna región más como "código de barras" para plantas.

**a) La región *rbcL***

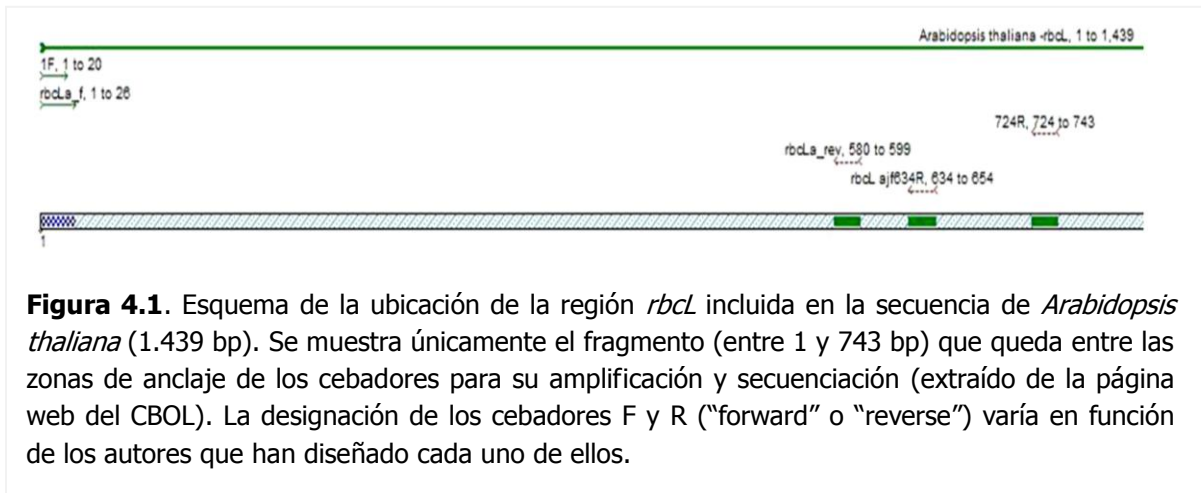
El gen *rbcL* es el mejor caracterizado de todos los que configuran el ADN cloroplástico y su secuencia de ADN es la mejor conocida y la primera que se secuenció en plantas. Además, es en la actualidad el gen más comúnmente utilizado en los análisis filogenéticos de plantas (Chase *et al.* 1993; Donoghue & Baldwin 1993). De hecho, existen en *GenBank* más de 10.000 secuencias disponibles de este gen, que codifica para la subunidad grande de la enzima RuBisCo (el aceptor de carbono más importante en todos los eucariotas fotosintéticos y en las cianobacterias).

Su elección como "código de barras" se debe a que:

- (1) está presente en casi todos los representantes del reino vegetal,
- (2) no presenta prácticamente problemas de alineamiento y,
- (3) dispone de muchas copias en cada célula, ya que forma parte del genoma del cloroplasto.

Este gen tiene una longitud de aproximadamente 1430 pares de bases y tiene una tasa de evolución bastante conservativa. No obstante, la longitud del gen es mayor de lo recomendado para su uso como "código de barras", con la consiguiente limitación de no permitir su secuenciación a través de una única reacción y la de no permitir la amplificación de ADN degradado. La solución que se encontró a estos inconvenientes fue la de diseñar cebadores para amplificar y secuenciar regiones cortas dentro de este gen *rbcL* (ver Tabla 3.4, en el cap. de Material y Métodos).

La sección de la región *rbcl* considerada como "código de barras" es la correspondiente al extremo 5' que se muestra en la Figura 4.1. En *Arabidopsis thaliana*, la secuencia para esta región abarca desde la posición 27 a la 579 en la secuencia de nucleótidos (ya que la secuencia del cebador "forward" ocupa las 26 primeras posiciones del extremo 5').



**Figura 4.1.** Esquema de la ubicación de la región *rbcl* incluida en la secuencia de *Arabidopsis thaliana* (1.439 bp). Se muestra únicamente el fragmento (entre 1 y 743 bp) que queda entre las zonas de anclaje de los cebadores para su amplificación y secuenciación (extraído de la página web del CBOL). La designación de los cebadores F y R ("forward" o "reverse") varía en función de los autores que han diseñado cada uno de ellos.

Debido a que la capacidad de *rbcl* para resolver las relaciones filogenéticas, por debajo del nivel de la familia, es a menudo baja (Doebley *et al.* 1990), su uso combinado con la región *matK* parecía ser prometedor para resolver relaciones entre taxones a niveles inferiores.

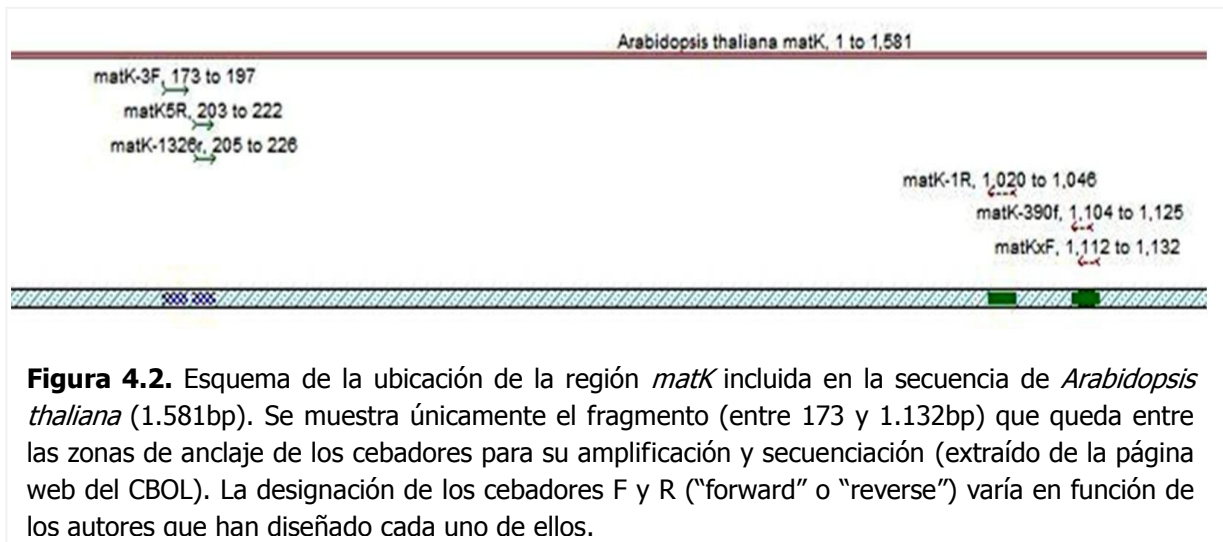
### b) La región *matK*

Aunque *matK* ha sido utilizado para la reconstrucción filogenética de plantas debido a su rápida evolución y a su presencia ubicua, también se han detectado problemas en su amplificación para algunos grupos taxonómicos (ver cap. de Material y Métodos). El gen *matK*, previamente conocido como ORF (por *open reading frame*), es un gen plastidial de la maturasa-K (que ayuda al ARN del intrón a plegarse en una



estructura catalíticamente activa) que se halla en el intrón que separa las regiones codificantes del gen *trnK* (Sugita *et al.* 1985). Tiene una tasa de mutación más alta que *rbcl* (Johnson & Soltis 1994 y 1995, Johnson *et al.* 1996), por lo que se consideró que podía complementar a *rbcl*, en la discriminación de las especies.

Para *matK*, la región propuesta como "código de barras" se corresponde en *Arabidopsis thaliana* con la zona comprendida entre las posiciones 227 a 1.019 si excluimos la secuencia del cebador (Fig. 4.2). Aunque *matK* ha sido utilizado para la reconstrucción filogenética de plantas debido a su rápida evolución y a su presencia ubicua, también se han detectado problemas en su amplificación para algunos grupos taxonómicos (ver cap. 2 de Material y Métodos).



#### 4.1.5 HACIA UN "CÓDIGO DE BARRAS" DE LA FLORA CANARIA

##### 4.1.5.1 Macaronesia y las islas Canarias: "Puntos calientes" de Biodiversidad

Las islas del mundo albergan una cuarta parte de las especies de plantas vasculares conocidas en todo el planeta (Suda 2005, Kreft *et al.* 2008, Kier *et al.* 2009), y 20 de los

34 "hotspots" de biodiversidad definidos por Myers *et al.* (2000) son islas, o contienen un componente insular relevante (reevaluaciones en <http://www.biodiversity-hotspots.org>). En consecuencia, los ecosistemas insulares representan importantes reservorios de riqueza vegetal endémica (9,5 veces mayor que en regiones continentales según Kier *et al.* 2009).

El denominado *hotspot* Mediterráneo, abarca además de zonas de España, Francia, los Balcanes, Grecia, Turquía, Siria, Líbano, Israel, Egipto, Libia, Túnez y Argelia, alrededor de cinco mil islas (en su gran mayoría continentales) esparcidas por el Mar Mediterráneo. Dentro de estas islas se encuentran las islas oceánicas macaronésicas: Canarias, Madeira, Salvajes, Azores y Cabo Verde. Este "punto caliente" mediterráneo de diversidad alberga a 22.500 especies de plantas vasculares (11.700 endémicas), que es más de cuatro veces el número de plantas que habitan en el resto de Europa (<http://www.conservation.org/where/priorityareas/hotspots/europecentralasia/Mediterranean-Basin>). Por lo tanto, es evidente la importancia que el porcentaje de plantas endémicas tiene en este *hotspot*, en comparación con la diversidad vegetal total del mismo. Dentro de Europa, Macaronesia es la región que presenta la mayor densidad de endemismos vegetales por unidad de territorio, el archipiélago canario (que representa aproximadamente el 1,5% de la totalidad del territorio español), alberga más del 50% de sus plantas vasculares endémicas, lo que le confiere el mayor índice de endemidad para cualquier área similar, continental o insular, en Europa y el cuarto Norte de África. En Canarias, la isla de La Gomera es la más rica en especies endémicas por unidad de superficie, en términos de densidad relativa, seguida del resto de islas centro-

occidentales, que están por delante, incluso, de la isla de Madeira (Marrero & Francisco-Ortega 2001, Martín Esquivel *et al.* 2005).

Dentro de La Gomera, el Parque Nacional de "Garajonay" destaca por su extraordinaria biodiversidad (más de 400 especies, muchas de éstas son endemismos canarios o gomeros, algunos incluso exclusivos del Parque), y por el especial protagonismo que adquieren los árboles de gran porte, y por los elementos característicos de la laurisilva: el laurel (*Laurus azorica*), la faya (*Myrica faya*), el brezo (*Erica arborea*), el barbusano (*Apollonias barbusana*), el follao (*Viburnum rigidum*), el aderno (*Heberdenia excelsa*), el til (*Ocotea foetens*) o el viñátigo (*Persea indica*). Además, este parque nacional cobija a una, no menos interesante, representación de helechos, líquenes, musgos, hongos, hierbas y arbustos.

La región Macaronésica, en general, y las islas Canarias, en particular, presentan unas características geográficas, geológicas y ecológicas que han favorecido la especiación (Carine 2005, Vargas 2007, Reyes-Betancort *et al.* 2008), muchas veces asociada a fenómenos de radiación (es decir, la rápida evolución de la diversidad fenotípica dentro de un linaje, con o sin el estímulo de la selección natural; Carlquist 1967, Baldwin *et al.* 1998). Los ejemplos de linajes vegetales endémicos de Canarias con un número elevado de especies, son abundantes, por ejemplo (según Acebes-Ginovés *et al.* 2009): *Aeonium* (36 especies), *Argyranthemum* (40 especies), *Crambe* (15 especies), *Convolvulus* (10 especies), *Echium* (24 especies), *Lotus* (17 especies), *Micromeria* (27 especies), *Pericallis* (12 especies), *Sideritis* (30 especies) y *Sonchus* (22 especies), entre otros. La mayoría de ellos tienen también especies endémicas de otros

archipiélagos macaronésicos, como *Echium hypertropicum*, *E. vulcanorum* y *E. stenosphon* de Cabo Verde ó *E. candicans* y *E. nervosum* de Madeira.

La mayoría de los estudios filogenéticos centrados en estos linajes ricos en especies endémicas están basados en la región *ITS* del ADN nuclear (Francisco-Ortega *et al.* 2002, Carine *et al.* 2004, Böhle *et al.* 1996, Allan *et al.* 2004, Panero *et al.* 1999, Barber *et al.* 2007, Kim *et al.* 1996), y el grado de divergencia genética detectado es muy bajo en comparación con la considerable variabilidad morfológica, que caracteriza a la mayoría de las especies conocidas de estos géneros. Para algunos de estos grupos que han radiado en Canarias, se han desarrollado también filogenias moleculares basadas en la combinación de la región *ITS* con otras regiones del ADNcp y/o con *rbcl* o *matK*, como son: *Aeonium* (Mort *et al.* 2002); *Echium* (Mansion *et al.* 2009); *Micromeria* (Bräuchler *et al.* 2005) y *Sonchus* (Lee *et al.* 2005, Kim *et al.* 2007). En general, estas nuevas filogenias en las que se han incorporado más marcadores (independientemente o conjuntamente con *ITS*, ver Tabla 1.1) tienen un nivel de resolución mayor, pero el grado de divergencia genética encontrado entre especies congénéricas sigue siendo, comparativamente, bajo respecto a su divergencia morfológica. Es decir, los grandes cambios morfológicos detectados entre las especies no vienen acompañados de diferencias significativas entre sus secuencias. Estas diversas particularidades hacen que el diseño de planes y prioridades de conservación de los numerosos endemismos vegetales amenazados en el archipiélago canario se vea, a menudo, dificultado por la imposibilidad de circunscribir UTO.

Por ello, seleccionar casos de estudio que sean representativos de los diferentes grados de complejidad taxonómica, presentes en diferentes linajes de endemismos

canarios, es de importancia fundamental para evaluar la aplicabilidad de las regiones "códigos de barras" como complemento con la Taxonomía clásica en la identificación de la flora canaria.

Las consecuencias de contener las claves de la identidad molecular de cualquier especie vegetal de la rica flora endémica de Canarias tendrán gran calado para la gestión de la biodiversidad, no solamente desde el punto de vista taxonómico y de la investigación del origen y relaciones entre los elementos de su biodiversidad, sino también desde un punto de vista legal: las secuencias "código de barras" permitirán identificar rápidamente y sin ambigüedades el tráfico de plantas endémicas o amenazadas y podrían detectar fraudes en la composición biológica de productos comerciales.

Existe una estrecha relación entre diversidad biológica y diversidad cultural, simplemente, por el hecho de que el ser humano es parte de la biodiversidad y tiene una gran dependencia de ella. La diversidad cultural (lenguaje, religión, música, ritos, dieta, manejo agrícola, etc.) está influida directamente por los recursos biológicos que el hombre encuentra disponibles en su entorno. De la misma forma, el uso cultural que el hombre ha hecho de la diversidad biológica, que le rodea, ha ido moldeando a la misma, transformando el entorno, especialmente, a nivel de suelo y paisaje. La biodiversidad tanto silvestre como cultivada se ha utilizado para desarrollar variedades de plantas y animales domésticos mejor adaptados a cambios climáticos, a plagas y enfermedades pero, en algunos casos, sin la sostenibilidad adecuada.

Si aceptamos que el valor de la biodiversidad abarca valores ecológicos, genéticos, culturales, económicos e incluso éticos, es incuestionable que necesitamos disponer de herramientas que nos permitan una cuantificación seria y rigurosa de la diversidad biológica desde diferentes aproximaciones metodológicas y conceptuales. Por ejemplo, para establecer una red de reservas naturales que alojen la mayor diversidad posible en el mínimo número de áreas protegidas, precisaremos de medidas de biodiversidad que incluyan aproximaciones que combinen no solo la información genética de las especies, sino también su distribución en el territorio (como veremos en el cap. 5 dedicado a la diversidad filogenética de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria). En cambio, si nuestro objetivo es investigar la importancia funcional de una o varias especies en un ecosistema dado, por ejemplo en relación a su estado de amenaza, nuestros estudios tendrán que dirigirse a conocer las funciones que realizan las distintas especies en el seno del ecosistema, y a averiguar cuál es el estado de los procesos ecológicos que están teniendo lugar y que puedan estar llevando a la especie a una situación de declive.

En cualquier caso, las distintas dimensiones de la diversidad biológica proporcionan los distintos marcos teóricos y metodológicos de referencia en los que deben desarrollarse las distintas investigaciones, para resolver las numerosas cuestiones que se plantean en la actualidad bajo el contexto de los rápidos cambios globales, y que son relativas a la conservación y preservación de la biodiversidad.

El hombre y su cultura, como parte y consecuencia de la diversidad biológica que le rodea, debe poner todo su esfuerzo en conocerla, protegerla y respetarla, pues la

biodiversidad es garantía de bienestar y equilibrio para todos los organismos que convivimos en el planeta.

#### **4.1.5.2 Principales retos para la identificación molecular en plantas endémicas de entornos insulares oceánicos**

Como ya mencionamos en el apartado anterior, las islas contienen los ecosistemas más importantes, ya que albergan una parte significativa de la biodiversidad global. Al mismo tiempo, son sistemas que destacan por la presencia de especies con distribuciones reducidas y altos niveles de endemidad (Whittaker & Fernández-Palacios 2007). Estas peculiaridades son fruto de la coexistencia de dos fenómenos evolutivos que se han visto favorecidos en islas y que son: acumulación de paleoendemismos, cuando las islas actúan como refugio, y formación de neoendemismos, cuando las islas actúan como centros activos de especiación.

Los distintos grados de aislamiento geográfico de los sistemas insulares oceánicos y continentales, los convierten en unidades discretas, biológicamente diferentes, y por tanto con distintas oportunidades para la evolución. De hecho, entre estos dos tipos de islas hay algunas características diferenciales básicas que resumimos en la Tabla 4.2 y que hacen referencia a su edad geológica, origen, geografía o a su riqueza de endemismos. Estas características han llevado a que, tradicionalmente, las islas continentales hayan sido consideradas como museos, donde han sobrevivido elementos ancestrales que representan a la flora autóctona del continente, al cual estuvieron conectadas. Por el contrario, a las islas oceánicas se las considera como centros originarios de nueva y rica biodiversidad, al presentar una gran abundancia de nichos

disponibles para la colonización después de su surgimiento desde el fondo del océano. Por ello, estudios en el marco de la evolución, biogeografía, ecología y conservación cobran mayor importancia, si cabe, en un contexto insular.

Además, la aplicación de marcadores moleculares ha permitido abordar preguntas clave dentro de estos campos, por ejemplo, acerca del origen de los organismos que inmigraron a las islas, del número de colonizaciones que tuvieron lugar para su llegada o sobre los mecanismos y patrones de dispersión (dentro y entre islas) después de su colonización. Todo ello ha supuesto un gran avance en el conocimiento de los procesos evolutivos, geográficos y ecológicos que tienen lugar en este tipo de enclaves.

Como vemos en la Tabla 4.2, una de las características que distinguen a las islas oceánicas de las continentales es que las primeras poseen un mayor número de especies endémicas por unidad de área y, también que exhiben una mayor incidencia de fenómenos como la radiación adaptativa y la hibridación (Losos & Ricklefs 2009, Mansion *et al.* 2008, Whittaker & Fernández-Palacios 2007), lo que implica que las dificultades de identificación de sus endemismos sean también mayores.

Por lo tanto, las islas oceánicas constituyen valiosos laboratorios naturales también para la investigación taxonómica, pues estos procesos evolutivos pueden obstaculizar la aplicación de los identificadores de ADN. Además, el aislamiento evolutivo de los endemismos de islas oceánicas (en muchos casos muy prolongado) los hace mucho más sensibles a los cambios medioambientales que los de otros entornos (Caujapé-Castells *et al.* 2010), con lo cual la necesidad de estudios con aplicación en conservación es aún mayor en este tipo de floras.



La radiación (ver Tabla 4.1) es un hándicap para la identificación molecular ya que las diferencias morfológicas a menudo visibles no están acompañados por niveles comparables de polimorfismo molecular (Jaén-Molina *et al.* 2010 y 2014). Del mismo modo, la hibridación (ver Tabla 4.1) que juega un papel importante en la evolución de las plantas y de los animales (Harrison 1990, Arnold 2006), es también un fenómeno que supone un reto para los "códigos de barras" moleculares elegidos en plantas terrestres (Saunders & Gibson 2005, Herben *et al.* 2005-revisión Macaronesia).

**Tabla 4.2.** Características diferenciales básicas entre los dos tipos fundamentales de islas (extraído del texto del proyecto "INSULARIDADES", inédito).

<b>ISLAS OCEÁNICAS</b>	<b>ISLAS CONTINENTALES</b>
Siempre han sido islas, es decir, siempre han estado separadas de las masas continentales.	Han estado ligadas a los continentes en alguna etapa de su génesis.
La actividad volcánica puede alterar dramática y súbitamente la distribución de los organismos y, provocar su extinción	Las transgresiones y regresiones marinas han condicionado la distribución geográfica de la biodiversidad de organismos y linajes
Poseen abruptos accidentes geográficos modelados por el vulcanismo que pueden representar barreras para el flujo genético.	Son menos accidentadas geográficamente, por lo cual cabría esperar mayor cohesión genética inter-poblacional
Su biota es taxonómicamente disarmónica	Su biota es taxonómicamente armónica
Elevada <i>ratio</i> de especies por género	Baja <i>ratio</i> de especies por género
Los procesos de radiación adaptativa están ligados a procesos activos de especiación	La radiación adaptativa no ha sido documentada fehacientemente como fenómeno ligado a la especiación insular
Alta proporción de taxones endémicos leñosos cuyos congéneres continentales son predominantemente herbáceos	Los taxones endémicos leñosos derivados son anecdóticos

Ya que las regiones del ADN cloroplástico (*rbcL* y *matK*) son de herencia uniparental; en la mayoría de angiospermas sólo pueden detectar las diferencias y/o similitudes que existan entre la especie madre y sus descendientes, y no permiten detectar diferencias entre las especies híbridas y la especie madre desde la que se originaron.

En este capítulo de la tesis doctoral, utilizamos las secuencias de las dos regiones plastidiales consideradas actualmente "código de barras moleculares universales" para plantas terrestres (*matK* y *rbcL*, CBOL PWG 2009) en un subconjunto de angiospermas endémicas canarias para dar respuesta a tres preguntas cruciales relativas a su aplicabilidad en la identificación de la flora endémica de este *hotspot* oceánico:

(1) ¿existe un "DNA barcoding gap" en las especies endémicas canarias comparadas en este estudio?,

(2) ¿qué criterio es más eficaz en la discriminación de los diferentes taxones comparados: un criterio basado en caracteres exclusivos o el criterio basado en distancias utilizado por el CBOL PWG (2009)? y,

(3) ¿revelan estas regiones "código de barras" la existencia de posibles especies crípticas no detectadas por la morfología?

Esta investigación representa el primer estudio en el que se pone a prueba la aplicabilidad de las dos regiones "código de barras" de plantas, como complemento a las variables morfológicas en la caracterización taxonómica de un número significativo de angiospermas endémicas de la flora canaria y, por lo tanto, es una contribución importante a la literatura sobre los "códigos de barras" de ADN de plantas insulares

(que como hemos ido explicando en este cap. y anteriores, tiene unas características que suponen un difícil reto para la identificación molecular).

Por todo lo dicho, y teniendo en cuenta que el prolongado aislamiento evolutivo de los endemismos de islas oceánicas, los hace mucho más sensibles a los cambios medioambientales que los de otros entornos (Caujapé-Castells *et al.* 2010), los objetivos de esta investigación tienen un marcado componente conservacionista.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 ELECCIÓN Y MUESTREO DE TAXONES.**

Se analizaron 75 angiospermas endémicas macaronésicas, de las cuales 60 son endémicas de Canarias (45 especies, 12 subespecies y 3 variedades), que pertenecen a 35 géneros (8 de ellos endémicos de Macaronesia). De esta forma, en esta parte de la tesis, quedan representadas 23 familias que abarcan un total de 314 taxones (264 especies y 50 subespecies), de los cuales 179 son endémicos de las islas Canarias (ver detalles en las Tablas S1, S2 y S4).

Cabe destacar que nuestro muestreo representa a diferentes elementos destacables de la flora canaria, ya que abarca: (i) las familias taxonómicamente más ricas en especies (especialmente Asteraceae, Brassicaceae, Crassulaceae, Fabaceae, Lamiaceae y Poaceae), (ii) todos los ecosistemas del archipiélago, (iii) tanto géneros radiantes como no radiantes, y (iv) tanto especies amenazadas como no amenazadas (ver Tabla S1 para más detalles). Incluye además a todas las especies canarias endémicas conocidas de géneros como *Parolinia* y *Ruta*, junto con varias subespecies endémicas de Canarias (p. ej., *Argyranthemum broussonetii* ssp. *broussonetii* y ssp. *gomerensis*;

*Micromeria varia* ssp. *canariensis*, ssp. *gomerensis* y ssp. *rupestris*) y variedades distinguibles morfológicamente (p. ej., *Bystropogon origanifolius* var. *origanifolius* y var. *palmensis*).

En conjunto, se examinaron 140 poblaciones (algunas de ellas sujetas a algún tipo de conflicto taxonómico): 118 en Macaronesia (102 de Canarias, 11 de Madeira y 5 de las Azores) y, 22 poblaciones de congéneres no macaronésicos (del Mediterráneo o ampliamente distribuidos). Se recolectaron hojas de 2 a 5 individuos por especie y población y, siempre que fue posible se recolectaron pliegos testigo (cuyos códigos de herbario se muestran en la Tabla S1) que se han depositado en los herbarios oficiales LPA (Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo") y ORT (Jardín de Aclimatación de La Orotava).

Aunque las regiones "códigos de barras" son una herramienta para la identificación y no para la Taxonomía, estábamos especialmente interesados en comprobar si proporcionan información adicional que complementa a los caracteres morfológicos en la identificación de especies taxonómicamente conflictivas.

Atendiendo a estas consideraciones, las 75 angiospermas endémicas macaronésicas analizadas incluyen: (i) 35 especies, subespecies y variedades inequívocamente identificados por la Taxonomía clásica (casos taxonómicamente no conflictivos, Tabla 4.1) y (ii) 40 especies, subespecies y/o poblaciones con-específicas difíciles de identificar en base a los caracteres morfológicos disponibles (casos taxonómicamente conflictivos, Tabla 4.1).

También se consideraron poblaciones mediterráneas y macaronésicas de especies, subespecies y variedades inequívocamente identificados por la Taxonomía clásica (26

secuencias disponibles en *GenBank*, Tabla S2) con el objetivo de evaluar la solidez de la eventual discriminación, especialmente en los casos taxonómicamente conflictivos.

El objetivo principal, de esta parte de la tesis, era tener una muestra lo suficientemente representativa de las angiospermas canarias endémicas para poner a prueba la capacidad de discriminación de las secuencias "código de barras" en la rica diversidad vegetal de este archipiélago oceánico.

#### **4.2.2. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN.**

En los apartados 2.3 al 2.8 del capítulo 2 se muestran los detalles de los protocolos seguidos para: extracción del ADN, evaluación de la calidad y la concentración de los extractos, y purificación del ADN (cuando fue necesario).

También se indican, las condiciones, los cebadores y reactivos utilizados para la preparación de las reacciones de amplificación de las regiones *rbcl* y *matK*, y del envío de los productos de *PCR* a la empresa Macrogen (Corea) para su secuenciación bi-direccional. Finalmente, se indican los pasos y los programas utilizados para la revisión, edición y el alineamiento de las secuencias generadas para constituir las distintas matrices de secuencias de ADNcp, para su posterior análisis.

Para cada marcador (*rbcl* y *matK*) se generó una matriz de 214 secuencias (aproximadamente 632 nucleótidos para *rbcl* y, 928 nucleótidos para *matK*) que fueron alineadas de forma independiente con el programa *MUSCLE* 3.7 (Edgar 2004) implementado en *Geneious* Pro 5.6.2 (Drummond *et al.* 2011).

### 4.3 ANÁLISIS DE DATOS

Hemos testado la utilidad relativa de los dos criterios definidos en la Tabla 4.1 para averiguar:

(i) Si una aproximación basada en caracteres diagnósticos era igual o más resolutive para la identificación molecular de las especies que la aproximación basada en distancias, empleada por el CBOL PWG en su publicación del 2009 (y seguida por numerosos autores en estudios de diferentes floras del mundo, Chase *et al.* 2007; Kress *et al.* 2007; Fazekas *et al.* 2008, 2009; Lahaye *et al.* 2008; Hollingsworth *et al.* 2009) y,

(ii) Si las variables moleculares permiten identificar con éxito todas las especies que no plantean conflicto taxonómico para la morfología. Nuestra hipótesis de partida, era que la tasa de identificación molecular aportada por estas regiones de ADN sería más elevada en los casos taxonómicamente claros que en los conflictivos, aunque también se esperaba aportar datos que contribuyeran a aclarar algunos casos taxonómicamente conflictivos.

Para ello, además de estimarse las distancias- $p$  (intra- e interespecíficas) máximas y mínimas para cada pareja de taxones comparados, se comprobó la distribución de ambos tipos de distancias para determinar la existencia (o no) de un "DNA barcoding gap" (ver definición Tabla 4.1).

Por otro lado, se revisaron las matrices con las secuencias alineadas de cada marcador por separado y combinadas, para detectar si existían nucleótidos o *indels* con

carácter exclusivo entre los individuos de las especies comparadas y, para establecer el número de caracteres con valor diagnóstico (ver definición Tabla 4.1) detectado con *matK*, *rbcL* y *matK+rbcL*.

Por otro lado, para evaluar la significación de las diferencias detectadas entre las secuencias a los distintos niveles taxonómicos (bióticos y abióticos), se aplicaron los *test* no paramétricos de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) o de Mann-Whitney (Mann & Whitney, 1947), con el programa XLSTAT versión 2009.1.01 (Addinsoft 2009). Este es un procedimiento estadístico no paramétrico que permite la comparación de los valores promedio de más de dos grupos de muestras independientes que pueden ser de diferente tamaño.

Para cada par de especies comparadas, determinamos el éxito en la discriminación tanto si:

- (i) la distancia-*p* inter-específica mínima era más alta que la distancia-*p* intraespecífica máxima (criterio 1, CBOL PWG 2009).
  
- (ii) se detectó al menos una posición diagnóstico que diferenciaba a los individuos de los taxones/poblaciones comparados/as (criterio 2).

#### **4.3.1 DISTANCIAS GENÉTICAS.**

Para establecer la discriminación según el criterio 2 (ver Tabla 4.1), se calcularon las distancias genéticas (distancias-*p*) entre especies con la aplicación DNADISTv. 3.5c (Felsenstein 1993) del programa BIOEDIT (Hall 2007).

Al comparar las distancia- $p$  intraespecífica (ver Tabla S3) con respecto a las distancia- $p$  interespecífica se pudo establecer si había habido o no discriminación y además, permitió evaluar si ambas distancias- $p$  se solapan entre sí (ver Fig. 4.3.), o por el contrario si existía un "DNA barcoding gap" (ver Tabla 4.1 y Hebert *et al.* 2003, Meyer & Paulay 2005).

#### 4.3.2 CARACTERES DIAGNÓSTICO.

Para determinar si el criterio 1, discriminaba entre los taxones comparados, realizamos una búsqueda de nucleótidos exclusivos en el alineamiento para determinar si existían o no posiciones en el mismo que se correspondieran con caracteres diagnósticos y que, por lo tanto, permitieran diferenciar las secuencias comparadas. Así, en la Figura 4.3 vemos como, los caracteres de secuencias pueden ser "diagnósticos" (permiten la discriminación entre las secuencias de las especies con-genéricas comparadas) o "no diagnósticos" (no permiten la discriminación entre las secuencias de los individuos comparados).

Los caracteres "no diagnósticos" monomórficos son aquellos que se corresponden con nucleótidos compartidos entre todas las secuencias disponibles para las dos especies comparadas, mientras que caracteres "no diagnósticos" polimórficos son aquellos que varían entre las secuencias de una misma especie pero son compartidos, al menos, por uno de los individuos de la otra especie comparada.

Para el caso de caracteres "diagnósticos" monomórficos, los cambios sólo se dan entre especies, pues las secuencias de los distintos individuos comparados de una misma especie no varían entre sí, mientras que, los caracteres "diagnósticos"



polimórficos son aquellos cambios que se dan entre las secuencias de una misma especie y, respecto a las secuencias de los distintos individuos de la otra especie congénica comparada.

Anotamos los caracteres diagnóstico y polimórficos detectados entre congéneres (ver definiciones en la Tabla 4.1).

#### 4.4 RESULTADOS

Se generaron 438 nuevas secuencias (*rbcl* + *matK*) para los 75 taxones recolectados para esta tesis (Tabla S1), que fueron analizadas junto con 52 secuencias descargadas desde *GenBank* (que se corresponden con 25 especies y una subespecie, Tabla S2).

Los niveles de éxito en la amplificación de *rbcl* y *matK* fueron aproximadamente del 99 % y el 85 %, mientras que las tasas de éxito en la secuenciación fueron del 99.9 % para *rbcl* y aproximadamente del 90 % para *matK*, para cuya amplificación y secuenciación fue necesario utilizar múltiples parejas de cebadores (Tabla 4.3).

La calidad de las secuencias bi-direccionales obtenidas para las dos regiones "código de barras" fue generalmente alta, aunque en algunos grupos taxonómicos (por ejemplo, *Ocotea*, *Picconia* ó *Rubus*) nos encontramos con problemas para obtener secuencias "reverse" (antisentido) de buena calidad, para la región *matK*.

Se realizaron 1.314 comparaciones por pares de especies analizadas (657 para cada región), y se calcularon 1.063 distancias-*p* interespecíficas y 200 distancias-*p* intraespecíficas para evaluar el poder discriminante de estas regiones "código de barras", en 147 casos taxonómicamente claros, y en 67 casos taxonómicamente conflictivos.

Los valores absolutos entre las distancias- $p$  intra- e interespecíficas fueron muy similares. Los resultados de los *test* de Kruskal- Wallis se muestran en la Tabla 4.4, para cada una de las regiones por separado (*matk* y *rbcl*), según los datos de distancias- $p$ , los caracteres diagnóstico y caracteres polimórficos detectados, para cada una de las siguientes categorías: tipo de casos (taxonómicamente no conflictivos vs taxonómicamente conflictivos); nivel taxonómico (género vs especies vs subsp. vs poblaciones con-específicas); distribución insular (misma isla vs islas diferentes) y, hábito de crecimiento (árboles vs otros).

Cada una de estas categorías se testó para el total de especies, subespecies y poblaciones comparadas (taxones insulares y no insulares) con respecto a las comparaciones que incluían únicamente los taxones insulares (canarios y macaronésicos).

**Tabla 4.3.** Parejas de cebadores utilizados para amplificar y secuenciar las dos regiones "código de barras" moleculares de plantas terrestres (TA= temperatura de anillamiento).

Region	Primer	Secuencia (5´-3´)	TA	Referencias
<i>rbcl</i>	<i>rbcl</i> -F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	55°C	CBOL PWG 2009
	<i>rbcl</i> -R	GAAACGGTCTCTCCAACGCAT		
<i>matk</i>	<i>matk</i> -F	AATTTACGATCHATTCATTCMATWTTT	48°C	Schaefer <i>et al.</i> 2011
	<i>matk</i> -R	AGTTYTARCAAGAAAGTCGAARTATATA		
<i>matk</i>	AST-F	CCTTACCCAGCTCATCTGGAAAT	48°C	Dunning & Savolainen 2010
	AST-R	CAAATAATATCCAAATACCAA		
<i>matk</i>	<i>matk</i> -XF	TAATTTACGATCAATTCATTC	46°C	Ford <i>et al.</i> 2009
	<i>matk</i> -5R	GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG		
<i>matk</i>	3F_KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	58°C	KJ. Kim (sin publicar)
	1R_KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG		
<i>matk</i>	<i>matk</i> -1F	ACTGTATCGCACTATGTATCA	53°C	Sang <i>et al.</i> 1997
	<i>matk</i> -1R	GAAGTATCGGATGGAGTAG		
<i>matk</i>	390-F	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	48°C	Cuénod <i>et al.</i> 2002
	1326-R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT		

#### 4.4.1 ANÁLISIS DE DISTANCIAS- $p$

A nivel intraespecífico, *matK* fue menos variable que *rbcL*, con distancias- $p$  comprendidas entre 0 a 0,027 y 0 a 0,047, respectivamente, pero esta diferencia no fue significativa ( $P > 0,001$ ). A nivel interespecífico, *matK* fue significativamente ( $P < 0,001$ ) más variable que *rbcL* (con distancias- $p$  de 0 a 0,080 y 0 a 0,068, respectivamente).

El promedio más alto de distancia- $p$  interespecífica encontrado con *matK* dentro de un género (0,0800 en *Silene* [Caryophyllaceae]) fue mucho más alto que el valor detectado con *rbcL* (0,0680 en *Erica* [Ericaceae]). La mayor coincidencia entre las distancias intra- e interespecífica se encontró en la familia Ericaceae.

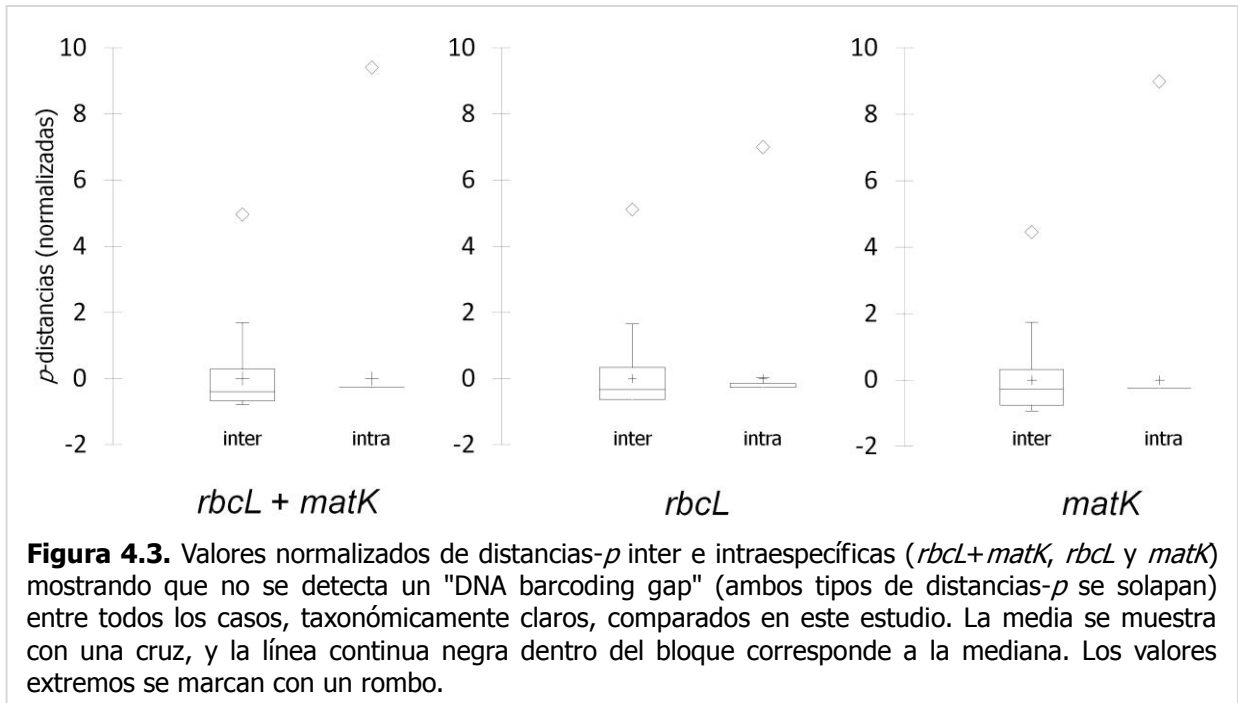
Para la muestra seleccionada de angiospermas de la flora canaria, la condición de discriminación establecida por el PWG (2009) solamente se verifica en promedio, y para la región *matK*.

Aunque el *test* de Mann-Whitney detectó diferencias significativas entre el promedio de distancias- $p$  intra- e interespecíficas (0,0140 y 0,0144 respectivamente;  $P < 0,001$ ), en general, detectamos siempre un gran solapamiento entre ambos tipos de distancias (es decir, no existe un "DNA barcoding gap" en nuestra muestra de datos de distancia) por lo que las distancias- $p$  no permiten la identificación general de todas las especies con-genéricas examinadas (véase la Tabla 4.1 y la Fig. 4.3).

**Tabla 4.4.** Valores promedio de los parámetros utilizados para evaluar la discriminación taxonómica de las secuencias de "código de barras" para las diferentes categorías de agrupación en los *test* de Kruskal-Wallis. Los números enteros entre paréntesis después de los nombres de los grupos se corresponden a los tamaños muestrales. Los valores promedio apoyados de manera significativa por los *test* están separados por corchetes y/o paréntesis (note que, en algunos casos, los valores promedio de ciertas categorías están englobados en más de un grupo estadístico).

Categorías testadas	matk			rbcL		
	P-distancias	Caracteres diagnóstico	Caracters polimórficos	P-distancias	Caracteres diagnóstico	Caracters polimórficos
<b>SÓLO TAXONES INSULARES</b>						
<b>Por casos</b>						
No-conflictivos (96) vs. conflictivos (67)	(0.012) (0.003)***	(8.250) (1.179)***	(0.344) (0.896)**	(0.007) (0.004)***	(3.00) (0.493)***	(1.531, 3.164)NS
<b>Por nivel taxonómico</b>						
Género (12) vs. especies (97) vs. subespecies (10) vs. poblaciones con-específicas (44)	(0.015, 0.012) (0.001, 0.001)***	(11.500) (7.340) (0.200, 0.432)***	(0.000, 0.495, 1.100, 0.77)NS	(0.011) (0.006 [0.005] 0.001)***	(6.333) (2.299) (0.000, 0.500)***	(0.000) (1.649, 1.600) (4.159)**
<b>Por distribución insular</b>						
Misma isla (26) vs. islas diferentes (137)	(0.008, 0.008)NS	(5.500, 5.314)NS	(0.500, 0.584)NS	(0.005, 0.006)NS	(1.577, 2.044)NS	(2.423, 2.161)NS
Gran Canaria (7) vs. La Gomera (15) vs. Tenerife (4)	(0.002 [0.009] 0.018)*	(0.429 [5.000] 12.500)*	(0.286, 0.600, 0.500)NS	(0.000 [0.005] 0.013)**	(0.000 [1.400] 5.000)**	(0.000, 2.800, 5.250)NS
<b>Por hábito de crecimiento</b>						
Árboles (49) vs. otros (114)	(0.012, 0.007)NS	(8.501, 3.965)NS	(0.776, 0.482)NS	(0.013) (0.003)***	(3.510) (1.307)**	(6.837) (0.211)***
<b>TODOS LOS TAXONES (INSULARES Y NO-INSULARES)</b>						
<b>Por casos</b>						
No-conflictivos (147) vs. conflictivos (67)	(0.014) (0.003)***	(9.156) (1.179)***	(0.469) (0.896)**	(0.008) (0.004)***	(3.381) (0.493)***	(1.980, 3.164)NS
<b>Por nivel taxonómico</b>						
Género (23) vs. especies (138) vs. subespecies (10) vs. poblaciones con-específicas (44)	(0.018, 0.013) (0.001, 0.001)***	(10.500) (8.500) (0.200, 0.432)***	(0.182 [0.580, 1.100, 0.773]*	(0.008, 0.008) (0.001, 0.005)***	(4.545) (2.957) (0.000, 0.500)***	(0.000) [2.203, 1.600] 4.159)**
<b>Por hábito de crecimiento</b>						
Árboles (64) vs. otros (150)	(0.013, 0.010)NS	(8.625, 5.820)NS	(0.750, 0.540)NS	(0.013) (0.004)***	(3.500) (2.040)**	(7.344) (0.220)***

\*: P < 0.05; \*\*: P < 0.01; \*\*\*: P < 0.001; NS: No-significativos



#### 4.4.2 ANÁLISIS DE CARACTERES

Con el criterio 1 de discriminación basado en caracteres (ver definición Tabla 4.1), se detectaron por encima de 2,5 veces más caracteres diagnósticos con *matK* que con *rbcL* para los casos taxonómicamente claros (9,156 vs 3,381 respectivamente;  $P < 0,001$ ), y por encima de dos veces más que con *rbcL* para los casos taxonómicamente conflictivos (1,179 vs 0,493 respectivamente;  $P < 0,001$ ). El número medio de posiciones no diagnósticas polimórficas detectadas con *matK* fue significativamente mayor ( $P < 0,01$ ) para los casos taxonómicamente conflictivos (0,896) que para los casos taxonómicamente claros (0,469), mientras que para *rbcL* las diferencias no fueron significativas (3,164 y 1,980 respectivamente). Se obtuvieron datos similares cuando se analizaron sólo las especies, subespecies y variedades insulares (Tabla 4.4).

