

# Facultat de Ciències Biològiques

# ESTUDIO DE LOS TAXA AFINES A *LIMONIUM VULGARE* MILLER DE MARISMAS DE PORTUGAL CONTINENTAL

# Ana Lúcia Teixeira Cortinhas

Proyecto Final de Máster

Máster de Biodiversidad: Conservación y Evolución

Directores:

Ana Delaunay Caperta,

Centro de Botânica Aplicada a Agricultura, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa

Miguel Guara Requena

Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia

# Agradecimientos

Fueron varias las personas que han contribuido para que este proyecto final de máster fuera posible de realizar, y por eso se lo quiero **agradecer**...

En primero lugar, quiero agradecer a mi madre por haberme permitido concluir esta importante etapa de mi vida, y por estar siempre a mi lado para apoyarme.

A mis tutores. Estoy segura que tuve los mejores tutores. Además de excelentes profesionales son excelentes personas. Gracias por guiarme en la realización de mi trabajo.

A las siguientes personas del Centro de Botânica Aplicada à Agricultura, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa:

- A la técnica Paula Paes, por toda la ayuda que ha dado a este proyecto final de máster desde que empezó hasta al final.
- A Sofia Róis por haberme ayudado en diversas etapas de este trabajo especialmente en la fase de laboratorio, y por tener siempre tiempo para mis preguntas.
- Al Profesor Pedro Arsénio por las clases de ArcGis, por su paciencia para esclarecer todas mis dudas y por estar siempre dispuesto a ayudar.
- A la Ingeniera Dalila Espírito Santo por permitirme trabajar en el Herbário João de Carvalho e Vasconcellos del Insituto Superior de Agronomia, de la Universidade Técnica de Lisboa. También por haberme apoyado en el proyecto, así como en todos las viajes por la costa portuguesa y en la revisión del trabajo.
- Al Profesor José Carlos Costa, por las aclaraciones sobre biogeografía, bioclimatología y fitosociología.
- A la técnica Augusta Barão por su ayuda en el laboratorio, que fue fundamental.
- A la Profesora Wanda Viegas por permitirme trabajar en el Laboratório de Genética do Centro de Botânica Aplicada à Agricultura, Instituto Superior de Agronomia, con un equipo fantástico.

A Lúcia Gomes por la colaboración en las mediciones.

A los conservadores de los herbarios: Herbarios do Museu Nacional de História Natural-LISU, Herbário da Estação Agronómica Nacional-LISE, Herbário da Universidade de Coimbra-COI, Herbário da Universidade do Porto-PO, Herbario del Real Jardín Botánico de Madrid – MA, Herbario del Jardín Botánico de la Universidad de Valencia - VAL y Herbario de la Sociedad de Ciencias Aranzadi – ARAN, que gentilmente me cedieron los ejemplares para este estudio.

A todos mis amigos que me apoyaron, en especial a mis compañeras de máster: Ana Hurtado, Esther Gimeno, Mar Pardos y Sara Rodrigo.

A José por el apoyo que me dio durante este periodo.

Sin vuestro apoyo, no hubiera sido posible. Muchas Gracias. Muito Obrigada

# Resumen

El género *Limonium* Miller presenta una gran complejidad taxonómica y un gran número de microespecies ha sido descrito como resultado de sus estrategias reproductivas, sexual y/o apomixia. En Portugal, existen pocos estudios sobre las especies de *Limonium* y además son antiguos, a pesar de que el país tiene condiciones excepcionales para su presencia, dado que habitan en acantilados rocosos, playas y marismas.

En el presente estudio se pretendió esclarecer la identidad de especímenes ambiguos afines al  $taxon\ Limonium\ vulgare\ Miller$ , típicos en las marismas de Portugal Continental. Se realizó un estudio comparativo corológico, morfométrico, cariológico y reprodutivo entre las especies de referencia  $L.\ vulgare$ ,  $L.\ humile\ y\ L.\ narbonense\ depositados\ en herbarios\ de España, ejemplares herborizados presentes en herbarios portugueses, y ejemplares recogidos a lo largo de la costa portuguesa. Todos los individuos recogidos o presentes en herbarios habitaban en estuarios, excepto una población que fue encontrada en una playa (Praia da Veiga, Viana do Castelo). Raíces obtenidas de las semillas de algunos de los individuos estudiados mostraron cariotipos tetraploides o aneuploides tetraploides con <math>2\ n = 4x = 35, 36$  ó 38 cromosomas. El análisis factorial de correspondencias, basado en el análisis de heterostilia indicó que la mayoría de las poblaciones son distilicas conteniendo ambas flores con pistilos cortos y estambres largos (flores "Thrum") y pistilos largos y estambres cortos (flores "Pin"). También, en este análisis revelo que las combinaciones polínico-estigmáticas mas frecuentes eran A y B, sugiriendo que la fecundación cruzada es favorecida.

El análisis de componentes principales permitió observar que los caracteres de la parte vegetativa de la planta, respectivamente tamaño del escapo, tamaño de las hojas, ángulo de ramificación están correlacionados significativamente entre si. Así como los caracteres reproductivos longitud de las espigas, la mayor distancia entre espiguillas y la longitud de las brácteas están correlacionados entre si. Tras el análisis discriminante fue posible observar que la mayoría de las poblaciones estudiadas son mixtas, predominando *L. narbonense* y *L. vulgare. Limonium humile* está presente apenas en los estuarios de Aveiro y Tejo en un pequeño porcentaje. La población de Praia da Veiga (Viana do Castelo), que manifiesta características propias, no puede atribuirse a ninguna de las tres especies de referencia.

Este estudio permitió concluir que existen dos nuevas especies para la flora de Portugal Continental, *L. humile* y *L. narbonense*, y sugiere que los individuos de la población Praia da Veiga (Viana do Castelo) pueda ser una otra nueva especie para la flora portuguesa.

**Palabras-clave:** Corología, cariología, *Limonium*, marismas, morfometria, Portugal, reproducción.

# **Abstract**

The genus *Limonium* Miller is a highly complex taxonomic group and a large number of micro-species has been described as a result of their reproductive strategies, sexual and/or apomixis. In Portugal, there are few and old studies on *Limonium* species, although the country has exceptional conditions for their presence, given that they inhabit rocky cliffs, beaches and salt-marshes.

This study was intended to clarify the identity of ambiguous specimens related to taxon  $Limonium\ vulgare\$ Miller, typical in the salt-marshes of Continental Portugal. We performed a comparative chorological, morphometric, karyological and reprodutive study between reference species  $L.\ vulgare,\ L.\ humile\$ and  $L.\$ narbonense\ deposited in herbaria in Spain, and herbarium specimens present Portuguese herbaria, and specimens collected along the Portuguese coast. All individuals collected or present in Portuguese herbaria inhabit in estuaries, except a population that was found on a beach (Praia da Veiga, Viana do Castelo). Roots obtained from the seeds collected in some of the individuals showed tetraploid or aneuploid tetraploid karyotypes with  $2\ n = 4x = 35$ , 36 or 38 chromosomes. Factorial correspondence analysis based on heterostyly reveal that except (Praia da Veiga, Viana do Castelo), most populations were distylic containing both the short-styled ("Thrum" flowers) and long-styled floral morphs ("Pin" flowers). Also this analysis reveal that the most frequent polen-stigma combinations present in the majority of populations were A and B, suggesting that cross-fertilization may be favored.

The principal component analysis allowed us to observe that vegetative traits, respectively the scape height, leaf length/width and branch angle are significantly correlated with each other. Reproductive traits like spike length, maximum distance between spikelets and bracts lenght are also correlated with each other. After discriminant analysis it was observed that most of the populations studied are mixed, with a predominance of *L. narbonense* and *L. vulgare. Limonium humile* is only present, in a small percentage, in populations of Aveiro and Tagus estuaries. The population of Praia da Veiga (Viana do Castelo), which shows proper characteristics, cannot be attributed to any of the three reference species.

This study concluded that there are two new species for the flora of continental Portugal, *L. humile* and *L. narbonense*, and suggests that individuals from Praia da Veiga (Viana do Castelo) population could be another new species to Portuguese flora.

Keywords: Chorology, karyology, Limonium, morphometry, Portugal, reproduction, salt-marsh

# Índice

Αç	radecimientos	II
Re	sumen	III
ΑŁ	stract	IV
ĺn	lice de tablas	VII
ĺn	lice de figuras	IX
1.	Introducción y objetivos	1
2.	Antecedentes	1
	2.1. El género <i>Limonium</i> Miller	1
	2.1.1. Especies de Limonium en Portugal	4
	2.1.2. Limonium vulgare Miller, L. humile Miller, y L. narbonense Miller	r 5
	2.2. Caracterización y contextualización del área de estudio	8
	2.2.1. Localización	8
	2.2.2. Biogeografía y bioclimatología	9
	2.2.3. Fitosociología	11
3.	Material y Métodos	12
	3.1. Área de estudio y muestreos	12
	3.2. Material vegetal	14
	3.2.1. Plantas herborizadas	14
	3.2.2. Plantas de herbarios	17
	3.3. Recolección, preparación y conservación de semillas	23
	3.3.1. Germinación de semillas y cultivo de plantas	23
	3.4. Estudio cromosómico	24
	3.5. Análisis de heterostilia y dimorfismo polínico-estigmático	25
	3.6. Análisis morfométrico de caracteres macroscópicos	26
4.	Resultados	29
	4.1. Distribución geográfica	29
	4.2. Germinación y cultivo de plantas	32
	4.3. Estudio cromosómico	32
	4.4. Heterostilia y dimorfismo polínico-estigmático	33
	4.5. Morfometría de los caracteres macroscópicos	38
5.	Discusión y Conclusiones	58
6.	Perspectivas futuras	62
7.	Bibliografía	63
	Webgrafía	
1A	IEXOS	
	Anexo 1. Descripción de las especies de <i>Limonium</i> de contraste según Erber (1993)	00
	1.1 Limonium vulgare Miller Gard, Dict. ed. 8 n.º 1 (1768)	68

	1.2. Limonium humile Miller Gard. Dict. ed. 8 n.° 4 (1768)	68
	1.3. Limonium narbonense Miller Gard. Dict. ed. 8 n.° 2 (1768)	69
Anexo 2.	Análisis Discriminante utilizando las especies de contraste <i>L. humile</i> , <i>L. narbonense</i> y <i>L. vulgare</i>	70
	2.1. Coeficientes de las funciones de clasificación en el AD	70
	2.2. Asignación de los individuos de las poblaciones a uno de los tres grupos considerados ( <i>Limonium humile</i> -8-, <i>L. narbonense</i> -9-, y <i>L. vulgare</i> -10-), y sus estadísticos	71
Anexo 3.	Análisis discriminante utilizando las especies de contraste <i>L. humile</i> , <i>L. narbonense</i> , <i>L. vulgare</i> y Viana	76
	3.1. Coeficientes de las funciones de clasificación en el AD	76
	3.2. Asignación de los individuos de las poblaciones a uno de los cuatro grupos considerados ( <i>Limonium humile -8-, L. narbonense -9-, L. vulgare -10-,</i> y Viana -11-), y sus estadísticos	77

# Índice de tablas

Tabla 1 – Adscripción biogeográfica de las provincias costeras portuguesas continentales (Rivas-Martínez, 2005)	10
Tabla 2 – Individuos analizados recogidos en la playa Praia da Veiga, Viana do Castelo.	14
Tabla 3 – Individuos analizados recogidos en el estuario de la ría de Aveiro	15
Tabla 4 – Individuos analizados recogidos en el estuario del río Tejo	16
Tabla 5 – Individuos analizados recogidos en el estuario del río Sado	16
Tabla 6 – Individuos analizados recogidos en el estuario del río Mira	17
Tabla 7 - Individuos analizados del estuario da ría de Aveiro	18
Tabla 8 - Individuos analizados del estuario del río Tejo	18
Tabla 9 - Individuos analizados del estuario del río Sado	19
Tabla 10 - Individuos analizados del estuario del río Mira	19
Tabla 11 - Individuos analizados del estuario del ría Formosa	20
Tabla 12 - Individuos analizados del estuario del río Guadiana	20
Tabla 13 - Individuos analizados de la especie L. vulgare	21
Tabla 14 - Individuos analizados de la especie L. humile	22
Tabla 15 - Individuos analizados de la especie L. narbonense	22
Tabla 16 – Localidades de recoleción de las semillas conservadas en el Banco de Semillas João do Amaral Franco, Jardim Botânico d'Ajuda	23
Tabla 17 – Caracteres cuantitativos analizados y sus acrónimos	26
Tabla 18 – Censo de las poblaciones de cada estuario/playa donde fueron recogidas plantas	31
Tabla 19 – Porcentaje de germinación	32
Tabla 20 - Frecuencias de heterostilia y homostilia, y combinaciones polínico- estigmáticas (A, B, C, y D)	35
Tabla 21 - Estadísticos descriptivos de los individuos de la especie L. vulgare	39
Tabla 22 - Estadísticos descriptivos de los individuos de la especie L. humile	39
Tabla 23 - Estadísticos descriptivos de los individuos de la especie L. narbonense	40
Tabla 24 - Estadísticos descriptivos de los individuos de la playa Praia da Veiga, Viana do Castelo	42
Tabla 25 - Estadísticos descriptivos de los individuos del estuario de la ría de Aveiro	42
Tabla 26 - Estadísticos descriptivos de los individuos del estuario del río Tejo	43

Tabla 27 - I	Estadísticos descriptivos de los individuos del estuario del río Sado	43
Tabla 28 - I	Estadísticos descriptivos de los individuos del estuario del río Mira	44
Tabla 29 - I	Estadísticos descriptivos de los individuos del estuario de la ría Formosa	44
Tabla 30 - I	Estadísticos descriptivos de los individuos del estuario del río Guadiana	45
	Descriptivos estadísticos de las variables estudiadas tras su transformación logarítmica	47
 	Matriz de correlación entre las variables consideradas transformadas logarítmicamente. Casos analizados 196. Grados de libertad, 194. Valores críticos calculados por interpolación lineal (Zar, 2010): $r_{0.05(2),194}=0.141$ (*); $r_{0.01(2),194}=0.183$ (**); $r_{0.001(2),194}=0.234$ (***). Se han suprimido los valores de la diagonal principal (1,000) por comodidad	49
(	Valores propios y sus porcentajes correspondientes a las tres primeras componentes principales (vectores propios). En negrita los valores de las componentes del vector con más importancia en la componente principal correspondiente.	50
	Matriz de estructura que recoge las correlaciones de las variables originales con las funciones discriminantes	53
Tabla 35 -	Matriz de clasificación (tabla de confusión)	54
	Matriz de estructura que recoge las correlaciones de las variables originales con las funciones discriminantes	55
Tabla 37 - ľ	Matriz de clasificación (tabla de confusión)	56