#### 4.4.3 DISTANCIAS vs CARACTERES (*rbcl*+*matK*)

Tanto al comparar todos los taxones evaluados (141 casos taxonómicamente conflictivos y 152 taxonómicamente claros), como únicamente los casos que abarcaban especies, subespecies y variedades insulares (92 taxonómicamente conflictivos y 103 taxonómicamente claros), el criterio basado en distancias-*p* (criterio 1) fue menos discriminante que el criterio basado en caracteres (criterio 2). Por otra parte, el criterio 2 resuelve nueve casos que el criterio 1 no resolvió, mientras que no hay ningún caso resuelto únicamente por el criterio 1.

#### 4.4.4 *matK* vs *rbcl*.

Para todas las comparaciones de casos taxonómicamente claros, *matK* discriminó una proporción de casos mucho mayor que *rbcl*, bajo cualquiera de los dos criterios (Tabla 4.5). Además, cada región proporcionó un porcentaje mucho más alto de discriminación en los casos conflictivos con el criterio basado en caracteres que con el criterio basado en distancias (respectivamente, 32,85 % y 23,88 % con *matK* y 11,94 % y 7,46 % con *rbcl*). Para los taxones insulares (Canarias y Macaronesia), *matK* volvió a mostrar una capacidad mucho más alta de discriminación que *rbcl*, resolviendo una proporción mucho mayor de casos (Tabla 4.5). Del mismo modo que cuando se analizaron todos los taxones (insulares y no insulares), cada región volvió a proporcionar un porcentaje mucho más alto de discriminación en los casos conflictivos, con el criterio basado en caracteres que con el criterio basado en distancias (respectivamente, 36,95 % y 21,39 % con *matK*, y 10,86 % y 8,69 % con *rbcl*).

**Tabla 4.5.** Resumen de los porcentajes de éxito de discriminación (todos los taxones frente a sólo taxones insulares) proporcionados por *matK* y *rbcL* bajo un criterio basado en distancias (CR-1) o bajo un criterio basado en caracteres (CR-2), entre pares de especies con-específicas para casos taxonómicamente claros ("No-conflictivos") respecto a casos taxonómicamente conflictivos ("Conflictivos"). Los resultados para sólo los taxones de Canarias no se muestran porque el porcentaje de éxito de discriminación es el mismo (75,38%) con cualquiera de los criterios tanto para *matK*, como para la combinación *rbcL* + *matK*, aunque para *rbcL* por separado el criterio-2 resuelve mejor que criterio-1 (45,16% y 38,70%, respectivamente).

Casos/criterios	TODOS LOS TAXONES			SÓLO TAXONES INSULARES		
	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>rbcL+matK</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>rbcL+matK</i>
<b>"No-conflictivos"</b>						
CR-1	85.03%	65.77%	86.39%	79.16%	45.16%	80.20%
CR-2	85.71%	66.44%	87.07%	81.25%	53.22%	82.29%
<b>"Conflictivos"</b>						
CR-1	23.88%	7.46%	24.18%	21.39%	8.69%	21.60%
CR-2	32.85%	11.94%	33.29%	36.95%	10.86%	37.31%

Además, mientras que los caracteres diagnósticos permiten distinguir de manera significativa entre las comparaciones con-específicas y con-genéricas de la muestra de flora canaria analizada (Tabla 4.4), el criterio basado en distancias no permitió discriminar entre ambos niveles taxonómicos.

Bajo el criterio 2, *matK* resolvió más casos taxonómicamente claros que *rbcL* en todas las comparaciones realizadas (126 frente a 102, respectivamente), y también más casos conflictivos (22 vs nueve, respectivamente).

Por otro lado, con el criterio basado en distancias, nuevamente *matK* resolvió más casos que *rbcL* (140 frente a 106, respectivamente). Un total de 42 casos (26 claros y 16 conflictivos) se resolvieron sólo por *matK* y no por *rbcL*, mientras que sólo cuatro casos (dos claros y dos conflictivos) se resolvieron por *rbcL* y no por *matK*.

Por lo tanto, como se muestra en la Tabla 4.5, la resolución más alta para los casos taxonómicamente claros es proporcionada por la combinación de las dos secuencias "código de barras" y con el criterio de discriminación basado en caracteres diagnósticos (CR-2): 87,07 % para todos los taxones examinados y 82,29 % para únicamente los taxones insulares incluidos en este estudio.

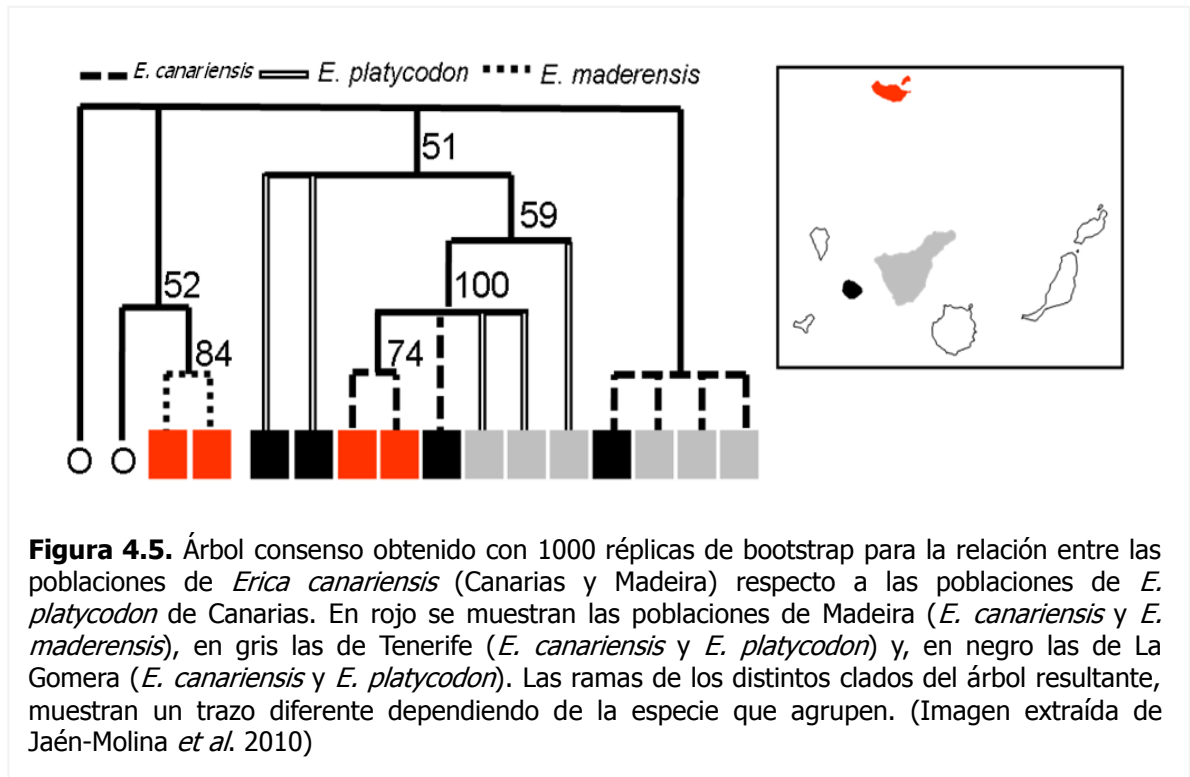
#### 4.4.5 DETECCIÓN DE POSIBLES ESPECIES CRÍPTICAS

En la Tabla 4.6, se resumen distintos aspectos relativos a los casos taxonómicamente conflictivos evaluados en este estudio y algunas recomendaciones para cada grupo en cuestión. Además, se incluyen algunos casos para los que, aunque considerados sin conflicto taxonómico, las secuencias "código de barras" detectaron un número inesperado de caracteres diagnósticos y, que podrían estar indicando la existencia de especies crípticas (Tabla 4.1); ya que se tratan de individuos de poblaciones diferentes pero morfológicamente indistinguibles, por lo que habían considerados bajo el mismo nombre específico. Nos referimos, por ejemplo, a individuos/poblaciones diferentes de *Erica canariensis* y *E. platycodon* (Ericaceae); *Argyranthemum broussonetii* ssp. *broussonetii* y ssp. *gomerensis* (Asteraceae), *Festuca agustinii* (Poaceae), *Lolium canariense* (Poaceae), *Galium scabrum* (Rubiaceae); *Picconia excelsa* (Oleaceae) y *Viola riviniana* (Violaceae).

En el caso de las especies del género *Erica* analizadas, las secuencias *rbcl* obtenidas mostraron un grado de complejidad y polimorfismo tan alto, que es posible hacer hipótesis de la existencia de especies crípticas en varias islas (Fig. 4.5). Las diferencias más notables se detectaron entre *Erica canariensis* (Canarias y Madeira).



Así vemos como, las muestras de *E. canariensis* se entremezclan con las de *E. platycodon* de Tenerife y La Gomera, con un valor de apoyo bootstrap máximo (BP=100, Fig. 4.5). Además, algunas poblaciones de Canarias descritas como *E. platycodon* forman un grupo aparte, aunque con apoyo bootstrap menor (BP=51, Fig. 4.5).



Todos estos casos van a examinarse en el futuro con un muestreo más amplio a nivel taxonómico y poblacional y con la inclusión de otras regiones (ver Tabla 4.6), para asegurarnos de que las diferencias detectadas se confirman y que, por lo tanto, los caracteres diagnósticos son suficientes para considerar la existencia de una nueva especie no definida anteriormente (especies crípticas para la morfología).

Hemos sido especialmente cautelosos, en los casos en los que se detectó una variación mínima, para los que se realizó una revisión meticulosa de cada secuencia y se

incluyeron varias secuencias por especie y población. Todo ello, para comprobar la consistencia de los caracteres diagnósticos detectados, especialmente, entre especies, subespecies o variedades muy cercanamente relacionadas, para las que esperaríamos o no detectar diferencias o que éstas fueran menores.

#### **4.5 DISCUSIÓN**

Las radiaciones evolutivas que caracterizan a muchas floras insulares oceánicas exhiben notables diferencias morfológicas entre congéneres combinadas con generalmente bajos niveles o ningún polimorfismo en sus secuencias de ADN. Las islas Canarias no son una excepción a este patrón general (por ejemplo, Carine *et al.* 2004, Barber *et al.* 2007, Kim *et al.* 2007 y García- Maroto *et al.* 2009), lo que plantea un desafío para los "códigos de barras moleculares", cuya aplicabilidad depende principalmente de la capacidad de las regiones de secuencias propuestas para discriminar entre especies con-genéricas, que son fácilmente diagnosticables por la Taxonomía clásica.

Coincidiendo con este hecho, se han dado bajos niveles de discriminación a nivel específico cuando se han aplicado los "códigos de barras" tanto en especies vegetales y animales de islas [Asteraceae en Galápagos (Seberg & Petersen 2009), Fabaceae en Macaronesia (Ojeda *et al.* 2008), en el género *Copelatus* del archipiélago de Fiji (Monaghan *et al.* 2005),].

**Tabla 4.6.** Casos taxonómicamente conflictivos (especies congenericas y taxones infraespecíficos), junto a casos taxonómicamente no conflictivos (poblaciones conespecíficas) en la flora canaria y macaronésica analizados en este estudio. La columna "Descripción de los casos" resume aspectos relevantes relativos a la identificación taxonómica de los taxones comparados, en base a los caracteres morfológicos disponibles. Las abreviaturas de las islas se corresponden con G: La Gomera, P: La Palma, T: Tenerife, C: Gran Canaria, F: Fuerteventura, M: Madeira y A: Azores. Las columnas *matK* y *rbcL* se corresponden con los caracteres diagnóstico obtenidos con cada uno de estos marcadores. En "Recomendaciones" se resumen las distintas posibilidades de actuación con respecto a la taxonomía del grupo en conflicto asumiendo que las secuencias "código de barras" fueran los únicos datos disponibles: "Mantener separación" cuando los resultados apoyan la actual separación de las especies o taxones infraespecíficos comparados (debido a que las secuencias "códigos de barras" sólo son aplicables a nivel de especie, mantenemos la separación infraespecífica cuando no se detectan caracteres diagnóstico); "Revisar" cuando el número de caracteres diagnóstico detectado en las poblaciones conespecíficas comparadas, con al menos una de las regiones "códigos de barras", sugiere que podrían ser especies crípticas y la necesidad de realizar más estudios taxonómicos.

NIVELES DE COMPARACIÓN/TAXONES	DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	RECOMENDACIONES
<b>ESPECIES CONGENERICAS</b>				
Apollonia ceballosii (G)	Morfológicamente muy similares, por lo que Mesa Coello et al. (2003) proponen abordar estudios taxonómicos apoyados en técnicas genéticas para dilucidar la posición de este taxón.	0	0	Las secuencias "código de barras" no apoyan su actual clasificación taxonómica.
Apollonia barbutiana (G, M)				
<i>Euphorbia bourgeauana</i> (T)	Morfológicamente muy similares (Santos 1988; Molero et al. 2002)	0	0	Las secuencias "código de barras" no apoyan su actual clasificación taxonómica
<i>Euphorbia lambii</i> (G)				
Laurus novocanariensis (G, M)	Aunque el reconocimiento de L. azorica como la única especie de Laurus endémica de Mac y el sur de Marruecos (Barbero et al. 1981; Jalas & Suominen 1991) está apoyado por datos moleculares (Arroyo-García et al. 2001; Rodríguez-Sánchez et al. 2009), en 2002 Rivas-Martínez et al. propusieron un nuevo nombre (L. novocanariensis) para las poblaciones de Canarias y M.	1 (G-A)	0	Mantener separación & revisar
Laurus azorica (A)		1 (M-A)		
<i>Lolium canariense</i> (C, T, G)	Morfológicamente muy similares y se han observado formas intermedias (datos sin publicar)	1 (C-P)	0	Mantener separación & revisar
<i>Lolium edwardii</i> (P)		1 (T-P)		
Morella rivas-martinezii (G)	Morfológica y genéticamente muy similares (Bañares 1990; González-Pérez et al. 2009)	2 (G-P)	0	Las secuencias "código de barras" no apoyan su actual clasificación taxonómica. Revisar (incluir poblaciones de H, locus d'assius de M, rivas-martinezii y de P)
Morella faya (G)				
<i>Parolina filifolia</i> (C)	Morfológicamente muy similares e incluso, en base a su morfología "algunas poblaciones de <i>P. ornata</i> (Veneguera & Agaete) han sido incluidas en el complejo poblacional de <i>P. filifolia</i> " (Fernández-Palacios 2009)	0	0	Las secuencias "código de barras" no apoyan su actual clasificación taxonómica
<i>Parolina ornata</i> (C)				

Tabla 4.6 (continuación-I)

NIVELES DE COMPARACIÓN/TAXONES	DESCRIPCIÓN DE CONFLICTOS	matK	rbcL	RECOMENDACIONES
<i>Picconia excelsa</i> (G, M) <i>Picconia azorica</i> (A)	Morfológicamente muy similares por lo que su taxonomía ha sido ampliamente discutida (Seubert & Hochstetter 1944; Tutin 1933)	1 (G-A) 1 (M-A)	13 (G-A) 2 (M-A)	Mantener separación
<i>Polycarphaa divaricata</i> (C) <i>Polycarphaa latifolia</i> (C)	Morfológicamente muy similares en ecosomas compartidas, por lo que algunos autores han cuestionado su clasificación como diferentes especies (Poirot 1816; Pitard & Proust 1909)	1	0	Mantener separación
<i>Silene bourgeauii</i> (G) <i>Silene legumensis</i> (T)	Morfológicamente muy similares (Kunkel 1992)	27	6	Mantener separación
<b>TAXONES INFRAESPECÍFICOS</b>				
<i>Argyranthemum broussonetii</i> ssp. <i>broussonetii</i> (G) <i>Argyranthemum broussonetii</i> ssp. <i>gomerensis</i> (G)	Morfológica y genéticamente diferentes (Humphries 1976; Francisco-Ortega <i>et al.</i> 1996)	3	0	Mantener separación & revisar (su estatus taxonómico probablemente debe ser elevado).
<i>Cistus chinamadensis</i> ssp. <i>gomeræ</i> (G) <i>Cistus chinamadensis</i> ssp. <i>chinamadensis</i> (G)	Morfológicamente muy distintos, mostrando una disyunción geográfica	0	0	Mantener separación
<i>Euphorbia mellifera</i> var. <i>canariensis</i> (G, T) <i>Euphorbia mellifera</i> var. <i>mellifera</i> (M)	Las poblaciones de G and M son morfológicamente diferentes de las de T (Molero & Rovira 2005) y, sospechamos que pueden haber diferencias en T dignas de consideración taxonómica	0	0	Mantener separación
<i>Ilex perado</i> ssp. <i>lopezilloi</i> (G) <i>Ilex perado</i> ssp. <i>platyphylla</i> (G)	Morfológicamente distintos, pero diferencias no siempre claras (Kunkel 1977; Andrews 1983) y baja diferenciación genética (Werner <i>et al.</i> 2007; González-González 2011)	0	0	Mantener separación & revisar
<i>Micromeria varia</i> ssp. <i>gomerensis</i> (G) <i>Micromeria varia</i> ssp. <i>canariensis</i> (C) <i>Micromeria varia</i> ssp. <i>rupestris</i> (F) <i>Micromeria varia</i> ssp. <i>thyroides</i> (M)	<i>M. varia</i> es altamente variable en Canarias y Madeira (Pérez de Paz 1978). Algunos taxónomos consideran que las diferencias entre algunas de las subespecies actuales pueden merecer la categoría taxonómica de especie (datos sin publicar)	0	0	Mantener separación
<i>Tellina stenopetalata</i> ssp. <i>pauciovulata</i> (G) <i>Tellina stenopetalata</i> ssp. <i>microphylla</i> (G)	Morfológicamente muy distintas y con suficiente diversidad molecular entre estas subespecies (Percy & Cronq 2002) que hacen que su estatus taxonómico actual sea cuestionable	0	0	Mantener separación & revisar (Incluir otras subespecies de <i>T. stenopetalata</i> y otras especies de <i>Tellina</i> )
<b>POBLACIONES CONESPECÍFICAS</b>				
<i>Erica canariensis</i> (G) <i>Erica canariensis</i> (T) <i>Erica canariensis</i> (M)	Désamoré <i>et al.</i> (2011) denuncian un bajo nivel de diversidad de haplotipos en Mac para <i>E. canariensis</i> (anteriormente <i>E. arborea</i> , Rivas-Martínez 2011)	3 (G-M) 3 (T-M)	1 (G-M) 8 (T-M)	Revisar

Tabla 4.6 (continuación-II)

NIVELES DE COMPARACIÓN/TAXONES	DESCRIPCIÓN DE CONFLICTOS	matk	rbcl	RECOMENDACIONES
<i>Festuca agustrii</i> (C) <i>Festuca agustrii</i> (T) <i>Festuca agustrii</i> (G)	Morfológicamente muy similares y estudios moleculares recientes no apoyan diferencias entre las poblaciones de estas especies dentro de Canarias (Díaz-Pérez et al. 2012)	1 (C-T) 1 (C-G)	2 (C-T) 2 (C-G)	Revisar
<i>Galium scabrum</i> (G) <i>Galium scabrum</i> (T)	<i>Galium scabrum</i> muestra una alta variabilidad morfológica en Canarias y, todas las plantas de G son glabrescentes a diferencia de las de T (Borrmüller 1904)	1	0	Revisar
<i>Heberdenia excelsa</i> (G) <i>Heberdenia excelsa</i> (T) <i>Heberdenia excelsa</i> (M)	Notables diferencias morfológicas y ecológicas entre las poblaciones de Canarias, donde se han observado tres formas ("sacatero" en los bosques de laurisilva, "adorno" en los bosques termófilos y "formas intermedias"). Dicha variación se ha observado también en Madeira (Jaén-Molina et al. 2007 y datos sin publicar)	0	0	Mantener separación & revisar
<i>Lolium canariense</i> (G) <i>Lolium canariense</i> (T) <i>Lolium canariense</i> (C)	Morfológicamente muy similares y algunas plantas del H, consideradas previamente <i>L. canariense</i> deben incluirse dentro <i>L. edwardii</i> (Scholz et al. 2000)	1 (G-T) 1 (G-C)	0	Revisar (se recomiendan estudios adicionales que incluyan las poblaciones del H)
<i>Picoonia excelsa</i> (G) <i>Picoonia excelsa</i> (M)	En un estudio filogenético (Ferreira et al. 2011) con la región <i>trnH-psbA</i> (ADNcp) se detectó una alta variación de las secuencias para <i>P. excelsa</i>	0	8	Revisar
<i>Viola niviariana</i> (G) <i>Viola niviariana</i> (M)	<i>Viola niviariana</i> es una especie taxonómicamente compleja, por lo que aún no se han encontrado buenos caracteres morfológicos para el diagnóstico de sus poblaciones (Muñoz Garmendia 1993)	3	0	Revisar

#### 4.5.1 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN DE LA FLORA CANARIA.

A pesar de todas estas cuestiones inherentes a las especies isleñas, que potencialmente dificultan la resolución de las regiones "códigos de barras", nuestros altos porcentajes de éxito en la identificación, tanto de angiospermas endémicas de Canarias como de Macaronesia, sin ningún conflicto taxonómico (75,38 % y 82,29 %, respectivamente) son superiores al 72 % obtenido en floras de regiones no oceánicas del mundo (CBOL PWG 2009; Hollingsworth *et al.* 2011). Este resultado está en consonancia con el hallazgo, de que las tasas de éxito de discriminación son, considerablemente mayores, cuando los estudios se centran en especies bien definidas geográficamente (Li *et al.* 2011, de Vere *et al.* 2012), coincidiendo así con la propuesta de Hollingsworth *et al.* (2011), de que la mejor aplicabilidad de los "códigos de barras" de ADN se da en estudios focalizados geográficamente.

Nuestros resultados también indican, claramente, que sólo el criterio 2 basado en caracteres permitió diferenciar las comparaciones de especies con-genéricas (el objetivo fundamental de los "códigos de barras de ADN") de las que implican niveles infra-específicos (Tabla 4.5). Además, no hay ningún caso resuelto por el criterio de distancias- $p$ , que no se haya resuelto también por el criterio basado en caracteres, por consiguiente, nunca puede considerarse que ambos criterios sean complementarios.

Por lo tanto, un criterio de discriminación basado en caracteres parece ser la mejor opción para maximizar la tasa de éxito en la identificación molecular de la flora canaria con las regiones cloroplásticas *rbcL* y *matK*. No obstante, los enfoques basados en distancias pueden ser viables en otras áreas, y adicionalmente, alternativas a criterios

basados en caracteres también pueden ser desarrollados (por ejemplo, el sistema de software BLOG, Weitschek *et al.* 2013).

Por otro lado, como era de esperar, los porcentajes de resolución más altos con las dos secuencias combinadas se logran para los casos taxonómicamente claros, tanto cuando se incluyen todas las comparaciones (87,07%), como cuando se analizan únicamente las comparaciones entre angiospermas macaronésicas, es decir, taxones insulares (82,29 %).

A partir de nuestros resultados, se puede concluir que la existencia de una "DNA barcoding gap" no es un requisito necesario para la correcta identificación molecular de la flora canaria, de manera similar a como ocurre en otros organismos y contextos geográficos (Wiemers *et al.* 2007, Ross *et al.* 2008, Lou & Golding 2010, Pettengill & Neel 2010, Zou *et al.* 2011). Sin embargo, nuestras estimaciones de éxito tienen que ser consideradas con precaución; ya que la adición de nuevas muestras a nuestro conjunto de datos puede o bien reducir el número de caracteres diagnósticos detectados por especie o, en otros casos, revelar posibles especies crípticas y, con ello revelar la biodiversidad previamente oculta (Blaxter 2004).

Por otro lado, el criterio 2 resuelve más casos que el criterio 1, incluso cuando se trata de casos conflictivos (32,83 % y 23,88 % con *matK*, respectivamente y 11,94 % y 7,46 % con *rbcl*, respectivamente). Consecuentemente, el conflicto taxonómico, en nuestra muestra, está estrechamente asociado con un número mucho menor de caracteres diagnósticos y un número mayor de caracteres polimórficos con respecto a los casos claros (véase Tabla 4.5). Cabe destacar que el mucho mayor éxito de discriminación del criterio 2 respecto al criterio 1, en los casos taxonómicamente

conflictivos, resalta aún más el potencial del criterio de discriminación basado en caracteres para la identificación molecular de especies pertenecientes a radiaciones recientes, como las que caracterizan a las floras insulares de muchos "puntos calientes" oceánicos (*hotspots*, Myers 1980) como las islas Canarias.

La situación de "conflicto taxonómico" nos impide saber cuáles de estos casos se corresponden con taxones con-genéricos y cuáles no (es decir, no podemos saber cuáles de las entidades afectadas por "conflictividad" son UTO). No obstante, nuestros análisis nos permiten concluir que en algunos casos dónde la morfología no parece aportar caracteres diagnósticos (casos taxonómicamente conflictivos), las variables moleculares si parecen suministrar indicios que den pie a un estudio taxonómico más profundo del grupo en cuestión y, tal vez, a una clarificación taxonómica. Por ello, aunque somos conscientes de que, serán necesarios muestreos más intensivos y marcadores adicionales para poder proporcionar una base molecular que sostenga mejor propuestas taxonómicas eventuales, en la Tabla 4.6 hacemos algunas recomendaciones preliminares en base a los resultados obtenidos con las secuencias "código de barras" para algunos casos taxonómicamente conflictivos.

El único caso, taxonómicamente conflictivo a nivel infra-específico, para el que se detectó caracteres diagnósticos (tres caracteres, con *matK*) comprendía las dos subespecies de *Argyranthemum broussonetii* (Tabla 4.6).

Además, aunque las regiones "código de barras" eran capaces, generalmente, de resolver casos taxonómicamente no conflictivos hay algunas comparaciones entre pares de especies, *a priori* sin conflicto taxonómico, para las que las secuencias "código de barras" no detectaron ninguna divergencia genética (Tabla 4.6) como por ejemplo, el



caso que abarca a las siete especies, actualmente, reconocidas del género *Parolinia* (Brassicaceae) que es endémico de Canarias. En la actualidad estamos analizando otros marcadores altamente polimórficos (secuencias de ADN adicionales [Jaén -Molina *et al.*, en prep.] y microsatélites [González -Pérez *et al.*, en prep.]) para determinar si existen diferencias genéticas entre estas especies o no, y evaluar las implicaciones a nivel de su conservación. En general, los distintos resultados en los que los "códigos de barras" no recuperan la identidad taxonómica de grupos taxonómicamente claros de la flora canaria endémica, nuevamente, subrayan que estas regiones "códigos de barras moleculares" deben ser utilizadas como un complemento a los datos morfológicos y, nunca como un sustituto. Además, a pesar de la alta tasa de éxito obtenida con las dos regiones "código de barras", es necesario buscar otras regiones adicionales que nos permitan discriminar el aproximadamente 20% de los casos para los que no encontramos caracteres diagnósticos. Conscientes de que existe esta limitación en muchas floras del mundo, el CBOL PWG ha estado explorando nuevos marcadores para complementar a *matK* y *rbcl*. Por ejemplo, Kress *et al.* (2005) y Li *et al.* (2011) sugieren que el espaciador transcrito interno del ADNn, *ITS* es la región más adecuada para su uso como "código de barras" para plantas con semillas (véase también Hollingsworth 2011), mientras que Kress & Erickson (2007) proponen al espaciador intergénico del ADNcp, *trnH-psbA*, como mejor región candidata a "código de barras molecular" de plantas terrestres. Por su parte, Yao *et al.* (2010) y Chen *et al.* (2010) apuntaron que la región *ITS2* se debía utilizar como "código de barras" de ADN para la identificación de plantas. Es por ello que, como ya hemos señalado, cuando las secuencias *matK* y *rbcl* sugieren la existencia de especies crípticas (ver resultados y

Tabla 4.6), sería recomendable realizar más estudios con un mayor número de muestras, para confirmar la existencia de posibles caracteres morfológicos diagnósticos que previamente se hubiesen podido pasar por alto, además del análisis de otros marcadores de ADN (que puedan ser más discriminantes) que confirmen la existencia de los caracteres diagnósticos a nivel molecular.

Las dificultades técnicas encontradas en la amplificación de *matK* representan un incumplimiento claro de la necesaria universalidad subyacente a los "códigos de barras moleculares" (Fazekas *et al.* 2008 y 2009, Dunning *et al.* 2010, Hollingsworth *et al.* 2011). Sin embargo, *matK* resolvió claramente muchos más casos, y ofreció muchos más caracteres diagnóstico que *rbcl* (Tabla 4.4). Por lo tanto, creemos que todos los esfuerzos hacia la mejora de la universalidad en la amplificación de *matK* son muy necesarios.

Actualmente, aún hay un debate candente sobre qué método o enfoque, de los numerosos que los investigadores venimos utilizando (DeSalle *et al.* 2005, Meier *et al.* 2006, Little & Stevenson 2007, Meier 2008, Fazekas *et al.* 2009, CBOL PWG 2009, Lou & Golding 2010, Jaén-Molina *et al.* 2014), es el mejor para analizar los datos generados con los "códigos de barras de ADN" para plantas. En este punto, es importante tener en cuenta que, aunque los árboles filogenéticos o los árboles basados en distancia son muy informativos acerca de las afinidades genéticas entre las secuencias de diferentes especies, sus topologías se construyen en base a sinapomorfias (es decir, un conjunto de caracteres derivados, en este caso de nucleótidos, compartidos por un grupo de taxones), por lo que pueden ser engañosos como referencia para la aplicación de los "códigos de barras", que están basados en cambios exclusivos de nucleótidos (o

autapomorfias) entre las especies de una muestra. Por el contrario, los métodos basados en caracteres diagnósticos (como nuestro criterio 2) no tienen en cuenta la variación dentro de la especie que puede oscurecer la discriminación, sino solamente las diferencias entre las secuencias alineadas (DeSalle *et al.* 2005, Reid *et al.* 2011). Por tanto, aunque los criterios basados en distancias probablemente se pueden aplicar cuando hay "DNA barcoding gap" entre las distancias intra e inter-específicas (por ejemplo, Hebert *et al.* 2004, Barrett & Hebert 2005, de Vere *et al.* 2012), su utilidad disminuye en contextos donde no existe este "gap" entre las distancias (Lahaye *et al.* 2008, Jiang *et al.* 2011), como ocurre en la flora canaria endémica.

Mientras los taxones de animales presentes en ecosistemas insulares son un componente menor de la biodiversidad mundial (Hebert *et al.* 2010), se estima que las islas albergan cerca de un cuarto de todas las especies de plantas vasculares conocidas existentes en todo el mundo (Kreft *et al.* 2008; Kier *et al.* 2009).

Los índices de diversidad de plantas vasculares endémicas de islas oceánicas son, por lo tanto, considerablemente superiores a las de otras zonas insulares o continentales (Kier *et al.* 2009). Sus características evolutivas únicas (derivadas eminentemente de su origen volcánico, del aislamiento y dureza geográfica) pueden hacer que las plantas endémicas de islas oceánicas sean mucho más sensibles a los rápidos cambios ambientales actuales que las plantas endémicas de otros enclaves (Caujapé-Castells *et al.* 2010).

Por todo lo dicho, nuestros estudios en la flora endémica de Canarias parecen apoyar la aplicación de los "códigos de barras de ADN" para su identificación taxonómica. Teniendo en cuenta que hemos combinado la creación de una base de datos molecular

de referencia (secuencias *rbcl* y *matK*) con datos taxonómicos aportados por expertos (caracteres morfológicos), este trabajo sienta las bases para contribuir a los esfuerzos de conservación y manejo de esta singular flora insular desde una perspectiva de identificación molecular.

Es por ello, por lo que las matrices de secuencias *rbcl* y *matK* obtenidas en el desarrollo de este capítulo de tesis han pasado a formar parte de las "supermatrices institucionales" de secuencias de la flora canaria (Cabildo de Gran Canaria, Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"-Unidad Asociada CSIC). Estas "supermatrices" ya han permitido la estimación de la diversidad filogenética (Faith *et al.* 1992) de la flora endémica de la Reserva de la Biosfera de "Gran Canaria" (cap. 5 de esta tesis y Jaén-Molina *et al.*, en prep.) y en el futuro permitirán la estimación de la diversidad filogenética de la flora de Gran Canaria, empezando por su componente endémico.

#### 4.6. BIBLIOGRAFÍA

- Addinsoft (2009) XLSTAT 2009.1.01. (<http://www.xlstat.com> ).
- Acebes Ginovés JR, Arco Aguilar M del, García Gallo A, *et al.* (2004) Pteridophyta, Spermatophyta. En: Izquierdo I, Martín JL, Zurita N & Arechavaleta M (eds.) *Lista de especies silvestres de Canarias (hongos, plantas y animales terrestres)*, Gobierno de Canarias, La Laguna, pp. 96–143.
- Acebes Ginovés JR, Arco Aguilar M del, García Gallo A, *et al.* (2009) Pteridophyta, Spermatophyta. En: Arechavaleta M, Rodríguez S, Zurita N & García A (eds.). *Lista de Especies Silvestres de Canarias. Hongos, Plantas y Animales terrestres*. 2010, , Gobierno de Canarias, Santa Cruz de Tenerife, pp. 579.
- Allan GJ, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, *et al.* (2004) Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: Loteae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32, 123-138.
- Alice LA, Eriksson T, Eriksen B, Campbell CS (2001) Hybridization and gene flow between distantly related species of *Rubus* (Rosaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Systematic Botany* 26, 769–778.
- Álvarez I, Wendel JF (2003) Ribosomal *ITS* sequences and plant phylogenetic inference.

Capítulo 4. "Barcoding" angiospermas endémicas de las islas Canarias

*Molecular Phylogenetics and Evolution* 29, 417–434.

- Andrews S (1983). A Reappraisals of *Ilex aquifolium* and *I. perado* (Aquifoliaceae). *Kew Bulletin* 39, 141-155.
- Arnold ML (2006) Evolution through genetic exchange. En: *Ecology and Evolution*. Oxford Series, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Arroyo-García R, Martínez-Zapater JM, Fernández Prieto JA, *et al.* (2001). AFLP evaluation of genetic similarity among laurel populations (*Laurus* L.). *Euphytica* 122, 155–164.
- Ashfaq M, Asif M, Anjum ZI, *et al.* (2013) Evaluating the capacity of plant DNA barcodes to discriminate species of cotton (*Gossypium*: Malvaceae). *Molecular Ecology Resources* 13, 573-582.
- Assunção P, Jaén-Molina R, Caujapé-Castells J, *et al.* (2012) Molecular taxonomy of *Dunaliella* (Chlorophyceae), with a special focus on *D. salina*: *ITS2* sequences revisited with an extensive geographical sampling. *Aquatic Biosystems* 8, 1-32.
- Ausubel JH (2009) A botanical microscope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31), 12569 –12570.
- Bailey CD, Carr TG, Harris SA, *et al.* (2003) Characterization of angiosperm *nrDNA* polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetic Evolution* 29, 35–55.
- Baldwin BG, Crawford DJ, Francisco-Ortega J, *et al.* (1998) Molecular phylogenetics insights on the origin and evolution of oceanic islands plants. En: Soltis DE, Soltis PS & Doyle JJ (eds.) *Molecular Systematics of Plants II. DNA Sequencing*, pp. 410–441, Kluwer Academic Publishers, Boston/ Dordrecht/London.
- Bañares Á (1990) Híbridos de la familia Crassulaceae en las islas Canarias. Novedades y datos corológicos, II. *Vieraea* 18, 65-85.
- Barber JC, Finch CC, Francisco-Ortega J, *et al.* (2007) Hybridization in Macaronesian *Sideritis* (Lamiaceae): evidence from incongruence of multiple independent nuclear and chloroplast sequence datasets. *Taxon* 56, 74-88.
- Barbero M, Benabid A, Peyre C, *et al.* (1981). Sur la présence au Maroc de *Laurus azorica* (Seub.) Franco. -Act. III Congr. OPTIMA. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 37, (2), 467-472.
- Barrett RDH, Hebert PDN (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 83, 481–491.
- Blaxter ML (2004) The promise of a DNA taxonomy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 359, 669–679.
- Bornmüller J (1904) Ergebnisse zweier botanischer nach Madeira und der Canarischen Inseln. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 33, 387-492.
- Böhle UR, Hilger HH, Martin WF (1996) Island Colonization and Evolution of the Insular Woody Habit in *Echium* L. (Boraginaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, (21), 11740-11745.
- Bramwell D (1975) Some morphological aspects of the adaptive radiation of Canary Islands *Echium* species. *Anales del Instituto Botánico A. J. Cavanilles* 32, 241-254.

Capítulo 4. "Barcoding" angiospermas endémicas de las islas Canarias

- Bräuchler C, Meimberg H, Abele T, *et al.* (2005) Polyphyly of the genus *Micromeria* (Lamiaceae) – evidence from cpDNA sequence data. *Taxon* 54, 639–650.
- Brochmann C (1984) Hybridization and distribution of *Argyranthemum coronopifolium* (Asteraceae – Anthemideae) in the Canary Islands. *Nordic Journal of Botany* 4, 729–736.
- Bruni I, de Mattia F, Martellos S, *et al.* (2012) DNA Barcoding as an Effective Tool in Improving a Digital Plant Identification System: A Case Study for the Area of Mt. Valerio, Trieste (NE Italy). *PLoS ONE* 7 (9), e43256.
- Buchheim MA, Keller A, Koetschan C, *et al.* (2011) Internal Transcribed Spacer 2 (nu *ITS2 rRNA*) Sequence-Structure Phylogenetics: Towards an Automated Reconstruction of the Green Algal Tree of Life. *PLoS ONE* 6, e16931.
- Buckler ES, Ippolito A, Holtsford TP (1997) The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogous and phylogenetic implications. *Genetics* 145, 821–832.
- Burgess KS, Fazekas AJ, Kesanakurti PR, *et al.* (2011) Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcl+matK* DNA barcode. *Methods in Ecology and Evolution* 2, 333-340.
- Carlquist S (1967) The biota of long-distance dispersal. V. Plant dispersal to Pacific islands. Bulletin of the Torrey. *Botanical Club* 94, 129–162.
- Carine MA, Russell SJ, Santos-Guerra A, *et al.* (2004) Relationships of the Macaronesian and Mediterranean floras: molecular evidence for multiple colonizations into Macaronesia and back-colonization of the continent in *Convolvulus* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 91, 1070-1085.
- Carine MA (2005) Spatio-temporal relationships of the Macaronesian endemic flora: a relictual series or window of opportunity? *Taxon* 54, 895–903.
- Caujapé-Castells J, Tye A, Crawford DJ, *et al.* (2010) Conservation of oceanic island floras: present and future global challenges. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12, 107-129.
- Caujapé-Castells J (2011) Jesters, red queens, boomerangs and surfers: a molecular outlook on the Canarian endemic flora. En: Bramwell D & Caujapé-Castells J (eds.) *The Biology of Islands Floras*, Chap.12, pp. 284-324. Cambridge University Press, UK.
- Caujapé-Castells J, Jaén-Molina R, Cabrera N, Curbelo L (2011) Manual del Banco de ADN de la Flora Canaria. Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN, Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"-Unidad Asociada CSIC, Cabildo de Gran Canaria (<http://www.bioclimac.com/mbdna/index.php/dna-bank/documentation/dna-bank-lab-manual> )
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106, 12794-12797.
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, *et al.* (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80, 528-580.
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, *et al.* (2007) A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56, 295–299.

- Chen S, Yao H, Han J, *et al.* (2010) Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* 5, e8613.
- Cowan RS, Chase MW, Kress WJ (2006) 300,000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants. *Taxon* 55, 611–616.
- Cuénod P, Savolainen V, Chatrou LW, *et al.* (2002) Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear *18S* rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany* 89, 132-144.
- Deguilloux MF, Pemonge MH, Petit RJ (2002) Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. *Proceedings of the Royal Society of London: Series B* 269, 1039-1046.
- DeSalle R, Egan MG, Siddall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360, 1905–1916.
- Désamoré A, Laenen B, Devos N, *et al.* (2011) Out of Africa: Northwestwards Pleistocene expansions of the heather *Erica arborea*. *Journal of Biogeography* 38, 164–176.
- Díaz-Pérez AJ, Sequeira M, Santos-Guerra A, *et al.* (2012) Divergence and biogeography of the recently evolved Macaronesian red *Festuca* (Gramineae) species inferred from coalescence-based analyses. *Molecular Ecology* 21, 1702–1726.
- Doebley J, Durbin M, Golenberg EM, *et al.* (1990) Evolutionary analysis of the large subunit of carboxylase (*rbcL*) nucleotide sequence among the grasses (Gramineae) *Evolution* 44, 1097-1108.
- Donoghue MJ, Baldwin BG (1993) Phylogenetic analysis of *Viburnum* based on ribosomal DNA sequences from the internal transcribed spacer regions. *American Journal of Botany* 80, 146.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, *et al.* (2011) Geneious Pro 5.6.2. Available from <http://www.geneious.com/>.
- Dunning LT, Savolainen V (2010) Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164, 1-9.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Resources* 32, (5), 1792–1797. Available from <http://www.drive5.com/muscle>.
- Faith DP (1992) Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 61, 1–10.
- Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, *et al.* (2008) Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3, e2802.
- Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS, *et al.* (2009) Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular Ecology Resources* 9, (Suppl. 1), 130–139.
- Fazekas AJ, Steeves R, Newmaster SG (2010) Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. *Biotechniques* 48, 277–285.
- Felsenstein J (1993) PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166.

- Fernández-Palacios O (2009) Biodiversidad morfológico-reproductiva y genética del género endémico canario *Parolinia* Webb (Brassicaceae). *PhD Thesis*. (<http://acceda.ulpgc.es/handle/10553/7922>). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
- Ferreira R, Piredda R, Bagnoli F, *et al.* (2011). Phylogeography and conservation perspectives of an endangered Macaronesian endemic: *Picconia azorica* (Tutin) Knobl. (Oleaceae). *European Journal of Forest Research* 130, 181–195.
- Ford CS, Ayres KL, Toomey N, *et al.* (2009) Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159, 1–11.
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Hines A, *et al.* (1996) Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 84, 1595–1613.
- Francisco-Ortega J, Barber JC, Santos-Guerra A, *et al.* (2001) Origin and evolution of the endemic genera of Gonosperminae (Asteraceae: Anthemideae) from the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 88, 161–169.
- Francisco-Ortega J, Fuertes-Aguilar J, Kim SC, *et al.* (2002) Phylogeny of the Macaronesian endemic Crambe section *Dendrocrambe* (Brassicaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 89, 1984–1990.
- Gao T, Sun Z, Yao H, *et al.* (2011) Identification of Fabaceae plants using the DNA barcode *matK*. *Planta Medica* 77, 92–94.
- García-Maroto F, Mañas-Fernández A, Garrido-Cárdenas JA, *et al.* (2009)  $\Delta^6$ -Desaturase sequence evidence for explosive Pliocene radiations within the adaptive radiation of Macaronesian *Echium* (Boraginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52, 563–574.
- González-González EA (2011). Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). PhD Thesis. (<http://acceda.ulpgc.es/handle/10553/6709>). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- González-Pérez MA, Sosa PA, Rivero E, *et al.* (2009) Molecular markers reveal no genetic differentiation between *Myrica rivas-martinezii* and *M. faya* (Myricaceae). *Annals of Botany* 103, 79–86.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, *et al.* (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genetics* 23, 167–172.
- Hall T (2007) BioEdit, version 7.0.9. CA: Computer Program and documentation, Carlsbad, *Ibis Biosciences*. Available from <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
- Hansen LB, Siegismund HR, Jorgensen RB (2003) Progressive introgression between *Brassica napus* (oilseed rape) and *B. rapa*. *Heredity* 91, 276–283.
- Harrison RG (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 7, 69–128.



Capítulo 4. "Barcoding" angiospermas endémicas de las islas Canarias

- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, *et al.* (2003) Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences SerB* 270, 313-321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard J (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B*, 7 (Suppl. 1), S96-S99.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, *et al.* (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101, 14812-14817.
- Hebert PDN, de Waard JR, Landry JF (2010) DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters* 6, 359-362.
- Herben T, Suda J, Munclinger P (2005). The ghost of hybridization past: niche pre-emption is not the only explanation of apparent monophyly in island endemics. *Journal of Ecology* 93(3), 572-575.
- Hoban SM, McCleary TS, Schlarbaum SE, *et al.* (2009) Geographically extensive hybridization between the forest trees American butternut and Japanese walnut. *Biology Letters* 5, 324-327.
- Hollingsworth PM (2008) DNA barcoding plants in biodiversity hot spots: progress and outstanding questions. *Heredity* 101, 1-2.
- Hollingsworth PM (2011) Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108, 19451-19452.
- Hollingsworth ML, Clark AA, Forrest LL, *et al.* (2009) Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources* 9, 439-457.
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP (2011) Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* 6, e19254.
- Humphries CJ (1976) A revision of the Macaronesian genus *Argyranthemum* Webb ex Schultz-Bip. (Compositae-Anthemideae). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Botany* 5, 147-240.
- Jaén-Molina R, Caujapé-Castells J, Fernández-Palacios JM, *et al.* (2007) ¿Pueden las técnicas moleculares ayudar a la taxonomía clásica? El caso de *Heberdenia excelsa* (Myrsinaceae) en Canarias. *III Congreso de Biología de Conservación de Plantas*, Puerto de La Cruz, Tenerife.
- Jaén-Molina R, Caujapé-Castells J, Reyes-Betancort JA, *et al.* (2009). Molecular phylogeny of *Matthiola* R. Br. (Brassicaceae) inferred from ITS sequences, with special emphasis on the Macaronesian endemics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53, 972-981.
- Jaén-Molina R, Marrero-Rodríguez A, Reyes-Betancort JA, *et al.* (2010) La flora endémica del Parque Nacional de Garajonay bajo la perspectiva molecular: las secuencias de ADN como herramienta en la identificación taxonómica. En: Ramírez Sanz L & Asensio Nistal B (eds.) *Proyectos de investigación en parques nacionales. 2006-2009* Organismos de Parques Nacionales, España, pp. 249-273.
- Jaén-Molina R, Marrero-Rodríguez A, Reyes-Betancort A, *et al.* (2014) Molecular taxonomic identification in the absence of a "barcoding gap": a test with the endemic flora of the Canarian oceanic hotspot. *Molecular Ecology Resources*, doi:10.1111/1755-0998.12292

Capítulo 4. "Barcoding" angiospermas endémicas de las islas Canarias

- Jalas J, Suominen J (1991) *Atlas Florae Europaeae (Paeoniaceae to Capparaceae)*. Helsinki University Printing House, Helsinki, Finland.
- Jiang Y, Ding C, Zhang L, *et al.* (2011) Identification of the genus *Epimedium* with DNA barcodes. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 6413–6417.
- Johnson LA, Schultz JL, Soltis DE, Soltis PS (1996) Monophyly and generic relationships of Polemoniaceae based on *matK* sequences. *American Journal of Botany* 83, 1207–1224.
- Johnson LA, Soltis DE (1994) *MatK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction Saxifragaceae s. str. *Systematic Botany* 19, 143–156
- Johnson LA, Soltis DE (1995) Phylogenetic inference using *matK* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82, 149–175
- Kier G, Kreft H, Ming Lee T, *et al.* (2009) A global assessment of endemism and species richness across island and mainland regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, 9322–9327.51.
- Kim SC, Crawford DJ, Francisco-Ortega J, *et al.* (1996) A common origin for woody *Sonchus* and five related genera in the Macaronesian islands: Molecular evidence for extensive radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 7743–7748.
- Kim SC, Lee C, Mejías JA (2007) Phylogenetic analysis of chloroplast DNA *matK* gene and *ITS* of nrDNA sequences reveals polyphyly of the genus *Sonchus* and new relationships among the subtribe Sonchinae (Asteraceae: Cichorieae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, 578–597.
- Kreft H, Jetz W, Mutke J, *et al.* (2008) Global diversity of island floras from a macroecological perspective. *Ecology Letters* 11, 116–127.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, *et al.* (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 8369–8374.
- Kress WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2, e508.
- Kress WJ, Erickson DL, Jones FA, *et al.* (2009) Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, 18621–18626.
- Kron KA, Gawen LM, Chase MW (1993) Evidence for introgression in azaleas (*Rhododendron*; Ericaceae): Chloroplast DNA and morphological variation in a hybrid swarm on Stone Mountain, Georgia. *American Journal of Botany* 80, 1095–1099.
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47, 260, 583–621.
- Kunkel G (1992) Flora y Vegetación del Archipiélago Canario. Tratado Florístico 2ª parte. Editorial Edirca. Las Palmas de Gran Canaria.
- Kunkel G (1977) The *Ilex* Complex in the Canary Islands and Madeira. *Cuaderno de Botánica Canaria* 28, 17–19.
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, *et al.* (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105, 2923–2928.

Capítulo 4. "Barcoding" angiospermas endémicas de las islas Canarias

- Leavitt DS, Esslinger TL, Hansen ES, *et al.* (2013) DNA barcoding of brown *Parmeliae* (Parmeliaceae) species: a molecular approach for accurate specimen identification, emphasizing species in Greenland. *Organisms Diversity & Evolution*, 14, 11-20.
- Lee C, Kim SC, Lundy K, Santos-Guerra A (2005) Chloroplast DNA phylogeny of the woody *Sonchus* alliance (Asteraceae: Sonchinae) in the Macaronesian Islands. *American Journal of Botany* 82, 2072–2085.
- Li DZ, Gao LM, Li HT, *et al.* (2011) Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (*ITS*) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108, 19641–19646.
- Little DP, Stevenson DW (2007) A comparison of algorithms for the identification of species using DNA barcodes: Examples for gymnosperms. *Cladistics* 23, 1–21.
- Losos JB, Ricklefs RE (2009) Adaptation and diversification on islands. *Nature* 457, 830-836.
- Lou M, Golding BG (2010) Assigning sequences to species in the absence of large interspecific differences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 187–194.
- Manen JF (2004) Are both sympatric species *Ilex perado* and *Ilex canariensis* secretly hybridizing? Indication from nuclear markers collected in Tenerife. *BMC Evolutionary Biology* 4, 46.
- Mann HB, Whitney DR (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* 18, 50–60.
- Mansion G, Selvi F, Guggisberg A, Conti E (2009) Origin of Mediterranean endemics in the Boraginales: Integrative evidence from molecular dating and ancestral area reconstruction. *Journal of Biogeography* 36, 1282-1296.
- Marrero Á (1992) Chromosomal evolutionary trends in the genus *Sideritis* subgenus *Marrubiastrum*. En: Harley RM & Reynolds T (eds.) *Advances in Labiate science*, pp. 247–256. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Marrero Á, Francisco-Ortega J (2001) Evolución en islas. La forma en el tiempo. En: Fernández-Palacios JM & Martín Esquivel JL (eds.) *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y conservación*, Cap. 15, pp. 141–150. Turquesa Ediciones, Santa Cruz de Tenerife.
- Martín-Esquivel JL, Marrero N, Zurita N, *et al.* (2005) Biodiversidad en gráficas. En: *Especies Silvestres de las Islas Canarias*, pp. 56. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias, Santa Cruz de Tenerife.
- de Mattia F, Bruni I, Galimberti A, *et al.* (2011) A comparative study of different DNA barcoding markers for the identification of some members of Lamiaceae. *Food Research International* 44, 693–702.
- Meier R (2008). DNA sequences in taxonomy: Opportunities and challenges. En: Wheeler QD (ed.) *The New Taxonomy*, Chap. 7, pp. 95-127. CRC Press, New York.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G, *et al.* (2006) DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 55, 715-728.
- Mesa Coello R, Marrero Gómez MV, Romero Manrique P, *et al.* (2003) *Apollonias barbujana* subsp. *ceballosi* (Svent.) G. Kunkel. En: Bañares Á, Blanca G, Güemes J, Moreno JC &

Capítulo 4. "Barcoding" angiospermas endémicas de las islas Canarias

- Ortiz S (eds.) *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*, pp. 1072. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3, e422.
- Molero J, Rovira AM (2005). Typification of some Macaronesian and Mediterranean dendroide spurge. *Taxon* 54 (2), 472-474.
- Molero J, Garnatje T, Rovira A, *et al.* (2002) Karyological evolution and molecular phylogeny in Macaronesian dendroid spurge (*Euphorbia* subsect. *Pachycladae*). *Plant Systematics and Evolution* 231, 109-132.
- Monaghan MT, Balke M, Gregory TR, *et al.* (2005) DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 360, 1925–1933.
- Moreno Saiz JC (2011) La diversidad florística vascular española. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 9, pp. 75-107. Facultades de Biología y Geología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Mort ME, Soltis DE, Soltis PS, *et al.* (2002) Phylogenetics and Evolution of the Macaronesian Clade of Crassulaceae Inferred from Nuclear and Chloroplast Sequence Data. *Systematic Botany* 27, 271-288.
- Muñoz Garmendia *et al.* (1993). *Viola* L. En: Castroviejo S, *et al.* (eds.) *Flora Iberica: Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*, vol. III, pp. 276-317. Real Jardín Botánico de Madrid-CSIC, Madrid.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, *et al.* (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858.
- Nieto Feliner G (2011) Contribution of natural hybridization to plant evolution in oceanic islands (and elsewhere). Is a conceptual synthesis possible? En: Caujapé-Castells J, Nieto-Feliner G, Fernández-Palacios JM (eds.) *Proceedings of the Amurga International Conferences on Island Biodiversity*, pp. 124-131. Las Palmas de Gran Canaria.
- Ojeda I, Santos-Guerra A, Oliva-Tejera, *et al.* (2008) Barcoding plant island radiation, what works and what does not. A case study in *Lotus* (Leguminosae) in the Macaronesia. AbstractID. 669, *Botany* 2008, Vancouver, British Columbia, Canada.
- Panero JL, Francisco-Ortega J, Jansen RK, Santos-Guerra A (1999) Molecular evidence for multiple origins of woodiness and a New World biogeographic connection of the Macaronesian Island endemic *Pericallis* (Asteraceae: Senecioneae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 13886-13891.
- Percy DM, Cronq Q (2002). Different fates of island brooms: contrasting evolution in *Adenocarpus*, *Genista* and *Teline* (Genisteae, Fabaceae) in the Canary Islands and Madeira. *American Journal of Botany* 89, (5), 854-864.
- Pérez de Paz PL (1978). Revisión del género *Micromeria* Bentham (Lamiaceae-Stachyoideae) en la región Macaronésica. En: Cabildo Insular, Aula de Cultura (eds.) *Monografías del Instituto Estudios Canarios* 16, 1-308 + XXXII láminas. La Laguna, Tenerife.
- Pettengill JB, Neel MC (2010) An evaluation of candidate plant DNA barcodes and assignment methods in diagnosing 29 species in the genus *Agalinis* (Orobanchaceae). *American Journal of Botany* 97, 1391–1406.

Capítulo 4. "Barcoding" angiospermas endémicas de las islas Canarias

- Pitard J, Proust L (1909). Les Iles Canaries. Flore de l'Archipel. *Librairie des sciences naturelles* Paul Klincksieck, Paris.
- Poiret JLM (1816). Encyclopédie méthodique. *Botanique*. (Suppl. 4), 472-473. Chez Mme. veuve Agasse, Imprimeur-Libraire, Paris.
- Ragupathy S, Newmaster SG, Murugesan M, *et al.* (2009) DNA barcoding discriminates a new cryptic grass species revealed in an ethnobotany study by the hill tribes of the Western Ghats in southern India. *Molecular Ecology Resources* 9 (Suppl. 1), 164–171.
- Ran JH, Wang PP, Zhao HJ, *et al.* (2010) A Test of Seven Candidate Barcode Regions from the Plastome in *Picea* (Pinaceae). *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 1109–1126.
- Reid BN, Le M, McCord WP, *et al.* (2011) Comparing and combining distance-based and character-based approaches for barcoding turtles. *Molecular Ecology Resources* 11, 956–967.
- Reyes-Betancort JA, Santos Guerra A, Guma IR, *et al.* (2008) Diversity, rarity and the evolution and conservation of the Canary Islands endemic flora. *Anales Jardín. Botánico de Madrid* 65 (1), 25-45.
- Rivas-Martínez S, *et al.* (2002). Vascular plant communities of Spain and Portugal. *Itinera Geobotanica* 15 (2), 433-922.
- Rivas-Martínez S (2009) Ensayo geobotánico global sobre la Macaronesia. En: Beltrán Tejera E., Afonso-Carrillo J, García Gallo A & Rodríguez Delgado O (eds.) *Homenaje al Profesor Dr. Wolfredo Wildpret de la Torre*. Instituto de Estudios Canario. La Laguna (Tenerife, Islas Canarias) Monografía LXXVIII, pp. 256-296.
- Rivas-Martínez S (2011). Mapa de series, geoserias y geopermaseries de vegetación de España: [Memoria del mapa de vegetación potencial de España]. Parte II. *Itinera Geobotanica* 18 (2), 425-800.
- Rodríguez-Sánchez F, Guzmán B, Valido A, *et al.* (2009) Late Neogene history of the laurel tree (*Laurus* L., Lauraceae) based on phylogeographical analyses of Mediterranean and Macaronesian populations. *Journal of Biogeography* 36, 1270–1281.
- Ross HA, Murugan S, Sibon Li WL (2008) Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Systematic Biology* 57, 216–230.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA Phylogeny, Reticulate Evolution, and Biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) *American Journal of Botany* 84, 1120–1136.
- Santos A (1988). Notas sobre *Euphorbia bourgeauana* Gay ex Boiss. En: DC. y especies afines. *Botánica Macaronésica* 16, 29-36.
- Santos A (2001) Flora Vascular Nativa. En: Fernández-Palacios JM & Martín Esquivel JL (eds.) *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y conservación*. Turquesa Ediciones, Santa Cruz de Tenerife, Cap. 21, pp. 185-192.
- Saunders, N.E. & Gibson, D.J. (2005) Breeding system, branching processes, hybrid swarm theory, and the hump-back diversity relationship as additional explanations for apparent monophyly in the Macaronesian island flora. *Journal of Ecology*, 93(4), doi: 10.1111/j.1365-2745.2005.01024.x.

Capítulo 4. "Barcoding" angiospermas endémicas de las islas Canarias

- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, *et al.* (2005) Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 360, 1850–1811.
- Schaefer H, Moura M, Belo Maciel MG, *et al.* (2011) The Linnean shortfall in oceanic island biogeography: a case study in Azores. *Journal of Biogeography* 38, 1345–1355.
- Scholz H, Stierstorfer Ch, Gaisberg M (2000). *Lolium edwardii* sp. nova (Gramineae) and its relationship with *Schedonorus* sect. *Plantynia* Dumort. *Feddes Repertorium* 111 (7-8), 561-565.
- Seberg O, Petersen G (2009) How Many Loci Does it Take to DNA Barcode a Crocus? *PLoS ONE* 4, e4598.
- Seubert M, Hochstetter C (1844). *Flora Azorica*, pp. 50, Bonnae : Apud A. Marcum, Bonn.
- Smith MA, Poyarkov NA Jr, Hebert PDN (2008) *CO1* DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Resources* 8, 235–246.
- Suda J, Kyncl T, Jarolímová V (2005) Genome size variation in Macaronesian angiosperms: forty percent of the Canarian endemic flora completed. *Plant Systematics and Evolution* 252, 215-238.
- Sugita M, Shinozaki K, Sugiura M (1985) Tobacco chloroplast tRNA (UUU) gene contains a 2.5-kilobase-pair intron: An open reading frame and a conserved boundary sequence in the intron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(11), 3557–3561.
- Tutin TG (1933). Notes from the university herbarium, Cambridge. *Journal of Botany* 71, 99-101.
- Van Hengstum T, Lachmuth S, Oostermeijer GB, *et al.* (2012) Human-induced hybridization among congeneric endemic plants on Tenerife, Canary Islands. *Plant Systematics and Evolution* 298, 1119–1131.
- Vargas, P. (2007) Are Macaronesian islands refugia of relict plant lineages?: a molecular survey. En: Weiss SJ & Ferrand N (eds.) *Phylogeography in Southern European Refugia: evolutionary perspectives on the origins and conservation of European biodiversity*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- de Vere N, Rich TCG, Ford CR, *et al.* (2012) DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of Wales. *PLoS ONE* 7, e37945.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 360, 1847–1857.
- Weitschek E, Van Velzen R, Felici G, *et al.* (2013) BLOG 2.0: a software system for character-based species classification with DNA Barcode sequences. What it does, how to use it. *Molecular Ecology Resources* 13, 1043-6.
- Werner O; Ros RM, Fernández Á (2007). Caracterización Genética de Poblaciones de Varias Especies Amenazadas en el Parque Nacional de Garajonay. *III Congreso de Biología de la Conservación de Plantas*. Puerto de la Cruz, España.
- Whittaker RJ, Fernández-Palacios JM (2007) *Island Biogeography. Ecology, Evolution and Conservation*. 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford, UK.

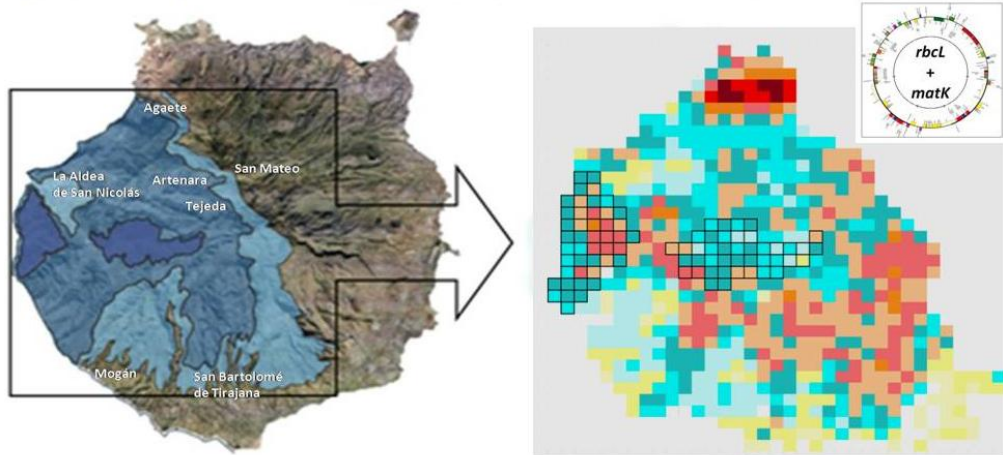
Capítulo 4. "Barcoding" angiospermas endémicas de las islas Canarias

- Wiemers M, Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology* 4, 8.
- Yang JB, Wang YP, Moller M, *et al.* (2012) Applying plant DNA barcodes to identify species of *Parnassia* (Parnassiaceae). *Molecular Ecology Resources* 12, 267–275.
- Yao H, Song J, Liu C, *et al.* (2010) Use of *ITS2* Region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE* 5, e13102.
- Zhang W, Fan X, Zhu S, *et al.* (2013) Species-Specific Identification from Incomplete Sampling: Applying DNA Barcodes to Monitoring Invasive *Solanum* Plants. *PLoS ONE* 8 (2), e55927.
- Zou S, Li Q, Kong L, *et al.* (2011) Comparing the usefulness of distance, monophyly and character-based DNA Barcoding Methods in species identification: a case study of *Neogastropoda*. *PLoS ONE* 6 (10), e26619.





## **Capítulo 5.** La “PD” asociada a la flora endémica terrestre de la RBGC



## **5. LA DIVERSIDAD FILOGENÉTICA: UN NUEVO INSTRUMENTO PARA CONTRIBUIR A LA CONSERVACIÓN Y GESTIÓN DE LA FLORA DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE GRAN CANARIA.**

### **5.1 INTRODUCCIÓN**

El concepto de Reserva de Biosfera fue desarrollado inicialmente en 1974 por un grupo de trabajo del Programa MaB sobre el Hombre y la Biosfera ("Man and Biosphere", <http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/ecological-sciences/man-and-biosphere-programme>), siendo precisado y reforzado en 1995 en el segundo encuentro mundial de Reservas de Biosfera, como queda recogido en la Estrategia de Sevilla y el Marco Estatutario de la Red Mundial de Reservas de Biosfera ([unesdoc.unesco.org/images/0010/001038/103849sb.pdf](http://unesdoc.unesco.org/images/0010/001038/103849sb.pdf)).

Dichos documentos fueron aprobados por la Conferencia General de UNESCO en ese mismo año y, aún hoy, permanecen vigentes. En ellos se destacaba el importante rol que las Reservas de Biosfera podían jugar en la implementación de la Agenda 21, adoptada en la Conferencia de Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, celebrada en Río (1992), y posteriormente por la Convención sobre la Diversidad Biológica.

Fue a partir de la Estrategia de Sevilla (UNESCO 1996) cuando el concepto de Reserva de Biosfera varió con respecto a parques nacionales, reservas naturales y otras zonas que reciben protección. Desde aquel momento, las Reservas de Biosfera dejaron de pretender establecer áreas protegidas alejadas de la acción del hombre, para buscar "reconciliar" a la humanidad con el medio natural (Hadley *et al.* 2002).

Las Reservas de Biosfera fueron concebidas para responder a la siguiente pregunta clave para el mundo actual: ¿cómo conciliar la preservación de la diversidad biológica y de los recursos naturales con un uso sostenible de los mismos? (UNESCO 1996). Para conciliar la conservación de los valores naturales y culturales con el desarrollo económico y social era necesario lograr una gestión sostenible, apoyada en bases científicas y en el conocimiento tradicional, de forma que la figura de "Reservas de Biosfera" buscaba que se reforzaran los vínculos entre la diversidad biológica y cultural. Así pues, comprenden ecosistemas terrestres, costeros o marinos, donde los seres humanos y la naturaleza conviven e interactúan de manera sostenible. Son propuestas por los gobiernos nacionales a los órganos pertinentes del MaB, que tras comprobar que satisfacen los criterios y requisitos mínimos, las aprobarán para que puedan ser admitidas en la Red Mundial de Reservas de Biosfera. En 2013, esta Red Mundial comprendía un total de 621 Reservas de Biosfera repartidas por 117 países. España, con un total de 45 reservas (de las cuales 6 se encuentran en Canarias), es el segundo país del mundo con más zonas declaradas como Reservas de Biosfera.

Como se recoge en la Estrategia de Sevilla (UNESCO 1996), cada Reserva de Biosfera debe contener tres zonas bien definidas:

1. Una o más *zonas núcleo* que se beneficien de protección a largo plazo y permitan conservar la diversidad biológica, vigilar los ecosistemas menos alterados y realizar investigaciones científicas y otras actividades poco perturbadoras (p. ej., las educativas);

2. Una *zona tampón* que generalmente circunda las zonas núcleo o colinda con ellas, que se utiliza para actividades de colaboración compatibles con prácticas ecológicas

racionales (como la educación relativa al medio ambiente, la recreación, el turismo ecológico y la investigación aplicada y básica); y

3. Una *zona de transición flexible* (o área de cooperación) que puede comprender variadas actividades agrícolas, de asentamientos humanos y otros usos, donde las comunidades locales, los organismos de gestión, los científicos, las organizaciones no gubernamentales, los grupos culturales, el sector económico y otros interesados trabajen conjuntamente en la administración y el desarrollo sostenible de los recursos de la zona.

De esta forma, el Programa MaB promueve en las Reservas de Biosfera la investigación interdisciplinaria que no sólo ha permitido comprender mejor el medio natural, sino también desarrollar prácticas innovadoras en el área de la ecología y el medio ambiente, con un mayor compromiso científico y político en la utilización racional de los recursos naturales. Así, la UNESCO y el MaB, en cooperación con otros organismos y programas internacionales, han llevado a cabo acciones en diversos campos, desarrollando iniciativas como "MaB Fauna" y "MaB Flora" para el inventario de especies, o el programa "Diversitas" para la investigación científica sobre biodiversidad.

También han impulsado convenios y programas concretos que tienen que ver con el desarrollo sostenible como:

- el Convenio sobre Diversidad Biológica (<http://www.cbd.int/doc/>),
- el Convenio Ramsar (<http://www.conanp.gob.mx/contenido/pdf>), o
- el Programa Internacional de Investigación Científica sobre la Biodiversidad (<http://www.diversitas-es.org/proyectos.php>).

En la actualidad, muchas de las acciones prioritarias del Programa MaB están centradas en las Reservas de Biosfera, tanto para su buen funcionamiento a nivel individual como, sobre todo, para potenciar el buen funcionamiento de la Red Mundial de Reservas de Biosfera.

Además, desde 1984, se está desarrollando el Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo (CYTED, [www.di.umnha.pt/cyted/cyted.htm](http://www.di.umnha.pt/cyted/cyted.htm)), que alcanza a más de 21 países de América Latina, España y Portugal y que comprende la Red Iberoamericana de Reservas de Biosfera. Posteriormente, en 1996 la UNESCO-MaB inicia el Proyecto de Estrategias de Diversidad Biológica para Islas y Áreas Costeras (IBSICA), especialmente a aquellos países que tienen o que planean tener Reservas de Biosfera en islas y/o zonas costeras y cuyos gobiernos han ratificado el Convenio sobre Diversidad Biológica. Este proyecto, patrocina a su vez, a una red llamada "REDBIOS" (Red de Reservas de la Biosfera del Atlántico Este, <http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/ecological-sciences/man-and-biosphereprogramme/networks/redbios/>) que integran Canarias, Cabo Verde, Mauritania, Madeira, Azores, Marruecos y Senegal.

Dentro de los objetivos que se contemplan en la Red Mundial de Reservas de Biosfera y del Proyecto IBSICA están: aumentar las capacidades locales de investigación, formación y gestión del uso sostenible de los recursos renovables; establecer el intercambio de información, de resultados de investigación y científicos, particularmente en lo que se refiere a la preservación y uso sostenible de la biodiversidad y, por último, la difusión de conocimientos adquiridos en la investigación comparativa a través de publicaciones y bases de datos en red.

Según el artículo 3 del Marco Estatuario de la Red Mundial de Reservas de Biosfera, éstas deben combinar tres funciones básicas (conservación, desarrollo y logística), de forma que constituyan lugares de excelencia para el ensayo y la demostración de métodos de conservación y desarrollo sostenible en los siguientes ámbitos:

1. Contribuir a la conservación de los paisajes, los ecosistemas, las especies y la variación genética.
2. Fomentar un desarrollo económico y humano sostenible desde los puntos de vista sociocultural y ecológico.
3. Prestar apoyo a proyectos de demostración, de educación y capacitación sobre el medio ambiente y de investigación y observación permanente en relación a cuestiones locales, regionales, nacionales y mundiales de conservación sostenible.

Estas tres funciones (en especial la primera y la tercera) muestran el importante rol que la investigación científica juega en las Reservas de Biosfera (ver p. ej., Müller & Karez 1998). Se podría decir que las Reservas de Biosfera son unidades del territorio planetario en las que el manejo y conservación están asociados a muy diversas condiciones biogeográficas y ecológicas, a la historia natural y cultural de las mismas, y a los distintos usos que de los recursos naturales se realicen en ellas.

### **5.1.1 LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE GRAN CANARIA (RBGC)**

En Canarias han sido declaradas como Reservas de Biosfera las islas de La Palma (1983), Lanzarote (1993), El Hierro (2000), parte de Gran Canaria (2005), Fuerteventura (2009), La Gomera (2012) y el Macizo de Anaga en Tenerife (2013).

Además, mediante el Decreto 103/2010, de 29 de julio (BOC, número 156, 2010, 21015-21019), se crea La Red Canaria de Reservas de Biosfera junto con el Consejo de Coordinación de dicha Red, aprobándose su Reglamento de organización y funcionamiento.

La "Red Mundial de Reservas de Biosfera de Islas y zonas Costeras", cuya constitución se firmó en la isla de Jeju (Corea del Sur) en Septiembre de 2012 (<http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/ecological-sciences/man-and-biosphere-programme/networks/world-network-of-island-biosphere-reserves/>), integra a todas las Reservas de Biosfera de Canarias.

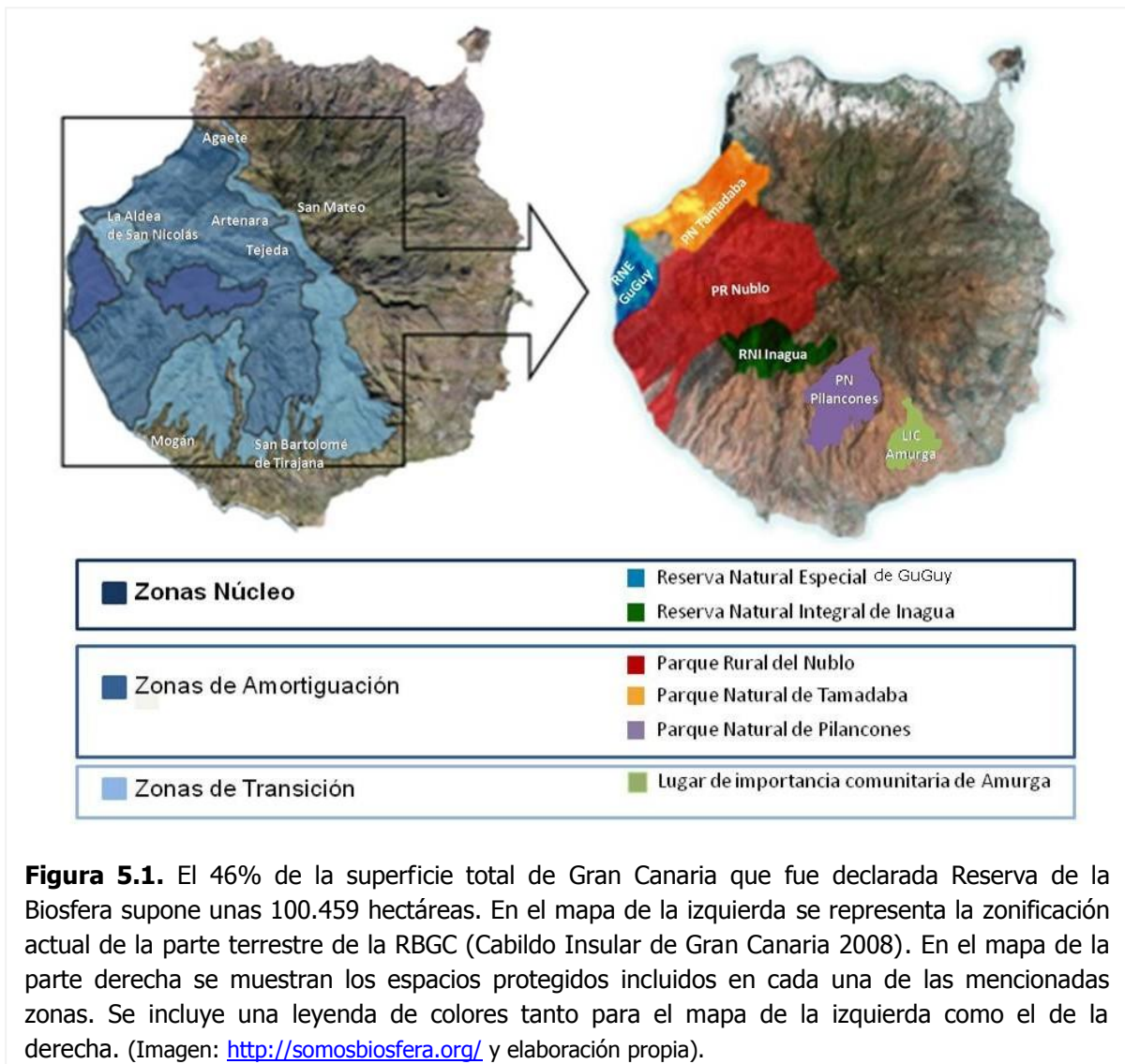
En el año 2005, el 46% de la superficie de Gran Canaria (Fig. 5.1) fue declarado como Reserva de Biosfera (RBGC, de aquí en adelante).

La RBGC se compone de un espacio terrestre y otro marino, estando su parte terrestre distribuida en los siguientes siete municipios: Agaete, Artenara, La Aldea de San Nicolás, Mogán, San Bartolomé de Tirajana, Tejeda y Vega de San Mateo.

La parte marina comprende la totalidad del LIC Franja Marítima de Mogán y una franja adicional que llega hasta el Puerto de las Nieves en Agaete, dónde entra en contacto con la zona terrestre que se corresponde con la Reserva Especial de GuGuy.

La RBGC se caracteriza por su gran valor florístico y elevado número de endemismos (108 endemismos grancanarios) pero también por otros importantes valores naturales, su elevado interés ecológico, geológico y antropológico (Jiménez- Suárez 2006, Montelongo (coord.) 2006, Montelongo 2007).

Además, como ocurre en otras Reservas de Biosfera, entre las zonas elegidas para ser protegidas dentro de la RBGC, se encuentran algunas de las que mejor representan la biodiversidad de Gran Canaria, abarcando simultáneamente a otros sistemas de zonas protegidas como reservas naturales (p. ej., Reserva Natural de Inagua o la Reserva Especial de GuGuy), parques naturales (p. ej., Parques Naturales de Tamadaba y Pílancones), monumentos naturales (como los del Risco de Tirajana, del Roque Nublo o de Tauro), y lugares de importancia comunitaria (como el LIC del macizo de Amurga).





El área terrestre de la RBGC agrupa en la actualidad las siguientes zonas (Fig. 5.1 y 5.8):

A) **Zonas núcleo** que se corresponden con la Reserva Natural Especial (RNE) de GuGuy (en el oeste) y la Reserva Natural Integral (RNI) de Inagua (en la zona centro-oeste de la isla) donde se consideró que se concentran los "valores naturales" más importantes de la RBGC.

La RNE de GuGuy es una zona de elevado interés botánico (Fig. 5.2), albergando una interesante muestra de cardonal-tabaibal (<http://cabildo.grancanaria.com/web/reserva-de-la-biosfera>). Además, en sus acantilados nidifican aves marinas amenazadas, como por ejemplo, la pardela cenicienta (*Calonectris diomedea*).



La RNI de Inagua (Fig. 5.3) está integrada por los pinares secos naturales mejor conservados de la isla, albergando numerosos endemismos tanto animales como vegetales (<http://cabildo.grancanaria.com/web/reserva-de-la-biosfera>). Inagua es también el hábitat preferente del pinzón azul (*Fringilla teydea subsp. polatzeki*), y la

cabecera de numerosos barrancos importantes, lo cual le confiere un papel fundamental en la recarga hídrica subterránea y la conservación del suelo.



**Figura 5.3.** La RNI de Inagua. A la derecha, paisaje del pinar de Inagua y a la izquierda detalle de la jarilla de Inagua (*Helianthemum inaguae*) uno de los endemismos vegetales exclusivos de esta RNI. (Fotos: José Naranjo y <http://www.lifeinagua.com/flora/>)

B) **Zona tampón o de amortiguación** que envuelve y protege a las zonas núcleo y que se corresponde con zonas de muy interesantes valores naturales como los Parques Naturales de Tamadaba (Fig. 5.4) y de Pílancones (Fig. 5.5) o el Parque Rural del Nublo (Fig. 5.6).



**Figura 5.4.** Parque Natural de Tamadaba y pinos canarios (*Pinus canariensis*). (Fotos: Ryan Black y Ruth Jaén-Molina)

El Parque Natural de Tamadaba (PN de Tamadaba), además del pinar húmedo que le da su nombre, es un gran espacio natural con una amplia representación de los diferentes ecosistemas grancanarios. El pinar de Tamadaba es uno de los pinares naturales mejor conservados de la isla, de notable eficacia en la captación hidrológica, como atestigua la presencia de varias presas artificiales en su entorno

Además, determinadas especies de aves endémicas y amenazadas (Fig. 5.5) encuentran en los pinares de este parque natural, áreas idóneas de nidificación (<http://cabildo.grancanaria.com/web/reserva-de-la-biosfera>), por lo que se ha incluido en la red zona de especial protección para las aves de la Unión Europea (Directiva [79/409/CEE](http://www.legislation.gov.uk/dir/1979/04/09/CEE)).



**Figura 5.5.** A la izquierda, el pico picapinos (*Dendrocopos major thanneri*) y, a la derecha el pinzón azul (*Fringilla teydea* subsp. *polatzeki*), ambas subespecies endémicas de Gran Canaria, que podemos encontrar en los pinares del Parque Natural de Pilancones (centro). (Fotos: <http://especiesamenazadascanarias.blogspot.com.es>; Ilustración: Tony Sánchez (extraída de <http://www.pella.gofio.com/>)

El Parque Rural del Nublo (PR del Nublo) es el mayor espacio natural, de este tipo, en Gran Canaria (Fig. 5.6). Alberga hábitats naturales en buen estado y abundantes especies endémicas y amenazadas, como el rosalillo (*Dendriopoterium pulidoi*), cuya distribución se restringe a este espacio natural. Por otro lado, los pinares, las



abundantes charcas artificiales y los acantilados costeros que forman parte del PR del Nublo, constituyen hábitats importantes para muchas especies de aves (<http://cabildo.grancanaria.com/web/reserva-de-la-biosfera>).



**Figura 5.6.** Parque Rural del Nublo y a la derecha, el endemismo conocido como rosalillo, *Dendriopterium pulidoi*. (Fotos: Ruth Jaén Molina y <http://www.lifeinagua.com/flora/>).

C) **Zonas de transición o zonas exteriores** dedicadas al fomento de modelos nuevos de gestión de los recursos naturales y que abarcan los municipios de La Aldea de San Nicolás, Agaete, San Mateo, Artenara, Tejeda, Mogán y San Bartolomé de Tirajana (Fig. 5.7).



**Figura 5.7.** Panorámica de San Bartolomé de Tirajana. (Foto: Ruth Jaén-Molina)

Dentro de la RBGC se conocen unos 1.308 taxones de plantas vasculares, de los cuales 245 son endemismos canarios, algunos de los cuales son exclusivos de la reserva como el rarísimo drago grancanario (*Dracaena tamaranae*) o el turmero de Inagua (*Helianthemum bystropogophyllum*), según los registros más actualizados de ocurrencia de especies del Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias ([www.biodiversidadcanarias.es/](http://www.biodiversidadcanarias.es/) ).

Este elevado número de especies, subespecies y variedades endémicas hace que la RBGC sea una zona de vital importancia para la conservación de la biodiversidad vegetal de Gran Canaria, confiriéndole además un destacado interés científico para el estudio de los mecanismos y procesos evolutivos que han configurado la biodiversidad de la isla. De hecho, Gran Canaria, debido a su elevada, exclusiva y frágil biodiversidad endémica es un *hotspot* que, junto con otros enclaves oceánicos insulares, merece ser conservado de manera prioritaria (Caujapé-Castells *et al.* 2010).

La diversidad filogenética (PD, ver apartado 1.4) por ser un índice integrador de aspectos genéticos, evolutivos y ecológicos de las especies que habitan en un territorio, se viene aplicando en distintos "puntos calientes" del planeta (Forest *et al.* 2007 y Anacker & Harrison 2012) para detectar zonas del territorio cuya biodiversidad merece especial protección. Por otro lado, la conservación de los procesos evolutivos ha sido reconocida como una de las máximas prioridades para preservar la biodiversidad, frente a la incertidumbre que plantean los cambios globales actuales (Mace *et al.* 2003), y la importancia de salvaguardar los ecosistemas, las especies y la diversidad genética se subraya en acuerdos internacionales como la Estrategia Global de Conservación de Plantas. Ésta, en su objetivo 7 se establece que para el año 2020, al menos el 75% de

las plantas amenazadas conocidas deben estar conservadas "in situ" (REGCP, reformulación de la Estrategia para el período 2011-2020, <http://www.cbd.int/gspc/targets.shtml>). Por lo tanto, a la hora de evaluar la relevancia de una zona geográfica y/ o las especies de cara a su conservación efectiva, es necesario disponer de indicadores fiables que sean capaces de abarcar la multi-dimensionalidad inherente a la biodiversidad, que va más allá de la riqueza o la abundancia de las especies que habitan un territorio, para proporcionar una visión más completa e integradora.

Forest *et al.* (2007) encontraron grandes diferencias en la forma en la que se distribuían sus datos de diversidad taxonómica y de diversidad filogenética obtenidos para la flora del Cabo, en Sudáfrica. Estas diferencias eran tales, que advirtieron que en función del índice en el que basaran sus decisiones (riqueza de especies frente a riqueza filogenética), debían seleccionar un *set* de áreas diferente para garantizar la conservación de la máxima biodiversidad florística de dicho territorio. Otros autores, como Devictor *et al.* (2010), observaron que sus datos de diversidad taxonómica, filogenética y funcional aunque estaban relacionados, variaban en la forma en la que se distribuían en el territorio, por lo que no era posible sustituir unos por otros, a la hora de tomar decisiones sobre conservación. H. Schaefer (2011) en sus análisis de diversidad filogenética para Macaronesia, comprobó que los valores de PD por taxón, obtenidos en cada archipiélago (Azores, Canarias y Cabo Verde), mostraban un patrón de distribución contrario al de los valores de riqueza de especies, de forma que el primero aumentaba según la distancia al continente (era el doble en Azores que en Canarias), mientras que el segundo, era mayor en Canarias que en Azores. A su vez, Reyes-Betancort *et al.* (2008) ya apuntaban que sus estimaciones por unidad de área

basadas en la diversidad filogenética de la flora endémica de las islas Canarias no coincidían siempre, con lo esperado, según otras estimaciones como riqueza de taxones amenazados, grado de rareza o riqueza en endemismos. Consecuentemente, un desafío clave antes de tomar decisiones sobre qué áreas y qué especies conservar, es lograr que éstas se basen en un conocimiento lo más multidisciplinar posible de los factores que han influido en los patrones actuales de distribución de la biodiversidad de un territorio (Graham & Fine 2008, Mouillot *et al.* 2013, Winter *et al.* 2013).

Por todo lo dicho, como complemento a los criterios de importancia ecológica y continuidad territorial, en base a los cuales se propuso la zonificación actual recogida en la declaración de Reserva Mundial de la Biosfera de Gran Canaria, en este estudio aportamos información sobre la diversidad filogenética (PD) asociada a la flora endémica distribuida en la RBGC y, hacemos un análisis comparativo con las estimaciones de diversidad tradicional o taxonómica (TD, en adelante) obtenidas también para la flora endémica de la RBGC. Así, partiendo de los resultados del proyecto "Desarrollo de un código de barras molecular para la flora de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria" (co-financiado por el Cabildo de Gran Canaria y el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y liderado por el Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN del JBCVCSIC), este capítulo de la tesis aporta una perspectiva genético-molecular a una posible estrategia de gestión multidisciplinar de la biodiversidad de la RBGC (Caujapé-Castells *et al.* 2013, 2013a y Jaén-Molina *et al.* 2013 y 2014).

Aunque otras aproximaciones han sido aplicadas para establecer actuaciones prioritarias de conservación en diferentes Reservas de Biosfera de la "Red global de

Reservas de Biosfera Islas y Zonas costeras" (<http://www.biosferamenorca.org/contingut.aspx?IdPub=210>), casi todas ellas están basadas en datos de abundancia de especies, de distribución de especies según SIG y/o en factores de amenaza.

Por último, el nivel de resolución de los datos que presentamos en este capítulo (cuadrículas de 1km<sup>2</sup>) es muy superior al establecido en otras zonas del planeta, como Sudáfrica y Gales (ver Forest *et al.* 2007 y Vere *et al.* 2012) y para Canarias, (Reyes-Betancort *et al.* 2008) estudio realizado para cuadrículas UTM de 10 km<sup>2</sup>. Con lo que podemos concluir, que tras este estudio, la RBGC será uno de los "puntos calientes" de biodiversidad del planeta mejor conocidos, a nivel florístico.

## 5.2. OBJETIVOS

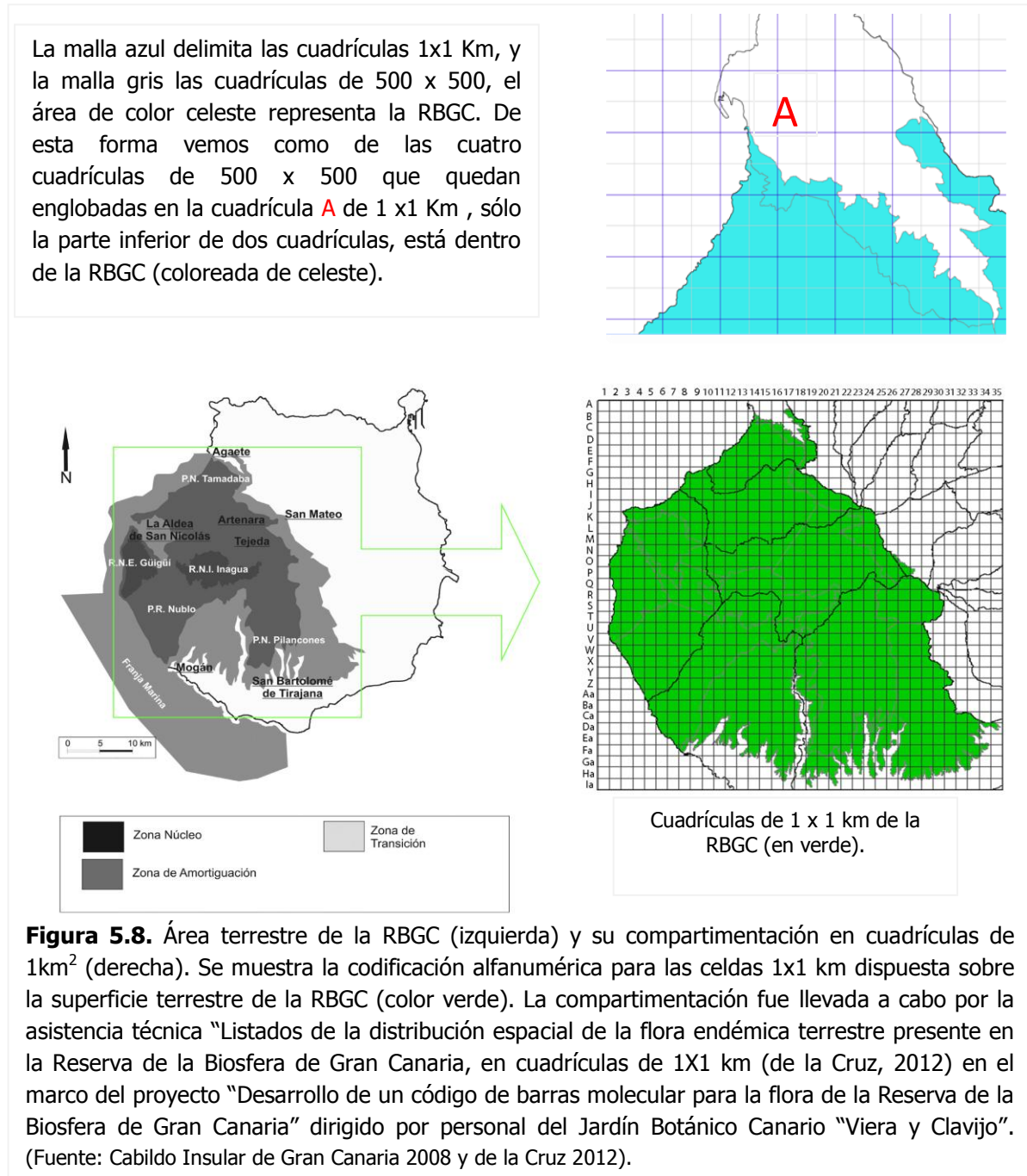
Nuestros objetivos dentro de este capítulo de tesis son:

- a) Facilitar la identificación molecular de los endemismos vegetales terrestres de Canarias que se distribuyen en la RBGC (ver también el Cap. 5).
- b) Estimar la diversidad filogenética asociada a la flora endémica conocida en cada una de las cuadrículas (1km<sup>2</sup>) en las que puede circunscribirse este territorio.
- c) Comparar los valores de diversidad filogenética y diversidad taxonómica obtenidos en las zonas núcleo, las de transición y amortiguación.
- d) Contribuir a la gestión y conservación de las plantas endémicas que se distribuyen en la RBGC y de las unidades de este territorio, donde se encuentre la biodiversidad con mayor complejidad evolutiva, señalando posibles "santuarios de biodiversidad".