# Índice de figuras

Figura 1	- Dimorfismo polínico-estigmático (adaptado de Crespo & Lledó (1998))	4
Figura 2	- Mapa de distribución de <i>Limonium vulgare</i> Miller (adaptado de www.gbif.org).	6
Figura 3	- Mapa de distribución de <i>Limonium humile</i> Miller (adaptado de www.gbif.org)	7
Figura 4	– Mapa de distribución de L. narbonense Miller (adaptado de www.gbif.org)	8
Figura 5	- Mapa de las provincias portuguesas (adaptado de http://pt.wikipedia.org)	8
Figura 6	– Imágenes representativas de las marismas portuguesas. En <b>b.</b> y <b>c.</b> se observa la presencia de ejemplares en flor de <i>Limonium</i> (óvalos amarillos)	9
Figura 7	– Mapas bioclimáticos: <b>a.</b> Mapa de los termotipos de Rivas-Martínez (2007); <b>b.</b> mapa de los ombrotipos (adaptado de Monteiro-Henriques, 2010)	11
Figura 8	– Localidades prospectadas en la costa portuguesa entre los años 2010 y 2011, pertenencentes a los estuarios: Minho, Lima, Cávado, Douro, Aveiro, Mondego, Tejo, Sado, Mira, Alvor, Formosa. (Abreviaturas de los nombres: V. N. – Vila Nova; Pr. – Praia; C Cabo)	13
Figura 9	- Ejemplares herborizados: <b>a.</b> <i>L. vulgare</i> (VAL); <b>b.</b> <i>L. humile</i> (ARAN); <b>c.</b> <i>L. narbonense</i> (VAL)	21
Figura 1	0 – Semillas almacenadas en tubos de vidrio con sílica-gel	23
Figura 1	1 - Bráctea media, interna, cáliz y flor (de izquierda a derecha)	25
Figura 1	2 – I. Ángulo de ramificación, II. Longitud de la espiga; III. Brácteas: a. longitud de la bráctea externa, b. anchura de la bráctea externa; c. longitud de la bráctea media, d. anchura de la bráctea media; e. longitud de la bráctea interna, f. anchura de la bráctea interna, i. ápice. IV. Cáliz: a. longitud, b. tubo, c. limbo. Adaptado de "Flora Ibérica" vol. II (Erben 1993)	26
Figura 1	3 – Mapa de distribución de las poblaciones <i>L. vulgare</i> y taxa afines (rombos verdes) en Portugal continental. Leyenda: V- Viana do Castelo; A – Aveiro; T – Tejo; S – Sado; M- Mira; RF – Ría Formosa	29
Figura 1	<b>4</b> – Mapas de distribución de las poblaciones <i>L. vulgare</i> y taxa afines (rombos verdes) en playa Praia da Veiga, Viana do Castelo y en cada estuario.  Leyenda: V- Viana do Castelo; A – Aveiro; T – Tejo; S – Sado; M- Mira; F – Formosa.	30
Figura 1	<b>5</b> – Células metafásicas con cromosomas de individuos del estuario de Aveiro y Tejo: a. y b. con $2n$ =4x=36 cromosomas; c. con $2n$ =4x=38 cromosomas; d. con $2n$ =4x=35 cromosomas	33
Figura 1	<ul> <li>6 – Dimorfismo polínico-estigmático: a. grano de polen microrreticlado (tipo B);</li> <li>b. detalle de un estigma tipo "papiloso" c. detalle de un estigma tipo "mazorca de maíz" d. grano de polen macrorreticulado (tipo A)</li> </ul>	34

•	7 - Ordenación obtenida en el AFC con los dos únicos factores posibles (100% de la variación total) a partir de los datos de la tabla 20, representando los estuarios/playa, la homostilia ("Homos") y la heterostilia (flores tipo "Pin" y tipo "Thrum").	36
	<b>B</b> - Ordenación obtenida en el AFC con los dos primeros factores calculados (94.91% de la variación total) a partir de los datos de la tabla 20. Están representados los estuario/ playa, y las combinaciones polínico-estigmáticas A (polen del tipo A/estigma "mazorca de maíz"), B (polen del tipo B/estigma "papiloso"), C (polen del tipo B/ estigma "mazorca de maíz") y D (polen del tipo A/ estigma "papiloso")	37
•	<b>9</b> - Ordenación obtenida en el AFC con los factores 1 y 3 (68.02% de la variación total) a partir de los datos de la tabla 20. Están representados los estuario/playa, y las combinaciones polínico-estigmáticas A (polen del tipo A/estigma "mazorca de maíz"), B (polen del tipo B/estigma "papiloso"), C (polen del tipo B/ estigma "mazorca de maíz") y D (polen del tipo A/ estigma "papiloso")	38
_	<ul> <li>O – Gráficas hechas a partir de los estadísticos básicos de los caracteres cuantitativos para las tres especies referencia, <i>Limonium vulgare</i>, <i>L. humile</i> y <i>L. narbonense</i>.</li> <li>A: Mínimo; B – Máximo; C- Media; D – Desviación Típica.</li> </ul>	41
_	<ul> <li>I – Gráficas hechas a partir de los estadísticos básicos de los caracteres cuantitativos para la playa (Praia de Veiga, Viana do Castelo) y estuários (Aveiro, Tejo, Sado, Mira, Formosa).</li> <li>A: Mínimo; B – Máximo; C- Media; D – Desviación Típica</li> </ul>	46
	2 - Ordenaciones (biplot) obtenidas a partir del ACP tipificado: <b>A)</b> Plano compuesto por la CP1 y CP2 (36,99%) <b>B)</b> Plano compuesto por la CP1 y CP3 (30,99%). Leyenda de las poblaciones y especies de contraste: 1: Aveiro; 2: Mira; 3: Sado; 4: Tejo; 5: Viana; 6: Guadiana; 7: Formosa; 8: <i>L. humile</i> (estrellas azules); 9: <i>L. narbonense</i> (rombos verdes); 10: <i>L. vulgare</i> (cuadrados marrones).	52
	3 - Ordenación obtenida a partir de las dos funciones discriminantes (FD) basado en las tres especies de contraste ( <i>Limonium humile</i> , <i>L. narbonense</i> y <i>L. vulgare</i> ) cuyos centroides se han representado con rombos azules. Leyenda de las poblaciones y especies contraste: 1: Aveiro; 2: Mira; 3: Sado; 4: Tejo; 5: Viana; 6: Guadiana; 7: Ria Formosa; 8: <i>L. humile</i> (estrellas azules); 9: <i>L. narbonense</i> (rombos verdes); 10: <i>L. vulgare</i> (cuadrados marrones)	54
	4 - Ordenación obtenida a partir de las dos primeras funciones discriminantes (FD) basado en las tres especies de contraste ( <i>Limonium humile</i> , <i>L. narbonense</i> y <i>L. vulgare</i> ) más la población de Viana (triángulos invertidos rojos), cuyos centroides se han representado con rombos negros. Leyenda de las poblaciones y especies contraste: 1: Aveiro; 2: Mira; 3: Sado; 4: Tejo; 5: Viana; 6: Guadiana; 7: Ria Formosa; 8: <i>L. humile</i> (estrellas azules); 9: <i>L. narbonense</i> (rombos verdes); 10: <i>L. vulgare</i> (cuadrados marrones)	56
	25 - Ordenación obtenida a partir de la primera y tercera funciones discriminantes (FD) basado en las tres especies de contraste ( <i>L. humile, L. narbonense</i> y <i>L. vulgare</i> ) más la población de Viana (triángulos invertidos rojos), cuyos centroides se han representado con rombos negros. Leyenda de las poblaciones y especies contraste: 1: Aveiro; 2: Mira; 3: Sado; 4: Tejo; 5: Viana; 6: Guadiana; 7: Ria Formosa; 8: <i>L. humile</i> (estrellas azules); 9: <i>L. narbonense</i> (rombos verdes); 10: <i>L. vulgare</i> (cuadrados marrones)	57

# 1. Introducción y objetivos

En 2009 la Dra. Ana Caperta (Centro de Botânica Aplicada à Agricultura/Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal) y el Dr. Mathias Erben (Section Biodiversity Research, Systematic Botany, Maximilian University of Munich, Germany) iniciaron la revisión del género *Limonium* Miller en Portugal. En este trabajo se recurrió al análisis de ejemplares depositados en diversos herbarios de Portugal continental, así como, del herbario personal de Mathias Erben, mostrando que varios ejemplares se encontraban mal identificados, como los que habían sido atribuidos al taxon *Limonium vulgare* Miller. Pero, estos ejemplares tampoco se encuadraban en las descripciones de los otros taxa reconocidos hasta ahora para Portugal continental, tanto en la Flora de Portugal (Franco, 1984), como en la Flora Ibérica (Erben, 1993). Se planteó inicialmente la hipótesis de que fuesen representantes de otras especies, como *L. humile* Miller y *L. narbonense* Miller, o eventualmente híbridos *L. humile* x *L. vulgare*, y *L. vulgare* x *L. narbonense*. Sin embargo, únicamente *L. vulgare* se encontraba descrito para Portugal (Franco, 1984; Erben, 1993), mientras que la presencia de *L. humille* y *L. narbonense* aún no fuera reportada para este país.

En el presente estudio se pretende esclarecer la identidad de los especímenes ambiguos morfológicamente afines con *L. vulgare*, presentes en las marismas de Portugal continental. Para esta finalidad, se realizarán análisis corológicos y morfométricos exhaustivos en ejemplares recogidos en poblaciones naturales a lo largo de toda la costa de Portugal continental y también en ejemplares herborizados provenientes de diferentes localidades depositados en distintos herbarios de Portugal continental y España. Igualmente, se evaluarán cariológicamente placas metafásicas en células somáticas de raíces obtenidas de semillas recogidas en diferentes poblaciones naturales en las marismas portugueses, para conocer el tamaño del genoma y el número de cromosomas de los individuos en estudio. Por otra parte, dado que los aspectos reproductivos relativos a heterostilia y dimorfismos polínico-estigmáticos han sido muy relevantes para la clasificación de muchas especies de *Limonium* (Baker, 1953ab, 1966; Erben, 1978, 1993), también se analizarán estos aspectos en diversos individuos.

# 2. Antecedentes

#### 2.1. El género *Limonium* Miller

El género *Limonium* Miller pertenece a la familia cosmopolita de las *Plumbaginaceae* (Franco, 1984; Erben, 1993), con 27 géneros y cerca de 650 especies (Kubitzki, 1993). Esta familia se encuentra bien representada en las zonas temperadas del Hemisferio Norte, generalmente ocupando pequeñas zonas aisladas, y habitando suelos salinos que se presentan en marismas, marjales, saladares y litorales rocosos (Erben, 1993; Kubitzki, 1993).

Esta familia tiene un centro genético principal en las áreas esteparias de la región Irano-Turania, con muchos géneros endémicos o casi exclusivos de esta región como *Acantholimon* Boiss. spp., *Chaetolimon* Lincz. spp., *Cephalorhizum* Popov & Korovin spp. o *Dictyolimon* Rech. spp. Además existen otros dos importantes centros, en el centro de Asia, donde son endémicos los géneros *Plumbagella* Spach spp., *Ikonnikovia* Lincz spp. y *Ceratostigma* Bunge spp.. Pero, la mayor parte de las especies de *Limonium* se distribuyen en las áreas secas y salinas de las regiones Mediterránea y Macaronésica, donde se sitúan sus centros de especiación (Erben, 1993; Kubitzky, 1993; Crespo & Lledó ,1998).

La gran complejidad taxonómica del género *Limonium* está relacionada con sus estrategias reproductivas, pues presenta reproducción sexual y/o apomíctica (reproducción clonal a través de semillas) asociada a hibridación frecuente (Baker, 1966; Pignatti, 1971,1972; Erben, 1978, 1979; Lledó *et al.*, 1998, 2001, 2005). A pesar de que se considera que existen entre 350 y 400 especies en el género *Limonium*, es posible que este número no sea correcto (Kubitzki, 1993). La frecuente ocurrencia de poliploides, hibridación y apomixia se han apuntado como los potenciales factores de radiación adaptativa en áreas geográficas como el Oeste de la cuenca Mediterránea, para la que se han descrito un gran número de microespecies (Erben, 1978; Cowan *et al.* 1998). Estos grupos agamospérmicos no muestra un sistema taxonómico jerárquico sencillo; en realidad, si la hibridación es una característica principal de la diversidad de especies del género *Limonium*, está de hecho relacionada con más de una línea filogenética (Lledó *et al.*, 2005).

Los estudios más completos sobre Plumbaginaceae y Limonium (inicialmente Statice, nom. rej. vs. Armeria; Greuter et al., 2000: 268) fueron hechos por Boissier en 1848 (Lledó et al., 2003). En los estudios posteriores apenas se hicieron algunas alteraciones (Hooker, 1876; Pax, 1889), y más recientemente se basaron en áreas geográficas específicas (Ingrouille, 1984; Erben, 1993) o en rangos taxonómicos infragenéricos (secciones) (Lledó et al., 2003; Karis, 2004). Basado en características florales, Boissier en 1848, (in Lledó et al., 2003) dividió inicialmente el género Statice en 12 secciones, pertenecientes a dos grupos: "Corolla gamopetala" (cuatro secciones) y "Corolla polypetala" (ocho secciones), tiendo después añadido al grupo "Corolla gamopetala" mas dos secciones (Boissier 1859; ). Posteriormente, del mismo grupo, las secciones Siphonantha y Polyarthrion, fueron incluidas en el L. subgénero Limonium; y las secciones Psylliostachys, Myriolepis, Pterolimon, Arthrolimon, fueron clasificadas, respectivamente, como nuevos géneros Psylliostachys, Myriolimon, Bakerolimon y Muellerolimon (Kubitzki, 1993; Lledó et. al. 2003). Del grupo "Corolla polypetala", la sección Pteroclados fue classificada como L. Subgen. Pteroclados, y las restantes secciones, Ctenostachys, Jovibarba, Plathymenium, Circinaria, Schizhymenium, respectivamente Sphaerostachys, Limoniodendron, Limonium, fueran incluidas en el grupo L. Subgen. Limonium.

Estudios filogenético basados en caracteres morfológicos y marcadores moleculares, dividieron las *Plumbaginaceae* en dos subfamilias: *Plumbaginoideae* y *Staticoideae* (Lledó *et al.*, 1998, 2001). Las especies del género *Limonium* fueron incluidas en la subfamilia

Staticoideae, que representa más del 85% de las especies que pertenecen a los géneros Limonium, Armeria y Acantholimon (Lledó et al. 2005). Estos estudios recogen unas relaciones filogenéticas que conllevan una reclasificación del género Limonium como un todo (grupo monofilético), en el que aparecen dos clados bien diferenciados correspondiéndose con la L. Sect. Pteroclados y, el resto del género. Estos grupos, organizados en un sistema semejante al propuesto por Pignatti (1971, 1972) fueran designados como L. Subg. Pteroclados y L. Subgen, Limonium, este último constituido por las restantes secciones (Lledó et al., 2005).

Según Franco (1984), Erben (1993) y Crespo & Lledó (1998), las plantas son generalmente perenes muy raramente anuales, arbustos pequeños a medianos o lianas (). Las hojas pueden ser enteras, lobadas, espatuladas, redondeadas, o solo escamas sin estípulas, dispuestas en roseta basal o alternadamente, y algunas presentan glándulas secretoras de sal. La inflorescencia puede ser de tipo cimoso o en glomérulos capituliformes, con flores actinomorfas, pentámeras que se disponen en espiguillas bracteadas. El fruto se encuentra encerrado en el cáliz y es generalmente indehiscente, pudiendo también ser dehiscente. Algunas de las especies de este género son cultivadas como ornamentales, o por sus hojas comestibles (Erben, 1993).

Las especies del género *Limonium* presentan una gran diversidad cromosómica (Baker, 1948; Dolcher & Pignatti, 1967, 1971; Erben, 1978; Diana 1995; Castro & Rosselló, 2007; Róis *et al.*, 2012). El *Limonium* presenta dos números básicos de cromosomas x1 = 9 (2n = 2x1 = 18) y x2 = 8 (2n = 2x2 = 16) (Erben, 1978). Diversos autores tienen estudiado la variabilidad citológica de las especies de este género de varias regiones, y encontraran especies diploides (2n = 2x = 16, 18), triploides (2n = 3x = 24, 25, 27), tetraploides (2n = 4x = 32, 35, 36), pentaploides (2n = 5x = 43), y hexaploides (2n = 6x = 51, 54, 56) (Erben, 1978; Brullo & Pavone, 1981; Arrigoni & Diana, 1993; Castro & Rosselló, 2007). Erben (1978, 1979) sugiere que las especies triploides se originaran a partir de la hibridación entre los dos tipos de diploides, y los híbridos triploides, resultan de la combinación entre gametos reducidos y no reducidos. En las especies poliploides, se han encontrado diferentes números de cromosomas dentro de la misma especie, población o, en el mismo individuo (Dolcher & Pignatti, 1967, 1971; Diana 1995; Castro & Rosselló, 2007).