Estos objetivos están en clara sintonía con las funciones de conservación, investigación y logística que deben cumplir las Reservas de Biosfera, especialmente en relación con la diversidad genética, de especies, ecosistemas y paisajes.

### 5.3. MATERIAL Y MÉTODOS



Basándonos en la compartimentación en 754 cuadrículas de 1km<sup>2</sup> correspondientes al área terrestre de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (Fig. 5.8) y en la información disponible en la base de datos Atlantis 3.0 ([www.biodiversidadcanarias.es/atlantis](http://www.biodiversidadcanarias.es/atlantis)) del [Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias](#), se seleccionaron aquellas especies vegetales endémicas de Canarias que se distribuían en la RBGC con un alto grado de certidumbre, según los criterios aplicados por de la Cruz (2012).

Es decir, se seleccionaron aquellas especies que en la base de datos Atlantis aparecían como "nativas seguras", endémicas de Canarias y con niveles máximos de precisión geográfica (1 y 2).

Como se indica en el esquema de la Figura 5.9 y siguiendo las recomendaciones y protocolos desarrollados en el capítulo 4 de esta tesis, se recolectó material vegetal (hojas y pliegos de herbario asociados) para las especies seleccionadas. Además, se realizó la extracción, purificación y cuantificación del ADN en los laboratorios del Departamento de Biodiversidad Molecular del JBCVCSIC y se depositaron alícuotas de aquellos extractos que cumplían los mínimos de calidad (concentración y pureza) en el banco de ADN de la flora canaria, creado y mantenido por este departamento desde 2005 (Caujapé- Castells *et al.* 2006 y 2011). Según las condiciones detalladas en las secciones 3.5 y 3.6, se llevó a cabo la amplificación de las dos regiones "códigos de barras" del ADN cloroplástico (*matK* y *rbcl*) para los aproximadamente 208 endemismos vegetales que se recolectaron en la RBGC (ver Anexo III).

Los productos de las amplificaciones exitosas fueron enviados a la empresa Macrogen (Corea) para su secuenciación bidireccional.

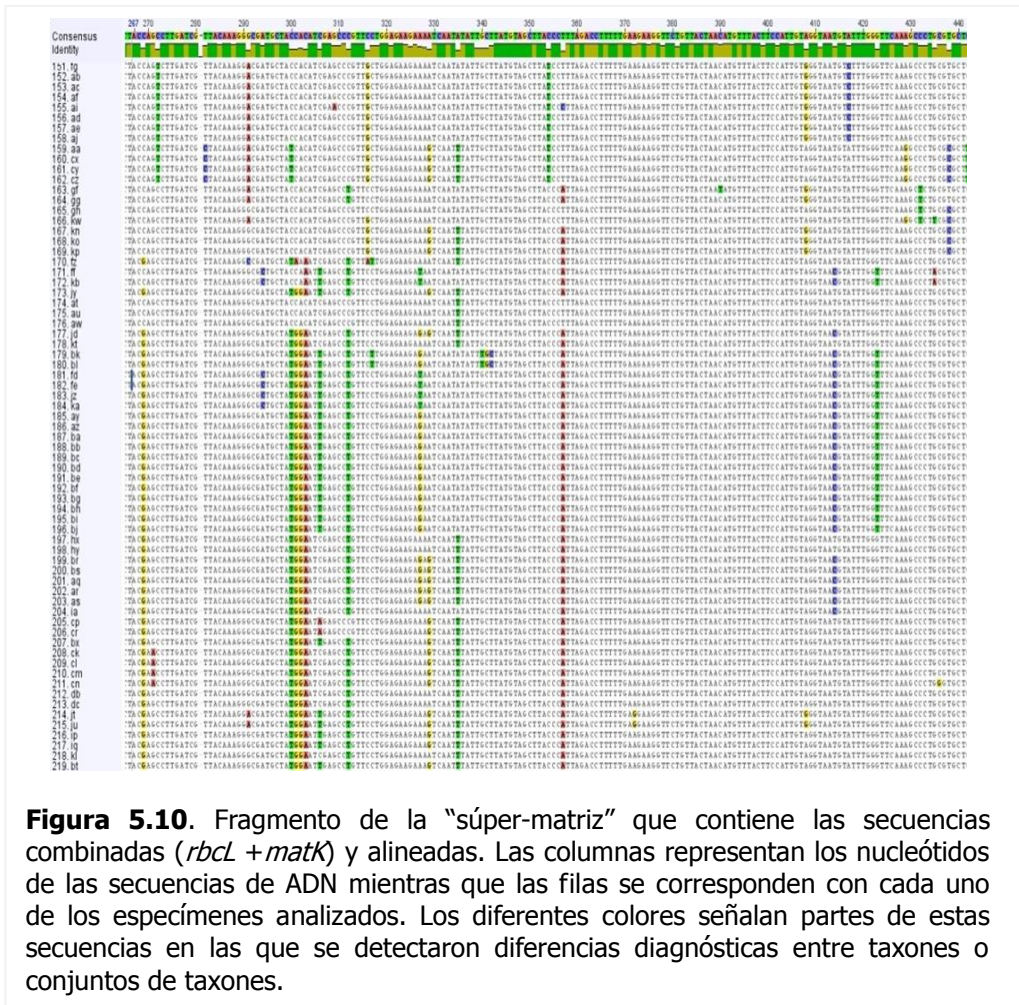


**Figura 5.9.** Esquema de los pasos seguidos para la recolección y conservación de muestras (1.1. hojas y 1.2. pliegos de herbario), protocolos de laboratorio (2.1 extracción de ADN, 2.2. cuantificación de los extractos de ADN, 2.3 amplificación de las regiones "código de barras") y para el análisis de datos (3.1. edición de las secuencias de ADN y alineamiento en matrices, 3.2. búsqueda de caracteres diagnóstico, 3.3. obtención del árbol de relaciones genéticas, 3.4 obtención del listado de taxones distribuidos por cuadrículas del territorio de la RBGC y 3.5 cálculo de valores de diversidad filogenética para los endemismos vegetales terrestres de la RBGC). Todos estos pasos se detallan en los correspondientes apartados de este capítulo y en el capítulo 4 de esta tesis.

Las secuencias revisadas, editadas y validadas (ver secciones 3.7 y 3.8 de esta tesis) fueron incorporadas como secuencias consenso a las matrices correspondientes (secuencias *rbcL* o secuencias *matK*). Una vez se dispuso de todas las secuencias para cada uno de los taxones seleccionados por cada marcador, las matrices fueron alineadas (Fig. 5.10) con el algoritmo (ocho iteraciones) MUSCLE (Edgar 2004) implementado en el programa Geneious v5.4 (Drummond *et al.* 2011).



Estas matrices de secuencias alineadas se depositaron en el sistema de información *Demiurge* como los siguientes compendios de diversidad genética con los siguientes código D-DNASE-89 para la región *matK* y D-DNASE-90 para la región *rbcl* (ver sección 3.8 de esta tesis).



**Figura 5.10.** Fragmento de la "super-matriz" que contiene las secuencias combinadas (*rbcl* + *matK*) y alineadas. Las columnas representan los nucleótidos de las secuencias de ADN mientras que las filas se corresponden con cada uno de los especímenes analizados. Los diferentes colores señalan partes de estas secuencias en las que se detectaron diferencias diagnósticas entre taxones o conjuntos de taxones.

Como hemos visto a lo largo de los capítulos 2 y 4 de esta tesis, las secuencias de las regiones "códigos de barras" (CBOL PWG 2009) pueden utilizarse en la construcción de filogenias (Kress *et al.* 2009), para ayudar a la Taxonomía clásica en la elaboración de mejores censos de la biodiversidad (Janzen *et al.* 2009), y en la elaboración de estrategias multidisciplinares de conservación.

Así, como se desarrolla a continuación, las matrices de secuencias consenso *matK* y *rbcL* (por separado y combinadas) constituyeron la base para la identificación molecular de los taxones endémicos presentes en la RBGC y también para las estimaciones de diversidad filogenética de la flora endémica de este territorio.

### 5.3.1 ANÁLISIS DE DATOS. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS

Para obtener las estimaciones de diversidad filogenética (PD, Faith 1992) se utilizó el programa PDA (*Phylogenetic Diversity Analyzer*, Minh *et al.* 2006, <http://www.cibiv.at/software/pda>), que necesita dos archivos de partida que contengan:

1) los nombres de los taxones seleccionados en cada unidad del territorio para el que se quiere hacer las estimaciones (en nuestro caso, se correspondía con el listado de los nombres de los taxones endémicos presentes en cada cuadrícula de 1km<sup>2</sup> de la RBGC, Tabla S5), y

(2) la topología de relaciones elegida tras el análisis de la información molecular para los taxones considerados (en nuestro caso, uno de los árboles de máxima parsimonia obtenidos con las dos secuencias "código de barras").

#### 5.3.1.1 Obtención de los listados de los taxones endémicos presentes en cada cuadrícula (1km<sup>2</sup>) de la RBGC

Los distintos pasos llevados a cabo para la obtención de los listados de presencia de taxones (especies y subespecies) endémicos de Canarias en la parte terrestre de la RBGC (cuadrículas 1x1 km) a partir de la base de datos *Atlantis*, 3.0 (Gobierno de Canarias 2012), con un nivel de fiabilidad alto, se recoge en el informe técnico

elaborado por Salvador de la Cruz (2012) para el proyecto "Listados de la distribución espacial de la flora endémica terrestre presente en la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria, en cuadrículas de 1x1 km" y sobre el que se sustentó esta parte de la tesis.

Los criterios de filtro que de la Cruz aplicó en el software de *Atlantis* 3.0 (<http://www.biodiversidadcanarias.es/atlantis/common/index.jsf>) para establecer con máxima fiabilidad qué taxones vegetales endémicos canarios se distribuían en las distintas cuadrículas de la RBGC, se resumen a continuación:

- a) **Nivel de confianza:** se utilizaron sólo datos "seguros", descartándose los que aparecían como "erróneos y equívocos".
- b) **Nivel de precisión:** se utilizaron el 1 y el 2, se descartaron el 3 y el 4.
- c) **Validez del taxón:** se utilizaron sólo los nombres de los taxones registrados como "válidos", descartándose los que aparecían como "erróneos y equívocos".
- d) **Año de observación:** se utilizaron "todos", no se aplicaron filtros temporales.
- e) **Origen:** se utilizaron todos los registros que aparecían bajo la categoría "nativo seguro".
- f) **Endemicidad:** se utilizaron todos los registros que aparecían bajo la categoría "endémico" (Canarias). *Atlantis* 3.0 no permite realizar filtros para endemicidad insular, por lo que el filtro que se aplicó fue para "endemicidad Canarias" frente a la otra opción que era "endemicidad Macaronesia".
- g) **Extinción:** se utilizaron todos los registros que aparecían bajo la categoría "no extinto".

Una vez realizada la "capa de análisis" según los criterios anteriores, se activaron las capas correspondientes a las cuadrículas de 1 km<sup>2</sup> y de 500x500 m. En la Fig. 5.8 se muestran las cuadrículas de 1 km<sup>2</sup> correspondientes a la RBGC (coloreadas en verde) y que fueron las que se analizaron dentro de este capítulo. A partir de los registros de Atlantis se obtuvo el listado de taxones endémicos de Canarias presentes en cada una de las mencionadas cuadrículas de 1x1 km, en las que se dividió la RBGC. Estos listados se compararon con el "Listado de especies silvestres de Canarias" (Arechavaleta *et al.* coord. 2010), y se seleccionaron las especies que se recogen como endémicas de Canarias es decir, que son nativas seguras y sólo tienen poblaciones naturales en el archipiélago y en ningún otro lugar del mundo.

Así, de los 245 taxones iniciales se descartaron aquellas especies que tienen también poblaciones en Macaronesia, como por ejemplo *Jasminum odoratissimum* (Oleaceae). Por otro lado, debido a que la mayoría de los taxones endémicos presentes en las islas pertenecen al grupo de las angiospermas (plantas vasculares con flor), y sólo una minoría a otros grupos como briófitos ó pteridófitos, sólo se incluyeron en este estudio las angiospermas, y aquellas gimnospermas de amplia distribución y alto carácter emblemático, como *Pinus canariensis* (Pinaceae) o *Juniperus cedrus* (Cupressaceae).

En el Anexo I, se incluye una descripción detallada de los criterios seguidos para la inclusión o exclusión de los taxones a estudio a partir de la información obtenida en Atlantis y en Arechavaleta *et al.* coord. (2010), de forma que el listado final de taxones analizados fue de 208 endemismos canarios distribuidos en la RBGC (Tabla S6).

El formato de salida de la base de datos Atlantis 3.0 es ".csv", de forma que los datos se agrupan en ficheros separados por comas en los que aparecen los nombres

completos de los taxones (ej. "*Parolinia ornata*"), además de otra información organizada en columnas, que no es reconocida por el programa PDA. Por ello, cada fichero ".csv" se tuvo que modificar y adaptar al formato requerido por el programa PDA, para poder llevar a cabo los cálculos. Para que este programa reconozca el listado de taxones para cada cuadrícula, necesita que estén en formato texto con los nombres apilados en una única columna.

### 5.3.1.2 Obtención del árbol de relaciones genéticas

A las matrices constituidas por 208 secuencias consenso (*matK* y *rbcl*) generadas en el laboratorio del banco de ADN del JBCVCSIC para los taxones endémicos canarios presentes en la RBGC, se les unieron las secuencias de dos gupos externos extraídas de *GenBank*: *Amborella trichopoda* (Amborellaceae) y *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae). Se obtuvo así una matriz final de 210 secuencias concatenadas (*rbcl* + *matK*) que, como vimos en los apartados 3.8 y 3.9, se utilizó para la búsqueda heurística de los árboles de máxima parsimonia con el software PAUP 4.0 (Swofford 2003). De los 82.500 árboles resultantes, se eligió al azar uno (que incluía estimaciones de longitudes de ramas) como "árbol de referencia" para el cálculo de los valores de diversidad filogenética (ver 5.4.3).

Es importante aclarar que este "súper-árbol" no puede concebirse como una genealogía ni una filogenia de todas las especies endémicas de la RBGC (ya que no incluye a muchos de sus congéneres próximos distribuidos en otras zonas de Gran Canaria, en otras islas Canarias, o en otras zonas geográficas más distantes). No obstante, la topología resultante (Fig. 5.18) refleja las relaciones entre géneros y



especies según el conocimiento taxonómico actual (p. ej., APG III 2009), y también la clasificación vigente de las familias de las angiospermas. Ambos resultados refuerzan el valor biológico de los datos obtenidos, garantizando por lo tanto la fiabilidad de las estimaciones de PD de este territorio. Una vez hechas estas comprobaciones, el árbol de la Figura 5.18 sirvió de base para los cálculos de diversidad filogenética efectuados para cada una de las cuadrículas de estudio, cuyo valor depende del número de taxones (con respecto al total) presentes en la cuadrícula y la proximidad filogenética que existe entre ellos.

### **5.3.1.3 Cálculo de los valores de diversidad filogenética por cuadrícula (1km<sup>2</sup>) de la RBGC**

El archivo de datos con extensión ".tre" que suministra el programa PAUP para las topologías relacionales fue transformado al formato "Newick" (Archie *et al.* 1986, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/newicktree.html>), que es uno de los que puede reconocer el programa PDA para poder llevar a cabo las estimaciones de diversidad filogenética.

Dicho formato "Newick" consiste en un código de paréntesis que representa la topología del árbol de referencia, con los códigos asignados a los nombres de los taxones y los números que indican la longitud de cada una de las ramas de dicho árbol. Así, en formato *Newick* la relación de los taxones codificados con las letras desde la a hasta la f en la topología de un supuesto árbol, podría ser:  
(a:3,(f:0.5,g:1):1,((c:1,b:2):3,(d:1,e:2):2):4)

El programa solicita el nombre de los archivos y el número de taxones por cada unidad de territorio que se quiere analizar (en nuestro caso, las 754 cuadrículas de 1 km<sup>2</sup> en las que se inscribe la RBGC).

Una vez especificados estos parámetros, con el comando:

**pda** "nombre archivo árbol" **.tre -i** "nombre archivo de taxones" **.taxa - k** "número de taxones en listado"; el programa genera un archivo de texto donde figura el valor de diversidad filogenética (p. ej., 1780) y un árbol en formato *Newick* construido a partir del subconjunto de taxones que aparecían en la cuadrícula analizada.

A continuación, con el comando:

**pda** "nombre archivo árbol" **.tre -i** "nombre archivo de taxones" **.taxa - k** "número de taxones en listado" "nombre archivo salida" **.txt**, se obtienen los datos en un formato de salida de archivo de texto.

Una vez generados los dos archivos que necesita el programa PDA, la obtención de valores de diversidad filogenética es relativamente rápida. Atendiendo a la definición de Faith (1992) y como vimos en el apartado 1.4, el programa realizará la suma total mínima de todas las longitudes de las ramas de la topología de relaciones genéticas del "super-árbol" de referencia, que se requieren para abarcar un conjunto dado de taxones, p. ej., los incluidos en la cuadrícula M10 según la compartimentación de la RBGC que se muestra en la Figura 5.8.

#### 5.3.1.4 Análisis estadísticos

Se realizaron comparaciones estadísticas (*test* de la U de Mann-Whitney, Mann & Whitney 1947) entre los valores estandarizados de diversidad taxonómica (TD) y de diversidad filogenética (PD), obtenidos para la flora endémica terrestre presente en cada km<sup>2</sup> de la RBGC, para estimar si la forma en la que se distribuían los valores de ambos indicadores era similar. También se quería comprobar si alguno de los dos índices resolvía con mayor detalle la riqueza de la biodiversidad florística por unidad o cuadrícula en la que se dividió este territorio.

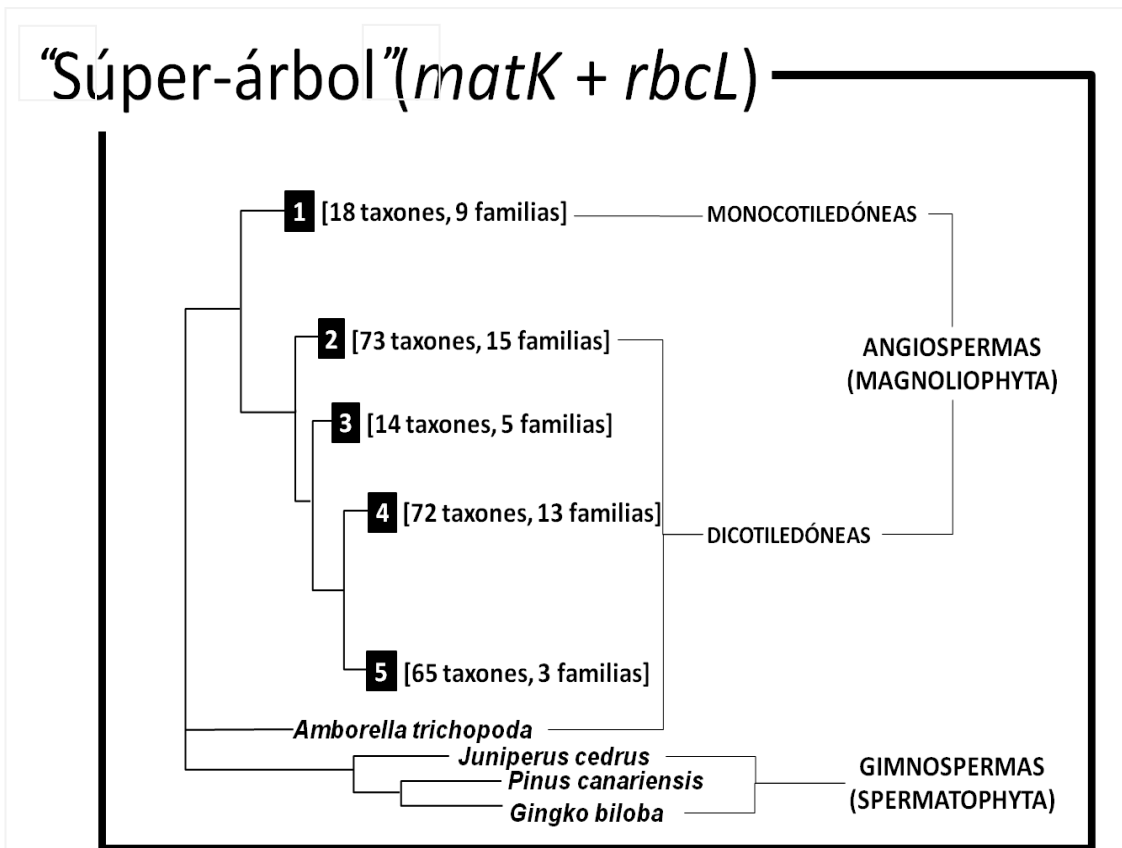
Por otro lado, se compararon estadísticamente (*test* de Kruskal-Wallis) los conjuntos de datos obtenidos por cuadrícula (cada cuadrícula de 1x1km sería una observación), agrupándolas según se circunscribían dentro de las actuales zonas núcleo (RNI de Inagua y RNE de GuGuy) o si se encontraban dentro de las zonas de amortiguación y transición, comprobándose así, si las zonas de mayor protección se correspondían con las cuadrículas que contienen mayor diversidad filogenética. Así, por ejemplo, se compararon por zonas las cuadrículas de: RNI de Inagua *vs* RNE de GuGuy; RNI de Inagua *vs* zona de amortiguación; RNI de Inagua *vs* zona de transición y, así sucesivamente.

Los valores de diversidad taxonómica y diversidad filogenética obtenidos para la biodiversidad vegetal, presente en cada cuadrícula en la que se dividió la parte terrestre de la RBGC, se representaron en mapas de colores. En estos mapas, las cuadrículas coloreadas de rojo oscuro representan zonas con mayor diversidad (taxonómica o filogenética) y las de amarillo claro, las de menor diversidad (taxonómica o filogenética).

## 5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.4.1 ÁRBOL DE RELACIONES GENÉTICAS

En la Figura 5.11 se muestra uno de los árboles resultantes (por sus grandes dimensiones nos referiremos a él como "súper-árbol") del análisis de máxima parsimonia (6088 pasos, CI =0,286, HI =0,714, RC= 0,234 y RI= 0,818) de la "súper-matriz" que contenía 210 secuencias (*rbcl* + *matK*) y 1697 caracteres.



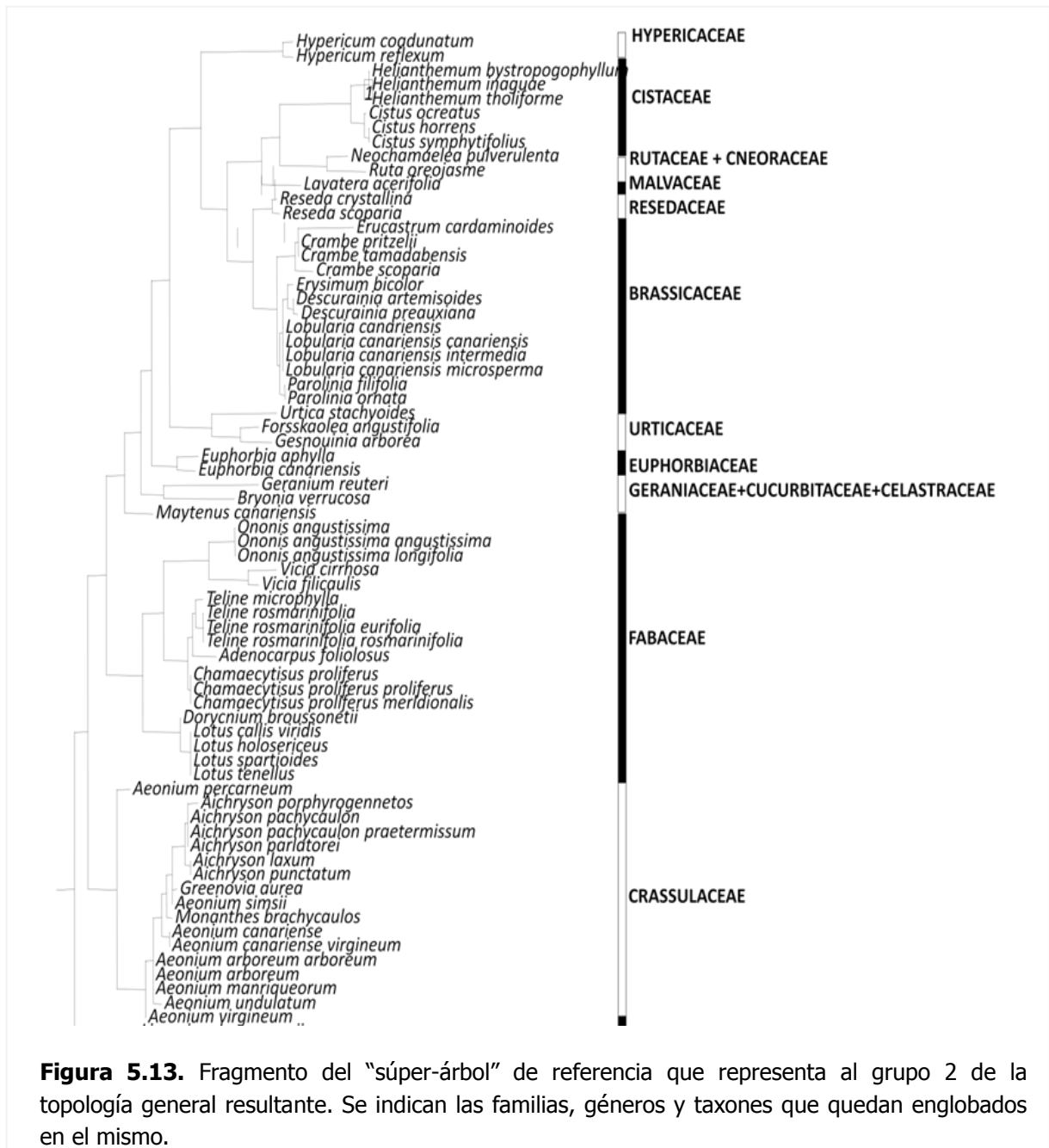
**Figura 5.11.** "Súper-árbol" de relaciones filogenéticas (*matK* y *rbcl*) obtenido para los taxones vegetales endémicos de la RBGC y 2 grupos externos (*Amborella trichopoda* y *Gingko biloba*). Se muestra únicamente la estructura básica de la topología resultante, dónde se agrupan los taxones y familias en cinco grandes grupos (numerados del 1 al 5).

A continuación, mostramos únicamente la estructura general de la topología del "súper-árbol", para las relaciones obtenidas entre los taxones de las distintas familias, para cuatro de los cinco grupos principales (Fig. 5.11 y 5.12).



**Figura 5.12.** Detalle de los grupos 1, 3, 4 y 5 que constituyen la estructura básica de la topología del "súper-árbol" de referencia. Para cada uno de ellos se indica el nombre de las familias a las que pertenecen los taxones que engloban. El grupo 1 agrupa a todas las monocotiledóneas incluidas en el análisis, mientras que los grupos 3, 4 y 5 agrupan a distintas familias de dicotiledóneas.

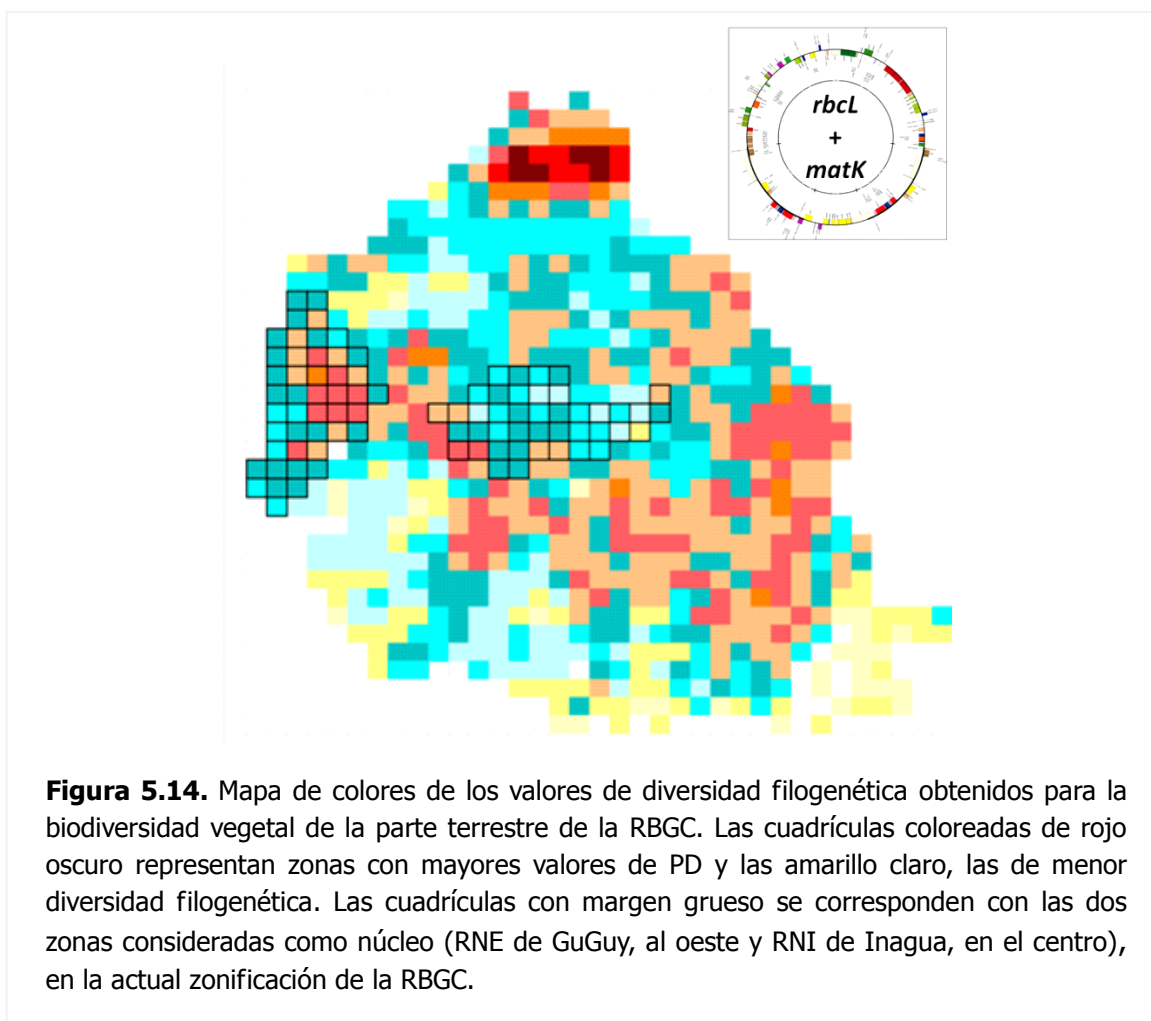
Por su parte, si observamos en detalle el grupo 2 (Fig. 5.13), podemos comprobar como, al igual que en el resto de los grupos, las relaciones obtenidas entre los géneros y especies obedece al conocimiento taxonómico actual, reflejando a su vez la clasificación vigente para las familias de angiospermas (APG III 2009).



**Figura 5.13.** Fragmento del "súper-árbol" de referencia que representa al grupo 2 de la topología general resultante. Se indican las familias, géneros y taxones que quedan englobados en el mismo.

### 5.4.2 ESTIMACIONES DE DIVERSIDAD FILOGENÉTICA

Las estimaciones de diversidad filogenética, obtenidas con el programa PDA para cada una de las 754 cuadrículas en las que se dividió la parte terrestre de la RBGC y según la topología del "súper-árbol" de referencia (*rbcL*+*matK*), las representamos en un mapa de colores (Fig. 5.14).



El valor de PD dependerá de la proximidad filogenética que exista entre los taxones presentes en una cuadrícula con respecto al total de las relaciones genéticas según la topología del árbol que engloba a todos los taxones.

Según nuestras estimaciones de PD, podemos ver como las zonas núcleo no coinciden con las áreas que presentan los valores más altos de diversidad filogenética, sino que éstos se detectaron en cuadrículas al norte de la RBGC (zonas roja oscuras) y que se corresponderían aproximadamente con el PN de Tamadaba y Andén Verde. Además, hay cuadrículas en las zonas de amortiguación y transición con valores de PD muy altos, en muchas cuadrículas mucho mayores que los valores estimados para la RNI de Inagua (zona núcleo).

Esta representación gráfica de la diversidad filogenética obtenida por cada km<sup>2</sup> para la biodiversidad vegetal terrestre endémica de la RBGC, nos permite percibir diferencias notables entre las distintas cuadrículas, mostrando una distribución geográfica de las estimaciones de PD, compleja y genéticamente muy diversa.

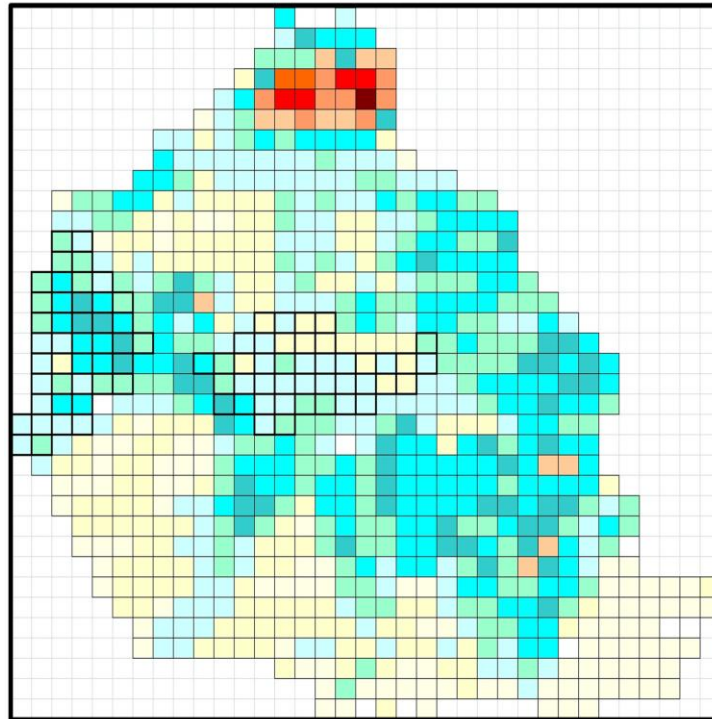
### **5.4.3 ESTIMACIONES DE DIVERSIDAD TAXONÓMICA**

Las estimaciones obtenidas según el número de taxones endémicos presentes por cuadrícula (1x1 km) de la RBGC se muestran como un mapa de colores de diversidad taxonómica en la Figura 5.15, en el que ya podemos percibir diferencias notables entre las distintas cuadrículas de la RBGC.

Así, según este mapa, podemos ver como de forma similar a lo detectado para las estimaciones de PD, las cuadrículas dentro de la RBGC que muestran mayores valores de TD son las que se encuentran en el norte de la misma (PN de Tamadaba y Andén Verde). Este resultado es afín al de Reyes Betancort *et al.* (2008), que mostraron que la máxima acumulación de endemismos en la isla de Gran Canaria se daba en el macizo de Tamadaba.



Así mismo, los análisis de la flora amenazada, endémica y rara de la flora vascular española para la detección de áreas importantes para la flora a nivel nacional en el marco de la Estrategia Global de Conservación Vegetal (<https://www.cbd.int/gspc>), destacan cinco áreas excepcionales en Canarias, y una de ellas es Tamadaba en Gran Canaria (Sánchez de Dios *et al.* 2013). Aunque la identificación de las áreas en los dos últimos trabajos citados se realizó con una escala muy superior (10x10 km) a la empleada por nosotros (1x1 km), la información corológica que utilizaron para los análisis si está referida a cuadrículas de 1x1 km [Lista Roja, Moreno (coord.) 2008 y AFA, Iriando (coord.) 2011], como en nuestro caso.



**Figura 5.15.** Mapa de colores de los valores de diversidad taxonómica obtenidos para la biodiversidad vegetal de la parte terrestre de la RBGC. Las cuadrículas rojo oscuro representan zonas con mayor diversidad taxonómica y las amarillas claras, las de menor diversidad taxonómica. Las cuadrículas con margen grueso se corresponden con las dos zonas consideradas como núcleo (RNE de GuGuv. al oeste y RNI de Inagua, en el centro), en la actual zonificación de la RBGC.

Por otro lado, hay otras cuadrículas como las que se corresponden con la RNE de GuGuy y algunas que quedan dentro de la zona de transición que muestran también valores elevados de TD (azul oscuro) e incluso al sureste de la zona de transición, observamos algunas cuadrículas coloreadas en tonalidades que van hacia el rojo.

Es destacable, comprobar que hay cuadrículas colindantes a la RNI de Inagua que muestran valores de TD más altos (con tonalidades azul oscuro e incluso hay una cuadrícula al norte que aparece coloreada de rojo claro, indicando un elevado valor de TD), que las cuadrículas englobadas dentro de esta segunda zona núcleo, para la que en general, podemos decir que todas sus cuadrículas muestran valores de diversidad taxonómica bajos o moderados (con rango de colores que van desde el amarillo claro hasta el azul claro).

Si bien la representación gráfica de la diversidad taxonómica, obtenida por cada km<sup>2</sup> para la biodiversidad vegetal terrestre endémica, nos permite percibir diferencias ostensibles, especialmente entre las cuadrículas al norte de la RBGC con respecto al resto, debemos tener en cuenta que las cuadrículas que contienen el mismo número de especies están representadas con el mismo color, independientemente de si las diferencias genéticas entre ellas son similares o muy acusadas. Por lo tanto, la TD es un estimador grosero, que no tiene en cuenta la diversidad genética de las especies de un territorio (en este caso de la RBGC) y, por ello, debería tener una repercusión limitada, a la hora de definir prioridades y actuaciones de gestión.

#### **5.4.4 COMPARACIÓN DE VALORES DE DIVERSIDAD FILOGENÉTICA CON VALORES DE DIVERSIDAD TAXONÓMICA**

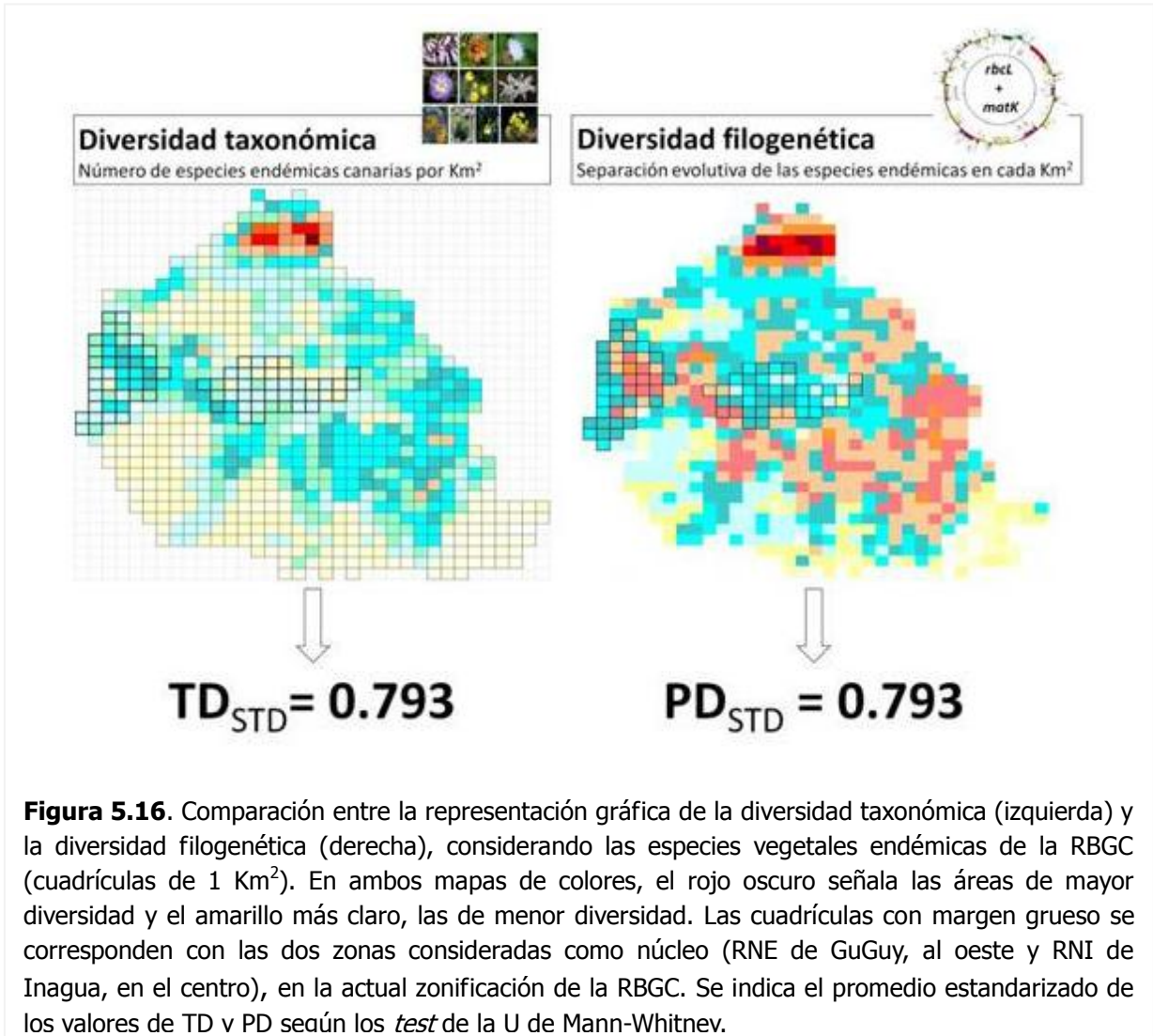
La comparación estadística (*test* de la U de Mann-Whitney, Mann & Whitney 1947, Fig. 5.16) entre los valores promedio estandarizados de TD y PD por cuadrícula revelan que ambos indicadores poseen estructuras análogas, que no se diferencian estadísticamente (el valor promedio para ambas estimaciones fue de 0,793).

De hecho, ni los valores más elevados de PD, ni los de TD obtenidos para la flora endémica canaria por cuadrícula (km<sup>2</sup>) se dan dentro de ninguna de las zonas núcleo consideradas en la actual zonificación de la RBGC. En efecto, podemos ver en la Figura 5.16 como muchas de las cuadrículas taxonómicamente y genéticamente más diversas se concentran en cuadrículas de la zona de amortiguación (al norte de la RBGC) o incluso en la zona de transición (al este de la RBGC).

No obstante, esta comparación nos permitió evidenciar diferencias en los valores de PD que no fueron detectadas en las estimaciones basadas en TD. Así, podemos ver como la riqueza de la biodiversidad vegetal terrestre endémica canaria que habita cada cuadrícula de la RBGC se resuelve con mayor detalle en las estimaciones de PD.

Efectivamente, hay cuadrículas con valores bajos de TD que muestran valores altos y más heterogéneos de PD (p. ej., dentro de la RNE de GuGuy). Este contraste refleja el hecho de que, en cuadrículas con igual número de taxones, la PD es muchísima más informativa, al reflejar las relaciones filogenéticas entre los taxones presentes en cada cuadrícula, y no solamente su número.

Por lo tanto, aunque existe una relación directa entre TD y PD, si queremos preservar la máxima diversidad evolutiva que caracteriza un territorio, la PD debería ser el parámetro de referencia siempre que sea posible



Estos resultados ponen de manifiesto que los datos moleculares permiten extraer información muy relevante sobre aspectos de la biodiversidad en el territorio, que no serían accesibles mediante otros métodos.

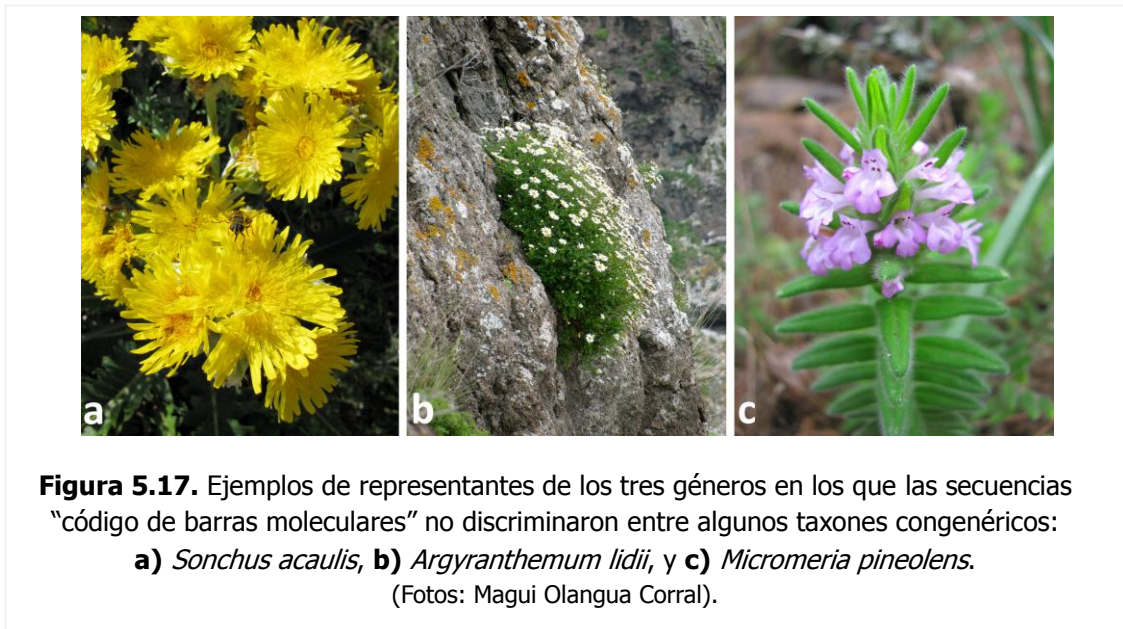
En conjunción con otras variables necesarias para el conocimiento de la biodiversidad, la protección de las áreas con los valores máximos de diversidad filogenética territorial (tonalidades más rojas en el mapa de colores) es la mejor estrategia para garantizar la conservación de los procesos evolutivos y, por lo tanto la supervivencia de las especies que habitan la RBGC.

### **5.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

En consonancia con otros estudios en los que se ha testado la utilidad de las dos regiones de ADN cloroplástico "código de barras" (*matK* y *rbcl*) para la identificación molecular de la flora canaria (Jaén-Molina *et al.* 2010 y Jaén-Molina *et al.* 2014a), la matriz que contiene las secuencias "código de barras" generadas para cada uno de los especímenes analizados (a los que previamente les habían sido asignados sus nombres taxonómicos por taxónomos expertos, según sus características morfológicas), constituyen una herramienta molecular precisa y fiable para ayudar a identificar o distinguir elementos de la flora terrestre endémica de la RBGC, con las implicaciones que esto puede tener para la gestión de esta zona protegida con tantos valores naturales.

Como era de esperar por los resultados de capítulos anteriores (ver apartados 4.4 y 4.5 de esta tesis), las comparaciones para las que no se encontraron caracteres moleculares con valor diagnóstico fueron a nivel de subespecies y entre algunas especies de géneros que han dado lugar a radiaciones y otras que representan posibles casos de hibridación.

Un ejemplo del último caso son las especies de cerrajas, magarzas y margaritas (géneros *Sonchus* y *Argyranthemum*), que presentan en general gran facilidad para producir híbridos entre individuos de muchas de sus especies, probablemente por el estrecho parentesco que existe entre ellas, señal de que los procesos de especiación que las generaron son muy recientes (Fig. 5.17).



Por otro lado, sin embargo se encontraron varios caracteres diagnóstico que separaban taxones, que en principio se suponen están cercanamente relacionados entre sí, dentro de géneros como *Teline* o *Hypericum* (con menos representantes en la RBGC), por lo que podrían estar indicando la continuidad de procesos evolutivos en esos grupos (Fig. 5.18). Así, por ejemplo, nos encontramos con 21 diagnósticos (*rbcL* + *matK*) entre *Hypericum coadunatum* e *Hypericum reflexum*.



Las mayores dificultades en la discriminación que encontramos para especies que se distribuyen en la RBGC, fueron precisamente además de en las especies de dos géneros, ya nombrados, de la familia Asteraceae (*Argyranthemum* y *Sonchus*), para algunas de las especies del género *Micromeria* (Lamiaceae) y para especies del género *Parolinia* (Brassicaceae). Todos estos géneros han experimentado una radiación muy intensa, por lo que están constituidos por un número elevadísimo de endemismos (32, 19 y 24, respectivamente para *Argyranthemum*, *Sonchus* y *Micromeria*) y son también los que mayor representación de taxones tienen en la RBGC (más de siete por género). *Parolinia* por su parte, aunque está representado únicamente por siete especies endémicas, varias de ellas se distribuyen en la RBGC (*P. ornata* y *P. filifolia*).



Por último, nos encontramos con otros taxones de géneros que representan radiaciones evolutivas (Fig. 5.19) para los que se detectaron varios caracteres diagnóstico, por ejemplo en los géneros *Aeonium*, *Aichryson* o *Convolvulus*.



**Figura 5.19.** Ejemplos de taxones de géneros que han sufrido radiación y para los que las secuencias "código de barras moleculares" lograron discriminar respecto a sus congéneres: a) *Aichryson punctatum*, b) *Aichryson parlatorei*, c) *Aeonium simsii* y d) *Aeonium simsii*. (Fotos: Magui Olangua).

### 5.5.1 DETECCIÓN DE ÁREAS "CALIENTES" DE ESPECIACIÓN EN LA RBGC

Se han localizado dentro de la RBGC aquellas áreas en las que se distribuyen las especies de los géneros *Argyranthemum*, *Sonchus*, *Micromeria* y *Parolinia* por ser las que más difícilmente se han podido identificar con las secuencias "código de barras", en algunos casos no encontrándose caracteres diagnósticos que discriminen las especies que engloban.

Posiblemente, estas dificultades detectadas en los géneros mencionados se deben a una especiación muy reciente en estos linajes, por lo que las zonas dónde se distribuyen estarían representando zonas evolutivamente "calientes" o "crisoles evolutivos" (Jaén-Molina *et al.* 2013 y 2014). En la Figura 5.20 mostramos las



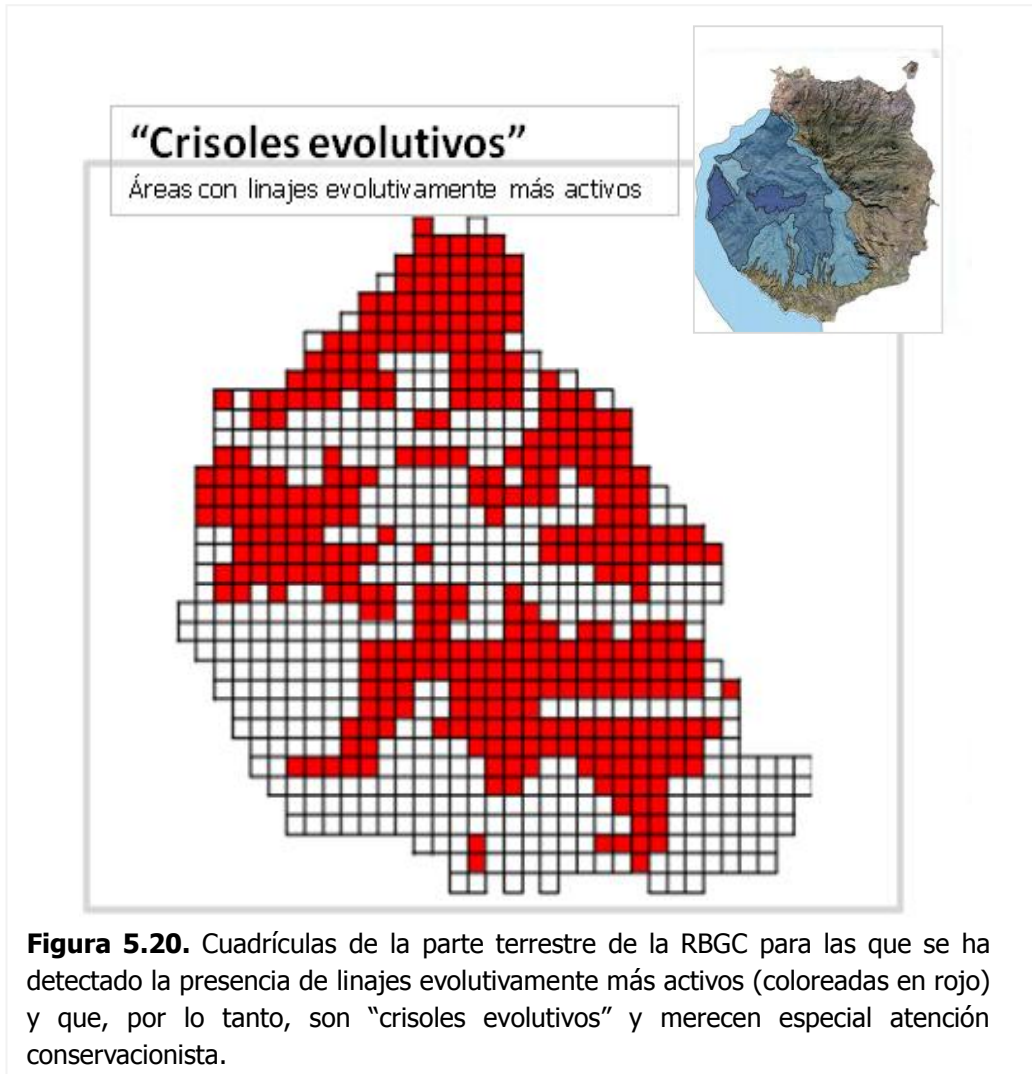
cuadrículas que albergan las especies con más problemas para su diagnóstico molecular basado en las secuencias "códigos de barras". Las cuadrículas de color rojo son aquellas dónde se han detectado la presencia de dos o más taxones con-genéricos de cualquiera de los géneros para los que no se ha logrado la identificación molecular de las especies que engloban.

La detección de estas áreas que muestran mayor tasa de especiación reciente puede ser muy importante para facilitar la supervivencia de los linajes evolutivamente más dinámicos especialmente teniendo en cuenta la amenaza que plantean las incertidumbres asociadas a los cambios globales actuales. Este es un aspecto a tener muy cuenta en islas oceánicas como Gran Canaria, dónde la biodiversidad es más vulnerable a perturbaciones externas (ver p. ej., Caujapé-Castells 2011).

Así, disponer de indicadores cuantitativos que señalen en qué zonas se están dando fenómenos de especiación más recientes es prioritario para establecer estrategias de conservación del territorio, que revertirán a su vez en la conservación de las especies, ya que éstas tendrían más posibilidades de sobrevivir, diferenciarse y en última instancia especiar en sus hábitats naturales, para los que están adaptadas. Por lo tanto, la protección de estos "crisoles evolutivos" tiene sentido porque favorecería el desarrollo de procesos de especiación que se han iniciado muy recientemente y que podrían dar lugar a nuevos endemismos o radiaciones en el futuro.

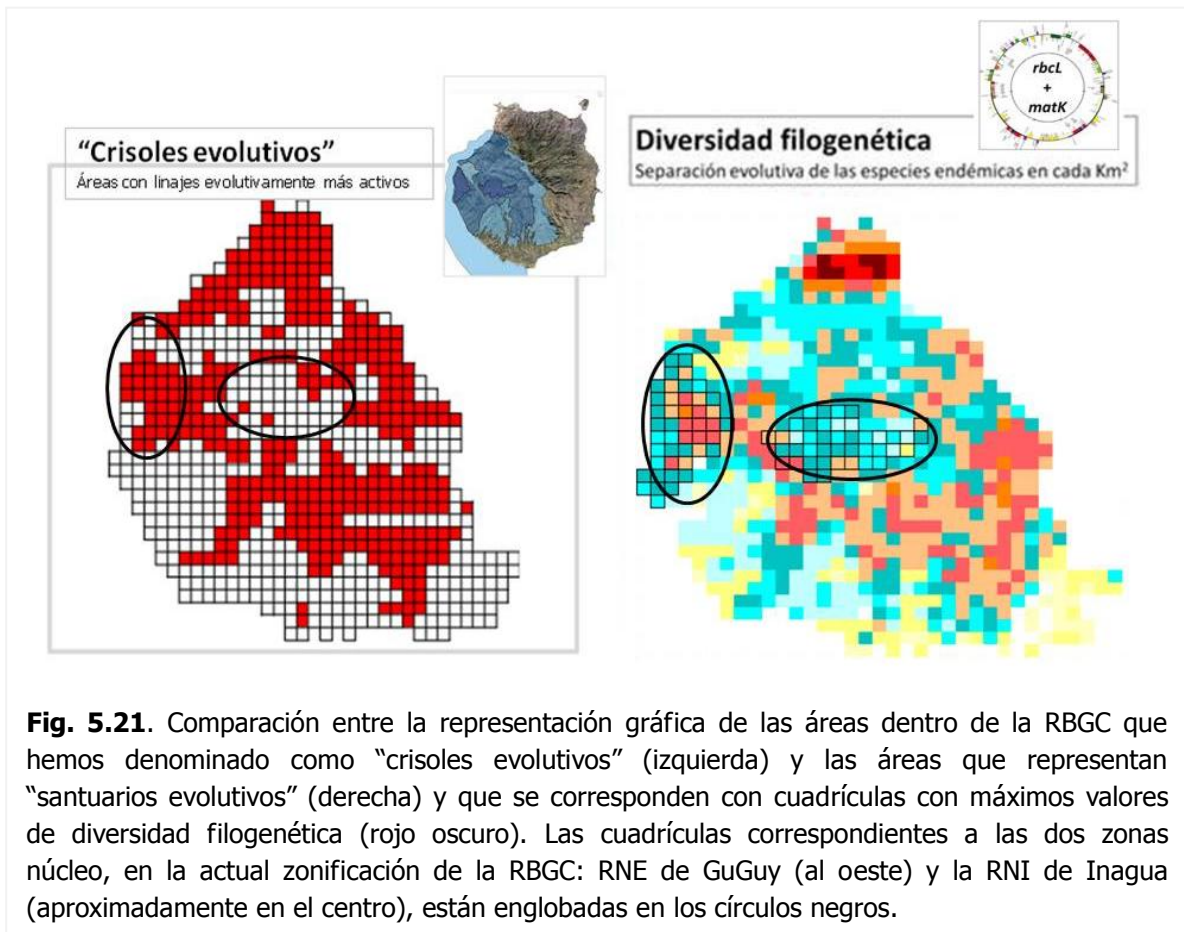
En la Figura 5.20 podemos ver como muchas de estas áreas "calientes" de especiación de la RBGC se encuentran en la zona norte (PN de Tamadaba), en el este (Artenara y Tejeda) y en el sureste (PR del Nublo, PN de Pílancones) y dentro de la RNE

de GuGuy, mientras que sólo unas pocas quedarían dentro de la zona centro que se corresponde con la RNI de Inagua.



De hecho, la Figura 5.20 ilustra como muchas de estas zonas que hemos denominado "crisoles evolutivos" y, que según este criterio, merecían especial atención conservacionista, se encuentran fuera de las actuales zonas núcleo de la RBGC, siendo la zona de transición dónde se encuentra el mayor porcentaje de áreas evolutivamente "calientes".

Por otro lado, si comparamos las áreas dentro de la RBGC con mayor acumulación de PD ("santuarios evolutivos") con las áreas con mayor acumulación de linajes evolutivamente más dinámicos ("crisoles evolutivos") (Fig. 5.21) vemos como el norte de la RBGC es claramente una zona de interés conservacionista porque estaría representando a la vez "un crisol y un santuario evolutivo".



**Fig. 5.21.** Comparación entre la representación gráfica de las áreas dentro de la RBGC que hemos denominado como "crisoles evolutivos" (izquierda) y las áreas que representan "santuarios evolutivos" (derecha) y que se corresponden con cuadrículas con máximos valores de diversidad filogenética (rojo oscuro). Las cuadrículas correspondientes a las dos zonas núcleo, en la actual zonificación de la RBGC: RNE de GuGuy (al oeste) y la RNI de Inagua (aproximadamente en el centro), están englobadas en los círculos negros.

Como hemos mencionado previamente, preservar la máxima diversidad evolutiva que caracteriza a un territorio, es decir áreas con máximos valores de PD, está reconocida como una de las prioridades en la conservación de la naturaleza (ver por ejemplo Forest *et al.* 2007), pero, en un contexto de cambio climático, es también fundamental

favorecer la aparición de nuevos taxones, pues éstos tendrán más capacidad de adaptarse y, por lo tanto, de sobrevivir.

## **5.6 IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN Y LA GESTIÓN DE LA BIODIVERSIDAD VEGETAL DE LA RBGC**

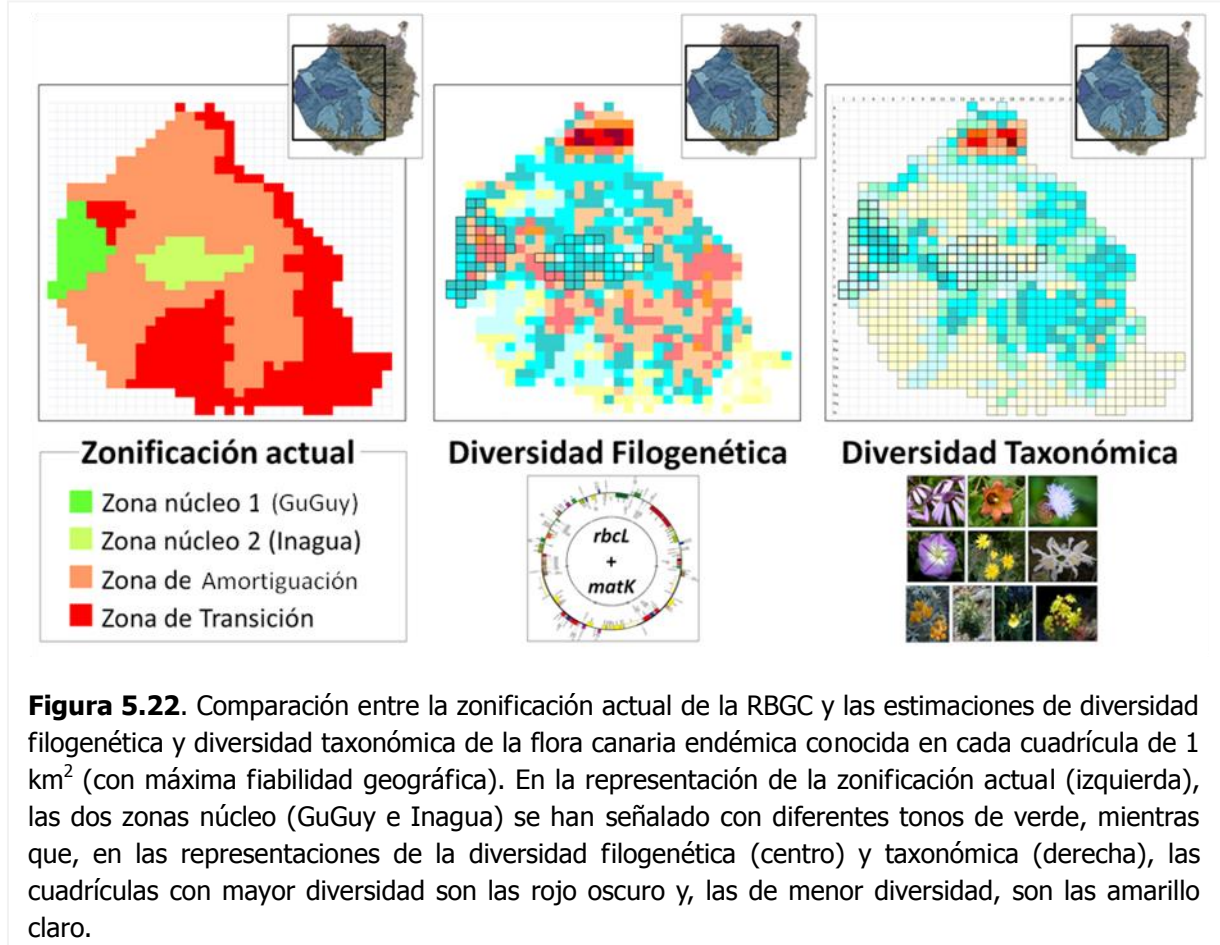
El concepto de biodiversidad no solamente se refiere al número de especies que habitan un territorio en un momento determinado, sino también (entre otros aspectos) a las relaciones genéticas entre ellas. En consecuencia, disponer de aproximaciones metodológicas e índices que nos permitan cuantificarla de una forma más rigurosa es cada vez más importante para resolver problemas relativos a su conservación (Vane-Wright *et al.* 1991). Debido a que los distintos niveles de diversidad (concentración de endemismos, riqueza de especies, rareza, diversidad funcional, diversidad genética, diversidad filogenética) no se distribuyen de igual manera en las diferentes áreas del mundo, a la hora de identificar las áreas que alojan la mayor diversidad de un territorio, se precisan parámetros que combinen información a distintos niveles (Crain & White 2011, Collen *et al.* 2011, Pio *et al.* 2011).

Nuestros resultados, sugieren que la conservación exclusivamente de zonas ricas en especies no implica la conservación de otros aspectos de la biodiversidad, en particular, de la diversidad filogenética. Purvis & Héctor (2000) hacen una reflexión similar al apuntar que la biodiversidad no puede quedar reducida a un número, o a una única variable (riqueza de especies) aunque muchas veces sea lo que los gestores demandan. El estudio de la biodiversidad se está convirtiendo en una tarea cada más amplia, requiriendo cada vez más datos y de análisis más ambiciosos.

Por todo lo dicho, nuestras estimaciones que correlacionan la información sobre el número de especies de la flora canaria endémica distribuidas en las distintas cuadrículas de la RBGC (diversidad taxonómica) con la información sobre su historia evolutiva (diversidad filogenética), nos van a permitir identificar qué áreas dentro de este territorio son susceptibles de merecer la máxima protección. Así, a continuación vamos a mostrar las diferencias detectadas en la distribución de los valores promedio a nivel taxonómico y filogenético obtenidos según las zonas actuales en las que se divide la RBGC y discutiremos las implicaciones que estos resultados pueden tener.

Considerando la zonificación actual de la RBGC (representada a la izquierda de la Fig. 5.22 y Fig. 5.23) y los *test* de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis 1952) realizados para comprobar las diferencias de magnitud entre la diversidad filogenética y taxonómica de las zonas núcleo respecto a las zonas de amortiguación y zona de transición, constatamos que la RNE de GuGuy ostenta valores promedio de PD más elevados que las otras zonas, aunque los de la TD son estadísticamente indiferenciables de los de la zona de amortiguación, que es muchísimo más extensa (en naranja en la Fig. 5.22 y 5.23).

Por otro lado, los valores promedio de TD en la RNI de Inagua son los más bajos de los obtenidos en el territorio de la RBGC, como se percibe gráficamente y según indican los test estadísticos en la Figura 5.23 (centro). Únicamente los valores de PD de la RNI de Inagua (2.392,5) son estadísticamente comparables a los de GuGuy y la zona de amortiguación (2.494,8 y 2.850,2, respectivamente), aunque siguen siendo considerablemente inferiores.

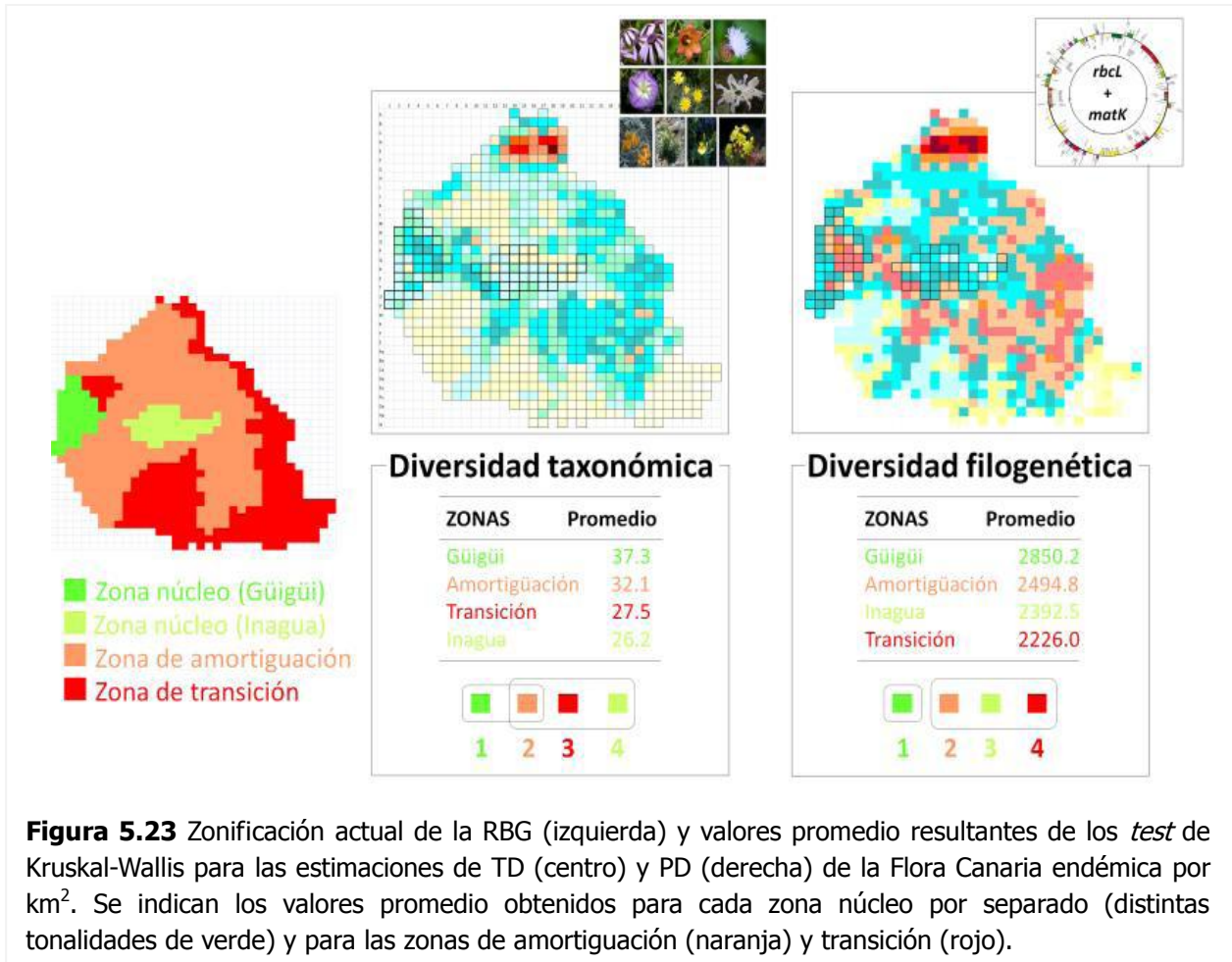


**Figura 5.22.** Comparación entre la zonificación actual de la RBGC y las estimaciones de diversidad filogenética y diversidad taxonómica de la flora canaria endémica conocida en cada cuadrícula de 1 km<sup>2</sup> (con máxima fiabilidad geográfica). En la representación de la zonificación actual (izquierda), las dos zonas núcleo (GuGuy e Inagua) se han señalado con diferentes tonos de verde, mientras que, en las representaciones de la diversidad filogenética (centro) y taxonómica (derecha), las cuadrículas con mayor diversidad son las rojo oscuro y, las de menor diversidad, son las amarillo claro.

Por lo tanto, los resultados de los *test* de Kruskal-Wallis (Fig. 5.23) indican que, tanto a nivel taxonómico como filogenético, la zona de amortiguación contiene como promedio tanta diversidad como una de las zonas núcleo (RNE de GuGuy), y mucha mayor diversidad que la otra zona núcleo actual (RNI de Inagua).

Al comparar la zonificación actual de la RBGC con nuestras estimaciones de TD y PD podemos ver cómo las zonas núcleo (que deben englobar los ecosistemas menos perturbados y que mejor representen los valores naturales de la RBGC) no contienen las cuadrículas con los valores más altos de diversidad asociados a la flora terrestre.

Como ilustra la Fig. 5.23, las zonas con mayor diversidad florística en sentido amplio se encuentran en la zona norte de la RBGC.

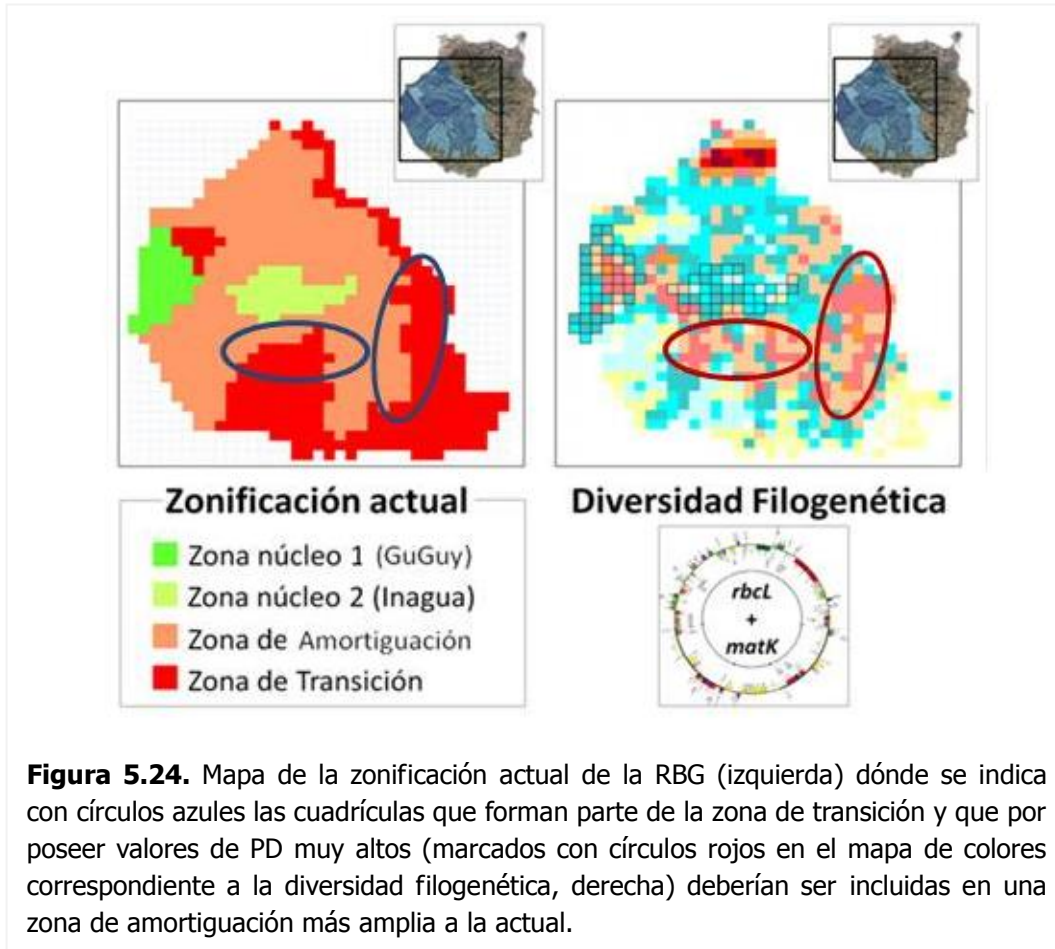


Además, la distribución geográfica de los valores de PD (Fig. 5.24) muestra que existen cuadrículas a lo largo de la vertiente Sureste de la RBGC (dentro de las actuales zonas de Amortiguación y Transición), con valores considerablemente más elevados que los de las cuadrículas de las zonas núcleo (principalmente en la RNI de Inagua)

Estos resultados sugieren que cabría considerar una posible ampliación de la zona de Amortiguación que incluyera a dichas cuadrículas al noreste y sureste y que se corresponden con parte de la zona de Transición de la actual RBGC (ver Fig. 5.25).



En general, estos resultados implican que la zonificación actual de la RBGC no refleja los más destacables valores naturales referidos a su biodiversidad vegetal terrestre endémica.



No obstante, es necesario matizar que en ningún momento se está cuestionando la consideración de la RNE de GuGuy y la RNI de Inagua como zonas núcleo de la RBGC, ya que además de poseer niveles de PD y TD muy elevados en promedio, albergan otros extraordinarios "valores naturales" que no se correlacionan con la PD ni con la TD. De hecho, no podemos olvidar que ambas zonas ya estaban dentro de áreas protegidas (reservas naturales) antes de su consideración como zonas núcleo en el momento que



se estableció la zonificación actual de la RBGC. Así, la RNI de Inagua tiene varias cabeceras de barrancos (Mulato, Mogán, etc.) con un papel fundamental en la recarga hídrica subterránea o la conservación del suelo de la isla, y es el hábitat preferente del pinzón azul (*Fringilla teydea subsp. polatzeki*), además está integrada por los pinares secos naturales mejor conservados de la isla, albergando numerosos endemismos tanto animales como vegetales. Por otro lado, la RNE de GuGuy cuenta con paisajes geológicos de muy alta singularidad y en excelente estado de conservación.

Finalmente, debe tenerse en cuenta que cuando se elaboró la propuesta que sustentó la declaración de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (el 29 de junio de 2005, por la Mesa del Consejo Internacional del MaB) no se disponía de información molecular tan precisa como la que presentamos en esta tesis.

Si consideramos que la diversidad florística de un territorio es un importante valor natural, y teniendo en cuenta las ventajas comentadas de los datos moleculares para evidenciar aspectos cuantitativos sobre la biodiversidad presente en un territorio, los resultados de este capítulo de la tesis abren la posibilidad de replantear la zonificación actual de la RBGC. En efecto, la distribución geográfica de los valores de TD y PD obtenidos para la flora endémica de la RBGC indica que la parte norte, que correspondería orientativamente a gran parte del Parque Natural de Tamadaba y al Andén Verde, podría constituir una tercera zona núcleo. De esta forma, los más destacables valores naturales florísticos y filogenéticos quedarían representados junto con los de otra índole dentro de las zonas de máxima protección de la RBGC.

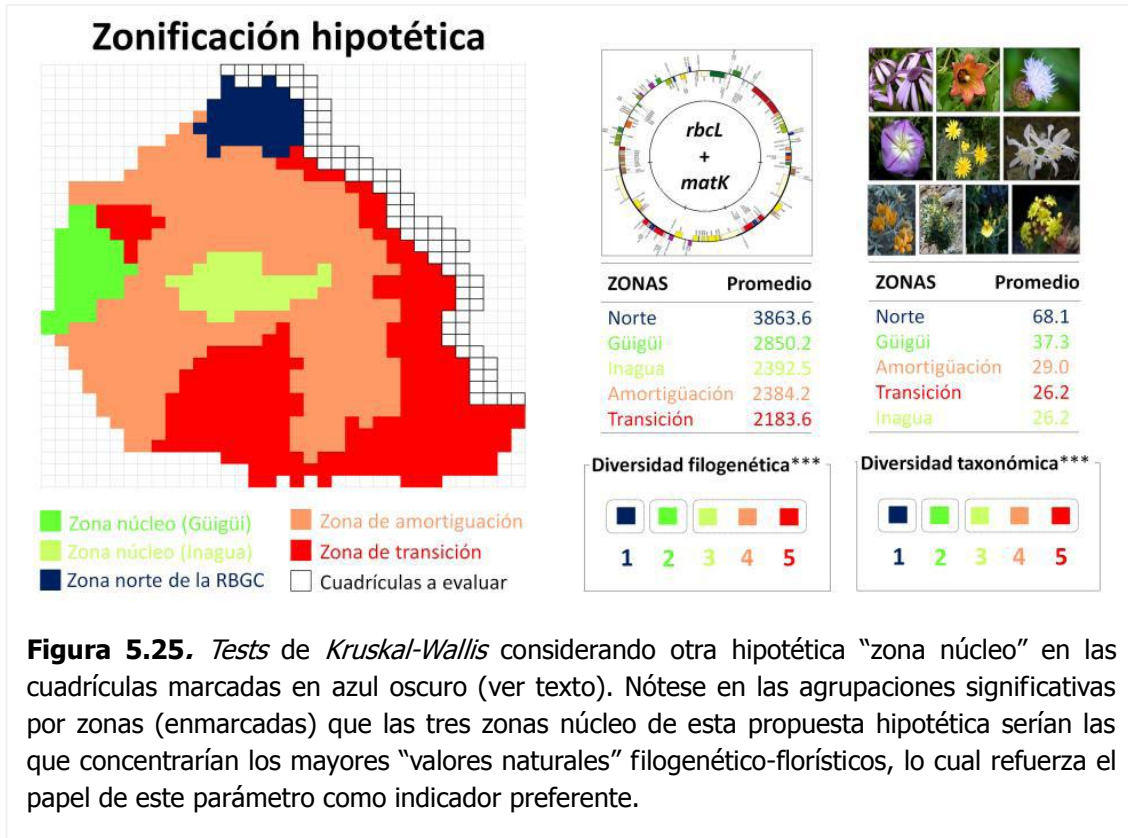
Siguiendo los mismos principios, y debido a que a lo largo de la actual zona de Transición (vertiente este de la actual RBGC) existen cuadrículas con valores

considerablemente elevados de PD y TD (Fig. 5.24, rodeadas de círculos de color), cabría también la posibilidad de ampliar la zona de Amortiguación de forma que incluyera esas cuadrículas de la actual zona de Transición con mayores valores de PD.

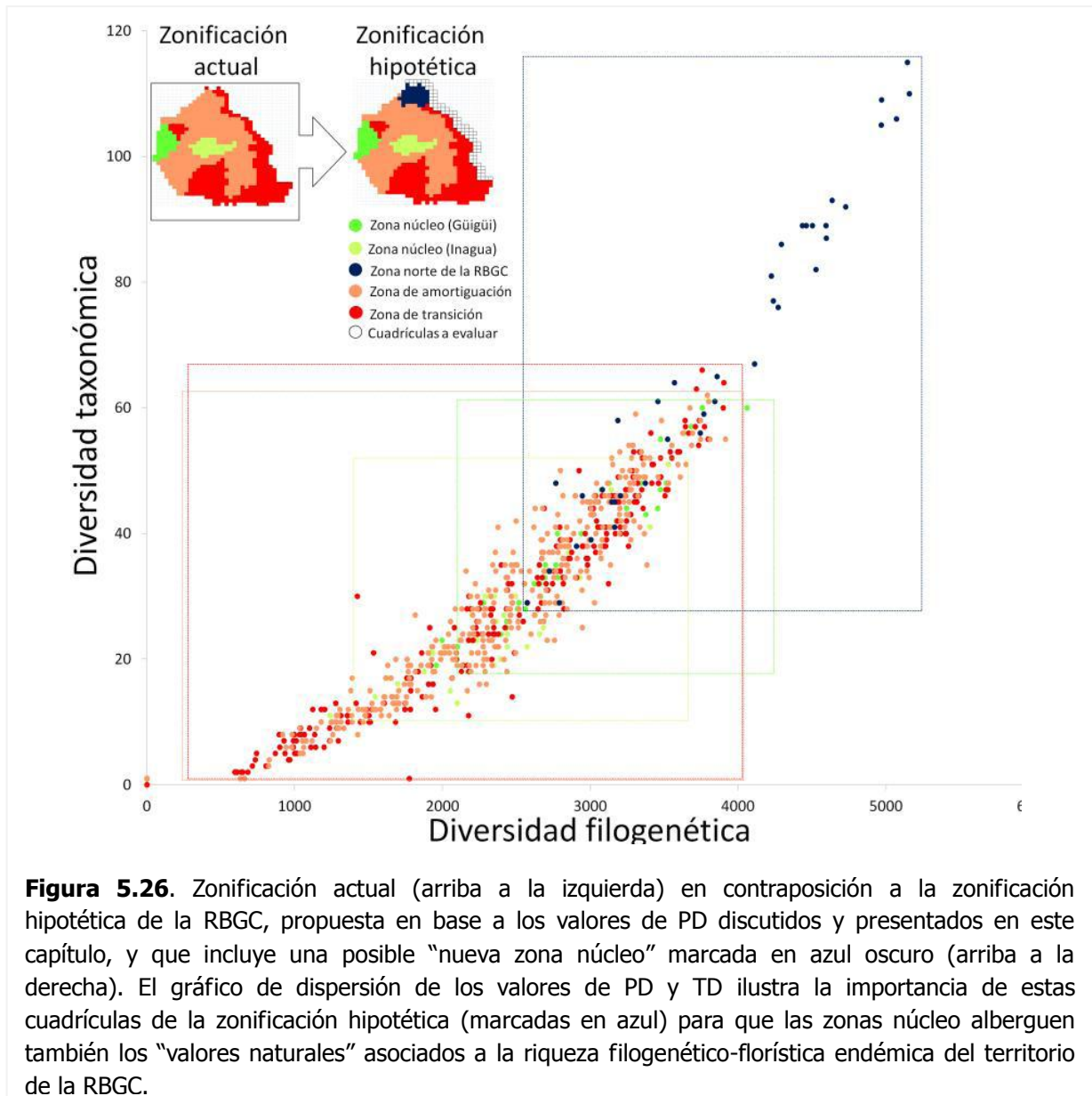
Por lo tanto, como se ha discutido a lo largo de este capítulo, disponemos de datos suficientemente robustos como para proponer:

a) el aumento a tres del número de zonas núcleo, para que éstas representen también la máxima riqueza vegetal endémica de la RBGC, y

b) la reconsideración de las dimensiones de las zonas de amortiguación y de transición, de forma que la primera incluya las cuadrículas colindantes a sus límites actuales y, que mostraron valores de PD y TD elevados, pero que en la actual zonificación están incluidas en la zona de transición.



En la Figura 5.25 mostramos un escenario hipotético dónde se representan (en azul intenso), las cuadrículas que corresponderían a la posible zona núcleo nueva y, que orientativamente, englobaría a gran parte del Parque Natural de Tamadaba y Andén Verde.



**Figura 5.26.** Zonificación actual (arriba a la izquierda) en contraposición a la zonificación hipotética de la RBGC, propuesta en base a los valores de PD discutidos y presentados en este capítulo, y que incluye una posible "nueva zona núcleo" marcada en azul oscuro (arriba a la derecha). El gráfico de dispersión de los valores de PD y TD ilustra la importancia de estas cuadrículas de la zonificación hipotética (marcadas en azul) para que las zonas núcleo alberguen también los "valores naturales" asociados a la riqueza filogenético-florística endémica del territorio de la RBGC.

Por descontado, estas propuestas basadas en datos moleculares (Fig. 5.25 y 5.26) y sus posibles repercusiones deben ser discutidas en el Comité Científico de la RBGC

antes de su eventual aplicación. Además, cualquier iniciativa sobre la zonificación del territorio de la RBGC debe implicar la participación de los diferentes actores políticos, sociales o económicos que intervienen en sus otros órganos estructurales de gestión: el Consejo de participación ciudadana y en el Consejo Rector.

Considerando estos resultados conjuntamente, sostenemos que las variables moleculares pueden aportar información valiosa (diversidad filogenética y diversidad genética) con aplicaciones muy directas en la conservación y gestión eficaz de cada una de las especies que habitan un territorio.

Aún así, debemos tener en cuenta que, en el futuro, se podrá tener aún un conocimiento más completo de la biodiversidad presente en la RBGC, pues su abrupta orografía hace que todavía existan áreas insuficientemente conocidas (p. ej., zonas del oeste). Es necesario pues incrementar la exploración y el seguimiento del territorio de Gran Canaria, pues algunas de las cuadrículas, ya analizadas, podrían contener más taxones endémicos que los que aparecen en el Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias. Un ejemplo reciente de que el aumento de la exploración en la RBGC puede llevar al hallazgo de nuevas especies, es el de la cueva de la montaña de Aslobas, entre los barrancos de Tasarte y Tasartico. Aunque este macizo montañoso está dentro de la RBGC se encuentra en una zona que había sido poco investigada. Gracias al proyecto "Un mundo escondido: fauna hipogea de la RBGC", investigadores de la Sociedad Entomológica Canaria Melansis, han descubierto en este tubo volcánico, el más antiguo del archipiélago canario, la presencia de dos nuevas especies de invertebrados cavernícolas: *Symploce* sp. n. (una variedad de la pequeña cucaracha subterránea de Gran Canaria) y un artrópodo de la familia de la cochinilla (Naranjo & Martín 2014).