Lo estudio de los sistemas de cruzamiento en la familia *Plumbaginaceae* en general, y en el género *Limonium*, en particular, por Baker (1948, 1953ab, 1966), resultaron muy importantes para el desarrollo de las hipótesis sobre la biogeografía de estos grupos taxonómicos. La heterostilia, a pesar de ser típica en las *Plumbaginoideae*, está también presente, en la *L.* Subsect. *Genuinae*, mientras que el dimorfismo polínico-estigmático asociado a la auto-incompatibilidad esporofítica, común en la subfamilia *Staticoideae* está muy extendido en el género *Limonium* (Baker, 1966).

La heterostilia es una forma única de polimorfismo morfológico en las flores de ciertas especies que, como mecanismo, impide la autofecundación de cada flor. En las especies heterostílicas existen dos o tres tipos de flores (llamadas *morfos*), siendo que en una planta individual, cada una de las flores comparten el mismo morfo. Estos *morfos* difieren

cualitativamente entre sí en las longitudes de los pistilos y de los filamentos de los estambres, estando el fenotipo para cada morfo genéticamente determinado. Cuando una especie presenta dos *morfos* florales se denomina distílica. En uno de los *morfos* los estambres son cortos y los pistilos largos flores ("Pin") y en el otro *morfo*, los estambres son largos y los pistilos cortos ("Thrum") (Darwin, 1877).

En las especies de *Limonium* es reconocido un sistema de auto-incompatibilidad esporofítica asociado a un dimorfismo polínico-estigmático (Baker 1948, 1953ab, 1966). El polen puede tener dos tipos de ornamentación de la exina, macro-reticulada (tipo A) o micro-reticulada (tipo B). Los estigmas filiformes pueden ser del tipo *papillate* ("papiloso") o *cob*-like ("mazorca de maíz"). Así, en las plantas que tienen flores con polen del tipo A y un estigma tipo "mazorca de maíz" (combinación A) o con polen del tipo B y estigma tipo "papiloso" (combinación B) son auto-incompatibles, favoreciendo la fecundación cruzada. Las plantas con flores con polen del tipo B y estigma del tipo "mazorca de maíz" (combinación C) o con polen tipo A y estigma tipo "papiloso" (combinación D) son auto-compatibles, por lo que la autofecundación es favorecida (Figura 1). Cuando en una población solo existen plantas con una combinación auto-incompatible, la producción de semillas es asegurada por apomixia (Baker, 1953ab, 1966).

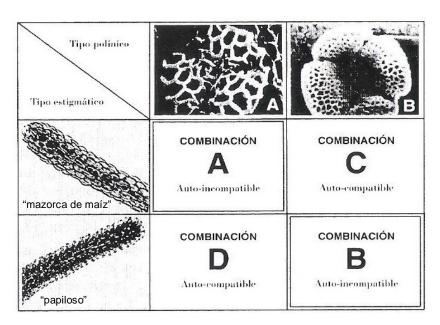


Figura 1- Dimorfismo polínico-estigmático (adaptado de Crespo & Lledó (1998)).

#### 2.1.1. Especies de Limonium en Portugal

En Portugal están reconocidas 18 especies de *Limonium* pero se estima que existan muchas más, ya que se trata de un género muy poco estudiado en el país. Además de la revisión del género en la década de 80 para la realización de la obra Flora de Portugal (Franco, 1984), posteriormente fueran descritas las especies *L. nydeggeri* Erben (Erben, 1999) y *L. lowei* R. Jardim, M. Seq., Capelo, J.C. Costa & Rivas Mart. (Jardim *et al.*, 2007). Las especies

actualmente reconocidas en Portugal son, en el continente: *L. algarvense* Erben, *L. auriculae-ursifolium* (Pourr.) Druce, *L. binervosum* (G.E.Sm.) Salmon, *L. daveaui* Erben (endemismo), *L. dodartii* (Girad) O. Kuntze, *L. dodartii* (Girad) O. Kuntze ssp. *lusitanicum* Franco (endemismo), *L. echioides* (L.) Miller, *L. lanceolatum* (Hoffmanns. & Link) Franco (endemismo, protegido por ley –Directiva 92/43/CEE, anexos B-II e B-IV), *L. multiflorum* Erben (endemismo y protegido por ley –Directiva 92/43/CEE, anexos B-II e B-IV), *L. nydeggeri* Erben (endemismo), *L. ovalifolium* (Poiret) O. Kuntze, *L. plurisquamatum* Erben (endemismo), *L. sinuatum* (L.) Miller, *L. virgatum* (Willd.) Fourr., *L. vulgare* Miller, y *L. laxiusculum* Franco; y en los territorios insulares: *L. lowei* R. Jardim, M. Seq., Capelo, J.C. Costa & Rivas Mart. (endemismo de la Isla de Porto Santo; Archipiélago da Madeira), *L. papillatum* (Webb & Berthel.) Kuntze var. *callibotryum* Svent. (Ilhas Selvagens, Archipiélago da Madeira). De estas, 6 crecen en marismas de la costa portuguesa: *L. algarvense*, *L. auriculae-ursifolium*, *L. daveaui*, *L. lanceolatum*, *L. sinuatum* y *L. vulgare*.

#### 2.1.2. Limonium vulgare Miller, L. humile Miller, y L. narbonense Miller

Las especies *L. vulgare* y *L. humile* son reconocidas como especies distintas desde el tiempo de Ray ,1724 (in Dawson & Ingrouille,1995) como "Limonium majus vulgatius" y "Limonium Anglieum minus, eaulibus ramosioribus, fioribus in spieis rarius sitis", respectivamente. La tercera especie, *L. narbonense*, también es conocida desde 1768 (Erben, 1993). Las especies *L. vulgare* y *L. narbonense* pertenecen a *L.* Subg. *Limonium*, *L.* Subsect. *Genuinae*. Forman un clado con *L. carnosum* (Subsect. *Sarcophyllae*) y *L. globuliferum* (Sect. *Sphaerostachys*), plantas del noroeste de África, y *Afrolimon purpuratum* (L.) Lincz. y *A. peregrinum* (Berg.) *Lincz.* (Subsect. *Circinaria*), del sur de África, mientras que *L. vulgare* y *L. narbonense* se distribuyen por la costa atlántica y mediterránea de Europa (Lledó *et al.*, 2005). Otra especie morfológicamente relacionada es *L. humile*, que se distribuye por toda la costa europea atlántica y está también clasificada en la Subsect. *Genuinae* (Baker, 1953b). Estas tres especies, que se reproducen sexualmente (Erben, 1979; Dawson & Ingrouille, 1995), son morfologicamente muy similares (Erben, 1993) (Anexo 1).

El *Limonium vulgare*, de acuerdo con Pignatti (1972), se distribuye por Suecia; Dinamarca; Alemania; Holanda; Bélgica; Gran Bretaña; Francia, incluída Córcega; Italia, incluídas Cerdeña y Sicilia; Albania; Grecia, incluída Creta; España; y Portugal, incluídas las Azores. Según Franco (1984), estas especies están presente en litoral norte y centro de Portugal continental y en las islas de las Azores: Pico, Terceira y Santa Maria. Erben (1993) afirma que *L. vulgare* se distribuye por Alemania, Inglaterra y toda la costa atlántica desde Bélgica hasta Portugal. En España está presente en Vizcaya, Cantabria, Asturias, Lugo, La Coruña, Pontevedra, Cádiz, y Huelva; y en Portugal, Beira Litoral, Estremadura, y en Baixo Alentejo. En la Figura 2 se muestra el mapa actualizado a partir de los datos del GBIF, que añade a España, las provincias: Gerona, Barcelona, Tarragona, Castellón y Valencia.

Los individuos de esta especie pueden presentar una ligera heterostilia dimórfica, a pesar de este ser un carácter muy variable (Dawson & Ingrouille, 1995). Además, presenta

dimorfismo polínico-estigmático, esto es, sus flores exhiben polen tipo A y estigma tipo "cob", y polen tipo B y estigma papiloso. Estos mecanismos favorecen la fecundación cruzada obligatoria (Baker, 1948, 1966; Dawson & Ingrouille, 1995).



Figura 2 – Mapa de distribución de *Limonium vulgare* Miller (adaptado de www.gbif.org).

Por otra parte, *L. humile*, se distribuye por el noroeste de Europa por los países de Noruega; Suecia; Dinamarca; Alemania; Gran Bretaña; Irlanda (Pignatti, 1972); y en España, en Vizcaya, Cantabria, Asturias y Lugo (Erben, 1993). El mapa actual confeccionado a partir de la base de datos del GBIF, confirma los países mencionados, excepto Dinamarca y Alemania, y añade Francia, y la provincia de Sevilla a España (Figura 3). Se considera esta especie presenta autofecundación facultativa, por sus flores monoestílicas auto-compatibles, siendo una condición rara en el género *Limonium*. Las flores presentan estigma papiloso compatible con polen tipo B, e incluso polen tipo A (Baker, 1948; Dawson & Ingrouille, 1995).

En las islas Británicas, ambos *L. vulgare* y *L. humile* crecen juntas en su hábitat natural, saladares costeros, encontrando poblaciones mixtas, donde, a veces, resultan difícil de distinguir (Dawson & Ingrouille, 1995). Además de las semejanzas morfológicas entre estas especies, hay un conflicto en lo que se refiere al estudio cromosómico, principalmente en relación al tamaño del genoma y el número de cromosomas. De acuerdo con Dawson (1990) y Dawson & Ingrouille (1995), *L. vulgare* es tetraploide (*2n*=4x=36), mientras que *L. humile* es tetraploide (*2n*=4x=36) o hexaploide (*2n*=6x=54), coexistiendo plantas aneuploides en la misma población. A pesar de encontrarse híbridos *L. humile* x *L. vulgare* [L. x neumanii Salmon in J. Bot. 42: 362 (1904)] con distribución en las islas Británicas (Baker, 1966; Dawson y Ingrouille, 1995), en España (Vizcaya, Cantabria y La Coruña) y en Portugal (Beira Litoral y Baixo Alentejo), la especie *L. humile* aún no ha sido descrita para Portugal (Franco, 1984; Erben, 1993).



Figura 3 – Mapa de distribución de *Limonium humile* Miller (adaptado de www.gbif.org).

Limonium narbonense, es morfológicamente y filogenéticamente una especie próxima de L. vulgare (Erben, 1993; Palacios et al., 2000; Lledó et al., 2005). Se distribuí por la costa oeste Mediterránea, en España se puede observar en Gerona, Barcelona, Tarragona, Castellón, Valencia, Alicante, Sevilla y Huelva; en Portugal, no fue aun citada, a pesar del híbrido L. vulgare x L. narbonense haber sido descrito para la provincia portuguesa Baixo Alentejo (Erben, 1993). En el mapa actual confeccionado con la información disponible en la base de datos del GBIF (Figura 4) están también señaladas las provincias de Vizcaya, Cantabria, Lugo, La Coruña y Pontevedra. De acuerdo con Erben (1979) y Georgakopoulou et al. (2006), esta especie se reproduce por fecundación cruzada pues presenta dimorfismo polínico-estigmático, esto es, tiene flores con polen tipo A y estigma tipo "cob", y flores con polen tipo B y estigma papiloso.

Atendiendo a Palop-Esteban *et al.*, (2011) parece que en este de España *L. vulgare* y *L. narbonense* no comparten la misma área de distribución, por lo que la hibridación entre ellas parece ser improbable. Las dos especies clasificadas en la subsección *Genuinae* (Boissier, 1848 in Lledó *et al.*, 2003; Lledó *et al.*, 2005), corresponden a un grupo monofilético separado de la gran mayoría de las especies incluidas en el grupo *L.* sect. *Limonium* (Palacios *et al.* 2000), cuyos parientes más próximos están presentes en el continente americano (Baker, 1953ab) o africano (Lledó *et al.*, 2005). También existen opiniones contradictorias en relación al tamaño del genoma y número de cromosomas; algunos autores refieren que es *L. narbonense* es tetraploide (*2n*=4x=36) (Arrigoni & Diana, 1999; Palacios *et al.*, 2000; Palop-Esteban *et al.*, 2011), mientras que Georgakapoulou *et al.* (2006) comentan que puede presentar individuos hexaploides (*2n*=6x=54) o octoploides (*2n*=8x=72).



Figura 4 – Mapa de distribución de *L. narbonense* Miller (adaptado de www.gbif.org).

Estas discrepancias explican el motivo por el cual la taxonomía establecida para el género *Limonium* en general, y para estas especies en particular, ha sido revisada en los últimos años, principalmente recurriendo a estudios morfométricos, reprodutivos y más recientemente de filogenia molecular (Dawson & Ingrouille, 1995; Lledó *et al.*, 1998, 2005; Palacios *et al.*, 2000; Palop-Esteban *et al.*, 2011).

# 2.2. Caracterización y contextualización del área de estudio

#### 2.2.1. Localización

El área de estudio de este trabajo se centra en la costa portuguesa continental, que tiene 1230 km y se localiza en la confluencia entre el Atlántico y el Mediterráneo, lo que resulta en una gran riqueza de especies florísticas (http://pt.wikipedia.org). Seis de las 11 provincias Portuguesas tienen área costera, respectivamente el Minho, Douro Litoral, Beira Litoral, Estremadura, Baixo Alentejo y Algarve (Figura 5).

En estas costas, además de acantilados y playas, también si encuentran estuarios, ambientes acuáticos de transición sujetos al flujo de dos veces de las mareas y consecuentemente a una variación de salinidad (ALFA, 2004). Los principales estuarios portugueses son Minho, Douro, Aveiro, Mondego, Tejo, Sado, Mira, Formosa y



**Figura 5** – Mapa de las provincias portuguesas (adaptado de http://pt.wikipedia.org).

#### Guadiana.

Los estuarios están asociados a marismas, ecosistemas húmedos donde son frecuentes las comunidades halófilas o sub-halófilas que se desarrollan en lodo, donde las corrientes son incapaces de transportar todos los sedimentos. Estas comunidades halófilas o sub-halófilas están compuestas por herbáceas o arbustos, entre las que crecen algunas especies del género *Limonium*, como *L. vulgare*, *L. humile* y *L. narbonense* (Dawson & Ingrouille, 1995; palop-Esteban et al., 2011). Estas comunidades tienen una gran importancia ecológica: son el alimento de muchos seres vivos, facilitan el reciclado de nutrientes y, son capaces de retener y eliminar substancias tóxicas. (Figura 6).



**Figura 6** – Imágenes representativas de las marismas portuguesas. En **b.** y **c.** se observa la presencia de ejemplares en flor de *Limonium* (óvalos amarillo).

Los estuarios atlánticos que se distribuyen al Norte del estuario del río Mondego son de pequeña dimensión, estrechos y están muy alterados debido a la acción antrópica, que ha modificado su vegetación profundamente. A sur del río Mondego, inclusive, los estuarios mediterráneos, que son generalmente de mayor dimensión y de mayor complejidad geomorfológica y ecológica que los atlánticos, se caracterizan también por la presencia de extensas y múltiples concavidades, protegidas de las corrientes fluviales y mareas más fuertes. Estos han sufrido un impacto antrópico mucho menor que los atlánticos (ALFA, 2004).

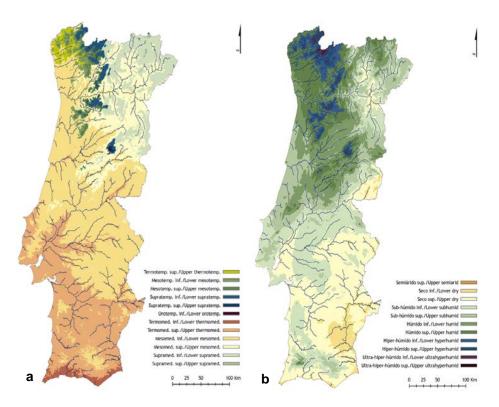
#### 2.2.2. Biogeografía y bioclimatología

Portugal continental se distribuye por dos regiones biogeográficas del Reino Holártico (Tabla 1): Región Eurosiberiana y Región Mediterránea. (Costa, 1998). La Región Eurosiberiana se

caracteriza por una aridez estival nula o muy ligera, nunca con más de dos meses de precipitación inferior al doble de la temperatura (P < 2T). Así, la precipitación es siempre superior a la evapotranspiración, evitando un agotamiento de las reservas hídricas en los suelos (Costa, 1998). La Región Mediterránea se caracteriza por tener un clima en que en el período estival, al menos dos meses, la precipitación es inferior al doble de la temperatura (P < 2T), y en el resto de las estaciones hay un exceso de agua (Costa, 1998).

Tabla 1 – Adscripción biogeográfica de las provincias costeras portuguesas continentales (Rivas-Martínez,								
2005)								
Reino		Holártico						
Región		Eurosiberiana		М	editerránea			
Subregión	Atlán	tico-centroeuropea		Mediter	ránea occidental			
Provincia	Atlántica Europea Lusitano-Andaluza Litoral							
Subprovincia	С	antabroatlántica	División Portuguesa- Sadense Gaditano-,		Gaditano-Alga	Algarbiense		
Sector	Ga	alaico-Portugués	Ribatagano	-Sadense	Sector Algarb	oiense		
Susector	Galaico	portugués Meridional						
Distrito	Durimínico	Duriense y Litoral	Ribatagano Sadense		Altoalgarbiense Costero	Algárbico		
	Minho Douro y Beira Litoral		Estrema	adura	Baixo Altentejo	Algarve		
	Províncias de Portugal							

De acuerdo con los termotipos de Rivas-Martínez (2007) y los ombrotipos de Monteiro-Henriques (2010) el clima de la costa portuguesa varia entre termotemperado superior a mesomediterráneo inferior, húmedo, en la provincia Minho; mesomediterráneo inferior, húmedo inferior, en Douro Litoral; mesomediterráneo inferior, sub-húmedo superior, en Beira Litoral; termomediterráneo superior, sub-húmedo, en Estremadura; termomediterráneo superior, seco superior, en Baixo Alentejo; y termomediterráneo inferior, seco inferior, en Algarve (Figura 7).



**Figura 7** – Mapas bioclimáticos: **a.** Mapa de los termotipos de Rivas-Martínez (2007); **b.** mapa de los ombrotipos (adaptado de Monteiro-Henriques, 2010).

#### 2.2.3. Fitosociología

Según ALFA (2004), los estuarios de la ría de Aveiro, del río Tejo, del río Sado, del río Mira, de la ría Formosa y del río Guadiana albergan especies halófitas como Sarcocornia fruticosa (L.) A .J. Scott o Sarcocornia alpini (Lag.) Castrov. y/o Halimione portulacoides (L.) que son dominantes, pudiéndose encontrar también otras especies como Cistanche phelypaea (L.) Cout., Inula crithmoides L., Puccinellia iberica (Wolley-Dod) Tzvele, P. maritima (Huds.) Parl. y Triglochin barrelieri Loisel. Ademas de éstas se encuentran, excepto en el estuario de la ría de Aveiro Arthrocnemum macrostachyum (Moric.) K.Koch, Juncus acutus L., Juncus maritimus Lam., Limonium algarvense Erben, L. daveaui Erben, L. diffusum (Pourr.) Kuntze, L. ferulaceum (L.) Chaz. y L. lanceolatum (Hoffmanns. & Link).

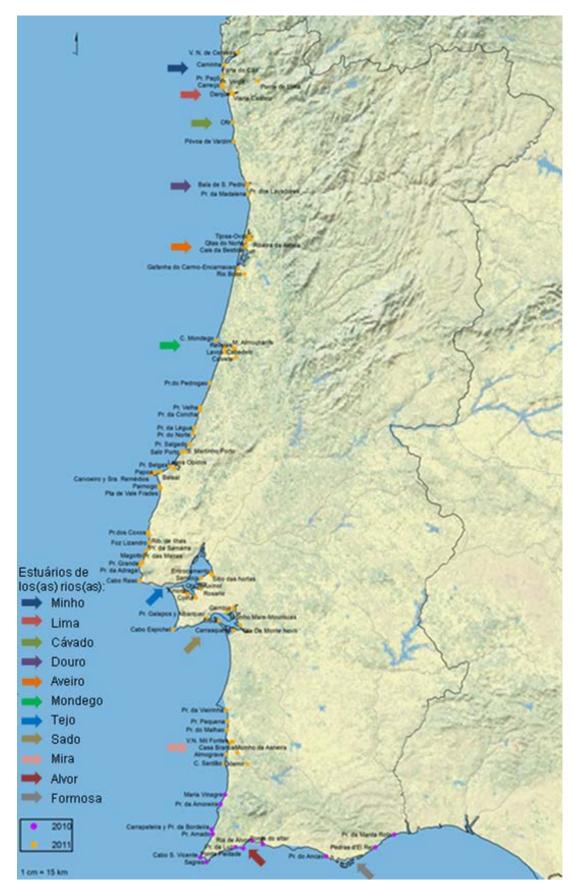
De acuerdo con Neto et al. (2009), en los estuarios las asociaciones fitosociológicas más comunes son Cistancho phelypaeae-Sarcocornietum fruticosae Géhu ex Géhu & Géhu-Franck 1977 nom. mut., Halimiono portulacoidis-Sarcocornietum alpini Rivas-Martínez & Costa 1984, Inulo crithmoidis-Arthrocnemetum macrostachyi Fontes ex Géhu & Géhu-Franck 1977, Puccinellio ibericae-Sarcocornietum perennis J.C. Costa in J.C. Costa, Lousã & Espírito Santo 1997 corr. Rivas-Martínez, T.E. Díaz, Fernádez-González, Izco, Loidi, Lousã & Penas 2002 & nom. ivers., aunque en Aveiro apenas están presentes las dos primeras. En cuanto a las comunidades vegetales presentes en la playa Praia Veiga en Aerosa, Viana do Castelo, el respectivo estudio se encuentra en curso (Costa et. al, no publicado).

# 3. Material y Métodos

# 3.1. Área de estudio y muestreos

Para este estudio, fueron prospectadas las siguientes localidades a lo largo de la costa portuguesa durante los meses del verano de 2011 (Figura 8): Vila Nova de Cerveira; Caminha; Forte do Cão; Praia do Paçô; Praia da Veiga; Carreço; Ponte de Lima; Darque; Viana do Castelo; Ofir; Póvoa de Varzim; Baía de S. Pedro; Praia dos Lavadores; Praia da Madalena; Tijosa, Ovar; Quintas do Norte; Ribeira da Aldeia, Estarreja; Cais da Bestida, Torreira; Gafanha do Carmo/Encarnação; Rio Boco; Cabo Mondego; Reveles; Moinho de Almocharife; Lavos; Cabedelo: Calvete: Praia do Pedrogão: Praia Velha: Praia da Concha: Praia da Légua: Praia do Norte; Praia Salgado; São Martinho do Porto; Salir do Porto; Lagoa de Óbidos; Praia dos Belgas; Papoa; Baleal; Carvoeiro; Sra. dos Remédios; Paimogo; Ponta de Vale Frades; Praia dos Coxos; Ribeira de Ilhas; Foz do Lizandro; Praia da Samarra; Magoito; Praia das Maçãs; Praia Grande; Praia da Adraga; Cabo Raso; Entroncamento, Alcochete; Sitio das Hortas, Alcochete; Samoco; Quinta Rouxinol; Rosário; Amora; Barreiro; Gâmbia; Mouriscas; Praia Galapos; Praia Albarquel; Cabo Espichel; Tróia; Quinta de Monte Novo; Carrasqueira; Praia da Vieirinha: Praia Pequena: Praia da Malhão: Vila Nova de Mil Fontes: Casa Branca: Moinho da Asneira; Almograve; Cabo Sardão y Odemira. Incorporándose las prospecciones previamente realizadas en año de 2010: Maria Vinagre; Praia da Amoreira; Carrapateira; Praia da Bordeira; Praia do Amado; Cabo de S. Vicente; Sagres; Ponta da Piedade; Praia da Luz; Ria de Alvor; Ponta do Altar; Praia do Ancão; Pedras d'El Rei y Praia da Manta Rota. No fue posible prospectar algunas localidades, como estaba previsto inicialmente atendiendo a los herbarios consultados, porque actualmente se encontraban en zonas de propiedad particular.

Para contrastar los datos que se observarían en las plantas herborizadas en las anteriores prospecciones, se consultaron pliegos de los siguientes herbarios: Herbário João de Carvalho e Vasconcellos do Instituto Superior de Agronomia-LISI, Herbário do Museu Nacional de História Natural-LISU, Herbário da Estação Agronómica Nacional-LISE, Herbário da Universidade de Coimbra-COI, Herbário da Universidade do Porto-PO, Herbario del Real Jardín Botánico de Madrid – MA, Herbario del Jardín Botánico de la Universidad de Valencia - VAL y Herbario de la Sociedad de Ciencias Aranzadi - ARAN (abreviaturas según Holmgren *et al.* 1990).



**Figura 8** – Localidades prospectadas en la costa portuguesa entre los años 2010 y 2011, pertenecientes a los estuarios: Minho, Lima, Cávado, Douro, Aveiro, Mondego, Tejo, Sado, Mira, Alvor, Formosa. (Abreviaturas de los nombres: V. N. – Vila Nova; Pr. – Praia; C. - Cabo)

# 3.2. Material vegetal

#### 3.2.1. Plantas herborizadas

Se recolectaron un total de 93 individuos que identificamos como *Limonium vulgare*, *Limonium humile x Limonium vulgare*, *Limonium vulgare* x *Limonium narbonense* através de las claves dicotómicas (Erben, 1993), cuyos testigos han sido depositados en el herbario João de Carvalho e Vasconcelos–LISI.

Estos ejemplares fueron encontrados en la playa, Praia da Veiga (Viana do Castelo, V; 6 individuos) y los estuarios de la ría de Aveiro (A; 33 individuos), del río Tejo (T; 12 individuos), del río Sado (S; 25 individuos) y del río Mira (M; 17 individuos). A pesar de que el Tejo es el mayor estuario, el número de individuos recolectados en este estuario es reducido debido a la dificultad en acceder a las marismas, pues es un área de propiedades privadas sin libertad de acceso. En las tablas 2, 3, 4, 5 y 6 se puede observar el número de individuos analizados por cada estuario/playa, el código de trabajo atribuido a cada individuo, su número de herbario, la localidad, las coordenadas geográficas, el país y la fecha. Solo en las localidades que presentaban un número igual o superior a 10 individuos se efectuaron recolecciones de individuos y un censo de la población. En las localidades pertenecientes al estuario del río Tejo (Barreiro y Rosário) solo fueron recolectadas semillas.

Todas las poblaciones fueron georreferenciadas con un GPS modelo Geoexplorer II, Trimble. Los dados del GPS fueron procesados mediante Google Earth 6.1.0 (http://earth.google.com) V su mapeado fue hecho con ArcGIS Desktop 10.0 (http://www.esri.com).

Tabla 2 – Individuos analizados recogidos en la Praia da Veiga, Viana do Castelo								
Código	Número de herbario*	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha			
V1	LISI-133/2012							
V2			Praia da Veiga, Aerosa, Viana N41 43.702 W8 52.293 do Castelo	Portugal	01-09-2011			
V3	No se aplica	Praia da Veiga,						
V4								
V5	LISI-134/2012							
V6	No se aplica							

<sup>\*</sup> Ejemplares depositados en el herbario João de Carvalho e Vasconcelos-LISI

		recogidos en el estuario de la ría	1			
Código	Número de herbario*	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha	
A1	No se aplica	Gafanha do	N40 37.328 W8 44.218			
A2	110 00 00 100	Carmo/Encarnação	1110 07.020 110 11.210			
А3	LISI -117/2012	Cais da Bestida, Torreira	N40 45.578 W8 40.597			
A4	LISI - 123/2012	Tijosa, Ovar	N40 49.244 W8 38.982	_		
A5		Ribeira da Aldeia, Estarreja	N40 48.078 W8 38.191			
A6						
A7	No se aplica					
A8	No se aplica	Gafanha do Carmo/Encarnação	N40 37.328 W8 44.218			
A9						
A10				-		
A11	LISI -125/2012	Quintas do Norte				
A12	LISI-126/2012		N40 47.719 W8 40.394			
A13	LISI - 124/2012	Tijosa, Ovar	N40 49.244 W8 38.982			
A14	LISI - 118/2012	Cais da Bestida, Torreira	N40 45.578 W8 40.597			
A15	No se aplica					
A16	LISI -161/2013		N40 40 070 W0 00 404			
A17	No se aplica	Ribeira da Aldeia, Estarreja	N40 48.078 W8 38.191			
A18	LISI -162/2013			Portugal	14-07-2011	
A19				=		
A20	No se aplica					
A21						
A22	LISI -119/2012	Gafanha				
A23	No se aplica	do Carmo/Encarnação	N40 37.328 W8 44.218			
A24	LISI - 120/2012					
A25						
A26	No se aplica					
A27	1			1		
A28	LISI - 121/2012					
A29	LISI - 122/2012					
A30						
A31	1	Восо	N40 35.369 W8 41.213			
A32	1					
A33	No se aplica					
A34	-					
A35	1					

<sup>\*</sup> Ejemplares depositados en el herbario João de Carvalho e Vasconcelos-LISI

Tabla 4 –	Tabla 4 – Individuos analizados recogidos en el estuario del río Tejo							
Código	Número de herbario*	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha			
T1								
T2	No se aplica	Sitio das hortas, Alcochete	N38 45.627 W8 56.245		25-07-2011			
T3								
T4	LISI-129/2012	Entroncamento, Alcochete	N38 44.928 W 8 55.325					
T5	LISI-131/2012	Amora	N38 37.602 W9 06.617					
T6	No se aplica			Dortugal	14-09-2011			
T7	LISI-127/2012	Citia das hartas Alasahata	N20 45 627 W0 56 245	Portugal				
Т8	LISI-128/2012	Sitio das hortas, Alcochete	N38 45.627 W8 56.245					
Т9	No se aplica			_				
T10	LISI-130/2012	Entroncamento, Alcochete	N38 44.928 W8 55.325		25-07-2011			
T11	LISI-132/2012	Amora	N38 37.602 W9 06.617		14.00.2011			
T12	No se aplica	Aillora	1130 37.002 W 9 00.017		14-09-2011			

<sup>\*</sup> Ejemplares depositados en el herbario João de Carvalho e Vasconcelos-LISI