## 5.7. BIBLIOGRAFÍA

- Anacker BL, Harrison S (2012) Historical and ecological controls on phylogenetic diversity in Californian plant communities. *American Naturalist* 180, 257-269.
- Angiosperm Phylogeny Group III: Bremen B, Bremer K, Chase MW, *et al.* (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 105–121.
- Arechavaleta M, Rodríguez S, Zurita N & García A (coord.) (2010). *Lista de especies silvestres de Canarias. Hongos, plantas y animales terrestres*. 2009. Gobierno de Canarias, 579 pp.
- Caujapé-Castells J (2011) Jesters, red queens, boomerangs and surfers: a molecular outlook on the Canarian endemic flora. En: Bramwell D & Caujapé-Castells J (eds.) *The Biology of Islands Floras*, Chap.12. Cambridge University Press, UK, pp. 284-324.
- Caujapé-Castells J, Jaén Molina R, Cabrera-García N (2006) El Banco de ADN de La Flora Canaria: Creación, Progresos y Líneas Futuras de Desarrollo. *Botánica Macaronésica* 26, 3–16.
- Caujapé-Castells J, Jaén-Molina R, Cabrera N, *et al.* (2011) Manual del Banco de ADN de la Flora Canaria. Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN, Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"-Unidad Asociada- CSIC, Cabildo de Gran Canaria. Available from <http://www.bioclimac.com/mbdna/index.php/dnabank/documentation/dna-bank-lab-manual> )
- Caujapé-Castells J, Jaén-Molina R, García-Verdugo de Lucas C, *et al.* (2013) The phylogenetic diversity of the terrestrial endemic flora in the Biosphere Reserve of Gran Canaria: first results, future prospects. En: Best practices of island and coastal biosphere reserves. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> meeting of the world network of island and coastal biosphere reserves*. Jeju-do, South Korea, pp. 81-93
- Caujapé-Castells J, Jaén-Molina R, García-Verdugo de Lucas C, *et al.* (2013a) Using Phylogenetic Diversity as a baseline indicator to propose conservation priorities for the flora in the Biosphere Reserve of Gran Canaria. En: *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> meeting of the world network of island and coastal biosphere reserves*. Hiiumaa and Saaremaa, Estonia, pp. 119-125.
- Cayley A (1877-8) On the theory of groups. *Proceedings of the London Mathematical Society* 9, 126-133.
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106, 12794–12797.
- Crain B, White J (2011) Categorizing locally rare plant taxa for conservation status. *Biodiversity and Conservation* 20, 451–463.
- Collen B, Turvey ST, Waterman C, *et al.* (2011) Investing in evolutionary history: implementing a phylogenetic approach for mammal conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 366, 2611–2622.
- de la Cruz López S (2012) Listados de la distribución espacial de la flora endémica terrestre de la Reserva de Biosfera de Gran Canaria, en cuadrículas de 1x1 km y 0.5x0.5 km. Informe técnico. Fundación Amurga, 20 pp.

- Devictor V, Mouillot D, Meynard C, *et al.* (2010) Spatial mismatch and congruence between taxonomic, phylogenetic and functional diversity: the need for integrative conservation strategies in a changing world. *Ecology Letters* 13, 1030–40.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, *et al.* (2011) Geneious Pro 5.6.2. Available from <http://www.geneious.com/>.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797.
- Faith DP (1992) Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation* 61, 1–10.
- Forest F, Grenyer R, Rouget M, *et al.* (2007). Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. *Nature* 445, 757–760.
- Gobierno de Canarias (2012) Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias. Atlantis 3.0. (<http://www.biodiversidadcanarias.es/atlantis/common/index.jsf>)
- Graham CH, Fine PV A (2008) Phylogenetic beta diversity: linking ecological and evolutionary processes across space in time. *Ecology Letters* 11, 1265–1277.
- Hadley M, Coghlan P, Fabbri I, Arico S (2002) Biosphere reserves: special places for people and nature. En: Hadley M (ed.) *Man and the biosphere series. Environment and Development - Man and the Biosphere*, U.S. National Committee for Man and the Biosphere. Unesco, pp. 208.
- Iriondo JM (coord.) (2011). Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España. Manual de metodología del trabajo corológico y demográfico. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino)-Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. Madrid, 70 pp.
- Jaén-Molina R, Marrero-Rodríguez A, Reyes-Betancort JA, *et al.* (2010) La flora endémica del Parque Nacional de Garajonay bajo la perspectiva molecular: las secuencias de ADN como herramienta en la identificación taxonómica. En: Ramírez Sanz L & Asensio Nistal B (eds.) *Proyectos de investigación en parques nacionales. 2006-2009*. Organismos de Parques Nacionales, España, pp. 249-273
- Jaén-Molina R, García-Verdugo C, de la Cruz S, *et al.* (2013). La Diversidad Filogenética: un instrumento de conservación y gestión de la flora de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria. En: Grupo BRES. Biología y Ecología de Briófitos y Espermatófitos. Universidad de Murcia (eds.) *Libro de Resúmenes del 6º Congreso de Biología de la Conservación de Plantas*, Murcia, pp. 20.
- Jaén-Molina R, García-Verdugo C, Olangua-Corral M, *et al.* (2014a). La diversidad filogenética de la flora como herramienta para contribuir al manejo y conservación de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria. *Programa del III Congreso de Ciencia en Jardines Botánicos* (Del 1 al 4 de abril de 2014) Iltmo. Gabinete Literario de las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, España.
- Jaén-Molina R, Marrero-Rodríguez A, Reyes-Betancort A, *et al.* (2014) "Molecular taxonomic identification in the absence of a "barcoding gap": a test with the endemic flora of the Canary oceanic hotspot. *Molecular Ecology Resources*, doi:10.1111/1755-0998.12292
- Janzen DH, Hallwachs W, Blandin P, *et al.* (2009) Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources* 9, 1–26.

- Jiménez Suárez J (2006): *Gran Canaria Reserva de la Biosfera*. Cabildo Insular de Gran Canaria.
- Kress WJ, Erickson DL, Jones FA, *et al.* (2009) Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106, 18621–18626.
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47, 260, 583–621.
- Mace GM, Gittleman JL, Purvis A (2003). Preserving the tree of life. *Science* 300, 5626, 1707–1709.
- Mann HB, Whitney DR (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* 18, 50–60.
- May RM (1990) Taxonomy as destiny. *Nature* 347, 129–130.
- Minh BQ, Klaere S, von Haeseler A (2006) Phylogenetic diversity within seconds. *Systematic Biology* 55, 769–773.
- Montelongo Parada V (coord.) (2006) Gran Canaria Reserva de la Biosfera. *Cabildo de Gran Canaria*, Área de Medio Ambiente, 16 pp.
- Montelongo Parada V (2007) La Reserva de Biosfera de Gran Canaria. *Ciencias de La Naturaleza. Anuario de Estudios Atlánticos*, Madrid-Las Palmas, núm. 53, pp. 565-614.
- Moreno JC (coord.) (2008). Lista Roja 2008 de la flora vascular española. *Dirección General de Medio Natural y Política Forestal*. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas, Madrid, 86 pp.
- Mouillot D, Graham NAJ, Villéger S, *et al.* (2013) A functional approach reveals community responses to disturbances. *Trends in Ecology and Evolution* 28, 167–177.
- Müller E, Karez C (1998). Las reservas de biosfera, la conservación de la biodiversidad y el desarrollo local. Trabajo presentado en la reunión del Corredor Biológico de las Américas – Ecoaméricas, Salta, Argentina.
- Naranjo M, Martín S (2014) Cuevas de Aslobas, el Origen. En: Naranjo M, Martín S, Fernández O (eds.) *De Aslobas a Fataga - Viaje al subsuelo de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria*. SEC-Melansis, pp. 10-22.
- Pio DV, Broennimann O, Barraclough TG (2011) Spatial Predictions of Phylogenetic Diversity in Conservation Decision Making. *Conservation Biology* 25, 1229–1239.
- Purvis A, Hector A (2000) Getting the measure of biodiversity. *Nature* 405 (6783), 212-9.
- Reyes-Betancort JA, Santos Guerra A, Guma IR, *et al.* (2008) Diversity, rarity and the evolution and conservation of the Canary Islands endemic flora. *Anales Jardín Botánico de Madrid* 65 (1), 25-45.
- Sánchez de Dios R, Cabal Ruano C, Sainz Ollero H, *et al.* (2013) Áreas importantes para la Flora Vascular Española. En: Grupo BRES. Biología y Ecología de Briófitos y Espermatófitos. Universidad de Murcia (eds.) *Libro de Resúmenes del 6º Congreso de Biología de la Conservación de Plantas*, Murcia, pp. 36.
- Schaefer H (2011) A phylogeny for the Macaronesian flora and how we can use it to predict potential invaders and identify hotspots of genetic diversity. En: Caujapé-Castells J,

- Nieto-Feliner G, Fernández-Palacios JM (eds.) *Proceedings of the Amurga International Conferences on Island Biodiversity*, pp. 220-226. Las Palmas de Gran Canaria.
- Swofford DL (2003) PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- UNESCO/MaB (1996) Reservas de biosfera. La Estrategia de Sevilla y el Marco Estatutario de la Red Mundial. París. UNESCO, pp 20.
- Vane-Wright RI, Humphries CJ, Williams PH (1991) What to protect? Systematics and the agony of choice. *Biological Conservation* 55, 235–254.
- Winter M, Devictor V, Schweiger O (2013) Phylogenetic diversity and nature conservation: where are we? *Trends in Ecology and Evolution* 10.1016/j.tree.2012.10.015





## ***Capítulo 6.*** Conclusiones generales/ Main conclusions

---

## Conclusiones generales

### -SOBRE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE "DNA BARCODING" EN LA IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA FLORA CANARIA

- A pesar de la gran incidencia de fenómenos inherentes a las islas oceánicas (radiación y/o hibridación), que suponen un reto para los "códigos de barras", se han obtenido unos porcentajes de éxito en la identificación de angiospermas (sin ningún conflicto taxonómico), tanto endémicas de Canarias (75,38%) como de Macaronesia (82,29 %), superiores a los alcanzados en otras floras de regiones no oceánicas del planeta.

- El único criterio molecular complementario a la morfología que proporciona resolución suficiente para la identificación taxonómica de las especies de angiospermas de la flora canaria es el basado en caracteres diagnóstico (con *matK+rbcl*), aunque en algunos linajes la discriminación molecular sea más propicia que en otros.

- La eficiencia de las regiones *rbcl* y *matK* en la identificación molecular de la flora canaria se corroboró con los altos niveles de diagnóstico molecular alcanzados para los endemismos de la RBGC analizados. Los únicos géneros para los que no se detectaron caracteres con valor diagnóstico (*Argyranthemum*, *Sonchus* y *Micromeria*) pertenecen a linajes de especiación reciente o en los que ha habido hibridación.

- Nuestros resultados refuerzan la necesaria complementariedad de las variables morfológicas y moleculares para la caracterización taxonómica de la flora canaria endémica.

- Nuestras estimaciones de porcentajes de éxito en la discriminación tienen que ser consideradas provisionales; la adición de nuevas muestras a nuestro conjunto de datos puede o bien reducir el número de caracteres diagnóstico por especie (llevando, en última instancia, a una reducción de nuestro porcentaje de éxito en algunas comparaciones) o, en otros casos, revelar potenciales especies crípticas.

- La existencia de un "DNA barcoding gap" no es un requisito necesario para la correcta caracterización molecular de la flora canaria, de manera similar que en otros organismos y contextos geográficos.

- Las dificultades técnicas encontradas en la amplificación de *matK* representan un incumplimiento claro de la universalidad subyacente a la definición de "código de barras molecular". Sin embargo, en nuestra muestra de angiospermas, *matK* resolvió muchos más casos y detectó muchos más caracteres diagnóstico que *rbcl*. Por lo tanto, todos los esfuerzos hacia la mejora de la universalidad en la amplificación de *matK* son muy necesarios.

- A pesar de la alta tasa de éxito en la discriminación obtenida con sólo las dos regiones "código de barras", se necesitan otras regiones adicionales para resolver el aproximadamente 20% de los casos, para los que no encontramos caracteres diagnósticos.

- Dado que *matK* y *rbcL* son marcadores plastidiales y, por lo tanto, dan información de la misma historia evolutiva se recomienda su combinación con otras regiones del ADN nuclear para aumentar el porcentaje de éxito en la identificación de las plantas endémicas canarias.

- La complementación entre los identificadores moleculares suministrados por las regiones *matK* y *rbcL* y los caracteres morfológicos debe facilitar la elaboración de censos más precisos de las angiospermas canarias, como base para desarrollar futuras acciones estratégicas de gestión y conservación de la flora de este archipiélago.

#### -SOBRE LA DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE LA FLORA ENDÉMICA DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE GRAN CANARIA

- La diversidad filogenética (PD) es un indicador cuantitativo, reproducible y fiable que nos proporciona información comparativa que puede ser de valor instrumental para la conservación o gestión de la rica biodiversidad vegetal endémica de la RBGC.

- La protección de áreas con máximos valores de PD y por tanto, representativas de procesos evolutivos asociados a la flora canaria endémica, es la mejor estrategia para garantizar la supervivencia de los endemismos vegetales canarios presentes en la RBGC, frente a los cambios globales actuales.

- La detección y la protección de "crisoles evolutivos" (áreas evolutivamente activas) puede ser importante para estrategias de protección de hábitats, ya que en ellos, se favorecen procesos biológicos que podrían dar lugar a la aparición de nuevos endemismos o eventos de radiación en el futuro.

- Los valores más elevados de PD y TD asociados a la flora canaria endémica de la RBGC, no se detectaron en las cuadrículas pertenecientes a las dos zonas núcleo de su actual zonificación. Por ello, para representar la máxima diversidad filogenética y taxonómica asociada a su flora endémica, proponemos incluir una tercera zona núcleo (que abarcaría gran parte del Parque Natural de Tamadaba y del Andén Verde) y una ampliación de la actual zona de amortiguación, para que incluyera las cuadrículas con elevados valores de PD, situadas al noreste y sureste, de la actual RBGC.

- El incremento de la exploración del territorio de la RBGC, en particular, y de Gran Canaria, en general, especialmente en las zonas más abruptas es fundamental, ya que algunas de las cuadrículas analizadas en esta tesis podrían contener más taxones endémicos que los conocidos y descritos en la actualidad.

### Main conclusions

#### - ON THE APPLICABILITY OF "DNA BARCODING" FOR THE IDENTIFICATION OF THE ENDEMIC CANARIAN FLORA

➤ Despite the high incidence of phenomena inherent to oceanic islands (radiation and/or hybridization) that posed a challenge to "DNA barcoding", our proportions of success in the identification of either the Canarian (75.38%) and Macaronesian (82.29%) endemic angiosperm taxa (with no taxonomic conflict), are above the obtained in floras of non-oceanic regions of the world.

➤ Only a character-based discrimination criterion (with *matK+rbcl*) provides the most useful approach to complement morphology in the taxonomical identification of the Canarian endemic angiosperms, although in some lineages molecular discrimination is more promising than in others.

➤ The efficiency of the regions *rbcl* and *matK* in the molecular identification of the Canarian flora was supported by the high levels achieved for the molecular diagnosis of the endemic plants from the RBGC analyzed. The only genera for which, we did not detect diagnostic characters (*Argyranthemum*, *Sonchus* and *Micromeria*) belong to lineages of recent speciation or for which hybridization may have occurred.

➤ Our results reinforce the necessary complementarity of morphological and molecular variables for the taxonomic characterization of the Canarian endemic flora.

- Our estimates of success in the discrimination have to be considered tentative; the addition of new samples to our dataset may either, reduce the number of diagnostic characters per species (leading, ultimately, to a decrease in our success percentage in some comparisons) or, in other cases, reveal putative cryptic species.
  
- A “DNA barcoding gap” is not a necessary prerequisite for the correct molecular identification of the Canarian flora, similarly, as found in other organisms and geographical contexts.
  
- The technical difficulties found in the amplification of *matK* represent a glaring breach of the universality requisite underlying “DNA barcoding”. However, in our sampling of angiosperms, *matK* clearly resolved many more cases, and offered many more diagnostic characters than *rbcL*. Therefore, we believe that, every effort towards the improvement of *matK*'s amplification universality is greatly needed.
  
- Despite the high discrimination success rate obtained with only the two DNA barcode regions, additional regions are needed to resolve the approximately 20% of cases, for which we did not find diagnostic characters.
  
- Since, *matK* and *rbcL* are plastidial markers and, therefore, both give information of the same evolutionary history it is recommended to combined them with other regions from the nuclear DNA, to increase the success rate in the identification of the Canarian endemic plants.



➤ The complementarity between molecular identifiers provided by *matK* and *rbcl* and, the morphological characters should facilitate the development of more accurate census of the Canarian angiosperms, as a base for developing future strategic actions of management and conservation of the flora of this archipelago.

- ON THE PHYLOGENETIC DIVERSITY OF THE ENDEMIC FLORA OF THE BIOSPHERE RESERVE OF GRAN CANARIA.

➤ The phylogenetic diversity (PD) is a quantitative, reproducible, and reliable indicator that provides comparative information that may be of instrumental value, for the conservation or management of the rich endemic plant biodiversity in the RBGC.

➤ The protection of areas with maximum PD values, and therefore, representative of evolutionary processes associated with the Canarian endemic flora is the best strategy to ensure the survival of the Canarian endemic plants, present in the RBGC, against the current global changes.

➤ The detection and protection of “evolutionary melting pots” (evolutionary active areas) may be important for habitat conservation strategies, because in them, speciation processes that could lead to new endemic species or radiation events in the future, are favoured.

➤ The highest PD and TD values of the Canarian endemic flora, per quadrat of the RBGC, were not detected in either central zones of its current zonification. To include the maximum “phylogenetic and taxonomic diversity” associated with the RBGC’s endemic flora, as well as the natural values already represented in the current zonification it is necessary to incorporate a large area of Tamadaba’s Natural Park and Andén Verde as a third central zone, and also the enhancement of the buffer zone to include the quadrats with high PD values, at northeast and southeast, of its current limits.

➤ Increasing the exploration in the Biosphere Reserve, particularly, but also in Gran Canaria, in general, especially in the more abrupt areas is essential since some of the quadrats discussed in this thesis could contain more endemic taxa than the ones currently known and described.



# **ANEXOS**

---

**Capítulo 4**

**Anexo I: Tabla S1.** Taxones muestreados para este estudio con los números de entrada a *GenBank* para las secuencias generadas *de novo* (ver Demiurge, *D-DNASE* 89 y *D-DNASE* 90), los códigos del banco de ADN de la flora canaria (*DNA bank*-JBCVCSIC), las localidades donde se recolectó el material vegetal (las siglas corresponden a las islas G: la Gomera, P: La Palma, T: Tenerife, C: Gran Canaria, F: Fuerteventura; M: Madeira y Az: Azores). Se indican los códigos de los pliegos depositados en los herbarios LPA (JBCVCSIC) y ORT (JAO).

<b>GenBank (<i>rbcl</i>/<i>matK</i>)</b>	<b>Taxones</b>	<b>Localidades</b>	<b>Islas</b>	<b>Pliegos</b>	<b>DNA bank</b>
KJ595589-90/ KJ747635-36	<i>Apollonias barbujana</i> * (Cav.) Bornm.	Hermigua	G	LPA 23442-23446	3952-53
KJ595591-92/ KJ747637-38	<i>Apollonias ceballosii</i> * Svent.	Vallehermoso	G	LPA 23347-23352	4000-01
KJ595594-95/ KJ747640-41	<i>Argyranthemum</i> + <i>broussonetii</i> (Pers.) Humphries ssp. <i>broussonetii</i> *	La Laguna	T	ORT 41138	5227
KJ595596-97/ KJ747642-43	<i>Argyranthemum broussonetii</i> ssp. <i>gomerensis</i> * Humphries	P.N.Garajonay	G	LPA 23200-23204	2555-56
KJ595598-99/ KJ747644-45	<i>Argyranthemum callichrysum</i> (Svent.) Humphries	P.N.Garajonay	G	ORT 41110, LPA 23119	3869,3907
KJ595600/ KJ747646	<i>Argyranthemum frutescens</i> (L.) Sch. Bip ssp. <i>pumilum</i> Humphries	Andén Verde	C	LPA s/n	13251
KJ595601-04/ KJ747647-50	<i>Asparagus fallax</i> * Svent.	Vallehermoso/Taganana	G/T	LPA 23247/ORT 41137	3886/5209
KJ595605-06/ KJ747651-52	<i>Bethencourtia rupicola</i> (B. Nord.) B. Nord.	Roque de la Zarcita	G	LPA 14678	2626-28
KJ595607-10/ KJ747653-56	<i>Bystropogon origanifolius</i> * L'Hér. var. <i>origanifolius</i>	Vallehermoso/Chío	G/T	LPA 23294/ ORT 41130	2549/5215
KJ595611-12/ KJ747657-58	<i>Bystropogon origanifolius</i> L'Hér. var. <i>palmensis</i>	Garafía	P	ORT 39047	5220
KJ595613-18/ KJ747659-64	<i>Carex perraudieriana</i> * Gay ex Bornm.	Vallehermoso/Los Tilos/Anaga	G/P/T	LPA 23257/ORT46136/ORT41140	3891/5223/5224
KJ595619-22/ KJ747665-68	<i>Chamaecytisus proliferus</i> (L.f.) Link ssp. <i>angustifolius</i> * (Kuntz) Kunk.	Roque de Agando/Las Cañadas	G/T	ORT 41129	3877/ 5214
KJ595623-24/ KJ747844-45	<i>Cistus chinamadensis</i> ssp. <i>gomeræ</i> * Bañares & P. Romero	Roque de Agando	G	LPA 23156-23158	3964-66

Tabla S1 (continuación-I)

<b>Genbank (<i>rbcl</i>/<i>matk</i>)</b>	<b>Taxones</b>	<b>Localidades</b>	<b>Islas</b>	<b>Pliegos</b>	<b>DNA bank</b>
KJ595625-26/ KJ747846-47	<i>Cistus chinamadensis</i> Bañares & P. Romero ssp. <i>chinamadensis</i> *	Anaga	T	ORT 39380	2584-86
KJ595627-28/ KJ747669-70	<i>Crambe</i> <sup>+</sup> <i>gomeræ</i> Webb ex Christ ssp. <i>gomeræ</i>	Los Roques	G	LPA 23275	2588,2589
KJ595629-30/ KJ747671-72	<i>Crambe santosii</i> Bramwell	Vallehermoso	G	LPA 23275, 23279-23280	2542-44
KJ595631-32/ KJ747673-74	<i>Crambe wildpretii</i> Prina & Bramwell	Lomo del Carretón	G	LPA 23131/ORT 41103	3872
KJ595633/ KJ747675	<i>Crambe sventenii</i> Pett. ex Barmwell & Sunding	Montaña de Los Cardones	F	ORT 25271	544
KJ595634-37/ KJ747676-79	<i>Erica canariensis</i> * Rivas-Mart. et al. in Rivas-Mart.	Bailadero/San José de Los Llanos	G/T	LPA 23159/ORT 41126	2579/5212
KJ595640-43/ KJ747682-85	<i>Erica platycodon</i> * (Webb & Berthel.) Rivas-Mart. et al.	Mirador del Rejo/Cabezo del Tejo	G/T	LPA 23539/ ORT 41128	3875/5213
KJ595644-45/ KJ747686-87	<i>Euphorbia</i> <sup>+</sup> <i>bourgeauana</i> * Gay ex Boiss. in DC.	Güímar	T	ORT 46126	5211
KJ595646-47/ KJ747688-89	<i>Euphorbia lambii</i> Svent.	Chorros de Epina	G	LPA 10247-10249	3876
KJ595648-51/ KJ747690-93	<i>Euphorbia mellifera</i> * Aiton var. <i>canariensis</i> Boiss.	Agulo/Cabezo del Tejo	G/T	LPA 23209-23210/ORT 46134	3906/5228
KJ595653-58/ KJ747695-700	<i>Festuca agustini</i> * Linding.	Roque de Agando/Güímar/ Guayedra	G/T/C	ORT 39253/ORT 46124	3882/5217/1321
KJ595659-62/ KJ747701-04	<i>Galium scabrum</i> * L.	Roque de Agando/Monte Pulpito	G/T	ORT 41108/ORT 41160	5226/3885
KJ595663-66/ KJ747705-08	<i>Geranium reuteri</i> * Aedo & Muñoz-Garm.	Chorros de Epina/Cabezo del Tejo	G/T	LPA 23361/ORT 41139	3878/5225
KJ595667-70/ KJ747709-12	<i>Greenovia diplocycla</i> * Webb ex Bolle	Roque de Agando/Barranco Dolores	G/P	ORT 33920/ORT 46123	3874/5218
KJ595671/ KJ7477	<i>Greenovia aurea</i> (C. Sm. ex Hornem.) Webb & Berthel.	Barranco Oscuro	C	LPA 13308-13309	1366
KJ595672-75/ KJ747713-16	<i>Heberdenia excelsa</i> * (Aiton) Banks ex DC.	Valle de Gran Rey/ Teno	G/T	LPA 23321/ORT 42933	3942/3705
KJ595680-81/ KJ747721-22	<i>Ilex perado</i> Aiton ssp. <i>lopezlillo</i> * (G. Kunkel) Hansen & Sunding	Ancón del Pajarito	G	LPA 19367-19368	421,2566

Tabla S1 (continuación-II)

<b>GenBank (<i>rbcl</i>/<i>matK</i>)</b>	<b>Taxones</b>	<b>Localidades</b>	<b>Islas</b>	<b>Pliegos</b>	<b>DNA bank</b>
KJ595682-86/ KJ747723-28	<i>Ilex perado</i> ssp. <i>platyphylla</i> * (Webb & Berthel.) Tutin	P.N.Garajonay/Anaga	G/T	LPA 23479-23480/-	430/IP62
KJ595688-89/ KJ747729-30	<i>Ilex canariensis</i> Poir.	Chorros de Epina	G	LPA 23580	3900,3972
KJ595690-93/ KJ747731-34	<i>Laurus novocanariensis</i> * Rivas-Mart. <i>et al.</i>	Hermigua/Los Tilos de Moya	G/C	LPA 23228-23231/-	3933/696
KJ595696-701/ KJ747737-42	<i>Lolium canariense</i> Steud.	Lomo del Carretón/Icod/Tafira	G/T/C	ORT41098/ORT42798/LPA2420	3883/5216/5159
KJ595702-03/ KJ747743-44	<i>Lolium edwardii</i> * H. Scholz <i>et al.</i>	San Andrés y Sauces (Los Tilos)	P	ORT 45650	5221
KJ595704-05/ KJ747745-46	<i>Micromeria</i> <sup>+</sup> <i>bentharii</i> Webb & Berthel.	Pinar Inagua	C	LPA s.n.	1103,1108
KJ595706-07/ KJ747747-48	<i>Micromeria varia</i> Benth. ssp. <i>canariensis</i> * P. Pérez	Montaña de las Vueltas	C	-	1427-1451
KJ595708-09/ KJ747749-50	<i>Micromeria varia</i> Benth. ssp. <i>gomerensis</i> * P. Pérez	Mirador del Rejo	G	ORT 41105	3879
KJ595710-11/ KJ747751-52	<i>Micromeria varia</i> Benth. ssp. <i>rupestris</i> * (Webb & Berthel.) P. Pérez	Riscos del Saladillo	F	-	2283-2284
KJ595714-16/ KJ747755-57	<i>Morella faya</i> (Aiton) Wilbur	La Cancela	G	LPA 23311	6902,178-179
KJ595717-18/ KJ747758-59	<i>Morella rivas-martinezii</i> * A. Santos & J. Herber	Las Creces	G	-	2563-2564
KJ595719-20/ KJ747760-61	<i>Ocotea foetens</i> * (Aiton) Baill.	Montaña Quemada	G	LPA 23267-23270	3895-3917
KJ595723-24/ KJ747764-65	<i>Parolinia</i> <sup>+</sup> <i>aridanae</i> A. Santos	Charco Verde	P	LPA 19432-19433	135
KJ595725-28/ KJ747766-69	<i>Parolinia filifolia</i> * Svent. <i>ex</i> G. Kunkel	Tasartico/La Aldea/Inagua/Siberio	C	-/LPA 10990/-/LPA 10989	136-141/182/183
KJ595729-30/ KJ747770-71	<i>Parolinia glabriuscula</i> Montelongo & Bramwell	Caldera de Bandama	C	LPA 19924-19926	130
KJ595731-32/ KJ747772-73	<i>Parolinia intermedia</i> Svent. & Bramwell	Adeje/Guaza	T	LPA 10994	132/187
KJ595733-36/ KJ747774-77	<i>Parolinia ornata</i> * Webb	Agate/Mogán/Vicentillos/Sorrueda	C	LPA15814/LPA13853/LPA19928	131/137/138/139

Tabla S1 (continuación-III)

<b>GenBank (<i>rbcl</i>/<i>matK</i>)</b>	<b>Taxones</b>	<b>Localidades</b>	<b>Islas</b>	<b>Pliegos</b>	<b>DNA bank</b>
KJ595737-38/ KJ747778-79	<i>Parolinia platypetala</i> G. Kunkel	Barranco de Guayadeque	C	LPA 11017-11019	134
KJ595739-40/ KJ747780-81	<i>Parolinia schizogynoides</i> Svent.	Barranco de Argaga	G	LPA 17042-17044/ORT 41099	140/3873
KJ595742-43/ KJ747783-84	<i>Pericallis<sup>+</sup> hansenii</i> (G. Kunkel) Sunding	Pista del Cura (P.N. Garajonay)	G	-	2623-2624
KJ595744-45/ KJ747785-86	<i>Pericallis steetzii</i> (Bolle) B. Nord.	La Meseta de Vallehermoso	G	LPA 23298-23299	2545-2546
KJ595746-49/ KJ747787-90	<i>Picconia excelsa</i> * (Aiton) DC.	El Rejo/Barranco del Agua	G/T	LPA 23205, ORT 41122/-	3881/9515-9517
KJ595678/ KJ747719	<i>Pleiomeris canariensis</i> (Willd.) A. DC.	Monte del Agua (Teno)	T	LPA 29808-29809-29810	3715
KJ595752-53/ KJ747793-94	<i>Polycarpaea divaricata</i> * (Aiton) Poir.	Riscos de Guayedra	C	LPA 9406-9408	1318-1319
KJ595754-55/ KJ747795-96	<i>Polycarpaea latifolia</i> * Willd.	El Cepo	G	LPA 23034	2527-2529
KJ595758-61/ KJ747799-802	<i>Rubus gr. bollei</i> * Focke	Raso de la Bruma/Bco. de la Mina	G/C	LPA 23387-23388/LPA s.n.	3973-3974/727
KJ595762/ KJ747803	<i>Rubus gr. ulmifolius</i> * Schott	Jandía	F	ORT 41538	975
KJ595763/ KJ747804	<i>Rubus palmensis</i> A. Hansen	El Rejo (P.N. Garajonay)	G	LPA 26543-26546	5870
KJ595764-65/ KJ747805-06	<i>Ruta microcarpa</i> Svent.	Dam of Malagua (Hermigua)	G	LPA 23587-23594	2525-3927
KJ595766-67/ KJ747807-08	<i>Ruta oreojasme</i> Webb & Berthel.	San Bartolomé de Tirajana (Fataga)	C	LPA 24201-24205	1062-1066
KJ595768-70/ KJ747809-11	<i>Ruta pinnata</i> L.f.	Las Nieves (Sta. Cruz de La Palma)	P	ORT 46135	5219,7070
KJ595771-78/ KJ747812-19	<i>Sambucus nigra</i> L. ssp. <i>palmensis</i> * (Link <i>in</i> Buch) Bolli	La Poyata/Los Tilos/Pijaral/Valleseco	G/P/T/C	LPA23465/-/LPA10350/LPA19333	2620/16060/101/51
KJ595779-80/ KJ747820-21	<i>Sideritis<sup>+</sup> gomerae</i> Bolle ssp. <i>gomerae</i>	Topo del Negrillo	G	-	2617-2618
KJ595781-82/ KJ747822-23	<i>Sideritis lotsyi</i> (Pit.) Bornm.	Roque de Agando	G	ORT 41119	3880



Tabla S1 (continuación-IV)

<b>GenBank (<i>rbcl</i>/<i>matK</i>)</b>	<b>Taxones</b>	<b>Localidades</b>	<b>Islas</b>	<b>Pliegos</b>	<b>DNA bank</b>
KJ595783-84/ KJ747824-25	<i>Silene<sup>+</sup> bourgeauii</i> Webb <i>ex</i> Christ.	Camino del Roquillo (Vallehermoso)	G	LPA 10365-10366	2521-2522
KJ595785-87/ KJ747826-28	<i>Silene lagunensis<sup>+</sup></i> C. Sm. <i>ex</i> Link	La Laguna	T	ORT 46125	5210
KJ595788-89/ KJ747829-30	<i>Silene nocteolens<sup>+</sup></i> Webb & Berthel.	Montaña Blanca	T	LPA 19320-19322	2662-2623
KJ595790-91/ KJ747831-32	<i>Sonchus<sup>+</sup> gomerensis</i> Boulos	El Rejo(P.N. Garajonay)	G	-	3871
KJ595792-93/ KJ747833-34	<i>Sonchus wildpretii</i> U. Reifemb. & A. Reifemb.	Ayamosna	G	ORT 41118	3870
KJ595794-95/ KJ747835-36	<i>Teline stenopetala</i> Webb & Berth. ssp. <i>pauciovulata<sup>*</sup></i> (del Arco) del Ar	Los Roques (P.N. Garajonay)	G	LPA 23161-23163	2602-2604
KJ595796-97/ KJ747837-38	<i>Teline stenopetala</i> ssp. <i>microphylla<sup>*</sup></i> (Pit. & Proust) del Arco	El Rejo (P.N. Garajonay)	G	LPA 23534-23535	2605-2607
KJ595798/ KJ747839	<i>Teline rosmarinifolia</i> Webb & Berthel.	Pinar Inagua	C	LPA 29538	1105
KJ595799-800/ KJ747840-41	<i>Viola riviniana<sup>*</sup></i> Rchb.	Los Noruegos (Hermigua)	G	LPA 23176-23177	2530-2531
<b>Taxones (poblaciones no canarias)</b>					
KJ595741/ KJ747782	<i>Diceratella elliptica</i> (DC.) Jonsell	Djebel Elba, Egypt	-	Herbario de Kadry Elsayed	159
KJ595679/ KJ747720	<i>Myrsine africana</i> L.	Caldeira do Faial	Az	-	6780
KJ595593/ KJ747639	<i>Apollonias barbujana</i> Bornm.	Pomar da Rocha-Ribeira Brava	M	LPA 29121-29125	2675
KJ595638-39/ KJ747680-81	<i>Erica canariensis<sup>*</sup></i> Rivas-Mart. <i>et al.</i>	Macizo Pico das Torres	M	LPA 29475	2772, 2784
KJ595652/ KJ747694	<i>Euphorbia mellifera</i> Aiton var. <i>mellifera</i>	Macizo Pico das Torres	M	-	2765
KJ595676-77/ KJ747717-18	<i>Heberdenia excelsa<sup>*</sup></i> (Aiton) Banks <i>ex</i> DC.	Laguna de Dona Beija	M	LPA 26773-26774	3779,H162
KJ595694-95/ KJ747735-36	<i>Laurus novocanariensis<sup>*</sup></i> Rivas-Mart. <i>et al.</i>	Ribeiro Frío, Levada do Furado	M	LPA 20849,20869-20870	3553,3585

Tabla S1 (continuación-IV)

<b>GenBank (<i>rbcl</i>/<i>matK</i>)</b>	<b>Taxones</b>	<b>Localidades</b>	<b>Islas</b>	<b>Pliegos</b>	<b>DNA bank</b>
KJ595712-13/ KJ747753-54	<i>Micromeria varia</i> Benth. ssp. <i>thymoides</i> * (Sol. ex Lowe) P. Pérez	Pomar da Rocha-Ribeira Brava	M	LPA 29087	2688,2757
KJ595721-22/ KJ747762-63	<i>Ocotea foetens</i> * (Aiton) Baill.	Ribeiro Frío-Levada do Furado	M	LPA 20866-20868	3583,3584
KJ595750-51/ KJ747791-92	<i>Picconia excelsa</i> * (Aiton) DC.	Ribeiro Frío-Levada do Furado	M	-	3600,3601
KJ595756-57/ KJ747797-98	<i>Rubus bollei</i> * Focke	Pomar da Rocha -Vereda do Lajado	M	-	2689,3738
KJ595801-02/ KJ747842-43	<i>Viola riviniana</i> * Rchb.	Ribeiro Frío-Levada do Furado	M	LPA 20835	3535,3536

+ =Géneros con siete o más especies con-genéricas en Macaronesia. \* =Casos taxonómicamente conflictivos.

**Anexo II: Tabla S2.** Secuencias *rbcl* y *matK* que fueron descargadas desde *GenBank* para este estudio. Se indican los números de entrada o "accesion numbers", el nombre de los taxones y su distribución (poblaciones macaronésicas o no).

<b>N</b>	<b>GenBank (<i>rbcl</i>/<i>matK</i>)</b>	<b>Taxones</b>	<b>Distribución</b>
1	AB029849/ AB029804	<i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.)Mer.	No macaronésico
2	Z37427/ AY840165	<i>Origanum vulgare</i> L.	No macaronésico
3	GQ248560/ GQ248090	<i>Carex lamprocarpa</i> Phil.	No macaronésico
4	FJ225874/ DQ093001	<i>Cistus ladanifer</i> ssp. <i>africanus</i> Dans.	No macaronésico
5	Z70086/ AY386902	<i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link	No macaronésico
6	JN893554/ JN896055	<i>Crambe maritima</i> L.	No macaronésico
7	AF419823/ ESU61341	<i>Erica sicula</i> Guss.	No macaronésico
8	HM84998/ HM850915	<i>Euphorbia azorica</i> Hochst.	Azores
9	AJ784822/ FJ395395	<i>Festuca rubra</i> L.	No macaronésico
10	HM850019/ FJ395417	<i>Galium mollugo</i> L.	No macaronésico
11	EU922353 /EU922315	<i>Geranium palmatum</i> Cav.	No macaronésico
12	FJ395601/ AF542607	<i>Ilex aquifolium</i> L.	No macaronésico
13	HM850110/ HM850594	<i>Laurus azorica</i> (Seub.) Franco	Azores
14	HM850132/ HM850533	<i>Lolium perenne</i> L.	No macaronésico
15	AJ626757/ AY191715	<i>Myrica gale</i> L.	No macaronésico
16	AM2350020/ JQ024978	<i>Ocotea bullata</i> (Burch.) E.Mey.	No macaronésico
17	HM850241/ HM850668	<i>Pericallis malvifolia</i> (L'Her.) B.Nord.	Azores
18	HM850258/ HM850981	<i>Picconia azorica</i> (Tutin) Knobl.	Azores
19	EU676996/ EU749388	<i>Rubus odoratus</i> L.	No macaronésico
20	HM850315/ HM850696	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	No macaronésico
21	HM850326/ HM850606	<i>Ruta chalepensis</i> L.	No macaronésico
22	SBURBCLA/ AF446898	<i>Sambucus racemosa</i> L.	No macaronésico
23	AF501999/ HQ911543	<i>Sideritis syriaca</i> L.	No macaronésico
24	SIPCPRUBIS/ FJ589528	<i>Silene gallica</i> L.	No macaronésico
25	HM850374/ HM850663	<i>Sonchus tenerrimus</i> L.	No macaronésico
26	HM850467/ HM850936	<i>Viola odorata</i> L.	No macaronésico

**Anexo III: Tabla S3.** Distancias genéticas (distancias- $p$ ) entre las especies comparadas dentro de este capítulo de tesis y calculadas con la aplicación DNADISTv. 3.5c (Felsenstein, 1993) del programa BioEdit (Hall, 1999-2004).