Tabla 5 – Individuos analizados recogidos en el estuario del río Sado								
Código	Número de herbario*	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha			
S1		Carrasqueira	N38 24.729 W8 45.175		12-07-2011			
S2		Mouriscas	N38 31.707 W8 48.261		22-07-2011			
S3	No se aplica	Tróia	N38 28.197 W8 52.063		05-09-2011			
S4		Tiola	N30 20.197 W 0 52.005		05-09-2011			
S5		Mouriscas	N38 31.707 W8 48.261		22-07-2011			
S6	LISI - 112/2011	Gâmbia	N38 32.911 W8 45.490		22-07-2011			
S7	LISI - 111/2012	Gambia	1036 32.911 006 45.490		22-07-2011			
S8								
S9	No se aplica							
S10								
S11		Tróia	N38 28.197 W8 52.063		05-09-2011			
S12								
S13	LISI-137/2012			Portugal				
S14	LISI-138/2012							
S15	No se aplica		NOT 40 0 40 11/0 45 070					
S16	LISI-139/2012	Mouriscas	N37 43.842 W8 45.270					
S17	LISI-141/20 12		NO. 00 700 W. 40 000					
S18	LISI-142/2012	Salinas Monte Novo	N38 26.729 W8 42.092		00.07.0044			
S19	LISI-140/2012				22-07-2011			
S20		Manufaca	NOT 40 0 40 W0 45 070					
S21	No se aplica	Mouriscas	N37 43.842 W8 45.270					
S22								
S23	LISI-135/2012							
S24	No se aplica	Carrasqueira	N38 24.729 W8 45.175		12-07-2011			
S25	LISI-136/2012							

<sup>\*</sup> Ejemplares depositados en el herbario João de Carvalho e Vasconcelos-LISI

Constants									
Código	Número de herbario*	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha				
M1	LISI - 114/2012								
M2	No se aplica	Casa Branca N37 39.981 W8 43.206	20-09-2011						
M3	LISI - 113/2012								
M4	No se aplica	Moinho da Asneira	N37 43.842 W8 45.270						
M5	No se aplica				12-07-2011				
M6	LISI - 143/2012	Vila Nova de Mil	N37 43.665 W8 46.256	66	12-07-2011				
M7	LISI - 144/2012	Fontes	N37 43.003 W 6 40.230						
M8									
M9				Portugal					
M10									
M11	No se aplica	Casa Branca	N37 39.981 W8 43.206		20-09-2011				
M12		Casa Branca							
M13									
M14				_					
M15	LISI - 115/2012								
M16	LISI - 116/2012	Moinho da Asneira	N37 43.842 W8 45.270		12-07-2011				
M17	No se aplica								

<sup>\*</sup> Ejemplares depositados en el herbario João de Carvalho e Vasconcelos-LISI

#### 3.2.2. Plantas de herbarios

A la colección de plantas frescas recogidas para estudio fueron añadidos especímenes herborizados de los estuarios de la ría Aveiro (A; 19 individuos), del río Tejo (T; 8 individuos), del río Sado (S; 5 individuos), del río Mira (M; 5 individuos), de la ría Formosa (F;17 individuos) y del río Guadiana (G; 2 individuos), conservados en los herbarios: de la Universidade do Porto-PO, de la Universidade de Coimbra-COI, del Museu Nacional de História Natural-LISU, João de Carvalho e Vasconcellos do Instituto Superior de Agronomia-LISI, y de la Estação Agronómica Nacional-LISE. Los ejemplares encontrados en estos herbarios estaban identificados como *Limonium vulgare* Mill., *Limonium humile x Limonium vulgare* Erben o *Limonium vulgare x Limonium narbonense* Erben. En las tablas 7, 8, 9, 10, 11 y 12 se muestra el número de individuos analizados por cada estuario, el código de trabajo atribuido a cada individuo, su número de herbario, la localidad, las coordenadas geográficas, el país y la fecha.

Tabla 7 -	Individuos analizados d	lel estuario da ría de Aveiro				
Código	Número de herbario	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha	
A34	PO – 6448 G.S.	Estarreja				8-1984
A35	PO – 6449 G.S.	Ria de Aveiro			8-1898	
A36	PO – 6450 G.S.	Ílhavo			30-7-1901	
A37	PO – 6451 G.S.	Ria de Aveiro: Gafanha			9-1898	
A38	PO - 52837	Ílhavo			21-7-1987	
A39	PO - 18798	Ovar: Marinha			30-11-1958	
A40	PO - 18801	Ìlhavo			27-6-1964	
A41	PO - 18802	Ria de Aveiro			28-7-1964	
A42	PO - 18803	Ilhavo: Gafanha da Nazaré			16-8-1965	
A43	COI - 20	Vagos	Sin información	Portugal	9-6-1961	
A44	COI - 217	Ria de Aveiro, Barra de Aveiro			4-7-1967	
A45	COI - 1030	Aveiro, Murtosa			1978	
A46	COI - 1340	Aveiro, Gafanha da Encarnação			18-6-1979	
A47	COI - 1491	Aveiro, Murtosa			3-12-1979	
A48	COI - 13866	Aveiro, Barra de Aveiro			27-7-1938	
A49	COI - 13759	Aveiro			29-7-1976	
A50	LISE - 45358	Aveiro, Murtosa			23-8-1954	
A51	LISE - 6588	Aveiro, Brunheiro			11-9-1939	
A52	LISE - 4730	Aveiro, Barra de Aveiro			27-7-1938	

PO-Herbário da Universidade do Porto, COI-Herbário da Universidade de Coimbra, LISE-Herbário da Estação Agronómica Nacional

Tabla 8 - Individuos analizados del estuario del río Tejo					
Código	Número de herbario	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha
T13	COI - 845	Sacavém			Sin información
T14	COI - 138887	Ribatejo, Pancas, a NW de Vale de Frades			30-9-1982
T15	COI - 150927	Ribatejo, Pancas, río Sorraia			8-7-1982
T16	COI - 29143	Alcochete	Sin información	Portugal	9-1883
T17	COI - 29148	Barreiro			9-1883
T18	LISE - 40159	Póvoa de Santa Iria			26-8-1942
T19	LISE - 40625	Sacavém			16-9-1942
T20	LISE - 58240	Barreiro			23-7-1958

COI-Herbário da Universidade de Coimbra, LISE-Herbário da Estação Agronómica Nacional

Tabla 9 - Individuos analizados del estuario del río Sado					
Código	Número de herbario	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha
S26	COI - 66	Setúbal, Pântanos da			8-1900
S27	COI – (sin número)	- Cotovia			9-1906
S28	LISU - 29146	Alcácer do Sal	Sin información	Portugal	15-9-1980
S29	LISE - 94940	Setúbal, márgenes del río Sado			15-7-1977
S30	LISE - 5145	Setúbal, Península			17-9-1938

COI-Herbário da Universidade de Coimbra, LISE-Herbário da Estação Agronómica Nacional, LISU-Herbário do Museu Nacional de História Natural

Tabla 10	Tabla 10 - Individuos analizados del estuario del río Mira					
Código	Número de herbario	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha	
M18	LISI - 556/2010	Vila Nova de Mil	N37 43.665 W8 46.256			
M19	LISI – 557/2010	Fontes	1.0.			
M20	LISI – 567/2010			Portugal	07-07-2010	
M21	LISI – 568/2010	Casa Branca	N37 39.981 W8 43.206			
M22	LISI – 579/2010					

LISI - Herbário João de Carvalho e Vasconcellos do Instituto Superior de Agronomia

Tabla 11 - Individuos analizados del estuario del ría Formosa					
Código	Número de herbario	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha
F1	PO - 18799	Faro, Salinas			17-6-1962
F2	LISU - 139914	Fare IIII and a Labora			6-1916
F3	LISU - 29150	Faro, Ilha das Lebres	Sin información		6-1916
F4	LISI - 41897/1999	Sé, ría Formosa			08-07-1982
F5	LISI - 46618/1999	Sin información			15-07-1988
F6	LISI - 348/2010	Quarteira, Praia do Ancão	N37 01.947 W8 02.233		17-10-2009
F7	LISI - 46188/1999	Panasqueira			13-05-1988
F8	LISI - 47146/1999	Ilha da Armona	Sin información	Portugal	05-08-1988
F9	LISI - 46148/1999	Fuzeta, Bias do Sul	Sin informacion		11-05-1988
F10	LISI - 47129/1999	Conceição, Cabanas de Tavira, Ribeira do Almargem			04-08-1988
F11	LISI - 813/2010				05-07-2010
F12	LISI - 259/2010				16-05-2010
F13	LISI - 553/2010	Pedras D'el Rei	N37 05.168 W7 39.766		
F14	LISI - 552/2010				
F15	LISI - 554/2010				
F16	LISE - 94568	Ilha da Armona			13-7-1929
F17	LISE - 92632	Faro, Ilha das Lebres	Sin información		6-1916

PO-Herbário da Universidade do Porto, LISU-Herbário do Museu Nacional de História Natural, LISI - Herbário João de Carvalho e Vasconcellos do Instituto Superior de Agronomia, LISE-Herbário da Estação Agronómica Nacional

Tabla 12	Tabla 12 - Individuos analizados del estuario del río Guadiana					
Código	Número de herbario	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha	
G1	LISI-41781/1999	Reserva Natural de Castro Marim, Venta-Moinhos, a sur do posto fiscal Seixo	Sin información	Portugal	22-06-1982	
G2	LISI-36273/1999	Reserva Natural de Castro Marim, entre los postos fiscales Seixo y Rocha	Sin información	Portugal	11-07-1978	

LISI - Herbário João de Carvalho e Vasconcellos do Instituto Superior de Agronomia

Para determinar la identidad de los individuos de la costa portuguesa fueron incluidos en el estudio, y utilizados como referencia, ejemplares de las especies *L. vulgare* (17; Figura 9a), *L. humile* (13 individuos; Figura 9b) y *L. narbonense* (17 individuos 9c) y, herborizados y conservados en los herbarios del Real Jardín Botánico de Madrid, del Jardín Botánico de la Universidad de Valencia y de la Sociedad de Ciencias Aranzadi, (Tablas 13, 14 y 15).







**Figura 9 -** Ejemplares herborizados: **a.** *L. vulgare* (VAL); **b.** *L. humile* (ARAN); **c.** *L. narbonense* (VAL)

Código	Número de herbario	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha						
MA8	MA 348673	La Coruña: Carnota, playa de Carnota									10-08-1982
MA9	MA 459699	La Coruña: Carballo, Playa de Baldayo				29-07-1987					
MA10	MA 595187	La Coruña: Carnota, marismas de Carnota		España	30-07-1995						
MA11	MA 470215	Vizcaya: Ria de Guernica, marismas de Axpe		·	08-08-1946						
MA12	MA 681330	Soano (Arnuero)			07-08-1981						
MA13	MA 593015	Ria de Soano a Quejo	Sin información		06-08-1990						
MA14	MA 289828	Algarve: Ilha de Tavira			20-04-1920						
MA15	MA 371528	Beja, Vila Nova Mil Fontes, Rio Mira			23-04-1984						
MA16	MA 310871	Beira Litoral: Bunheiro: Bestida		Portugal	10-07-1975						
MA17	MA 372195	Ausine Die de Ausine Muntage		i ortugai	20-08-1984						
MA18	MA 372194	Aveiro, Ria de Aveiro, Murtosa									
MA19	MA 289830	Beira Litoral: Bunheiro: Bestida			10-07-1975						
VAL15	VAL 172185	Tarragona: Tamarit de Mar, La Mora	Sin información	España	18-09-1948						
VAL16	VAL 154052	Sin información	Sin información	Reino Unido	1827						
VAL17	VAL 154054	Nord Beveland, Kamperland	Sin información	Países Bajos	Set-31						
VAL18	VAL 154053	Gironde, Arachon	Sin información	Francia	Ago-30						
VAL19	VAL 973674	Cantabria, Oriñon, Ría de Oriñón	UTM:30TVP70	España	14-09-1991						

MA - Herbario del Real Jardín Botánico de Madrid, VAL - Herbario del Jardín Botánico de la Universidad de Valencia

i apia 14 ·	- individuos analiz	ados de la especie L. humile			
Código	Número de herbario	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha
ARAN1	ARAN 36106	Euskal Herria, Gipuzkoa, Zarautz	Sin información		13-09-1986
ARAN2	ARAN 9794	Euskal Herria, Gipuzkoa, Zarautz, Desembocadura de Iñurritza erreka,	UTM: 30TWN6893		05-09-1982
ARAN3	ARAN 36107	Cantabria, San Vicente de la Barquera	Sin información		21-08-1984
ARAN4	ARAN 52971	Euskal Herria, Pyrénées Atlantiques, Baiona, St. Bernard	UTM:30TXP21		24-09-1995
ARAN5	ARAN 36105	Cantabria, Argoños, Ancillo	UTM:30TVP6011	España	29-09-1985
ARAN6	ARAN 55151	Euskal Herria, Gipuzkoa, Zumaia	UTM:30TWN6193		07-08-1987
ARAN7	ARAN 47391	Euskal Herria, Gipuzkoa, Zumaia, Playa	UTM:		26-07-1989
ARAN8	ARAN 47390	de Santiago	30TWN6094		20-07-1989
ARAN9	ARAN 9793	Euskal Herria, Gipuzkoa, Zarautz, Desembocadura de Iñurritza erreka	UTM: 30TWN6893		24-07-1981
MA1	MA 617149	Cantabria: marisma de Rubín, junto a Abaño, San Vicente de la Barquera			23-07-1983
MA2	MA 681337	Miengo, Mogro	Sin información	España	15-09-1995
MA3	MA 681334	Cicero (Bárcena de Cicero)	Siii iiiioiiiiacioii	Espana	29-08-1985
MA4	MA 681335	Miengo, Mogro			06-07-1973

ARAN - Herbario de la Sociedad de Ciencias Aranzadi, MA - Herbario del Real Jardín Botánico de Madrid

Código	Número de herbario	Localidad	Coordenadas geográficas	País	Fecha
MA5	MA 695629	Ayamonte			25-09-2011
MA6	MA 394690	Castellón, Oropesa del Mar: Punta del Faro			08-08-1984
MA7	MA 426143	Valencia: El Saler			28-10-1981
VAL1	VAL149647	Alicante: Pego (la marina alta)	Sin información		08-12-1990
VAL2	VAL 149560	Alicante: Dénia (la marina alta)	Sin informacion		27-07-1991
VAL3	VAL 149649	Alicante: Pego (la marina alta)			08-10-1987
VAL4	VAL 20801	Valencia: Marjal de Oliva			14-09-1987
VAL5	VAL 19382	Castellón: Cabanes (la plana alta), Torrelasal			07-08-1981
VAL6	VAL 19384	Castellón:Orpesa (Laplana Alta), Morro de Gós,	UTM:31TBE54	España	09-09-1989
VAL7	VAL 19383	Castelló: Cabanes (La plana Alta), Platja Torrelasal	01W.311BE34		15-06-1989
VAL8	VAL 187540	Castelló: Xilxes (La Plana Baixa)	UTM:30SYK40		01-11-1993
VAL9	VAL 21202	Castelló: Orpesa (La plana alta), Far d' Orpesa	UTM:31TBE54		27-07-1988
VAL10	VAL 19385	Castelló: Castelló de la Plana (La Plana Alta), Aerodromo	UTM:31TBE43		09-09-1989
VAL11	VAL 27396	Castelló: Torreblanca (La Plana Alta),	LITM 04TDF05		05 00 4000
VAL12	VAL 27372	Colt de Tomàs	UTM:31TBE65		25-08-1992
VAL13	VAL 28341	Castelló: Orpesa (La Plana Alta)	UTM:31TBE54	]	27-08-1992
VAL14	VAL 19386	Castelló: Alcalá de Xivert (El Baix Maestrat) Cap i Corp	UTM:31TBE65	1	04-05-1991

MA -Herbario del Real Jardín Botánico de Madrid, VAL - Herbario del Jardín Botánico de la Universidad de Valencia

# 3.3. Recolección, preparación y conservación de semillas

De algunos de los individuos recogidos que se encontraban en fructificación, fueron retiradas las cápsulas (frutos) y extraídas las semillas utilizando dos placas de corcho. Por acción abrasiva, las semillas fueron separadas de las partes florales.