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Apollonias barbujana G-Apollonias barbujanaMD matK	0,000
Apollonias ceballosii G-Apollonias barbujana G-matK	0,001
Apollonias ceballosii G-Apollonias barbujanaMD matK	0,001
Argyranthemum callichryssum G-Argyranthemumfrutescens C matK	0,006
Argyranthemum callichryssum G-Artemisia thusculaC DNABANK matK	0,031
Argyranthemum brosussonetii ssp. gomerensisG- Argyranthemum callichryssum G matK	0,011
Argyranthemum brosussonetii ssp. gomerensisG-Argyranthemumfrutescens C GENBANK matK	0,014
Argyranthemum brosussonetii ssp. gomerensisG-Artemisia thusculaC DNABANK matK	0,036
Argyranthemum broussetii ssp. broussetiiT - Argyranthemum callichryssum G matK	0,011
Argyranthemum broussetii ssp. broussetiiT - Argyranthemum brosussonetii ssp. gomerensisG	0,006
Argyranthemum broussetii ssp. broussetiiT-Argyranthemumfrutescens C GENBANK matK	0,014
Argyranthemum broussetii ssp. broussetiiT-Artemisia thusculaC DNABANK matK	0,036
Asparagus fallax G- Asparagus cochinchinensis GENBANK matK	0,000
Asparagus fallax G- Asparagus fallax T matK	0,001
Asparagus fallax T- Asparagus cochinchinensis GENBANK matK	0,001
BethencourtiarupicolaG- Pericallis hanseniiG matK	0,007
BethencourtiarupicolaG- Pericallis steetzii GmatK	0,008
Bystropogon origanifolius G - Bystropogon origanifolius P matK	0,000
Bystropogon origanifolius G -Origanum vulgare GENBANK- matK	0,018
Bystropogon origanifolius P- Origanum vulgare GENBANK- matK	0,018
Bystropogon origanifolius T - Bystropogon origanifolius P matK	0,000
Bystropogon origanifolius T- Origanum vulgare GENBANK- matK	0,018
Bystropogon origanifoliusG - Bystropogon origanifoliusT matK	0,000
Carex perraudieriana G-Carex perraudieriana P matK	0,009
Carex perraudieriana G-Carex perraudieriana T matK	0,000
Carex perraudieriana G-CarexlamprocarpaGENBANKmatK	0,010
Carex perraudieriana P -CarexlamprocarpaGENBANKmatK	0,010
Carex perraudieriana T -CarexlamprocarpaGENBANKmatK	0,010
Carex perraudieriana T-Carex perraudieriana P matK	0,009
Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius G- Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius T	0,000
Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius G- Chamaecytisus scopariusC DNABANK-matK	0,000
Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius T- Chamaecytisus scopariusC DNABANK-matK	0,004
Cistus chinamadensis subsp. chinamadensis - Cistus ladanifer GENBANK matK	0,014
Cistus chinamadensis subsp. gomerae - Cistus ladanifer GENBANK matK	0,015
Cistus chinamadensis subsp. gomeraeG - Cistus chinamadensis ssp. chinamadensisG matK	0,000
Crambe gomeraeG- Crambe maritima GENBANK matK	0,017
Crambe gomeraeG- Crambe strigosaG matK	0,013

**Tabla S3 (continuación-I)**

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Crambe gomeraeG- Crambe sventeniiC DNABANK matK	0,017
Crambe strigosaG- Crambe maritima GENBANK matK	0,013
Crambe strigosaG- Crambe sventeniiC DNABANK matK	0,013
Crambe wildpretiiG - Crambe gomeraeG matK	0,013
Crambe wildpretiiG - Crambe strigosaG matK	0,008
Crambe wildpretiiG- Crambe maritima GENBANK matK	0,017
Crambe wildpretiiG- Crambe sventeniiC DNABANK matK	0,017
Erica arborea G-Erica arborea MD-matK	0,007
Erica arborea G-Erica arborea T-matK	0,002
Erica arborea G-Erica sicula GENBANK matK	0,033
Erica arborea MD-Erica arborea T-matK	0,009
Erica arborea MD-Erica sicula GENBANK matK	0,040
Erica arborea T-Erica sicula GENBANK matK	0,033
Erica platycodon G-Erica arborea G-matK	0,014
Erica platycodon G-Erica arborea MD-matK	0,021
Erica platycodon G-Erica arborea T-matK	0,016
Erica platycodon G-Erica platycodon T-matK	0,000
Erica platycodon G-Erica sicula GENBANK matK	0,035
Erica platycodon T- Erica arborea G-matK	0,014
Erica platycodon T-Erica arborea MD-matK	0,021
Erica platycodon T-Erica arborea T-matK	0,016
Erica platycodon T-Erica sicula GENBANK matK	0,035
Euphorbia borgueauanaT- Euphorbia azorica AZ GENBANK matK	0,024
Euphorbia lambiiG- Euphorbia borgueauanaT matK	0,001
Euphorbia lambiiG-Euphorbia mellifera canariensis G matK	0,043
Euphorbia lambiiG-Euphorbia mellifera canariensis T matK	0,043
Euphorbia lambiiG-Euphorbia mellifera MD matK	0,043
Euphorbia mellifera melliferaMD-Euphorbia azorica AZ GENBANK matK	0,046
Euphorbia mellifera canariensis G-Euphorbia azorica AZ GENBANK matK	0,046
Euphorbia mellifera canariensis G- Euphorbia borgueauanaT matK	0,044
Euphorbia mellifera canariensis G-Euphorbia mellifera canariensis T matK	0,000
Euphorbia mellifera canariensis G-Euphorbia mellifera MD matK	0,000
Euphorbia mellifera canariensis T- Euphorbia azorica AZ GENBANK matK	0,046
Euphorbia mellifera canariensis T- Euphorbia borgueauanaT matK	0,044
Euphorbia mellifera canariensis T-Euphorbia mellifera mellifera MD matK	0,000
Festuca agustinii C- Festuca rubraGENBANK-matK	0,003
Festuca agustinii G- Festuca agustinii C matK	0,002
Festuca agustinii G- Festuca agustinii TmatK	0,000
Festuca agustinii G- Festuca rubraGENBANK- matK	0,001
Festuca agustinii T- Festuca agustinii C matK	0,002
Festuca agustinii T- Festuca rubraGENBANK- matK	0,001

Tabla S3 (continuación-II)

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Gallium rotundifolium G-Gallium mollugo GENBANK matK	0,032
Gallium rotundifolium G-Gallium scabrum T matK	0,001
Gallium scabrum T-Gallium mollugo GENBANK matK	0,015
Geranium reuteri G-Geranium palmatum GENBANK matK	0,003
Geranium reuteri G-Geranium reuteri T matK	0,001
Geranium reuteri T-Geranium palmatum GENBANK matK	0,002
Greenovia diplocycla G-Greenovia aurea C DNABANK-matK	0,016
Greenovia diplocycla G-Greenovia diplocycla P matK	0,002
Greenovia diplocycla P-Greenovia aurea C DNABANK-matK	0,016
Heberdenia excelsa G-Heberdenia excelsa MD-matK	0,000
Heberdenia excelsa G-Heberdenia excelsa T-matK	0,000
Heberdenia excelsa G-Myrsine africana AZ DNABANK matK	0,012
Heberdenia excelsa G-Pleiomeris canariensis T DNABANK matK	0,009
Heberdenia excelsa MD-Myrsine africana AZ DNABANK matK	0,012
Heberdenia excelsa MD-Pleiomeris canariensis T DNABANK matK	0,009
Heberdenia excelsa T-Heberdenia excelsa MD-matK	0,000
Heberdenia excelsa T-Myrsine africana AZ DNABANK matK	0,012
Heberdenia excelsa T-Pleiomeris canariensis T DNABANK matK	0,009
Ilex perado ssp. platyphylla G-Ilex perado ssp. lopezlilloi G-matK	0,000
Ilex perado ssp. platyphylla-Ilex aquifolium GENBANK matK	0,000
Ilex perado ssp. lopezlilloi-Ilex aquifolium GENBANK matK	0,000
Laurus cf. novocanariensis MD-Laurus azorica-AZ GENBANK-matK	0,002
Laurus novocanariensis G- Laurus azorica-AZ GENBANK-matK	0,002
Laurus novocanariensis G-Laurus cf. novocanariensis MD-matK	0,001
Lolium canariense C- Lolium edwardii P matK	0,003
Lolium canariense G - Lolium edwardii P matK	0,003
Lolium canariense G- Lolium canariense C matK	0,003
Lolium canariense G- Lolium canariense T matK	0,001
Lolium canariense T - Lolium edwardii P matK	0,001
Lolium canariense T- Lolium canariense C matK	0,000
Lolium canariense C-Lolium perenne AZ-GENBANK matK	0,004
Lolium canariense G-Lolium perenne AZ-GENBANK matK	0,004
Lolium canariense T-Lolium perenne AZ-GENBANK matK	0,003
Lolium edwardii P-Lolium perenne AZ-GENBANK matK	0,004
Micromeria varia ssp. canariensis C-Micromeria benthamii C DNABANK-matK	0,000
Micromeria varia ssp. canariensis C-Micromeria varia ssp. rupestris F matK	0,000
Micromeria varia ssp. canariensis C-Micromeria varia ssp. thymoides MD matK	0,000
Micromeria varia ssp. gomerensis G-Micromeria benthamii C DNABANK -matK	0,000
Micromeria varia ssp. gomerensis G-Micromeria varia ssp. canariensis C-matK	0,000
Micromeria varia ssp. gomerensis G-Micromeria varia ssp. rupestris F matK	0,000
Micromeria varia ssp. gomerensis G-Micromeria varia ssp. thymoides MD matK	0,000

**Tabla S3 (continuación-IV)**

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Micromeria varia ssp. rupestris F-Micromeria benthamii C DNABANK -matK	0,000
Micromeria varia ssp. thymoides MD-Micromeria benthamii C DNABANK -matK	0,000
Micromeria varia ssp. thymoides MD-Micromeria varia ssp. rupestris F matK	0,000
Myrica faya1 G-Myrica gale GENBANK-matk	0,009
Myrica rivasi-martinezii1 G-Myrica faya G-matk	0,004
Myrica rivasi-martinezii1 G-Myrica gale GENBANK-matk	0,006
Ocotea foetens G-Ocotea bullata GENBANK-matk	0,000
Ocotea foetens G-Ocotea foetens MD-matk	0,001
Ocotea foetens MD-Ocotea bullata GENBANK-matk	0,000
Parolinia aridanae-Diceratella elliptica-E-DNABANK matK	0,020
Parolinia filifolia C-P. aridanae P-matk	0,000
Parolinia filifolia C-P. glabriuscula C-matk	0,000
Parolinia filifolia C-P. intermedia T-matk	0,000
Parolinia filifolia C-P. platypetala C-matk	0,003
Parolinia filifolia-Diceratella elliptica-E-DNABANK matK	0,020
Parolinia glabriuscula C-P. intermediaT-matk	0,000
Parolinia glabriuscula C-P. platypetalaC-matk	0,003
Parolinia glabriuscula -Diceratella elliptica-E-DNABANK matK	0,020
Parolinia glabriuscula -P. aridanae-matk	0,000
Parolinia intermedia -Diceratella elliptica-E-DNABANK matK	0,023
Parolinia intermedia -P. aridanae-matk	0,000
Parolinia intermedia T-P. platypetala C-matk	0,006
Parolinia ornata C-P. filifolia C-matk	0,003
Parolinia ornata C-P. glabriuscula C-matk	0,003
Parolinia ornata C-P. intermedia T-matk	0,003
Parolinia ornata C-P. platypetala C-matk	0,001
Parolinia ornata-Diceratella elliptica-E-DNABANK matK	0,023
Parolinia ornata-P. aridanae-matk	0,003
Parolinia platypetala-Diceratella elliptica-E-DNABANK matK	0,023
Parolinia platypetala-P. aridanae-matk	0,003
Parolinia schizogynoides-Diceratella elliptica-E-DNABANK matK	0,023
Parolinia schizogynoides G-P. aridanae P-matk	0,005
Parolinia schizogynoides G-P. filifolia C-matk	0,003
Parolinia schizogynoides G-P. glabriuscula C-matk	0,003
Parolinia schizogynoides G-P. intermedia T-matk	0,003
Parolinia schizogynoides G-P. ornata C-matk	0,005
Parolinia schizogynoides G-P. platypetala C-matk	0,006
Pericallis hansenii G-Pericallis malviflora AZ GENBANK matK	0,004
Pericallis steetzii G -Pericallis hansenii G matK	0,007
Pericallis steetzii G-Pericallismalviflora AZ GENBANK matK	0,007
Picconia excelsa G- Picconia azorica AZ GENBANK matK	0,003

Tabla S3 (continuación-V)

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Picconia excelsa G- Picconia excelsa MD matk	0,000
Picconia excelsa MD- Picconia azorica GENBANK matK	0,003
Polycarpaea divaricata C- Polycarpaea latifoliaG matK	0,001
Rubus bollei C-Rubus bollei MD-matK	0,000
Rubus bollei C-Rubus gr bollei F-matK	0,000
Rubus bollei C-Rubus odoratus GENBANK-matK	0,017
Rubus bollei C-Rubus ulmifolius AZ GENBANK-matK	0,003
Rubus bollei G-Rubus bollei C-matK	0,000
Rubus bollei G-Rubus bollei MD-matK	0,000
Rubus bollei G-Rubus gr bollei F -matK	0,000
Rubus bollei G-Rubus odoratus GENBANK-matK	0,017
Rubus bollei G-Rubus ulmifolius AZ GENBANK-matK	0,003
Rubus bollei MD-Rubus odoratusGENBANK-matK	0,017
Rubus bollei MD-Rubus ulmifolius AZ GENBANK-matK	0,003
Rubus cf bollei F-Rubus bollei MD-matK	0,000
Rubus cf bollei F-Rubus odoratus GENBANK matK	0,017
Rubus cf bollei F-Rubus ulmifolius AZ GENBANK-matK	0,003
Ruta microcarpa G-Ruta chalepensis AZ GENBANK matk	0,032
Ruta microcarpa G-Ruta oreojasme C-matK	0,011
Ruta microcarpa G-Ruta pinnata P-matK	0,004
Ruta oreojasme C-Ruta chalepensis AZ GENBANK matk	0,032
Ruta oreojasme C-Ruta pinnata P-matK	0,007
Ruta pinnata P-Ruta chalepensis AZ GENBANK matK	0,027
Sambucus nigra subsp. palmensis C- Sambucus racemosa GENBANK matK	0,010
Sambucus nigra subsp. palmensis G - Sambucus nigra subsp. Palmensis C matk	0,004
Sambucus nigra subsp. palmensis G - Sambucus nigra subsp. Palmensis P-matK	0,004
Sambucus nigra subsp. palmensis G - Sambucus nigra subsp. Palmensis T-matK	0,004
Sambucus nigra subsp. palmensis G- Sambucus racemosa GENBANK matK	0,012
Sambucus nigra subsp. palmensis P - Sambucus nigra subsp. palmensisC matk	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis P- Sambucus racemosa GENBANK matK	0,010
Sambucus nigra subsp. palmensis T - Sambucus nigra subsp. palmensis C matk	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis T - Sambucus nigra subsp. palmensis P matk	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis T- Sambucus racemosa GENBANK matK	0,010
Senecio hermosae G-Pericallis malviflora AZ GenBank matK	0,006
Sideritis gomerae subsp. gomerae G- Sideritis syriaca GENBANK -matK	0,018
Sideritis gomerae subsp. gomerae G- Sideritis lotsyi G matK	0,002
Sideritis lotsyi G-Sideritis syriaca GENBANK-matK	0,020
Silene bourguaeui G -Silene lagunensis T matK	0,054
Silene bourguaeui G -Silene nocteolens T matk	0,050
Silene bourguaeuiG-Silene gallica GENBANK matK	0,080
Silene lagunensis T-Silene gallica GENBANK matK	0,062



Tabla S3 (continuación-VII)

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Silene nocteolens T-Silene gallica GENBANK matK	0,063
Silene nocteolens T -Silene lagunensis T matK	0,004
Sonchus gonzalezpadroniiG-Sonchus tenerrimus AZ GENBANK matK	0,003
Sonchus willdpretii G- Sonchus tenerrimus AZ GENBANK matK	0,003
Sonchus willdpretii G-S. gomerensisG matK	0,000
Teline stenopetala ssp. microphylla G-Teline rosmanirifoliaC DNABank matK	0,016
Teline stenopetala ssp. pauciovulata G- Teline rosmanirifoliaC DNABank matK	0,016
Teline stenopetala ssp. pauciovulata G- Teline stenopetala ssp. microphylla G-matK	0,000
Viola riviniana G-Viola odorata AZ GENBANK matK	0,007
Viola riviniana G-Viola riviniana MD- matK	0,004
Viola riviniana MD-Viola odorata AZ GENBANK matK	0,006
Festuca agustinii C- Festuca rubra GENBANK rbcL	0,006
Apollonias barbujana G-Apollonias barbujana MD rbcL	0,000
Apollonias ceballosii G-Apollonias barbujana G-rbcL	0,000
Apollonias ceballosii G-Apollonias barbujana MD rbcL	0,000
Argyranthemum callichrysum G-Argyranthemumfrutescens C rbcL	0,000
Argyranthemum callichrysum G-Artemisia thuscula C DNABANK rbcL	0,016
Argyranthemum brosussonetii ssp. gomerensisG- Argyranthemum callichrysum G rbcL	0,000
Argyranthemum brosussonetii ssp. gomerensisG-Argyranthemum frutescensC rbcL	0,000
Argyranthemum brosussonetii ssp. gomerensisG-Artemisia thuscula DNABANK rbcL	0,016
Argyranthemum broussetii ssp. broussetiiT - Argyranthemum callichrysum G rbcL	0,000
Argyranthemum broussetii ssp. broussetiiT - Argyranthemum brosussonetii ssp. gomerensis G	0,000
Argyranthemum broussetii ssp. broussetiiT-ArgyranthemumfrutescensC rbcL	0,000
Argyranthemum broussetii ssp. broussetiiT-Artemisia thusculaC DNABANK rbcL	0,016
Asparagus fallax G- Asparagus cochinchinensis GENBANK rbcL	0,013
Asparagus fallax G- Asparagus fallax T rbcL	0,000
Asparagus fallax T- Asparagus cochinchinensis GENBANK rbcL	0,013
BethencourtiarupicolaG- Pericallis hanseniiG-rbcL	0,000
BethencourtiarupicolaG- Pericallis steetziiG-rbcL	0,003
Bystropogon organifolius G - Bystropogon organifolius P rbcL	0,000
Bystropogon organifolius G - Bystropogon organifolius T rbcL	0,000
Bystropogon organifolius G - Origanum vulgare GENBANK- rbcL	0,002
Bystropogon organifolius P-Origanum vulgare GENBANK- rbcL	0,002
Bystropogon organifolius T - Bystropogon organifolius P rbcL	0,000
Bystropogon organifolius T- Origanum vulgare GENBANK- rbcL	0,002
Carex perraudieriana G-Carex perraudieriana P rbcL	0,002
Carex perraudieriana G-Carex lamprocarpaGENBANKrbcL	0,003
Carex perraudieriana P -Carex lamprocarpaGENBANKrbcL	0,003
Carex perraudieriana T -Carex lamprocarpaGENBANKrbcL	0,003
Carex perraudieriana T-Carex perraudieriana P rbcL	0,000

**Tabla S3 (continuación-VIII)**

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius G- Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius T	0,001
Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius G- Chamaecytisus scopariusC DNABank-rbcl	0,001
Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius T- Chamaecytisus scopariusC DNABank-rbcl	0,000
Cistus chinamadensis subsp. chinamadensis - Cistus ladanifer GENBANK rbcl	0,002
Cistus chinamadensis subsp. gomerae - Cistus ladanifer GENBANK rbcl	0,002
Cistus chinamadensis subsp. Gomerae G – Cistus chinamadensis ssp. chinamadensis G rbcl	0,000
Crambe gomerae G- Crambe maritima GENBANK rbcl	0,065
Crambe gomerae G- Crambe strigosa G rbcl	0,008
Crambe gomerae G-Crambe sventenii T- DNABANKrbcl	0,065
Crambe strigosa G- Crambe maritima GENBANK rbcl	0,031
Crambe strigosa G-Crambe sventenii T- DNABANKrbcl	0,031
Crambe wildpretii G - Crambe gomeraeG-rbcl	0,008
Crambe wildpretii G - Crambe strigosaG-rbcl	0,004
Crambe wildpretii G- Crambe maritima GENBANK rbcl	0,027
Crambe wildpretii G -Crambe sventenii T DNABANK -rbcl	0,027
Erica arborea G-Erica arborea MD rbcl	0,057
Erica arborea G-Erica arborea T rbcl	0,017
Erica arborea G-Erica sicula GENBANK rbcl	0,021
Erica arborea MD-Erica arborea T rbcl	0,062
Erica arborea MD-Erica sicula GENBANK rbcl	0,066
Erica arborea T-Erica sicula GENBANK rbcl	0,009
Erica platycodon G-Erica arborea G-rbcl	0,023
Erica platycodon G-Erica arborea MD-rbcl	0,068
Erica platycodon G-Erica arborea T-rbcl	0,010
Erica platycodon G-Erica platycodon T-rbcl	0,020
Erica platycodon G-Erica sicula GENBANK rbcl	0,005
Erica platycodon T-Erica arborea G-rbcl	0,027
Erica platycodon T-Erica arborea MD-rbcl	0,060
Erica platycodon T-Erica arborea T-rbcl	0,027
Erica platycodon T-Erica sicula GENBANK rbcl	0,023
Euphorbia borgueauana T- Euphorbia azorica AZ GENBANK rbcl	0,002
Euphorbia lambiiG- E. borgueauana T rbcl	0,000
Euphorbia lambii G-Euphorbia azorica AZ GENBANK rbcl	0,002
Euphorbia lambii G-Euphorbia mellifera canariensis G rbcl	0,012
Euphorbia lambii G-Euphorbia mellifera canariensis T rbcl	0,011
Euphorbia lambii G-Euphorbia mellifera MD rbcl	0,012
Euphorbia mellifera melliferaMD-Euphorbia azorica AZ GENBANK rbcl	0,014
Euphorbia mellifera canariensis G -Euphorbia mellifera melliferaMD rbcl	0,001
Euphorbia mellifera canariensis G-Euphorbia azorica AZ GENBANK rbcl	0,014
Euphorbia mellifera canariensis G-Euphorbia mellifera canariensis T rbcl	0,001
Euphorbia mellifera canariensis T- E. borgueauanaT rbcl	0,011

Tabla S3 (continuación-IX)

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Euphorbia mellifera canariensis T- Euphorbia azorica AZ GENBANK rbcl	0,013
Euphorbia mellifera canariensis T -Euphorbia mellifera mellifera MD rbcl	0,001
Euphorbia mellifera mellifera MD- E. borgueauanaT rbcl	0,012
Euphorbiamellifera canariensis G- E. borgueauanaT rbcl	0,012
Festuca agustinii G- Festuca agustinii C rbcl	0,005
Festuca agustinii G- Festuca agustinii T rbcl	0,001
Festuca agustinii G- Festuca rubra GENBANK- rbcl	0,002
Festuca agustinii T- Festuca agustinii C rbcl	0,006
Festuca agustinii T- Festuca rubra GENBANK- rbcl	0,002
Gallium rotundifolium G-Gallium mollugo GENBANK rbcl	0,012
Gallium rotundifolium G-Gallium scabrum T rbcl	0,000
Gallium scabrum T-Gallium mollugo GENBANK rbcl	0,012
Geranium reuteri G-Geranium reuteri T rbcl	0,002
Geranium reuteri T-Geranium palmatum GENBANK rbcl	0,006
Geranium reuteriG-Geranium palmatum GENBANK rbcl	0,008
Greenovia diplocycla G-Greenovia aureaC DNABank-rbcl	0,001
Greenovia diplocycla G-Greenovia diplocycla P rbcl	0,000
Greenovia diplocycla P-Greenovia aurea C DNABank-rbcl	0,000
Heberdenia excelsa G-Heberdenia excelsa MD-rbcl	0,000
Heberdenia excelsa G-Heberdenia excelsa T-rbcl	0,000
Heberdenia excelsa G-Myrsine africanaAZ DNABANK rbcl	0,013
Heberdenia excelsa G-Pleiomeris canariensisT DNABANK rbcl	0,012
Heberdenia excelsa MD-Myrsine africana AZ DNABANK rbcl	0,013
Heberdenia excelsa MD-Pleiomeris canariensisT DNABANK rbcl	0,012
Heberdenia excelsa T-Heberdenia excelsa MD-rbcl	0,000
Heberdenia excelsa T-Myrsine africana AZ DNABANK rbcl	0,013
Heberdenia excelsa T-Pleiomeris canariensisT DNABANK rbcl	0,012
Ilex perado ssp. lopezlilloi-Ilex aquifolium GENBANKrbcl	0,000
Ilex perado ssp. platyphylla G-Ilex perado ssp. lopezlilloiG-rbcl	0,007
Ilex perado ssp. platyphylla-Ilex aquifolium GENBANKrbcl	0,020
Laurus novocanariensis G-Laurus azorica-AZ GENBANK-rbcl	0,010
Laurus novocanariensis G-Laurus cf.novocanariensis MD-rbcl	0,001
Laurus novocanariensis MD-Laurus azorica-AZ GENBANK-rbcl	0,000
Lolium canariense C- Lolium edwardii P rbcl	0,000
Lolium canariense G - Lolium edwardii P rbcl	0,000
Lolium canariense G- Lolium canariense C rbcl	0,000
Lolium canariense G- Lolium canariense T rbcl	0,000
Lolium canariense T - Lolium edwardii P rbcl	0,000
Lolium canariense T- Lolium canariense C rbcl	0,000
Lolium canariense C-Lolium perenneGENBANK rbcl	0,002
Lolium canariense G-Lolium perenneGENBANK rbcl	0,002

Tabla S3 (continuación-XI)

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Lolium canariense T-Lolium perenneGENBANK rbcl	0,002
Lolium edwardii P-Lolium perenneGENBANK rbcl	0,002
Micromeria varia ssp. canariensis C-Micromeria benthamii C DNABank-rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. canariensis C-Micromeria varia ssp. rupestris F rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. canariensis C-Micromeria varia ssp. thymoides MD rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. gomerensis G-Micromeria benthamii C DNABank-rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. gomerensis G-Micromeria varia ssp. canariensis C-rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. gomerensis G-Micromeria varia ssp. rupestris F rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. gomerensis G-Micromeria varia ssp. thymoides MD rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. rupestris F-Micromeria benthamii C DNABank-rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. thymoides MD-Micromeria benthamii C DNABank-rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. thymoides MD-Micromeria varia ssp. rupestris F rbcl	0,000
Myrica faya G-Myrica gale GENBANK-rbcl	0,004
Myrica rivas-martinezii G-Myrica faya G-rbcl	0,000
Myrica rivas-martinezii G-Myrica gale GENBANK-rbcl	0,004
Ocotea foetens G-Ocotea bullata GENBANK-rbcl	0,002
Ocotea foetens G-Ocotea foetens MD-rbcl	0,000
Ocotea foetens MD- Ocotea bullata GENBANK-rbcl	0,002
Parolinia aridanae-Diceratella elliptica-E-DNABANK rbcl	0,005
Parolinia filifolia C-P. aridanaeP-rbcl	0,000
Parolinia filifolia C-P. glabriusculaC-rbcl	0,000
Parolinia filifolia C-P. intermediaT-rbcl	0,000
Parolinia filifolia C-P. platypetalaC-rbcl	0,000
Parolinia filifolia-Diceratella elliptica-E-DNABANK rbcl	0,005
Parolinia glabriuscula C-P. platypetalaC-rbcl	0,000
Parolinia glabriuscula-Diceratella elliptica-E-DNABANK rbcl	0,005
Parolinia glabriuscula-P. aridanae-rbcl	0,000
Parolinia glabriuscula-P. intermedia-rbcl	0,000
Parolinia intermedia-Diceratella elliptica-E-DNABANK rbcl	0,005
Parolinia intermedia- P. aridanae-rbcl	0,000
Parolinia intermedia T-P. platypetala C-rbcl	0,000
Parolinia ornata C-P. filifolia C-rbcl	0,000
Parolinia ornata C-P. glabriuscula C-rbcl	0,000
Parolinia ornata C-P. platypetala C-rbcl	0,000
Parolinia ornata-Diceratella elliptica-E-DNABANK rbcl	0,005
Parolinia ornata-P. aridanae-rbcl	0,000
Parolinia ornata-P. intermedia-rbcl	0,000
Parolinia platypetala-Diceratella elliptica-E-DNABANK rbcl	0,005
Parolinia platypetala-P. aridanae-rbcl	0,000
Parolinia schizogynoides-Diceratella elliptica-E-DNABANK rbcl	0,005
Parolinia schizogynoides-P. aridanae-rbcl	0,000

Tabla S3 (continuación-XIII)

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Parolinia schizogynoides-P. filifolia-rbcl	0,000
Parolinia schizogynoides-P. glabriuscula-rbcl	0,000
Parolinia schizogynoides-P. intermedia-rbcl	0,000
Parolinia schizogynoides-P. ornata-rbcl	0,000
Parolinia schizogynoides-P. platypetala-rbcl	0,000
Pericallis hansenii G-Pericallis malviflora AZ GENBANK rbcl	0,003
Pericallis steetzi G -Pericallis hansenii G-rbcl	0,003
Pericallis steetzii G-Pericallis malvifloraAZ GENBANK rbcl	0,000
Picconia excelsa G- Picconia azorica GENBANK rbcl	0,022
Picconia excelsa G- Picconia excelsa MD rbcl	0,043
Picconia excelsa MD- Picconia azorica GENBANK rbcl	0,002
Polycarpaea divaricata C- Polycarpaea latifoliaG rbcl	0,003
Rubus bollei C-Rubus odoratus GENBANK rbcl	0,005
Rubus bollei C- Rubus bollei MD rbcl	0,000
Rubus bollei C- Rubus cf bollei F rbcl	0,000
Rubus bollei C-Rubus ulmifolius AZ GENBANK rbcl	0,000
Rubus bollei G-Rubus bollei C-rbcl	0,000
Rubus bollei G-Rubus bollei MD rbcl	0,000
Rubus bollei G-Rubus gr bollei F rbcl	0,000
Rubus bollei G-Rubus odoratus GENBANK rbcl	0,005
Rubus bollei G-Rubus ulmifolius AZ GENBANK rbcl	0,000
Rubus bollei MD-Rubus odoratus GENBANK rbcl	0,005
Rubus bollei MD-Rubus ulmifolius AZ GENBANK rbcl	0,000
Rubus cf bollei F-Rubus bollei MD- rbcl	0,000
Rubus cf bollei F-Rubus odoratus GENBANK rbcl	0,005
Rubus cf bollei F-Rubus ulmifolius AZ GENBANK rbcl	0,000
Ruta microcarpa G-Ruta chalepensis AZ GENBANK rbcl	0,004
Ruta microcarpa G-Ruta oreojasme C-rbcl	0,002
Ruta microcarpa G-Ruta pinnata P-rbcl	0,001
Ruta oreojasme C-Ruta chalepensis AZ GENBANK rbcl	0,002
Ruta oreojasme C-Ruta pinnata P-rbcl	0,002
Sambucus nigra subsp. palmensis C- Sambucus racemosa GENBANK rbcl	0,008
Sambucus nigra subsp. palmensis G - Sambucus nigra subsp. palmensis P-rbcl	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis G - Sambucus nigra subsp. palmensis T-rbcl	0,002
Sambucus nigra subsp. palmensis G -Sambucus nigra subsp. palmensis C-rbcl	0,000
Sambucus nigra subsp. Palmensis G- Sambucus racemosa GENBANK rbcl	0,008
Sambucus nigra subsp. palmensis P - Sambucus nigra subsp. palmensisC-rbcl	0,000
Sambucus nigra subsp. Palmensis P- Sambucus racemosa GENBANK rbcl	0,008
Sambucus nigra subsp. palmensis T - Sambucus nigra subsp. palmensis C-rbcl	0,002
Sambucus nigra subsp. palmensis T - Sambucus nigra subsp. palmensis P rbcl	0,002
Sambucus nigra subsp. palmensis T- Sambucus racemosa GENBANK rbcl	0,009

**Tabla S3 (continuación-XIV)**

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Senecio hermosae G-Pericallis malviflora AZ GENBANK rbcL	0,003
Sideritis gomerae subsp. gomerae G- Sideritis lotsyi G rbcL	0,001
Sideritis gomerae subsp. gomerae G- Sideritis syriaca GENBANK-rbcL	0,002
Sideritis lotsyi G-Sideritis syriaca GENBANK-rbcL	0,002
Silene bourgouei G-Silene gallica GENBANK rbcL	0,010
Silene bourgouei G-Silene lagunensis T rbcL	0,010
Silene bourgouei G-Silene nocteolens T rbcL	0,009
Silene lagunensis T-Silene gallica GENBANK rbcL	0,014
Silene nocteolens T-Silene gallica GENBANK rbcL	0,015
Silene nocteolensT-Silene lagunensis T rbcL	0,002
Sonchus gonzalezpadronii G-Sonchus tenerrimus AZ GENBANK rbcL	0,004
Sonchus willdpretii G- Sonchus tenerrimus AZ GENBANK rbcL	0,004
Sonchus willdpretii G-S. gomerensisG-rbcL	0,000
Teline stenopetala ssp. microphylla G-Teline rosmanirifoliaC DNABANK rbcL	0,016
Teline stenopetala ssp. pauciovulata G- Teline rosmanirifoliaC DNABANK rbcL	0,005
Teline stenopetala ssp. pauciovulata G-Teline stenopetala ssp. microphylla G-rbcL	0,000
Viola riviniana G-Viola odorataAZ GENBANK rbcL	0,002
Viola riviniana G-Viola riviniana MD rbcL	0,000
Viola riviniana MD-Viola odorata AZ GENBANK rbcL	0,002
<b>COMPARACIONES INTRA-ESPECÍFICAS</b>	
Apollonias barbujana G-matK	0,001
Apollonias ceballosii G- matK	0,003
Argyranthemum broussetii ssp. broussetii-T matK	0,000
Argyranthemum broussetii ssp. gomerensis-G matK	0,000
Argyranthemum callichrysum-G matK	0,000
Asparagus fallax G-matK	0,000
Asparagus fallax T-matK	0,000
Bystropogon organifolius G- matK	0,000
Bystropogon organifolius P- matK	0,000
Bystropogon organifolius T- matK	0,000
Carex perraudieriana G- matK	0,000
Carex perraudieriana P- matK	0,003
Carex perraudieriana T- matK	0,000
Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius G- matK	0,000
Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius T- matK	0,000
Cistus chinamadensis subsp. chinamadensis- matK	0,000
Cistus chinamadensis subsp. gomerae- matK	0,001
Crambe gomerae- matK	0,000
Crambe strigosaG- matK	0,001
Crambe willdpretii- matK	0,000
Erica arborea G- matK	0,000

**Tabla S3 (continuación-XV)**

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Erica arborea MD- matK	0,001
Erica arborea T- matK	0,002
Erica platycodon G- matK	0,000
Erica platycodon T- matK	0,000
Euphorbia borgueauana T- matK	0,000
Euphorbia lambii G- matK	0,000
Euphorbia mellifera G- matK	0,000
Euphorbia mellifera MD- matK	0,000
Euphorbia mellifera T- matK	0,000
Festuca agustinii C- matK	0,001
Festuca agustinii G- matK	0,000
Festuca agustinii T- matK	0,000
Gallium scabrum G- matK	0,002
Gallium scabrum T- matK	0,000
Geranium reuteri G- matK	0,002
Geranium reuteri T- matK	0,000
Greenovia diplocycla G- matK	0,002
Greenovia diplocycla P- matK	0,001
Heberdenia excelsa G- matK	0,000
Heberdenia excelsa MD- matK	0,000
Heberdenia excelsa T- matK	0,000
Ilex perado ssp. lopezlilloi G- matK	0,000
Ilex perado ssp. platyphylla G- matK	0,000
Laurus novocanariensis G- matK	0,001
Laurus novocanariensis MD- matK	0,001
Lolium edwardii T- matK	0,000
Lolium grex canariense C- matK	0,003
Lolium grex canariense G- matK	0,000
Lolium grex canariense T- matK	0,000
Micromeria benthami C- matK	0,000
Micromeria varia ssp. canariensis C- matK	0,000
Micromeria varia ssp. gomerensis G- matK	0,000
Micromeria varia ssp. rupestris F- matK	0,000
Micromeria varia ssp. thymoides MD- matK	0,000
Myrica faya G- matK	0,004
Myrica rivas-martinezii G- matK	0,000
Ocotea foetens G- matK	0,000
Ocotea foetens MD- matK	0,002
Parolinia aridanae- matK	0,000
Parolinia filifolia- matK	0,000
Parolinia glabriuscula- matK	0,000

Tabla S3 (continuación-XVII)

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Parolinia intermedia- matK	0,000
Parolinia ornata- matK	0,002
Parolinia platypetala- matK	0,000
Parolinia schizogynoidesG- matK	0,007
Pericallis hansenii- matK	0,000
Pericallis steetzii- matK	0,000
Picconia excelsa G- matK	0,000
Picconia excelsa MD- matK	0,000
Polycarpaea divaricata C (cf)- matK	0,027
Polycarpea latifolia- matK	0,000
Rubus bollei C-rbcl	0,000
Rubus bollei F- matK	0,000
Rubus bollei G- matK	0,000
Rubus bollei MD- matK	0,000
Ruta microcarpa G- matK	0,000
Ruta oreojasme C- matK	0,000
Ruta pinnata-P- matK	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis C- matK	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis G- matK	0,004
Sambucus nigra subsp. palmensis P- matK	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis T- matK	0,000
Senecio hermosae- matK	0,000
Sideritis gomerae subsp. gomeraeG- matK	0,000
Sideritis lotsyiG- matK	0,000
Silene bourgouei G- matK	0,000
Silene lagunensis T- matK	0,000
Silene nocteolens T matK	0,000
Sonchus gonzalez-padronii- matK	0,000
Sonchus willdpretii- matK	0,000
Teline stenopetala ssp. microphylla-matK	0,000
Teline stenopetala ssp. pauciovulata- matK	0,000
Viola riviniana G- matK	0,000
Viola riviniana MD- matK	0,000
Apollonias barbujana G-rbcl	0,000
Apollonias ceballosii G-rbcl	0,000
Argyranthemum broussetii ssp. broussetii-T rbcl	0,000
Argyranthemum broussetii ssp. gomerensis-G rbcl	0,000
Argyranthemum callichrysum-G rbcl	0,000
Asparagus fallax G-rbcl	0,000
Asparagus fallax T-rbcl	0,000
Bystropogon organifolius G-rbcl	0,000



**Tabla S3 (continuación-XVIII)**

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Bystropogon origanifolius P-rbcl	0,000
Bystropogon origanifolius T-rbcl	0,000
Carex perraudieriana G-rbcl	0,004
Carex perraudieriana P-rbcl	0,000
Carex perraudieriana T-rbcl	0,000
Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius G-rbcl	0,000
Chamaecytisus proliferus subsp. angustifolius T-rbcl	0,002
Cistus chinamadensis subsp. chinamadensisG-rbcl	0,000
Cistus chinamadensis subsp. gomeraeG-rbcl	0,000
Crambe gomeraeG-rbcl	0,004
Crambe strigosaG-rbcl	0,000
Crambe willdpretiiG-rbcl	0,000
Erica arborea G-rbcl	0,017
Erica arborea MD-rbcl	0,047
Erica arborea T-rbcl	0,002
Erica platycodon G-rbcl	0,000
Erica platycodon T-rbcl	0,018
Euphorbia borgueauana T-rbcl	0,000
Euphorbia lambii G-rbcl	0,000
Euphorbia mellifera G-rbcl	0,002
Euphorbia mellifera MD-rbcl	0,002
Euphorbia mellifera T-rbcl	0,000
Festuca agustinii C-rbcl	0,003
Festuca agustinii G-rbcl	0,000
Festuca agustinii T-rbcl	0,002
Gallium scabrum G-rbcl	0,000
Gallium scabrum T-rbcl	0,000
Geranium reuteri G-rbcl	0,002
Geranium reuteri T-rbcl	0,002
Greenovia diplocycla G-rbcl	0,006
Greenovia diplocycla P-rbcl	0,003
Heberdenia excelsa G-rbcl	0,000
Heberdenia excelsa MD-rbcl	0,000
Heberdenia excelsa T-rbcl	0,000
Ilex perado ssp. lopezlilloi G-rbcl	0,000
Ilex perado ssp. platyphylla G-rbcl	0,010
Laurus novocanariensis G-rbcl	0,002
Laurus novocanariensis MD-rbcl	0,000
Lolium edwardii T-rbcl	0,000
Lolium grex canariense C-rbcl	0,000
Lolium grex canariense G-rbcl	0,000

**Tabla S3 (continuación-XX)**

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Lolium grex canariense T-rbcl	0,000
Micromeria benthami C-rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. canariensis C-rbcl	0,002
Micromeria varia ssp. gomerensisG-rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. rupestris F-rbcl	0,000
Micromeria varia ssp. thymoides MD-rbcl	0,002
Myrica faya G-rbcl	0,000
Myrica rivas-martinezii G-rbcl	0,000
Ocotea foetens G-rbcl	0,000
Ocotea foetens MD-rbcl	0,000
Parolinia aridanaeP-rbcl	0,000
Parolinia filifoliaC-rbcl	0,000
Parolinia glabriusculaC-rbcl	0,000
Parolinia intermedia T-rbcl	0,000
Parolinia ornata C-rbcl	0,000
Parolinia platypetala C-rbcl	0,000
Parolinia schizogynoidesG-rbcl	0,000
Pericallis hansenii G-rbcl	0,000
Pericallis steetzii G-rbcl	0,000
Picconia excelsa G-rbcl	0,003
Picconia excelsa MD-rbcl	0,002
Polycarpaea cf. divaricata C -rbcl	0,000
Polycarpaea latifoliaG-rbcl	0,006
Rubus bollei C-rbcl	0,000
Rubus bollei F-rbcl	0,000
Rubus bollei G-rbcl	0,000
Rubus bollei MD-rbcl	0,000
Ruta microcarpaG -rbcl	0,000
Ruta oreojasme C-rbcl	0,000
Ruta pinnata-P-rbcl	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis C-rbcl	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis G-rbcl	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis P-rbcl	0,000
Sambucus nigra subsp. palmensis T-rbcl	0,002
Senecio hermosaeG-rbcl	0,000
Sideritis gomerae subsp. gomeraeG-rbcl	0,002
Sideritis lotsyiG-rbcl	0,000
Silene bourguaeui G-rbcl	0,000
Silene lagunensis T-rbcl	0,000
Silene nocteolens T-rbcl	0,000
Sonchus gonzalez-padroniiG-rbcl	0,000

**Tabla S3 (continuación-XXI)**

<b>TAXONES</b>	<b>distancias</b>
Sonchus willdpretii-rbcl	0,000
Teline stenopetala ssp. microphylla G-rbcl	0,000
Teline stenopetala ssp. pauciovulata G-rbcl	0,000
Viola riviniana G-rbcl	0,000
Viola riviniana MD-rbcl	0,000

**Anexo IV: Tabla S4.** Número total de especies por género presentes en Canarias (según el listado de Arechavaleta *et al.* coord. 2010) Se indica el total de especies endémicas y nativas distribuidas en Canarias respecto al número de especies endémicas y nativas analizadas dentro del capítulo 4 de esta tesis doctoral.

GENUS	ENDÉMICAS		NATIVAS	
	TOTAL	ANALIZADAS	TOTAL	ANALIZADAS
<i>Apollonias</i>	1	1	1	1
<i>Argyranthemum</i>	35	3	0	0
<i>Asparagus</i>	5	1	5	0
<i>Bethencourtia</i>	3	1	0	0
<i>Bystropogon</i>	5	2	0	0
<i>Carex</i>	3	1	1	0
<i>Chamaecytisus</i>	4	1	0	0
<i>Cistus</i>	13	2	1	0
<i>Crambe</i>	15	4	0	0
<i>Erica</i>	2	1	1	1
<i>Euphorbia</i>	11	2	5	1
<i>Festuca</i>	1	1	0	0
<i>Galium</i>	0	0	10	1
<i>Geranium</i>	1	1	5	0
<i>Greenovia</i>	4	2	0	0
<i>Heberdenia</i>	0	0	1	1
<i>Ilex</i>	2	2	2	1
<i>Laurus</i>	0	0	1	1
<i>Lolium</i>	1	1	3	1
<i>Micromeria</i>	26	4	1	1
<i>Morella</i>	1	1	1	1
<i>Ocotea</i>	0	0	1	1
<i>Parolinia</i>	6(+1)	6(+1)	0	0
<i>Pericallis</i>	12	2	0	0
<i>Picconia</i>	0	0	1	1
<i>Pleiomeris</i>	1	1	0	0
<i>Polycarpaea</i>	8	2	1	0
<i>Rubus</i>	1	1	2	2
<i>Ruta</i>	3	3	0	0
<i>Sambucus</i>	1	1	1	1
<i>Sideritis</i>	30	2	0	0
<i>Silene</i>	8	3	20	1
<i>Sonchus</i>	21	2	7	1
<i>Teline</i>	18	3	2	1
<i>Viola</i>	3	1	4	1

(+1): Aunque la descripción de *P. aridanae* Santos está pendiente de publicación (y por lo tanto no está incluida en la lista de Arechavaleta *et al.* coord. 2010), esta especie se analizó en este estudio.

**Anexo V:** Artículo Jaén-Molina *et al.* 2014 (*Molecular Ecology Resources*)

**Anexo VI:** Artículo Jaén-Molina *et al.* 2010 (*Proyectos de investigación en parques nacionales 2006-2009*)

**NOTA:** Estos Anexos sólo han sido incluidos en la versión digital de esta tesis doctoral.

## **Capítulo 5**

**Anexo VII:** Listado de taxones incluidos y excluidos en el capítulo 5 de esta tesis.

### **1. ESPECIES EXCLUIDAS**

Las siguientes especies se eliminaron de los listados obtenidos a partir de la base de datos Atlantis 3.0 (Gobierno de Canarias, 2012) por el motivo detallado en cada apartado:

**a) Especies pertenecientes al grupo de los Pteridófitos** (no se incluyeron en esta tesis)

- Sinopteridaceae

*Cheilanthes pulchella* Bory & Willd.

- Dryopteridaceae

*Dryopteris oligodonta* (Desv.) Pic.-Serm.

**b) Especies introducidas o de dudoso origen nativo en Gran Canaria**

- Asteraceae

*Asteriscus sericeus* (L. f.) DC.

- Boraginaceae

*Echium wildpretii* Pearson ex Hook. f.

*Echium horridum* Batt.

- Fabaceae

*Ononis serrata* Forssk.

**c) Especies no endémicas**

Las siguientes especies aparecen en el Listado de la propuesta de la Reserva de La Biosfera de Gran Canaria (Jiménez-Suárez *et al.* 2005) pero no son endémicas de Canarias según Arechavaleta *et al.* coord. (2010):

- Asteraceae

*Tolpis glabrescens* Kämmer

- Boraginaceae

*Myosotis discolor* Pers. subsp. *canariensis* (Pit.) Grau

- Caryophyllaceae

*Bufonia paniculata* F. Dubois ex Delarbre

- Cupressaceae

*Juniperus turbinata* subsp. *canariensis* (A.P. Guyot in Mathou & A.P. Guyot) Rivas-Mart., Wildpret & P. Pérez

- Hypericaceae

*Hypericum canariense* L.

- Lamiaceae

*Sideritis dendro-chahorra* Bolle

- Lauraceae

*Laurus novocanariensis* Rivas-Mart., Lousa, Fern. Prieto, E. Días, J.C. Costa & C. Aguiar

- Plantaginaceae

*Plantago coronopus* L.

- Poaceae

*Anisantha rubens* L. subsp. *kunkelii* (H. Scholz) H. Scholz

*Melica ciliata* L. subsp. *magnolii* (Green & Godr.) K. Richt

*Oropetium capense* Stapf subsp. *hesperidum* (Maire) Marrero Rodr.

- Rhamnaceae

*Rhamnus glandulosa* Aiton

- Rosaceae

*Bencomia caudata* (Aiton) Webb & Berthel.

#### **d) Especies no presentes en la zona delimitada por la RBGC**

Especies citadas en la base de datos Atlantis (Gobierno de Canarias, 2012) pero no incluidas en la zona delimitada por la RBGC según datos de distribución actualizados:

- Convallariaceae

*Semele gayae* (Webb) Svent. & G. Kunkel

- Rhamnaceae

*Rhamnus crenulata* Aiton

- Hyacinthaceae

*Scilla dasyantha* Webb & Berthel.

**NOTA:** Tampoco se consideraron dentro de esta tesis, aquellas especies endémicas de Macaronesia pero que no eran endémicas de Canarias como por ejemplo: *Jasminum odoratissimum* L., *Ilex canariensis* Poir. o *Persea indica* (L.) C. K. Spreng).

## **2. ESPECIES INCLUIDAS**

Las siguientes especies no están recogidas en los listados de la propuesta de la RBGC (Jiménez-Suárez *et al.* 2005) pero sí se encuentran citadas en los listados de la base de datos Atlantis (Gobierno de Canarias, 2012), por lo que las incluimos en los estudios realizados dentro de este capítulo de tesis.

- Asteraceae

*Argyranthemum frutescens* (L.) Sch. Bip. subsp. *canariae* (Christ) Humphries

*Pericallis hadrosoma* (Svent.) B. Nord.

- Brassicaceae

*Lobularia canariensis* (DC.) L. Borgen subsp. *canariensis*

- Convallariaceae

*Asparagus arborescens* Willd.

- Cistaceae

*Cistus horrens* Demoly

*Cistus ocreatus* C. Sm. in L. von Buch

*Helianthemum bystropogophyllum* Svent.

*Helianthemum inaguae* Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles

- Convolvulaceae

*Convolvulus floridus* L. f.

- Fabaceae

*Lotus tenellus* (Lowe) Sandral, A. Santos & D.D. Sokoloff

- Lamiaceae

*Sideritis guayedrae* Marrero Rodr.



- Plumbaginaceae

*Limonium sventenii* A. Santos & M. Fernández

- Urticaceae

*Gesnouinia arborea* (L. f.) Gaudich.

*Urtica stachyoides* Webb & Berthel.

### **3. CONSIDERACIONES SOBRE NOMENCLATURA TAXONÓMICA**

#### **a) Nombres inválidos según la Taxonomía reciente.**

- Caryophyllaceae

*Bufonia calderae* Chrtek & Krísa (= *Bufonia paniculata* F. Dubois ex Delarbre)

- Fabaceae

*Lotus genistoides* Webb. (= *Lotus spartioides* Webb & Berthel.)

#### **b) Sinonimias y división de táxones** (Nombre antiguo = Nombre(s) aceptado(s))

- Adoxaceae

*Viburnum tinus* subsp. *rigidum* (Vent.) P.Silva = *Viburnum rigidum* Vent.