Fueron seleccionadas cerca de 100 semillas de ejemplares de cada una de las localidades referidas en la tabla 16, siendo depositadas en el Banco de Semillas João Amaral Franco, en el Jardim Botânico d' Ajuda (Lisboa) tras haber sido tratadas según la método de conservación de Gómez-Campo (2002) (Figura 10).



Figura 10 – Semillas almacenadas en tubos de vidrio con sílica-gel

<b>Tabla 16</b> – Localidades de recoleción de las semillas conservadas en el Banco de Semillas João do Amaral Franco, Jardim Botânico d'Ajuda			
Estuario	Localidad		
Aveiro	Ribeira da Aldeia, Estarreja		
Aveilo	Восо		
	Sitio das Hortas, Alcochete		
Tejo	Amora		
	Barreiro		
Sado	Mouriscas		
Jau	Tróia		
Mira	Vila Nova de Mil Fontes		
ivilia	Casa Branca		

#### 3.3.1. Germinación de semillas y cultivo de plantas

Dado que las poblaciones fueron visitadas durante la época de floración, pocos individuos presentaban frutos. Consecuentemente, el número total de semillas obtenidas para poder sembrar fue bajo.

Para determinar la porcentaje de germinación de las semillas, fueron puestas a germinar un total de 68 semillas, recogidas en la playa Praia da Veiga (Viana do Castelo) (1), y en los estuarios Aveiro (20), Tejo (29), Sado (9) y Mira (9).

Estas fueron colocadas en una placa de Petri con papel humedecido en agua destilada y colocadas en un fitotrón con 8 h de luz/16h escuro y con una temperatura de 25°C, de acuerdo con el protocolo descrito en Róis et al. (2012). Al final de 10 días fue determinada la tasa de germinación.

Las plántulas obtenidas fueron colocadas en pequeñas macetas con sustrato propio para plantas, previamente auto clavado a una presión de 1 bar y a una temperatura de 120°C. Las macetas fueron, debidamente identificadas con la fecha y la localidad de procedencia donde fueron recogidas las semillas, y colocadas en un fitoclima con el mismo régimen térmico y

fotoperiodo arriba descrito. El riego se aplicaba cada dos días. Después de un mes en cultivo, fueran transferidas al invernadero.

#### 3.4. Estudio cromosómico

Para la obtención de aplastamientos fueron usados ápices radiculares, mas que uno por individuo, de plantas con una edad de 45 – 60 días (1,5 - 2 meses), de cada una de las localidades siguientes: Boco (A; 3 individuos), Alcochete -Sítio das Hortas (T; 3 indivíduos), Rosário (T; 2 individuos), Amora (T; 3 individuos), Barreiro (T; 2 individuos). En los restantes individuos no fue posible por falta de condiciones de las raízes y/o por la ausencia divisiones mitóticas.

Los aplastamientos fueron hechos de acuerdo con la metodología descrita por Caperta et al., (2008), con algunas modificaciones. Así, los ápices radiculares ya lavados fueron colocados en tubos de vidrio con (p/v) 2mM 8-hidroxiquinolina, durante 2,5 horas a 4°C, y subsecuentemente fueran colocados a temperatura ambiente 2,5 horas, siempre cubiertos con papel de aluminio. Tras 5h de tratamiento con 8-hidroxiquinolina, los ápices fueron fijados con una solución 3:1 etanol-acético (v/v) durante la noche, y quardados a -20°C. A continuación, los ápices radiculares fueron trasladados a una solución enzimática tamponada 1xEB [dilución 1:10 de la solución "stock" (40 ml de ácido cítrico monohidratado y 60 ml de citrato trisódico deshidratado 0.1 M; pH 4,8; almacenado a 4°C)] continuando con un proceso de agitación durante dos veces cada 5 minutos. Posteriormente los ápices radiculares se colocaron en vidrios de reloj que contenían una solución enzimática [3% (p/v) de celulasa (Onozuka), 3% (p/v) pectoliasa (Sigma) y 3% (p/v) citohelicasa (Sigma), em 1XEB], manteniéndose a 37°C en una estufa durante una hora. Terminado este período, se retiraban de la estufa y la enzima de digestión se sustituía por la solución 1xEB. Los aplastamientos fueron realizados añadiendo una gota de una solución acuosa (v/v) de ácido acético al 60%. Después de congelados los portaobjetos con CO<sub>2</sub> líquido, y removidos los cubreobjetos, se dejaron secar a temperatura ambiente.

Los aplastamientos fueron teñidos con un colorante específico para DNA –DAPI- (Dilución de 1:1500 en citofluor; 7 µl en cada portaobjetos). El DAPI es un marcador específico fluorescente del DNA, que permitió visualizar los cromosomas en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Imager Z1) equipado con una cámara AxioCam (HRm Zeiss) y con un transmisor de fluorescencia (HXP 120). Las imágenes fueran posteriormente procesadas y tratadas mediante el software Adobe Photoshop CS 5.1 (Adobe Systems Inc., 1990-2011). Las mediciones de los cromosomas fueron realizadas en microfotografias obtenidas con un objectivo 63x.

### 3.5. Análisis de heterostilia y dimorfismo polínico-estigmático

Del conjunto de ejemplares prospectados y de los ejemplares escogidos del herbario LISI para el análisis morfométrico, se seleccionaron una media de 4 flores de 6 individuos por estuario/playa (Praia da Veiga, Viana do Castelo; Aveiro; Tejo; Sado; Mira; Formosa y Guadiana) para analizar la heterostilia y el dimorfismo polínico-estigmático. En total se

estudiaron 153 flores correspondientes a 44 individuos.

Las flores fueron recogidas con una pinza y las brácteas, el cáliz y las pétalas fueron removidas con el auxilio de dos pinzas y uno estéreo microscopio (Zeiss stemi DV4 equipado con una cámara digital Zeiss AxioCam ) (Figura 11)

Para la determinación del número de flores del tipo "Pin" o "Thrum" fue observada en cada flor la posición de los estambres en relación al estigma



**Figura 11** - Bráctea media, interna, cáliz y flor (de izquierda a derecha).

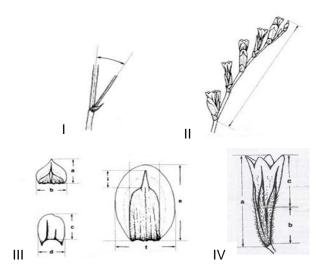
(Baker 1966). Para la evaluación del dimorfismo polínico-estigmático fueron observados el tipo de exina (macrorreticulada o microrreticulada) de los granos del polen y la morfología del estigma [papillate ("papiloso") o cob ("mazorca de maíz")]. Después se determinó el tipo de combinación (A, B, C, o D) segundo Baker (1948). Estas observaciones fueron realizadas con un microscopio óptico (Leitz hm-lux 3).

Las observaciones realizadas se han tabulado en forma de tabla cruzada o de contigencia, representado en las filas las poblaciones donde se han realizado los muestreos (Praia da Veiga, Viana do Castelo; Aveiro; Tejo; Sado; Mira; Formosa y Guadiana) y en las columnas bien la heterostilia y homostilia, bien los cuatro tipos polínico-estigmáticos (ver resultados página 35.

La información de estas tablas ha sido analizada inicialmente mediante un análisis factorial de correpondencias –AFC- (Foucart 1982; Podani 1994) que permite representar en un espacio multidimensional reducido -mapa perceptual en el sentido de Hair *et al.* (1998)- para explorar las interrelaciones entre los atributos reflejados en sus dos dimensiones (filas, columnas) empleándose el paquete estadístico NTSYS-pc v. 2.11 ó v. 2.21 según las necesidades (Rohlf 2000, 2009). Posteriormente, se han realizado diferentes testes de independencia (Sokal & Rohlf 1997) subdividiendo las tablas (Zar 2010) con el fin de confirmar las poblaciones con estructuras semejantes en las tipologías analizadas, aprovechando las capacidades de cálculo del programa Excel 2007 (Microsoft Corporation, 2008).

# 3.6. Análisis morfométrico de caracteres macroscópicos

Tanto de los individuos procedentes de nuestras prospecciones como los de los herbarios consultados, fueron analizados los caracteres cuantitativos (Figura 12) de acuerdo con Erben (1993) y Dawson & Ingrouille (1995), que se indican en la tabla 17. Las mediciones fueron hechas con la ayuda de uno estéreo microscopio Zeiss stemi DV4, un pinza, dos agujas de disecación, papel milimétrico, una regla de 50 cm y un transportador.



**Figura 12 – I.** Ángulo de ramificación, **II.** Longitud de la espiga; **III.** Brácteas: **a.** longitud de la bráctea externa, **b.** anchura de la bráctea externa; **c.** longitud de la bráctea media, **d.** anchura de la bráctea media; **e.** longitud de la bráctea interna, **f.** anchura de la bráctea interna, **i.** ápice. **IV.** Cáliz: **a.** longitud, **b.** tubo, **c.** limbo. Adaptado de "Flora Ibérica" vol. II (Erben 1993)

Tabla 17 – Caracteres cuantitativos analizados y sus acrónimos			
Longitud del pecíolo de la hoja (cm)	Lp		
Longitud del limbo de la hoja (cm)	Llh		
Anchura máxima de la hoja (cm)	Alh		
Longitud del escapo hasta la 1ª ramificación (cm)	Le1		
Longitud del escapo total (cm)	Le		
Ángulo entre el escapo y la 1ª ramificación (grados)*	Sen*		
Longitud de la espigas (cm)	Les		
Mayor distancia entre espiguillas (mm)	Des		
Nº de espiguillas por cm	Es		
Nº de flores por espiguilla	Fes		
Bráctea externa			
Longitud (mm)	Lbe		
Anchura (mm)	Abe		
Bráctea media			
Longitud (mm)	Lbm		
Anchura (mm)	Abm		
Bráctea interna			
Longitud (mm)	Lbi		
Anchura (mm)	Abi		
Cáliz			
Longitud (mm)	Lk		
Proporción de limbo	Pk		
Longitud de los pétalos (mm)	LP		

<sup>\*</sup>Para cálculos posteriores se transformaron en radianes.

Tras la exploración inicial de las variables cuantitativas consideradas, tanto en su conjunto, como en el seno de las poblaciones (estuarios/playas), se constató la ausencia de una distribución normal, por lo que tuvo que aplicarse el test de Kruskal-Wallis, test no paramétrico de la varianza (Sokal y Rohlf, 1995; Zar, 2010), para comprobar la igualdad o diferencia de las mismas. Para estos análisis univariantes se utilizó el paquete estadístico SPSS 19 (IBM SPSS, 2010).

Con objeto de detectar posibles afinidades entre las poblaciones muestreadas, se realizó un Análisis en Componentes Principales -ACP- tipificado a partir de una matriz que recopila los 196 casos correspondientes a los ejemplares de los distintos estuarios/playas y a los ejemplares L. vulgare, L. humile y L. narbonense (especies que han servido de contraste) -UTO's (unidades taxonómicas operativas) - (Tablas 2 a 15) por las 19 variables consideradas (Tabla 17) transformadas logarítmicamente también mediante la fórmula  $y' = \log_{10}(y+1)$ para evitar los valores negativos. Se trata de un análisis multivariante de interdependencia (Mallo, 1985) en el que las variables son de naturaleza métrica, entre las que no se puede distinguir entre variables criterio (dependientes) o variables predictoras (independientes). Es un método de ordenación ampliamente empleado en la exploración de las estructuras multidimensionales de datos de naturaleza biológica (p. ej. Legendre y Legendre, 1998; Podani, 2000), basado en el procedimiento de extracción de valores y vectores propios a partir de la matriz de análisis en modo R (matriz de varianzas-covarianzas –denominado ACP centrado–, o matriz de correlación -ACP tipificado-, utilizado en este estudio para tener menos heterogeneidad entre los datos), cuyo sentido es el de la reducción de dimensionalidad (Goodall, 1954) de modo que las variables originales interrelacionadas son substituidas por variables artificiales (componentes principales = dimensiones) no correlacionadas (ortogonales entre sí) y ordenadas en un intento de conseguir una representación más eficiente de los datos con pocas de las primeras dimensiones que retienen la mayor parte de la variación (Jolliffe, 2002). El software utilizado para este tipo de análisis ha sido el paquete estadístico NTSYSpc 2.21 (Rohlf, 2009).

Complementariamente, se realizó un Análisis Discriminante -AD- a partir de la misma matriz de datos anterior sin transformar los valores iniciales, tomando como grupos de referencia las especies de Limonum anteriormente utilizadas de contraste, considerando los restantes casos como elementos problema para su reasignación -clasificación-. En el caso de que se detectara algún nuevo grupo en el análisis anterior, se consideraría como un nuevo grupo de referencia. Se trata de un método de dependencia (Mallo, 1985), también conocido como Análisis Discriminante Múltiple, Análisis de la Función Discriminante, Análisis de Variables Canónicas, Análisis Canónico, o Análisis Factorial Discriminante, cuyo propósito básico es la estimación de la relación entre una variable dependiente (Y) no-métrica (categórica: dicótoma o multicótoma) y un conjunto de variables métricas predictivas ( $X_1 \dots X_p$ ), que se resume con la expresión general

$$Y = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + \dots + a_n X_n$$

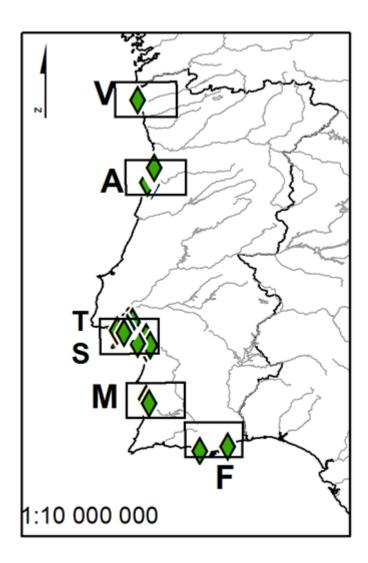
en la que la variable dependiente establece dos o más grupos del total de la muestra de las entidades en estudio (casos, UTO's), siendo su finalidad doble: i) ayudar a entender las diferencias entre los grupos (establecidos *a priori*, como en este estudio); y ii) predecir la probabilidad de que un individuo pertenezca a uno de los grupos considerando sus valores en las variables independientes. Afín a los modelos lineales (análisis múltiple de la varianza, regresión lineal múltiple y análisis de correlación canónica) (Hair *et al.*, 1998; Legendre y Legendre, 1998), basado, igualmente, en la extracción de vectores y valores propios trata de maximizar la variación –separación– entre los grupos minimizando las diferencias –variación– dentro de los grupos (Manley, 1994; Podani, 2000, McCune y Grace, 2002). Para este segundo tipo análisis, el software utilizado ha sido el paquete estadístico SPSS 19.0 (IBM SPSS, 2010).

El empleo conjunto de estas dos técnicas de análisis multivariante de ordenación, aprovechando sus cualidades exploratorias -ACP- y clasificatorias -AD- es común en estudios taxonómicos, pudiendo citar ejemplos recientes en otros géneros, como los (Dawson y Ingrouille, 1995) en el mismo género, Lauranson et al. (1995) en Armeria Willd. (Plumbaginaceae), Amich et al. (2009) en Ophrys L. (Orchidaceae), Szczepaniak (2009) en Elymus L. (Poaceae) y Letz et al. (2012) en Cerastium L. (Caryophyllaceae).