- Asteraceae

*Allagopappus dichotomus* (L. fil) Cass. = *Allagopappus canariensis* (Willd.) Greuter

*Sonchus leptcephalus* Cass. = *Atalanthus pinnatus* (L. f.) D. Don

*Sonchus arboreus* DC. = *Atalanthus arboreus* (DC.) Sw.

*Sonchus capillaris* Svent. = *Atalanthus capillaris* (Svent.) A. Hansen & Sunding

*Tanacetum ferulaceum* (Webb) Sch.Bip. = *Gonospermum ferulaceum* (Webb) Febles

*Tanacetum oshanahanii* Marrero Rodr., Febles & Suárez = *Gonospermum oshanahanii* (Marrero Rodr., Febles & Suárez) Febles

*Tanacetum ptarmiciflorum* (Webb & Berth.) Sch.Bip. = *Gonospermum ptarmiciflorum* (Webb) Febles

- Cistaceae

*Cistus symphytifolius* = taxon dividido en *Cistus horrens* Demoly y *Cistus ocreatus* C. Sm. in L. von Buch

- Crassulaceae

*Aeonium manriqueorum* Bolle = *Aeonium arboreum* (L.) Webb & Berthel. subsp. *arboreum*

*Aeonium virgineum* Webb ex Christ en Bot. Jahrb. = *Aeonium canariense* (L.) Webb & Berthel. subsp. *virgineum* (Webb ex Christ) Bañares

- Fabaceae

*Lotus genistoides* Webb. = *Lotus spartioides* Webb & Berthel

*Lotus glaucus* Dryand. var. *leptophyllus* Lowe, *Lotus glaucus* Dryand. var. *villosus* Brand = *Lotus tenellus* (Lowe) Sandral, A. Santos & D.D. Sokoloff

*Ononis serrata* var. *erecta* Webb & Berthel. = *Ononis serrata* Forssk.

- Hypericaceae

*Hypericum canariense* L. var. *canariense* = *Hypericum canariense* L.

- Plantaginaceae

*Plantago aschersonii* Bolle = *Plantago coronopus* L.

- Plumbaginaceae

*Limonium preauxi* (Webb & Berthel.) Kuntze = *Limonium sventenii* A. Santos & M. Fernández

- Poaceae

*Melica canariensis* Hempel = *Melica ciliata* L. subsp. *magnolii* (Green & Godr.) K. Richt

- Sapotaceae

*Sideroxylon mirmulano* Sol. ex Lowe = *Sideroxylon canariensis* T. Leyens, W. Lobin & A. Santos

**ANEXO VIII: Tabla S5.** Codificación de los taxones endémicos de Canarias presentes en la RBGC y considerados en este capítulo de tesis.

<b>TAXON</b>	<b>CÓDIGO</b>
<i>Adenocarpus foliolosus</i>	aa
<i>Aeonium arboretum</i>	ab
<i>Aeonium arboreum arboreum</i>	ac
<i>Aeonium canariense</i>	ad
<i>Aeonium canariense virgineum</i>	ae
<i>Aeonium manriqueorum</i>	af
<i>Aeonium percarneum</i>	ag
<i>Aeonium simsii</i>	ah
<i>Aeonium undulatum</i>	ai
<i>Aeonium virgineum</i>	aj
<i>Aichryson laxum</i>	ak
<i>Aichryson pachycaulon</i>	al
<i>Aichryson pachycaulon praetermissum</i>	am
<i>Aichryson parlatorei</i>	an
<i>Aichryson porphyrogennetos</i>	ao
<i>Aichryson punctatum</i>	ap
<i>Allagopappus canariensis</i>	aq
<i>Allagopappus dichotomus</i>	ar
<i>Allagopappus viscosissimus</i>	as
<i>Andryala pinnatifida</i>	at
<i>Andryala pinnatifida pinnatifida</i>	au
<i>Andryala pinnatifida preauxiana</i>	aw
<i>Arbutus canariensis</i>	ax
<i>Argyranthemum adauctum</i>	ay
<i>Argyranthemum adauctum canariense</i>	az
<i>Argyranthemum adauctum gracile</i>	ba
<i>Argyranthemum adauctum jacobaeifolium</i>	bb
<i>Argyranthemum escarrei</i>	bc
<i>Argyranthemum filifolium</i>	bd
<i>Argyranthemum frutescens</i>	be
<i>Argyranthemum frutescens canariae</i>	bf
<i>Argyranthemum frutescens frutescens</i>	bg
<i>Argyranthemum frutescens gracilescens</i>	bh
<i>Argyranthemum frutescens pumilum</i>	bi
<i>Argyranthemum lidii</i>	bj
<i>Artemisia thuscula</i>	bk
<i>Artemisia ramosa</i>	bl
<i>Asparagus arborescens</i>	bm
<i>Asparagus plocamoides</i>	bn
<i>Asparagus umbellatus</i>	bp
<i>Asparagus umbellatus umbellatus</i>	bq
<i>Asteriscus graveolens</i>	br
<i>Asteriscus graveolens stenophyllus</i>	bs
<i>Atalanthus arboreus</i>	bt

<b>TAXON</b>	<b>CÓDIGO</b>
<i>Atalanthus capillaris</i>	bu
<i>Atalanthus pinnatus</i>	bw
<i>Babcockia platylepis</i>	bx
<i>Bencomia brachystachya</i>	by
<i>Bosea yervamora</i>	bz
<i>Bosea yerbamora</i>	ca
<i>Bryonia verrucosa</i>	cb
<i>Bupleurum salicifolium</i>	cd
<i>Bupleurum salicifolium aciphyllum</i>	ce
<i>Bystropogon canariensis</i>	cf
<i>Bystropogon organifolius</i>	cg
<i>Camptoloma canariense</i>	ch
<i>Campylanthus salsoloides</i>	ci
<i>Canarina canariensis</i>	cj
<i>Carduus baeocephalus</i>	ck
<i>Carduus baeocephalus baeocephalus</i>	cl
<i>Carduus baeocephalus microstigma</i>	cm
<i>Carduus clavulatus</i>	cn
<i>Carex canariensis</i>	co
<i>Carlina canariensis</i>	cp
<i>Carlina texedae</i>	cr
<i>Ceballosia fruticosa</i>	cs
<i>Ceropegia fusca</i>	cu
<i>Chamaecytisus proliferus</i>	cx
<i>Chamaecytisus proliferus proliferus</i>	cy
<i>Chamaecytisus proliferus meridionalis</i>	cz
<i>Cheirolophus arbutifolius</i>	db
<i>Cheirolophus falcisectus</i>	dc
<i>Chrysoprenanthes pendula</i>	dd
<i>Chrysoprenanthes pendula flaccida</i>	de
<i>Chrysoprenanthes pendula pendula</i>	df
<i>Cistus ocreatus</i>	dg
<i>Cistus horrens</i>	dh
<i>Cistus symphytifolius</i>	di
<i>Convolvulus canariensis</i>	dj
<i>Convolvulus caput-medusae</i>	dk
<i>Convolvulus floridus</i>	dl
<i>Convolvulus glandulosus</i>	dm
<i>Convolvulus perraudieri</i>	dn
<i>Convolvulus scoparius</i>	do
<i>Crambe pritzelii</i>	dp
<i>Crambe scoparia</i>	dq
<i>Crambe tamadabensis</i>	dr
<i>Dactylis smithii</i>	ds
<i>Dactylis smithii smithii</i>	dt
<i>Dendriopoterium menendezii</i>	du
<i>Dendriopoterium pulidoi</i>	dw
<i>Descurainia artemisioides</i>	dx

<b>TAXON</b>	<b>CÓDIGO</b>
<i>Descurainia preauxiana</i>	dy
<i>Dorycnium broussonetii</i>	dz
<i>Dracaena tamaranae</i>	ea
<i>Dracunculus canariensis</i>	eb
<i>Echium bonnetii</i>	ef
<i>Echium callithyrsum</i>	eg
<i>Echium decaisnei</i>	eh
<i>Echium decaisnei decaisnei</i>	ei
<i>Echium onosmifolium</i>	ej
<i>Echium onosmifolium onosmifolium</i>	ek
<i>Echium onosmifolium spectabile</i>	el
<i>Echium strictum</i>	em
<i>Echium strictum strictum</i>	en
<i>Echium triste</i>	eo
<i>Echium triste triste</i>	ep
<i>Erucastrum canariense</i>	eq
<i>Erysimum albescens</i>	er
<i>Euphorbia aphylla</i>	et
<i>Euphorbia canariensis</i>	eu
<i>Ferula linkii</i>	ew
<i>Festuca agustinii</i>	ex
<i>Forsskaolea angustifolia</i>	ey
<i>Geranium reuteri</i>	ez
<i>Globularia ascanii</i>	fa
<i>Globularia sarcophylla</i>	fc
<i>Gonospermum ferulaceum</i>	fd
<i>Gonospermum oshanahanii</i>	fe
<i>Gonospermum ptarmiciflorum</i>	ff
<i>Greenovia aurea</i>	fg
<i>Habenaria tridactylites</i>	fh
<i>Helianthemum bystropogophyllum</i>	fj
<i>Helianthemum inaguae</i>	fk
<i>Helianthemum tholiforme</i>	fl
<i>Hypericum coadunatum</i>	fn
<i>Hypericum reflexum</i>	fp
<i>Isoplexis isabelliana</i>	fr
<i>Juniperus cedrus</i>	ft
<i>Juniperus cedrus cedrus</i>	fu
<i>Kickxia pendula</i>	fx
<i>Kickxia scoparia</i>	fy
<i>Kleinia neriifolia</i>	fz
<i>Lavandula bramwellii</i>	gb
<i>Lavandula minutolii</i>	gc
<i>Lavandula canariensis</i>	gd
<i>Lavatera acerifolia</i>	ge
<i>Limonium benmageci</i>	gf
<i>Limonium preauxii</i>	gg
<i>Limonium vigaroense</i>	gh

<b>TAXON</b>	<b>CÓDIGO</b>
<i>Lobularia canariensis</i>	gi
<i>Lobularia canariensis canariensis</i>	gj
<i>Lobularia canariensis intermedia</i>	gk
<i>Lobularia canariensis microsperma</i>	gl
<i>Lotus callis-viridis</i>	gn
<i>Lotus holosericeus</i>	go
<i>Lotus spartioides</i>	gp
<i>Marcetella moquiniana</i>	gq
<i>Maytenus canariensis</i>	gr
<i>Micromeria benthamii</i>	gt
<i>Micromeria helianthemifolia</i>	gu
<i>Micromeria lanata</i>	gw
<i>Micromeria leucantha</i>	gx
<i>Micromeria pineolens</i>	gy
<i>Micromeria tenuis</i>	gz
<i>Micromeria tenuis linkii</i>	ha
<i>Micromeria tenuis tenuis</i>	hb
<i>Micromeria varia</i>	hc
<i>Micromeria varia canariensis</i>	hd
<i>Micromeria varia meridialis</i>	he
<i>Monanthes brachycaulos</i>	hf
<i>Neochamaelea pulverulenta</i>	hi
<i>Olea cerasiformis</i>	hj
<i>Ononis angustissima</i>	hk
<i>Ononis angustissima angustissima</i>	hl
<i>Ononis angustissima longifolia</i>	hm
<i>Orchis canariensis</i>	ho
<i>Pancratium canariense</i>	hp
<i>Parolinia filifolia</i>	hq
<i>Parolinia ornata</i>	hr
<i>Paronychia canariensis</i>	hs
<i>Paronychia capitata</i>	ht
<i>Paronychia capitata canariensis</i>	hu
<i>Patellifolia webbiana</i>	hw
<i>Pericallis tussilaginis</i>	hx
<i>Pericallis webbii</i>	hy
<i>Phagnalon umbelliforme</i>	ia
<i>Phoenix canariensis</i>	ib
<i>Pinus canariensis</i>	id
<i>Plantago arborescens</i>	ie
<i>Plantago arborescens arborescens</i>	if
<i>Plantago asphodeloides</i>	ig
<i>Plantago webbii</i>	ih
<i>Plocama pendula</i>	ii
<i>Poa pitardiana</i>	ij
<i>Polycarpaea aristata</i>	ik
<i>Polycarpaea divaricata</i>	il
<i>Polycarpaea filifolia</i>	im

<b>TAXON</b>	<b>CÓDIGO</b>
<i>Polycarpha latifolia</i>	in
<i>Pterocephalus dumetorus</i>	io
<i>Reichardia ligulata</i>	ip
<i>Reichardia crystallina</i>	iq
<i>Reseda crystallina</i>	ir
<i>Reseda scoparia</i>	is
<i>Rubia fruticosa</i>	iu
<i>Rubia fruticosa melanocarpa</i>	iw
<i>Rumex lunaria</i>	iy
<i>Ruta oreojasme</i>	iz
<i>Salsola divaricata</i>	jb
<i>Salvia canariensis</i>	jc
<i>Schizogyne glaberrima</i>	jd
<i>Scilla dasyantha</i>	je
<i>Scilla haemorrhoidalis</i>	jf
<i>Scrophularia calliantha</i>	jg
<i>Seseli webbii</i>	jh
<i>Sideritis dasygnaphala</i>	ji
<i>Sideritis guayedrae</i>	jj
<i>Sideritis sventenii</i>	jk
<i>Sideroxylon mirmulano</i>	jl
<i>Sideroxylon canariensis</i>	jm
<i>Silene canariensis</i>	jn
<i>Silene tamaranae</i>	jo
<i>Solanum lidii</i>	jp
<i>Sonchus acaulis</i>	jq
<i>Sonchus arboreus</i>	jr
<i>Sonchus brachylobus</i>	js
<i>Sonchus canariensis</i>	jt
<i>Sonchus canariensis canariensis</i>	ju
<i>Sonchus congestus</i>	jw
<i>Sonchus leptoccephalus</i>	jx
<i>Sventenia bupleuroides</i>	jy
<i>Tanacetum ferulaceum</i>	jz
<i>Tanacetum oshanahanii</i>	ka
<i>Tanacetum ptarmiciflorum</i>	kb
<i>Teline microphylla</i>	kc
<i>Teline rosmarinifolia</i>	kd
<i>Teline rosmarinifolia eurifolia</i>	ke
<i>Teline rosmarinifolia rosmarinifolia</i>	kf
<i>Teucrium heterophyllum</i>	kg
<i>Teucrium heterophyllum brevipilosum</i>	kh
<i>Todaroa aurea</i>	ki
<i>Todaroa aurea suaveolens</i>	kj
<i>Todaroa montana</i>	kk
<i>Tolpis lagopoda</i>	kl
<i>Urtica stachyoides</i>	km
<i>Viburnum rigidum</i>	kn

<b>TAXON</b>	<b>CÓDIGO</b>
<i>Viburnum tinus</i>	ko
<i>Viburnum tinus rigidum</i>	kp
<i>Vicia cirrhosa</i>	kq
<i>Vicia filicaulis</i>	kr
<i>Volutaria canariensis</i>	kt
<i>Lotus tenellus</i>	ku
<i>Limonium sventenii</i>	kw
<i>Gesnouinia arborea</i>	kx
<i>Oropetium capense hesperidum</i>	ky
<i>Teline canariensis</i>	kz
<i>Pericallis hadrosoma</i>	la



**ANEXO IX: Tabla S6.** Taxones analizados dentro del capítulo 5 de esta tesis doctoral y muestreados en la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria (RBGC). Se indica el código de la alícuota de ADN depositada en el banco de ADN de la flora canaria (Vial Code) así como la Localidad (Municipio) donde fue recolectada. Los taxones del Anexo II que representan sinonimias no han sido incluidos en esta tabla.

N	Vial CODE	TAXONES	POBLACIÓN
1	12236-12238	<i>Adenocarpus foliolosus</i> ([Dryand. in] Aiton) DC. var. <i>foliolosus</i>	Desde Llanos Ana López a inicio Camino Roque Nublo (Tejeda)
2	1504-1506	<i>Aeonium arboreum</i> (L.) Webb & Berthel. ssp. <i>arboreum</i>	Mesa Junquillo (Tejeda)
3	6856-6858	<i>Aeonium canariense</i> ssp. <i>virgineum</i> (Webb ex Christ) Bañares	Los Tilos (Moya)
4	1671-1673	<i>Aeonium percarneum</i> (R.P.Murr.) (Pit.& Proust)	Cuesta de Silva (Guía)
5	13627-13629	<i>Aeonium simsii</i> (Sweet) (Stearn)	Camaretas (San Mateo)
6	6859-6860	<i>Aeonium undulatum</i> (Webb & Berthel.)	Los Tilos (Moya)
7	6964-6965	<i>Aichryson laxum</i> (Haw.) (Bramw.)	Los Tilos (Moya)
8	13695-13696	<i>Aichryson pachycaulon</i> (Bolle)	Barranco del Andén (Valleseco)
9	13697	<i>Aichryson pachycaulon</i> ssp. <i>praetermissum</i> Bramwell	Barranco del Andén (Valleseco)
10	13573-13575	<i>Aichryson parlatorei</i> (Bolle)	Fagagesto (Guía)
11	13218-13221	<i>Aichryson porphyrogennetos</i> (Bolle)	Barranco de Moya (Moya)
12	13392-13395	<i>Aichryson punctatum</i> (C. Sm. ex Buch) Webb & Berthel.	El Calero (San Mateo)
13	13229	<i>Allagopappus canariensis</i> (Willd.) Greuter	Roque Bentayga (Tejeda)
14	12153-12155	<i>Allagopappus viscosissimus</i> (Bolle)	Carretera de Tunte a Risco Blanco (Tirajana)
15	7363-7374-	<i>Andryala pinnatifida</i> Aiton	Andenes de Guayedra a Barranco Oscuro (Moya)
16	7379	<i>Andryala pinnatifida</i> ssp. <i>preauxiana</i> (Sch. Bip.) G. Kunkel	Tenteniguada (Valsequillo)
17	8509-8510	<i>Arbutus canariensis</i> Veill.	Barranco Oscuro (Moya)
18	1630-1631	<i>Argyranthemum adauctum</i> (Link) Humphries	Barranco del Incienso y Andén Blanco (San Nicolás de Tolentino)
19	S2009-1050	<i>Argyranthemum adauctum</i> ssp. <i>canariense</i> (Sch. Bip.) Humphries	Barranco de las Magarzas (Tejeda)
20	2366	<i>Argyranthemum adauctum</i> ssp. <i>gracile</i> (Sch. Bip.) Humphries	Montaña Faneque (Agaete)
21	I06	<i>Argyranthemum adauctum</i> ssp. <i>jacobaeifolium</i> (Sch. Bip.) Humphries	Barranco del Pinillo (Teror)
22	1632-1633	<i>Argyranthemum escarrei</i> (Svent.) Humphries	La Aldea (San Nicolás de Tolentino)
23	2357	<i>Argyranthemum filifolium</i> (Sch. Bip.) Humphries	Cortadores (Barranco Arguineguín)
24	13515-13516	<i>Argyranthemum frutescens</i> (L.) Sch. Bip.	En la base del Pico de La Atalaya (Guía)
25	13517	<i>Argyranthemum frutescens</i> ssp. <i>canariae</i> (Christ) Humphries	San Felipe (Guía)

Tabla S6 (continuación-I)

N	Vial CODE	TAXONES	POBLACIÓN
26	1318	<i>Argyranthemum frutescens</i> ssp. <i>pumilum</i> Humphries	En la base del Pico de La Atalaya (Guía)
27	4207-4208	<i>Argyranthemum lidii</i> Humphries	Andén Verde (San Nicolás de Tolentino)
28	13371-13372	<i>Artemisia thuscula</i> Cav.	Mesa Junquillo (Tejeda)
29	13396-13397	<i>Artemisia ramosa</i> C. Sm. in Buch	Barranco del medio Almud (Mogán)
30	13596-13600	<i>Asparagus arborescens</i> Willd.	Caldera de Bandama (Las Palmas de Gran Canaria)
31	13350-13351	<i>Asparagus plocamoides</i> Webb ex Svent.	La Agujereada (San Nicolás de Tolentino)
32	1730-1731	<i>Asparagus umbellatus</i> Link ssp. <i>umbellatus</i>	Cuesta de Silva, Barranco del Calabozo (Guía)
33	11781-11782	<i>Asteriscus graveolens</i> ssp. <i>stenophyllus</i> (Link) Greuter	Degollada de GuGuy-Playa de Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
34	B15150	<i>Atalanthus capillaris</i> (Svent.) A. Hansen & Sunding	Amagro (Gáldar)
35	13343-13346	<i>Atalanthus pinnatus</i> (L. f.) D. Don	Los Caideros, sobre la Cta. de Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
36	7786-7792-7796	<i>Babcockia platylepis</i> (Webb) Boulos	Morro de Pajonales. Inagua (Tejeda)
37	3867	<i>Bencomia brachystachya</i> Svent. ex Nordborg	Riscos Tirajana. (San Bartolomé de Tirajana)
38	13386-13389	<i>Bosea yervamora</i> L.	Ctra. de la Calzada (Las Palmas de Gran Canaria)
39	1733	<i>Bryonia verrucosa</i> Dryand.	Cuesta de Silva, Barranco del Calabozo (Guía)
40	12679-12680	<i>Bupleurum salicifolium</i> ssp. <i>aciphyllum</i> (Webb ex Parl.) Sunding & G. Kunkel	Desde el Sao a Hotel Guayarmina (Agaete)
41	8650-8652	<i>Bystropogon canariensis</i> (L.) L`Hér.	Finca de Samsó (Moya)
42	6638-6639	<i>Bystropogon origanifolius</i> L`Hér.	Barranco de La Laja, los Azulejos (Mogán)
43	13590-13592	<i>Camptoloma canariense</i> (Webb & Berthel.) Hilliard	Montaña de Almagro (Gáldar)
44	12424-12425	<i>Campylanthus salsoloides</i> (L. f.) Roth	Ctra. de Fataga a Ayagaures (San Bartolomé de Tirajana)
45	7410-7424-7423	<i>Canarina canariensis</i> (L.) Vatke	Andenes de Guayedra a Barranco Oscuro (Moya)
46	11023	<i>Carduus baeocephalus</i> Webb	Cuesta de Silva (Guía)
47	11023B	<i>Carduus baeocephalus</i> ssp. <i>baeocephalus</i>	Cuesta de Silva (Guía)
48	11024	<i>Carduus baeocephalus microstigma</i> v. Gaisberg & Wagenitz	Andén Verde (San Nicolás de Tolentino)
49	10282	<i>Carduus clavulatus</i> Link	Camino a Los Roquetes (San Mateo)
50	3891-3892	<i>Carex canariensis</i> Kük.	Bco. de La Virgen (Valleseco)
51	11821-11823	<i>Carlina canariensis</i> Pit.	Degollada de GuGuy-Playa de Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
52	12301-12303	<i>Carlina texedae</i> Marrero Rodr.	Ctra. Cruz de San Antonio (Tejeda)
53	13253-13255	<i>Ceballosia fruticosa</i> (L. f.) G. Kunkel	Ayagaures (San Bartolomé de Tirajana)

Tabla S6 (continuación-II)

N	Vial CODE	TAXONES	POBLACIÓN
54	13561-13562	<i>Ceropegia fusca</i> Haw.	Montaña de Almagro (Gáldar)
55	12319-12321	<i>Chamaecytisus proliferus</i> (L. f.) Link	Ctra. Cruz de San Antonio (Tejeda)
56	234-23476	<i>Chamaecytisus proliferus</i> ssp. <i>meridionalis</i> Acebes	Cortadores (Barranco Arguineguín)
57	12691-12698	<i>Cheirolophus arbutifolius</i> (Svent.) G. Kunkel	Desde el Sao a Hotel Guayarmina (Agaete)
58	13417-13420	<i>Cheirolophus falcisectus</i> Montelongo & Moraleda	Degollada de AguaSabina- Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
59	12763	<i>Chrysoprenanthes pendula</i> (Sch. Bip.) Bramwell	Camino del Sao a Presa de los Pérez (Agaete)
60	B15174-15183	<i>Chrysoprenanthes pendula</i> ssp. <i>flaccida</i> (Svent.) Bramwell	El Sao (Agaete)
61	11995-11999	<i>Cistus horrens</i> Demoly	Ctra. Ayacata a Chira (San Bartolomé de Tirajana)
62	12840-12842	<i>Cistus ocreatus</i> C. Sm. in L. von Buch	Ctra. circular Artenara-Tamadaba (Artenara)
63	2506-2508	<i>Convolvulus canariensis</i> L.	Los Tilos (Moya)
64	6715-6716	<i>Convolvulus caput-medusae</i> Lowe	Tufia (Telde)
65	12571/12590	<i>Convolvulus floridus</i> L.	Desde el Sao a Hotel Guayarmina (Agaete)
66	1142-1144	<i>Convolvulus glandulosus</i> (Webb) Hallier f.	Barranco de los Gallegos, Amurga (San Bartolomé de Tirajana)
67	2336-2336	<i>Convolvulus perraudieri</i> Coss.	Cortadores, Barranco Arguineguín (Mogán)
68	13428-13430	<i>Convolvulus scoparius</i> L. f.	La Filipina, Barranco de Arguineguín (Mogán)
69	8662-8664	<i>Crambe pritzelii</i> Bolle in A. Braun	Bco. del Pagador, Azuaje (Moya)
70	8692-8694	<i>Crambe scoparia</i> Svent.	Peñones del Amo (San Nicolás de Tolentino)
71	8703-8705	<i>Crambe tamadabensis</i> Prina & Marrero Rodr.	Andenes de La Breña-A. de La Tortolita (San Nicolás de Tolentino)
72	9934	<i>Dactylis smithii</i> Link. ssp. <i>smithii</i>	Amagro (Gáldar)
73	12726-12728	<i>Dendriopoterium menendezii</i> Svent.	Camino del Sao a Presa de los Pérez (Agaete)
74	13359-13361	<i>Dendriopoterium pulidoi</i> Svent. ex Bramwell	Peñones del Amo (San Nicolás de Tolentino)
75	2380	<i>Descurainia artemisioides</i> Svent.	Guayedra, andén de los Tomillos (Agaete)
76	13422-13424	<i>Descurainia preauxiana</i> (Webb) O. E. Schulz	Degollada de Agua Sabina-Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
77	7965-7967	<i>Dorycnium broussonetii</i> (Choisy ex Ser. in DC.) Webb & Berthel.	Degollada de GuGuy (San Nicolás de Tolentino)
78	3668-3669	<i>Dracaena tamaranae</i> Marrero Rodr., Almeida-Pérez & González-Martín	Tagoror Jardín Botánico Viera y Clavijo (Las Palmas de GC.)
79	8416-8417	<i>Dracunculus canariensis</i> Kunth	El Hornillo-Fagagesto, después de la Presa de los Pérez (Agaete)
80	12772-12773	<i>Echium bonnetii</i> Coincy	Camino del Sao a Presa de los Pérez (Agaete)
81	11963-11965	<i>Echium callithyrsum</i> Webb ex Bolle	Ctra. Ayacata a Chira (San Bartolomé de Tirajana)

Tabla S6 (continuación-III)

N	Vial CODE	TAXONES	POBLACIÓN
82	12064-12066	<i>Echium decaisnei</i> Webb	Circular Camino Roque Nublo-La Culata-La Goleta (Tejeda)
83	705	<i>Echium decaisnei</i> ssp. <i>decaisnei</i>	Montaña de Amagro (Gáldar)
84	12001-12003	<i>Echium onosmifolium</i> Webb	Ctra. Ayacata a Chira (San Bartolomé de Tirajana)
85	702	<i>Echium onosmifolium</i> ssp. <i>onosmifolium</i>	Los Lajiales (Tirajana)
86	PO04	<i>Echium onosmifolium</i> ssp. <i>spectabile</i> G. Kunkel	Degollada de Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
87	7360-7361	<i>Echium strictum</i> L. f.	Andenes de Guayedra a Barranco Oscuro (Moya)
88	708	<i>Echium strictum</i> ssp. <i>strictum</i>	Bco. de Los Tilos (Moya)
89	JA34	<i>Echium triste</i> Svent.	Playa Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
90	GB138	<i>Echium triste</i> ssp. <i>triste</i>	Playa Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
91	13607-13608	<i>Erucastrum canariense</i> Webb & Berthel.	Cuesta de Silva (Guía)
92	12082-12093	<i>Erysimum albescens</i> (Webb & Berthel.) Bramwell	Circular Camino Roque Nublo-La Culata-La Goleta (Tejeda)
93	7661-7663	<i>Euphorbia aphylla</i> Brouss. ex Willd.	Playa del Risco (Agaete)
94	13469-13471	<i>Euphorbia canariensis</i> L.	La Cardonera, Valle de Agaete (Agaete)
95	13006/12259	<i>Ferula linkii</i> Webb	Desde Llanos Ana López a inicio Camino Roque Nublo (Tejeda)
96	1346	<i>Festuca agustini</i> Linding.	Encima de los Riscos de Guayedra (Agaete)
97	11757-11759	<i>Forsskaolea angustifolia</i> Retz.	Degollada de GuGuy-Playa de Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
98	2376	<i>Geranium reuteri</i> Aedo & Muñoz Garm.	Guayedra, barranco de Los Palos Blancos (Agaete)
99	13689-13692	<i>Gesnouinia arborea</i> (L.) Gaud.	Barranco del Andén (Valleseco)
100	23382340	<i>Globularia ascanii</i> Bramwell & G. Kunkel	Cortadores, Barranco Arguineguín (Mogán)
101	JA38	<i>Globularia sarcophylla</i> Svent.	Entre Cañadón Sombrío y del Jierro (Gáldar)
102	13632-13635	<i>Gonospermum ferulaceum</i> (Webb) Febles	Subida al Camping de Temisas (Agüimes)
103	13309-13310	<i>Gonospermum oshanahanii</i> (Marrero Rodr., Febles & Suárez) Febles	Riscos de Guayedra (Agaete)
104	1656	<i>Gonospermum ptarmiciflorum</i> (Webb) Febles	Barranco de Tirajana (San Bartolomé de Tirajana)
105	1366-1367	<i>Greenovia aurea</i> (C. Sm. ex Hornem.) Webb & Berthel	Barranco Oscuro, Camino desde Riscos de Guayedra (Agaete)
106	13530-13531	<i>Habenaria tridactylites</i> Lindl.	cerca del Barranco de los Cabucos, El Sao (Agaete)
107	7702-7705	<i>Helianthemum bystropogophyllum</i> Svent.	Montaña de los Hornos. Inagua. (San Nicolás de Tolentino)
108	13304-13305	<i>Helianthemum inaguae</i> Marrero Rodr., González-Martín & González-Artiles	Montaña de Los Hornos, Inagua (San Nicolás de Tolentino)
109	13680-13685	<i>Helianthemum tholiforme</i> Bramwell, J. Ortega & B. Navarro	Faneque (Agaete)

Tabla S6 (continuación-IV)

N	Vial CODE	TAXONES	POBLACIÓN
110	13335-13339	<i>Hypericum coadunatum</i> C. Sm. ex Link	La umbría de la Cresta, bajo Montañón Negro (Gáldar)
111	8404-8405	<i>Hypericum reflexum</i> L. f.	El Hornillo- Fagagesto, después de la Presa de los Pérez (Agaete)
112	6721-6722	<i>Isoplexis isabelliana</i> (Webb & Berthel.) Masf.	Barranco de las magarzas, Inagua (Tejeda)
113	4110-4111	<i>Juniperus cedrus</i> Webb & Berthel. ssp. <i>cedrus</i>	Montaña del Cedro, Macizo de GuGuy (San Nicolás de Tolentino)
114	13638-13640	<i>Kickxia pendula</i> (G. Kunkel) G. Kunkel	Barranco de Guayadeque (Ingenio)
115	13636-13637	<i>Kickxia scoparia</i> (Brouss. ex Spreng.) G. Kunkel & Sunding	Subida al Camping de Temisas (Agüimes)
116	13476-13478	<i>Kleinia neriifolia</i> Haw.	Barranco de los Frailes (Mogán)
117	6640-6641	<i>Lavandula bramwellii</i> Upson & S. Andrews	Degollada de Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
118	8362-8363	<i>Lavandula canariensis</i> Mill.	Puente en el camino de San Mateo hacia Tenteniguada (Valsequillo)
119	13398-13401	<i>Lavandula minutolii</i> Bolle	Barranco del medio Almud (Mogán)
120	13363-13364	<i>Lavatera acerifolia</i> Cav.	Mesa Junquillo (Tejeda)
121	13214-13215	<i>Limonium benmageci</i> Marrero Rodr. in Marrero Rodr. & Almeida	Andenes de las Arenas, Punta La Aldea (San Nicolás de Tolentino)
122	1138-1139	<i>Limonium sventenii</i> A. Santos & M. Fernández	Barranco de los Gallegos, Amurga (San Bartolomé de Tirajana)
123	7610-7627	<i>Limonium vigaroense</i> Marrero Rodr. & Almeida	Barranquillo de Las Magarzas (Inagua)
124	13378	<i>Lobularia canariensis</i> (DC.) L. Borgen ssp. <i>canariensis</i>	Ctra. Aldea-Presa del Paralillo-Mesa del Junquillo (Tejeda)
125	13674	<i>Lobularia canariensis</i> (DC.) L. Borgen ssp. <i>microsperma</i> L. Borgen	Alto del Confital, La Isleta (Las Palmas de Gran Canaria)
126	654	<i>Lotus callis-viridis</i> Bramwell & D. H. Davis	Andén Verde (San Nicolás de Tolentino)
127	12310/12313/12315	<i>Lotus holosericeus</i> Webb & Berthel.	Pilancones (San Bartolomé de Tirajana)
128	12636-12638	<i>Lotus spartioides</i> Webb & Berthel.	Cañadón del Jierro (Gáldar)
129	2244	<i>Lotus tenellus</i> (Lowe) Sandral, A. Santos & D.D. Sokoloff	Andén Verde, Punta Góngora (San Nicolás de Tolentino)
130	1529-1530	<i>Marcetella moquiniana</i> (Webb & Berthel.) Svent	Mesa Junquillo (Tejeda)
131	7348-7349	<i>Maytenus canariensis</i> (Loes.) G. Kunkel & Sunding	Peñones del Amo (San Nicolás de Tolentino)
132	12864-12867	<i>Micromeria benthamii</i> Webb & Berthel.	Ctra. circular Artenara-Tamadaba (Artenara)
133	1160-1161	<i>Micromeria helianthemifolia</i> Webb & Berthel.	Barranco de los Gallegos, Amurga (San Bartolomé de Tirajana)
134	6633-6635	<i>Micromeria lanata</i> (C. Sm. ex Link) Benth.	Barranco de La Laja, los Azulejos (Mogán)
135	7553-7554	<i>Micromeria leucantha</i> Svent. ex P. Pérez	Peñones del Amo (San Nicolás de Tolentino)
136	12824-12827	<i>Micromeria pineolens</i> Svent.	Ctra. circular Artenara-Tamadaba (Artenara)
137	12559-12561	<i>Micromeria tenuis</i> (Link) Webb & Berthel.	Ctra. desde Artenara a La Aldea (San Nicolás de Tolentino)

Tabla S6 (continuación-V)

N	Vial CODE	TAXONES	POBLACIÓN
138	12655-12656	<i>Micromeria tenuis</i> ssp. <i>linkii</i> (Webb & Berthel.) P. Pérez	Ctra. desde Fontanales a Artenara (San Nicolás de Tolentino)
139	12673-12674	<i>Micromeria varia</i> Benth.	Camino desde Don Pedro a Tamadaba
140	1427	<i>Micromeria varia</i> ssp. <i>canariensis</i> P. Pérez	Montaña de las Vueltas, ctra. a El Sao (Agaete)
141	S2009	<i>Micromeria varia</i> ssp. <i>meridialis</i> P. Pérez	Montaña de La Gorra (San Bartolomé de Tirajana)
142	13441-13443	<i>Monanthes brachycaulos</i> (Webb in Webb & Berthel.) Lowe	Los Jediondos, degollada de Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
143	4805-4806	<i>Neochamaelea pulverulenta</i> (Vent.) Erdtman	Cruce de Tasarte (San Nicolás de Tolentino)
144	8189-8191	<i>Olea cerasiformis</i> Rivas-Mart. & del Arco	Camino a Bandama, El Cabezo (Las Palmas de Gran Canaria) Inmediaciones de la degollada de Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
145	13444-13445	<i>Ononis angustissima</i> Lam.	Camino desde Don Pedro a Tamadaba
146	12667-12668	<i>Ononis angustissima</i> (Lam.) ssp. <i>angustissima</i> <i>Ononis angustissima</i> (Lam.) ssp. <i>longifolia</i> (Brouss. ex Willd.) (Förther & Podlech)	Cruce de Tasartico-Degollada de GuGuy (San Nicolás de Tolentino)
147	11854-11856	<i>Orchis canariensis</i> Lindl.	Inmediaciones Pinos de Gáldar (Gáldar)
148	13553-13554	<i>Pancratium canariense</i> Ker-Gawl.	Montaña de las Vueltas, ctra. a El Sao (Agaete)
149	1446/1450	<i>Parolinia filifolia</i> G. Kunkel	Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
150	4089	<i>Parolinia ornata</i> Webb	Ctra. de Arguineguín a Soria (Mogán)
151	12460-12461	<i>Paronychia canariensis</i> (L. f.) Juss	Barranco de Carpinteras (Valleseco)
152	8273-8274	<i>Paronychia capitata</i> (L.) Lam. ssp. <i>canariensis</i> (Chaudhri) Sunding	Barranco de Guayedra (Agaete)
153	13652	<i>Patellifolia webbiana</i> (Moq.) A. J. Scott, Ford-Lloyd & J. T. Williams	Las Coloradas, La Isleta (Las Palmas de Gran Canaria)
154	13449-13451	<i>Pericallis tussilaginis</i> (L`Hér.) D. Don in Sweet	Montaña de Tirma (Gáldar)
155	8123-8126	<i>Pericallis hadrosoma</i> (Svent.) B. Nord.	Roque Sardina (San Mateo)
156	GC3085-GC3086	<i>Phagnalon umbelliforme</i> DC.	Montaña de Almagro (Gáldar)
157	13542-13544	<i>Phoenix canariensis</i> Chabaud	Acusa Verde (Artenara)
158	987-989	<i>Pinus canariensis</i> Chr. Sm. ex DC.	Pinos de Gáldar (Gáldar)
159	7714-7715	<i>Plantago arborescens</i> Poir. spp. <i>arborescens</i>	Cruce de Tasartico-Degollada de GuGuy (San Nicolás de Tolentino)
160	11756-11757	<i>Plantago asphodeloides</i> Svent.	Montaña de Almagro (Gáldar)
161	11032-11034	<i>Plantago webbii</i> Barnéoud	Roque Bentayga (Tejeda)
162	13234-13235	<i>Plocama pendula</i> Aiton	Cruce de Tasartico (San Bartolomé de Tolentino)
163	11800-11803	<i>Poa pitardiana</i> H. Scholz	San Mateo a Tenteniguada (Valsequillo)
164	LPAPOA		

Tabla S6 (continuación-VI)

N	Vial CODE	TAXONES	POBLACIÓN
165	1318-1319	<i>Polycarpaea aristata</i> (Aiton) DC.	Encima de los Riscos de Guayedra (Agaete)
166	5702-5704	<i>Polycarpaea divaricata</i> (Aiton) Poir.	Caldera de Bandama (Las Palmas de Gran Canaria)
167	11084-11805	<i>Polycarpaea filifolia</i> Webb ex Christ	Caldera de Bandama (Las Palmas de Gran Canaria)
168	10611-10612	<i>Polycarpaea latifolia</i> Willd.	Encima de los Riscos de Guayedra (Agaete)
169	12028-12030	<i>Pterocephalus dumetorus</i> (Brouss. ex Willd.) Coult.	Circular Camino Roque Nublo-La Culata-La Goleta (Tejeda)
170	B16250-16253	<i>Reichardia crystallina</i> (Sch. Bip.) Bramwell	La Hondura, Fasnía
171	13239-13244	<i>Reichardia ligulata</i> (Vent.) G. Kunkel & Sunding	Mirador de La Aldea (San Nicolás de Tolentino)
172	13653-13655	<i>Reseda crystallina</i> Webb & Berthel.	Bajada a la Laya del Risco (Agaete)
173	11853	<i>Reseda scoparia</i> Brouss. ex Willd.	Cruce de Tasartico-Degollada de GuGuy (San Nicolás de Tolentino)
174	B15185	<i>Rubia fruticosa</i> Aiton ssp. <i>melanocarpa</i> (Bornm.) Bramwell	El Sao (Agaete)
175	12534-12536	<i>Rumex lunaria</i> L.	Ctra. desde Artenara a La Aldea (San Bartolomé de Tirajana)
176	6214-6217	<i>Ruta oreojasme</i> Webb	Montaña La Gorra, Ayagaures (San Bartolomé de Tirajana)
177	13630-13631	<i>Salsola divaricata</i> Masson ex Link in Buch	La Isleta (Las Palmas de Gran Canaria)
178	13347-13348	<i>Salvia canariensis</i> L.	Los Jediondos (San Nicolás de Tolentino)
179	13402-13405	<i>Schizogyne sericea</i> (L. f.) DC.	Barranco del medio Almud (Mogán)
180	13472-13475	<i>Scilla haemorrhoidalis</i> Webb & Berthel.	Montaña de Almagro (Gáldar)
181	7787-7789	<i>Scrophularia calliantha</i> Webb & Berthel.	Morro de Pajonales, Inagua (Tejeda)
182	4205-4206	<i>Seseli webbii</i> Coss.	Andén Verde (San Nicolás de Tolentino)
183	12622-12623	<i>Sideritis dasygnaphala</i> (Webb & Berthel.) Clos emend. Svent.	Ctra. desde Fontanales a Artenara (San Nicolás de Tolentino)
184	13676-13679	<i>Sideritis guayedrae</i> Marrero Rodr.	Riscos Blancos (Artenara)
185	7678-7679	<i>Sideritis sventenii</i> (G. Kunkel) Mend.-Heuer	Andenes del Viso, Inagua (San Nicolás de Tolentino)
186	7055	<i>Sideroxylon canariensis</i> T. Leyens, W. Lobin & A. Santos	Barranco Oscuro, Tamadaba (Agaete)
187	7795/7797	<i>Silene tamaranae</i> Bramwell	Morro de Pajonales, Inagua (Tejeda)
188	1147-1149	<i>Solanum lidii</i> Sunding	Barranco de los Gallegos, Amurga (San Bartolomé de Tirajana)
189	7356	<i>Sonchus acaulis</i> Dum. Cours.	Andenes de Guayedra a Barranco Oscuro (Agaete)
190	13455-13459	<i>Sonchus brachylobus</i> Webb & Berthel.	Degollada de AguaSabina- Tasartico (San Nicolás de Tolentino)
191	13519-13520	<i>Sonchus canariensis</i> (Sch. Bip.) Boulos	Fuente Parra, cerca de Fagagesto (Guía)
192	7546-7549	<i>Sonchus congestus</i> Willd.	Barranquillo del Caidero, Los Tilos (Moya)

Tabla S6 (continuación-VII)

<b>N</b>	<b>Vial CODE</b>	<b>TAXONES</b>	<b>POBLACIÓN</b>
193	7745-7747	<i>Sventenia bupleuroides</i> Font Quer	Faneque a Morro de Las Lechugas (Agaete)
194	12359-12361	<i>Teline microphylla</i> (DC.) P. E. Gibbs & Dingwall	Ctra. de Arguineguín a Soria (Mogán)
195	1105-1107	<i>Teline rosmarinifolia</i> Webb & Berthel.	Pinar Inagua, Inagua (San Nicolás de Tolentino)
196	13686-13688	<i>Teline rosmarinifolia</i> ssp. <i>eurifolia</i> del Arco	Faneque (Agaete)
197	GB139	<i>Teline rosmarinifolia</i> spp. <i>rosmarinifolia</i>	Lomito de Pilancones (San Bartolomé de Tirajana)
198	6500-6501	<i>Teucrium heterophyllum</i> L `Hér.	Barranco del Cañizo (San Bartolomé de Tirajana)
199	6502	<i>Teucrium heterophyllum</i> ssp. <i>brevipilosum</i> v. Gaisberg	Barranco Los Vicentillos (San Bartolomé de Tirajana)
200	13611-13613	<i>Todaroa aurea</i> Parl.	La Lechuza (San Mateo)
201	15175-15178	<i>Todaroa aurea</i> ssp. <i>suaveolens</i> P. Pérez	El Sao (Agaete)
202	12743	<i>Todaroa montana</i> Webb ex Christ	Camino del Sao a Presa de los Pérez (Agaete)
203	12761-12762	<i>Tolpis lagopoda</i> C. Sm. in Buch	Camino del Sao a Presa de los Pérez (Agaete)
204	13460-13467	<i>Urtica stachyoides</i> Webb & Berthel	Barranco de los Cabucos, El Sao (Agaete)
205	8243-8244	<i>Viburnum rigidum</i> Vent.	Barranco de Carpinteras (Valleseco)
206	13540-13541	<i>Vicia cirrhosa</i> C. Sm. ex Webb & Berthel.	Montaña de Almagro (Gáldar)
207	13641-13642	<i>Vicia filicaulis</i> Webb & Berthel.	Cerca del Mulato (Mogán)
208	13326-13329	<i>Volutaria canariensis</i> Wagenitz	Barranco de los Frailes, (Mogán)