# 4. Resultados

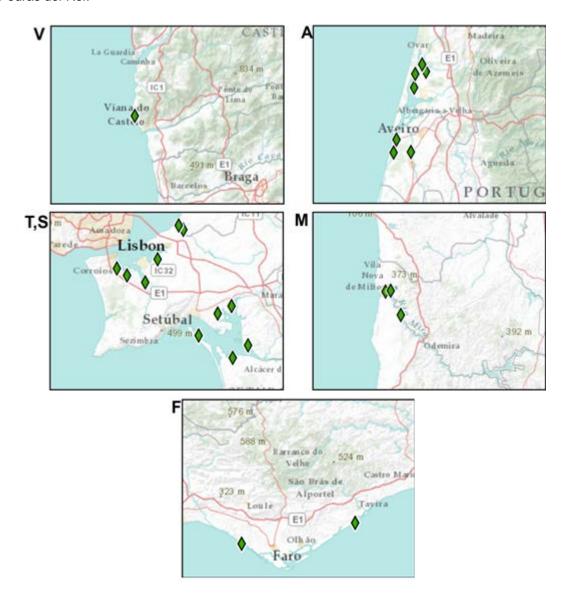
### 4.1. Distribución geográfica

De las localidades prospectadas fueron encontrados individuos en la playa Praia da Veiga (Viana do Castelo; V) y en los estuarios: de la ría de Aveiro (A), del río Tejo (T), del río Sado (S), del río Mira (M) y de la ría Formosa (F), como se puede observar en la Figura 13.



**Figura 13** – Mapa de distribución de las poblaciones *L. vulgare* y taxa afines (rombos verdes) en Portugal continental. Leyenda: V- Praia da Veiga, Viana do Castelo; A – Aveiro; T – Tejo; S – Sado; M- Mira; F – Formosa.

En la Figura 14 es posible observar la distribución de las poblaciones dentro de cada estuario y en la playa Praia da Veiga, que presenta una sola localización. Os individuos identificados como *L. vulgare* y taxa afines están presentes en el estuario de la ría de Aveiro en las localidades Gafanha do Carmo/Encarnação; Cais da Bestida, Torreira; Tijosa, Ovar; Ribeira da Aldeia, Estarreja; Quintas do Norte y Boco. En el estuario del río Tejo es posible encontrarla en Sítio das Hortas, Alcochete; Entroncamento, Alcochete; Amora y Barreiro. En el estuario del río Sado se encuentra por Carrasqueira; Mouriscas; Tróia; Gâmbia y Salinas de Monte Novo. En el estuario del río Mira se distribuye por las localidades Vila Nova de Mil Fontes; Casa Branca; Moinho da Asneira. En el estuario de la ría Formosa se encuentra en Praia do Ancão y Pedras del Rei.



**Figura 14** – Mapas de distribución de las poblaciones *L. vulgare* y taxa afines (rombos verdes) en Viana do Castelo y en cada estuario. Leyenda: V- playa Praia da Veiga, Viana do Castelo; A – Aveiro; T – Tejo; S – Sado; M- Mira; F – Formosa.

A pesar de haber sido exploradas las distintas áreas de marismas atlánticas al norte de Aveiro, en Vila Nova de Cerveira, Caminha, Forte do Cão, Praia do Paçô, Carreço, Ponte de Lima, Darque, Viana do Castelo, Ofir, Póvoa de Varzim, Baía de S. Pedro, Praia dos Lavadores, Praia da Madalena, nunca se encontró especie alguna de *Limonium*, excepto en playa Praia da Veiga.

El estuario/playa con más individuos es Aveiro con 1300 individuos (Tabla 18), siendo la localidad de Boco la que presenta más individuos(700). El estuario/playa con menos individuos es la playa Praia da Veiga, con solo 30 individuos. Se indica el número de individuos pertenecientes al *Limonium vulgare* y taxa afines.

Estuarios/Playa	Localidades	Estimativa
Viana do Castelo	Praia da Veiga, Aerosa	30
	Gafanha do Carmo/Encarnação	50
	Cais da Bestida, Torreira	50
Aveiro	Tijosa, Ovar	50
Aveilo	Ribeira da Aldeia, Estarreja	400
	Quintas do Norte	50
	Восо	700
	Sítio das Hortas, Alcochete	100
	Entroncamento, Alcochete	30
Tejo	Amora	30
	Barreiro	<10
	Rosário	<10
	Carrasqueira	10
	Mouriscas	50
Sado	Tróia	50
	Gâmbia	10
	Salinas de Monte Novo	50
	Vila Nova de Mil Fontes	30
Mira	Casa Branca	100
	Moinho da Asneira	10

## 4.2. Germinación y cultivo de plantas

### 4.2.1. Germinación y cultivo de plantas

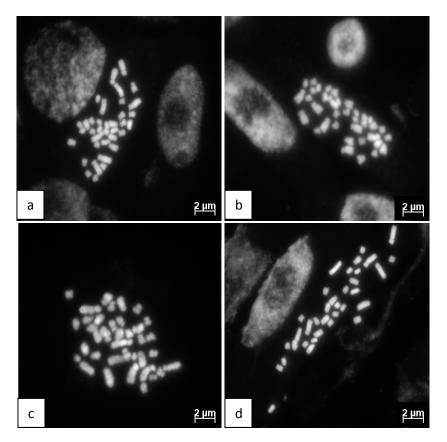
Como ya ha referido en la sección de material y métodos el números de semillas sembradas fue bajo, consecuentemente, el porcentaje de germinación fue igualmente bajo en todas las muestras analizadas (entre 0% - 34.5%), como se puede ver en la tabla 19.

Tabla 19 - Porcenta Estuario/Playa	Localidades	Nº de semillas sembradas	Nº de semillas germinadas	% Germinación
Viana do Castelo	Praia da Veiga	1	0	0
	Ribeira da Aldeia, Estarreja	10	1	
Aveiro	Восо	10	3	20
	Sítio das Hortas, Alcochete	4	3	
	Amora	5	3	]
Tejo	Barreiro	10	2	34,5
	Rosário	10	2	
	Mouriscas	5	0	
Sado	Tróia	4	2	22,2
	Vila Nova de Mil Fontes	4	0	
Mira	Casa Branca	5	2	22,2
	Total	68	18	26,5

Las semillas que germinaron y dieron origen a plántulas, se han mantenido en el invernadero hasta la fecha (un año, aproximadamente). Ya tienen hojas grandes, mantienen la misma forma (oblongo-lanceolada) y nerviación (penninervia), que sus progenitores en las localidades de origen, pero aún no empezaron la formación del escapo floral.

#### 4.3. Estudio cromosómico

En el estudio cariológico solo se consideraron células metafásicas con cromosomas bien individualizados y con el mismo nivel de condensación, de individuos provenientes de semillas del estuario de Aveiro y Tejo. La mayoría de los individuos presentaban 2n=4x=36 cromosomas (Figura 15a y 15b) pero también fueron encontrados individuos aneuploides con 2n=4x=38 (Figura 15c) y 2n=35 (Figura 15d) cromosomas.



**Figura 15** – Células metafásicas con cromosomas de individuos del estuário de Aveiro y Tejo: **a.** y **b.** con 2n=4x=36 cromosomas; **c.** con 2n=4x=38 cromosomas; **d.** con 2n=4x=35 cromosomas.

Para cromosomas con aproximadamente el mismo nivel de condensación entre los varios individuos analizados, su longitud osciló entre 0,69  $\mu$ m y 4,12  $\mu$ m. Los cromosomas metacéntricos pequeños variaron entre 0,69  $\mu$ m y 1,17  $\mu$ m, mientras que los grandes lo hicieron entre 1,19  $\mu$ m y 2,02  $\mu$ m. Los acrocéntricos presentaron longitudes comprendidas entre 2,04  $\mu$ m y 4,12  $\mu$ m.

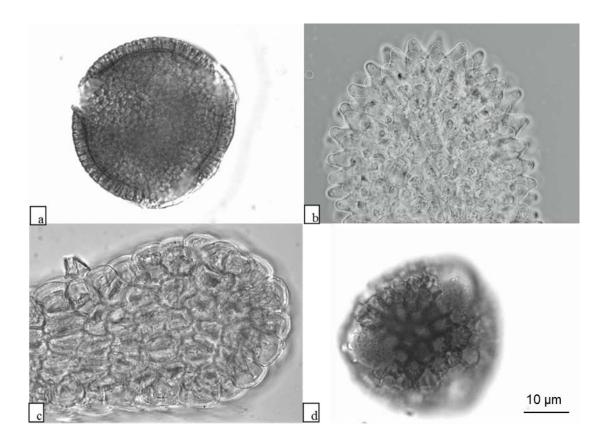
### 4.4. Heterostilia y dimorfismo polínico-estigmático

El total de individuos estudiados para la heterostilia y dimorfismo polínico-estigmático asciende a 44, habiéndose analizado 153 flores, que se reparten entre las poblaciones en diferente número, como se puede ver en las tabla 20.

Todos los individuos analizados se encontraban en el inicio o en plena floración, excepto 15 de los ejemplares herborizados pertenecientes al estuario de la ría Formosa. Por ello, los análisis de polimorfismos florales de estos ejemplares no fueron analizados. La mayoría de las flores observadas, 88% (135), eran heterostílicas, siendo el 12% (18) restantes homostílicas. En las heterostílicas, el 93% (125) eran flores del "tipo Pin" (Tabla 20) y el restante 7% (10) del flores "tipo Thrum". Excepto en Praia da Veiga que la mayoría de las flores analizadas, 56% (9) son homostílicas, en la mayoría de los estuarios el tipo de flores más frecuentes es el "tipo

Pin", llegando a representar la totalidad de las flores observadas en los estuarios del río Mira (25) y del río Guadiana (2).

Fueron observados estigmas tipo *papillate* ("papiloso") y del tipo *cob* ("mazorca de maíz"). También fueron observados granos de polen con los dos tipos de ornamentación: uno con exina microrreticulada (tipo B) y otro con exina macrorreticulada (tipo A). En la mayoría de los casos, el polen de retículo estrecho (Figura 16a) fue encontrado asociado a un estigma del tipo "papiloso" (Figura 16b), mientras que el polen de retículo ancho (Figura 16d) estaba asociado a un estigma de tipo "mazorca de maíz" (Figura 16c).

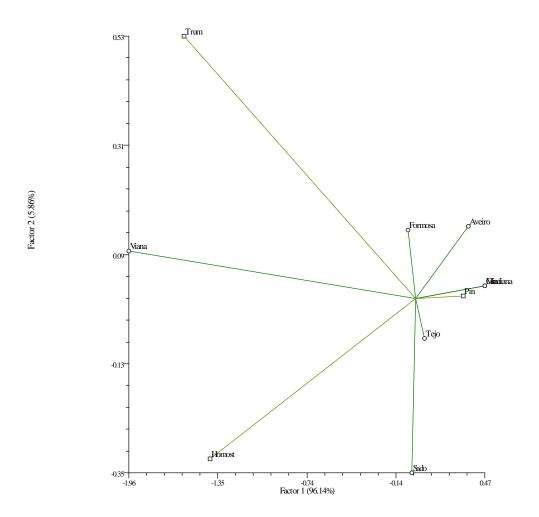


**Figura 16** – Dimorfismo polínico-estigmático: **a.** grano de polen microrreticlado (tipo B); **b.** detalle de un estigma tipo "papiloso" **c.** detalle de un estigma tipo "mazorca de maíz" **d.** grano de polen macrorreticulado (tipo A).

En cuanto al dimorfismo polínico-estigmático, en las flores analizadas se encontraron los 4 tipos de combinación: A, B, C, y D. La mayoría de estas flores tienen una combinación del tipo B (Tabla 20), 62% (95); el 26 % (40) de las flores son del tipo A; el 11,1% del tipo D y únicamente fue observada una flor del tipo C (0,7%). A pesar de que la combinación del tipo B es dominante en la mayoría de las poblaciones y representar 100% de las observaciones en la Praia da Veiga y en Guadiana, en el estuario del río Mira fueron observadas más flores de la combinación del tipo A, siendo esta la única excepción.

Tabla 20 -	Tabla 20 - Frecuencias de heterostilia y homostilia, y combinaciones polínico-estigmáticas (A, B, C, y D)									
				Nº Flores	(%)					
			Hetered	ostilia	11	№ Combinaciones polen- estigma (%)				
Estuario/ Playa	Nº de individuos analizados	Nº de flores analizadas	Pin	Thrum	Homostilia	А	В	С	D	
Praia da Veiga, Viana do Castelo	2	16	1 (6)	6 (38)	9 (56)	0 (0)	16 (100)	0	0	
Aveiro	18	50	48 (96)	2 (4)	0 (0)	14 (28)	29 (58)	1 (2)	6 (12)	
Tejo	5	25	21 (84)	1 (4)	3 (12)	10 (40)	15 (60)	0	0	
Sado	8	25	20 (80)	0 (0)	5 (20)	0	19 (76)	0	6 (24)	
Mira	7	25	25 (100)	0 (0)	0 (0)	11 (44)	9 (36)	0	5 (20)	
Formosa	2	10	8 (80)	1 (10)	1 (10)	5 (50)	5 (50)	0	0	
Guadiana	2	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0	0	
Total de muestras	44	153	125 (81)	10 (7)	18 (12)	40 (26)	95 (62)	1 (0.7)	17 (11)	

La ordenación obtenida mediante el AFC de los datos de la tabla 20 se muestran en la Figura 17. El valor del estadístico obtenido para esta tabla de contigencia es significativo ( $X^2 = 78.768$ ; p=7.087\*10<sup>-12</sup>;  $X^2_{0.001,12}$ =32.910), lo que indica que los individuos heterostilicos y homostilicos no están independientemente distribuidos entre las poblaciones. Esto queda perfectamente reflejado en la gráfica, donde el primer factor representa el 96,14% de la inercia (variación) del sistema, mientras que el segundo factor, el 5.86%. El primer factor segrega el tipo "Pin" del "Thrum" y "Homos", mientras que el segundo factor segrega el tipo "Thrum" del "Homos".



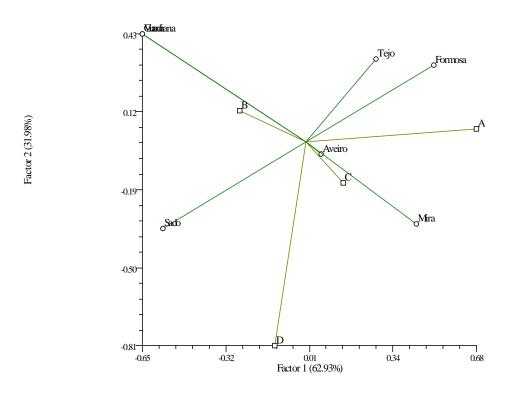
**Figura 17** - Ordenación obtenida en el AFC con los dos únicos factores posibles (100% de la variación total) a partir de los datos de la tabla 20, representando los estuarios/playa, la homostilia ("Homos") y la heterostilia (flores tipo "Pin" y tipo "Thrum").

Las observaciones de homostilia en las poblaciones tiene muy poco peso en la variación total, ya que su eliminación en el test de independencia, así como su adición al tipo "Thrum" siguen mostrando niveles significativos del estadístico  $X^2 = 67.632$  (p=1.250\*10<sup>-12</sup>) y  $X^2$ =73.961 (p=6.280\*10<sup>-14</sup>), respectivamente ( $X^2_{0.001,6}$ =22.458). Las poblaciones de Aveiro, Mira, Sado, Tejo, Guadiana y Formosa presentan una distribución heterostílica equivalente con predominio de individuos con flores del tipo "Pin", mientras que en la playa Praia da Veiga, (Viana do Castelo), que muestra un predominio de individuos con flores homostílicas, sería distinta ( $X^2 = 68.719$ , p=1.196\*10<sup>-15</sup>;  $X^2_{0.001,2}$ =13.816).

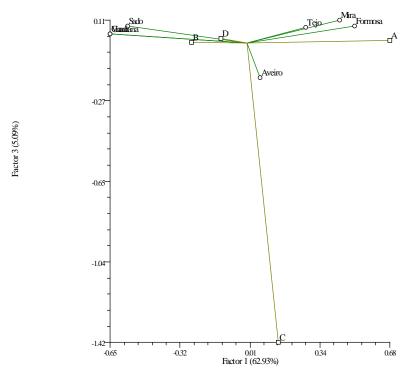
La ordenación obtenida mediante el AFC de los datos de la tabla 20 se muestra en las Figuras 18 y 19. El valor del estadístico obtenido para esta tabla de contigencia es significativa ( $X^2 = 39.943$ ; p=0.0021;  $X^2_{0.01,18}$ =34.805), lo que indica que las combinaciones polínico-estigmáticas no están independientemente distribuidos entre las poblaciones. Así, el primer factor representa el 62.93% de la inercia (variación) del sistema, mientras que el segundo

factor, el 31.96%, y el tercero, el 5.09%. El primer factor segrega el tipo "A" del "B", mientras que el segundo factor segrega el tipo "D" del resto, y el tercer factor, el tipo "C" de los demás.

Las observaciones de las combinaciones polínico-estigmáticas en las poblaciones tienen un peso distinto en la variación total, como lo indican sus contribuciones absolutas en los factores extraídos. La combinación "A" representa el 72.61% en el primer factor, el tipo "D", el 87,38% en el segundo factor, y el tipo "C", el 99.06% en el tercer factor. Esto se traduce en valores del estadístico  $X^2$  siempre significativos, superiores a los tabulados, por lo que es difícil establecer agrupaciones sencillas entre las poblaciones, que sólo se consiguen cuando se eliminan de los cálculos las observaciones de los tipos "C" y "D". Así, considerando las poblaciones de Aveiro, Mira, Tejo y Formosa con los datos de los tipos "A" y "B" no se encuentran diferencias significativas ( $X^2 = 3.236$ , p=0.356;  $X^2_{0.05,3}$ =7.815). Que igualmente sucede con las la playa Praia da Veiga y poblaciones de Sado y Guadiana ( $X^2 = 2.217$ , p=0.330;  $X^2_{0.05,2}$ =5.992) que carecen de la combinación "A" y domina la combinación "B".



**Figura 18** - Ordenación obtenida en el AFC con los dos primeros factores calculados (94.91% de la variación total) a partir de los datos de la tabla 20. Están representados los estuario/ playa, y las combinaciones polínico-estigmáticas A (polen del tipo A/estigma "mazorca de maíz"), B (polen del tipo B/estigma "papiloso"), C (polen del tipo B/ estigma "mazorca de maíz") y D (polen del tipo A/ estigma "papiloso").



**Figura 19** - Ordenación obtenida en el AFC con los factores 1 y 3 (68.02% de la variación total) a partir de los datos de la tabla 20. Están representados los estuario/playa, y las combinaciones polínico-estigmáticas A (polen del tipo A/estigma "mazorca de maíz"), B (polen del tipo B/estigma "papiloso"), C (polen del tipo B/ estigma "mazorca de maíz") y D (polen del tipo A/estigma "papiloso").

### 4.5. Morfometría de los caracteres macroscópicos

Los estadísticos descritivos básicos de los caracteres cuantitativos de los individuos procedentes de las prospecciones y de los herbarios están en las tablas 21 a 23 organizados por especie referencia y en las tablas 24 a 30, organizados por estuarios/playa.

Los caracteres que más varían entre las 3 especies, *L. vulgare*, *L. humile* y *L. narbonense* son la longitud del escapo, la longitud del escapo hasta la primera rama y el ángulo del escapo con la primera ramificación (Figura 20). Para todos los caracteres la especie que parece presentar menor variación es *L. humile* (Figura 20 D).

Los caracteres que más varían entre estuarios/playa son la longitud del escapo, la longitud del escapo hasta la primera rama, el ángulo del escapo con la primera ramificación, la longitud del limbo de la hoja, y la longitud del pecíolo. Los otros caracteres también varían entre poblaciones pero debido a su menor tamaño/menor valor varían en una escala menor. Esto es, los caracteres más variables fueron los vegetativos (Figura 21).

Tabla 21 - Estadísticos descriptivos de los individuos de la especie L. vulgare Desviación Ν Mínimo Máximo Media Típica 12,00 19,00 6,75 4,61 2,00 Lр 17,00 10,75 5,12 8,00 4,00 Llh 5,00 1,00 3,00 2,20 0,84 Α 12,00 36,00 8,13 6,00 16,25 Le1 9,00 20,00 49,00 38,00 10,90 Le 17,00 17,78 53,33 29,02 11,01 Sen 5,00 2,00 1,40 0,55 1,00 Les 1,41 17,00 3,00 1,00 0,62 Des 17,00 4,00 8,00 5,53 0,94 Es 17,00 1,00 2,00 1,71 0,47 Fes 14,00 3,75 2,05 0,73 1,00 Lbe 13,00 1,00 3,00 1,38 0,65 Abe 12,00 4,00 2,58 2,00 0,67 Lbm 11,00 1,00 2,00 1,09 0,30 Abm 5,00 4,20 10,00 4,00 0,42 Lbi 12,00 2,00 3,00 2,83 0,39 Abi 13,00 4,00 6,00 5,69 0,63 Lk 17,00 0,33 0,50 0,34 0,04 Pk 14,00 4,00 7,00 5,86 1,29 Lp

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Típica
Lp	11,00	2,50	16,00	8,65	3,86
Llh	10,00	6,20	26,00	10,77	5,81
Α	8,00	1,20	5,00	2,81	1,11
Le1	7,00	19,00	40,00	27,53	6,56
Le	8,00	44,00	72,50	60,99	11,91
Sen	8,00	12,00	31,11	23,08	7,56
Les	11,00	5,10	10,30	7,24	1,64
Des	13,00	4,00	17,00	8,62	3,71
Es	13,00	2,00	3,00	2,77	0,44
Fes	13,00	1,00	3,00	2,00	0,58
Lbe	13,00	2,00	3,50	2,54	0,52
Abe	12,00	1,00	3,00	2,00	0,67
Lbm	10,00	2,50	5,00	3,65	0,75
Abm	12,00	1,00	2,50	1,58	0,47
Lbi	12,00	3,00	6,00	4,79	0,86
Abi	11,00	3,00	4,00	3,18	0,34
Lk	12,00	4,00	7,00	5,71	0,78
Pk	13,00	0,33	0,50	0,45	0,08
Lp	13,00	4,00	7,00	5,15	0,77

Tabla 23 - Estadísticos descriptivos de los individuos de la especie L. narbonense Desviación Ν Mínimo Máximo Media Típica 2,00 17,00 6,71 4,30 14,00 Lp 11,00 7,00 25,00 13,18 5,95 Llh 2,00 8,00 4,00 3,00 0,93 Α 10,00 6,00 30,00 17,30 7,67 Le1 92,00 8,00 31,00 53,00 18,08 Le 26,67 93,33 17,51 16,00 48,61 Sen 5,00 6,00 1,00 2,00 1,55 Les 17,00 1,00 8,00 3,12 1,73 Des 17,00 3,00 8,00 6,53 1,42 Es 17,00 1,00 4,00 2,00 0,79 Fes 10,00 2,00 2,00 2,00 0,00 Lbe 10,00 1,00 2,00 0,48 1,70 Abe 11,00 2,00 3,00 2,64 0,50 Lbm 9,00 1,00 2,00 1,67 0,50 Abm 12,00 3,00 4,00 0,49 3,67 Lbi 12,00 2,00 3,00 2,83 0,39 Abi 13,00 5,00 5,00 5,00 0,00 Lk 17,00 0,33 0,50 0,36 0,07 Pk

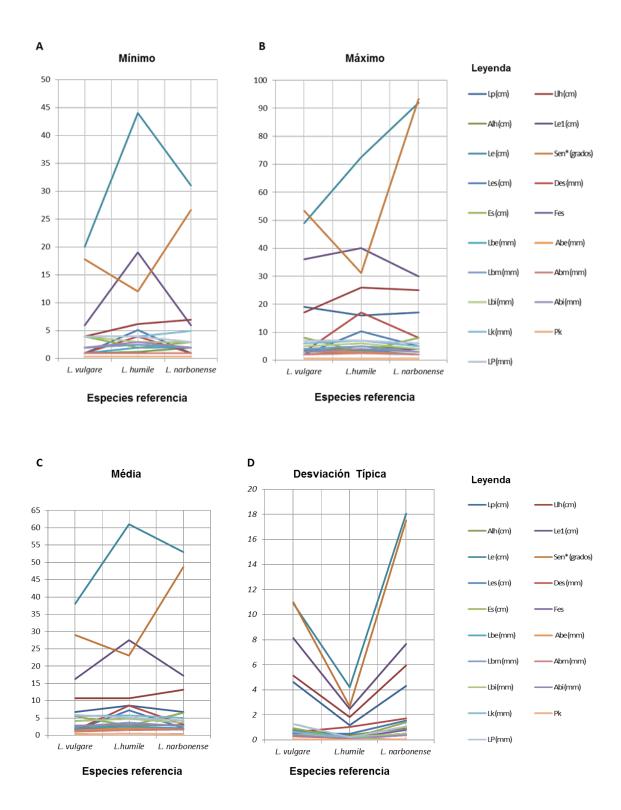
3,00

6,00

4,23

1,09

13,00



**Figura 20** – Gráficas hechas a partir de los estadísticos básicos de los caracteres cuantitativos para las tres espécies referencia, *Limonium vulgare*, *L. humile* y *L. narbonense*. **A**: Mínimo; **B** – Máximo; **C**- Media; **D** – Desviación Típica.

Tabla 24 - Estadísticos descriptivos de los individuos de Praia da Veiga, Viana do Castelo Desviación Ν Mínimo Máximo Media Típica Lр 6,00 0,50 2,60 1,50 0,72 Llh 6,00 2,70 6,40 4,40 1,29 6,00 1,00 1,33 0,37 Α 1,80 Le1 6,00 5,40 8,40 7,05 1,16 5,00 26,50 18,66 Le 13,00 5,21 Sen 6,00 13,30 26,67 17,03 5,91 Les 6,00 0,70 7,00 2,85 2,30 Des 6,00 2,00 2,58 0,66 3,50 Es 6,00 4,00 5,00 4,33 0,52 2,00 Fes 6,00 3,00 2,50 0,55 Lbe 6,00 2,00 2,50 2,08 0,20 Abe 6,00 1,00 1,50 0,45 2,00 Lbm 6,00 2,50 4,50 3,17 0,68 Abm 6,00 1,00 2,00 1,33 0,41 Lbi 6,00 3,00 5,00 3,92 0,66 Abi 6,00 2,00 3,00 2,58 0,38 Lk 5,00 5,42 6,00 6,00 0,49 Pk 6,00 0,33 0,44 0,67 0,14 LΡ 6,00 3,00 5,00 4,25 0,76

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Típica
Lp	43,00	2,00	16,50	6,23	3,19
Llh	36,00	6,50	26,00	15,02	4,98
Α	40,00	1,50	7,00	3,18	1,25
Le1	39,00	6,00	39,00	17,31	7,32
Le	36,00	18,80	67,20	41,13	13,59
Sen	52,00	13,33	88,89	33,85	14,00
Les	44,00	0,60	9,00	1,87	1,63
Des	51,00	1,00	5,00	1,96	0,84
Es	52,00	2,00	9,00	5,58	1,26
Fes	52,00	1,00	4,00	2,23	0,61
Lbe	52,00	1,30	3,00	1,99	0,34
Abe	38,00	1,00	3,00	1,50	0,39
Lbm	47,00	2,00	4,00	2,70	0,60
Abm	39,00	1,00	3,00	1,55	0,48
Lbi	50,00	3,00	6,00	4,10	0,62
Abi	49,00	2,00	3,50	2,78	0,43
Lk	47,00	4,50	7,00	5,84	0,64
Pk	52,00	0,33	0,67	0,46	0,15
LP	49,00	4,00	8,00	5,36	1,21

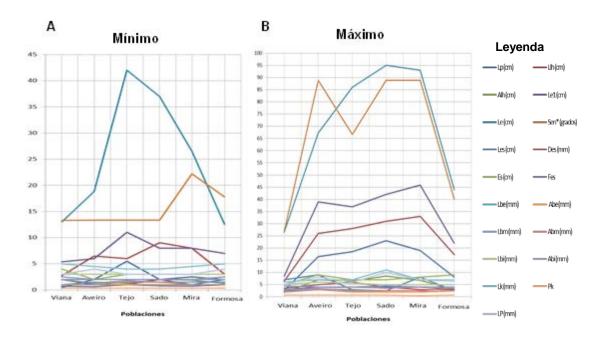
Tabla 26 - Estadísticos descriptivos de los individuos del estuario del río Tejo Desviación Ν Mínimo Máximo Media Típica Lр 17,00 5,50 18,50 10,41 4,04 Llh 6,00 28,00 17,49 5,55 16,00 Α 14,00 1,30 6,40 3,44 1,44 Le1 17,00 11,00 36,90 25,14 8,62 86,00 Le 16,00 42,00 71,26 14,12 20,00 31,56 12,97 Sen 13,33 66,67 Les 14,00 1,00 3,00 1,83 0,56 Des 17,00 1,00 6,00 2,53 1,14 Es 20,00 3,00 7,00 5,40 1,31 Fes 20,00 1,00 4,00 2,23 0,70 Lbe 17,00 1,80 3,00 2,16 0,31 Abe 19,00 1,00 2,00 1,68 0,38 Lbm 17,00 2,00 4,00 3,09 0,62 Abm 15,00 1,50 2,50 1,93 0,37 Lbi 19,00 3,00 5,50 4,16 0,67 Abi 18,00 2,00 4,00 2,92 0,60 Lk 19,00 4,00 7,00 5,67 0,67 Pk 20,00 0,33 0,67 0,43 0,10 LP 16,00 3,00 6,00 4,47 0,72

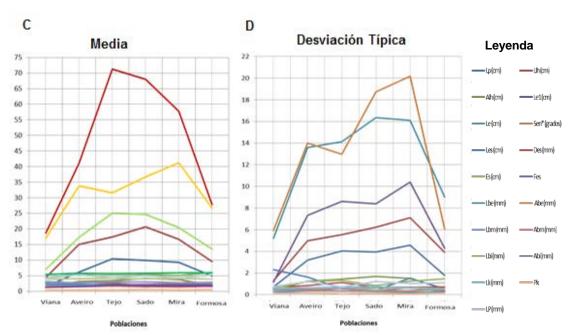
Tabla 27 - Estadí	sticos descriptivos d	le los individuos de	l estuario del río Sa	do	
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Típica
Lp	28,00	2,00	23,00	9,89	3,94
Llh	27,00	9,00	31,00	20,74	6,23
Α	25,00	2,00	8,50	4,20	1,69
Le1	25,00	8,00	42,00	24,72	8,39
Le	23,00	37,00	95,00	68,07	16,35
Sen	28,00	13,33	88,89	36,67	18,72
Les	29,00	0,80	2,50	1,49	0,41
Des	30,00	1,00	4,00	1,93	0,69
Es	30,00	3,00	7,00	5,40	0,86
Fes	30,00	2,00	4,00	2,17	0,46
Lbe	30,00	1,50	2,50	1,85	0,27
Abe	30,00	1,00	2,00	1,52	0,31
Lbm	29,00	2,00	4,50	3,05	0,66
Abm	28,00	1,50	2,50	1,84	0,36
Lbi	28,00	3,00	5,00	4,00	0,47
Abi	27,00	2,00	3,50	2,96	0,31
Lk	30,00	1,10	7,00	5,72	1,05
Pk	30,00	0,33	0,67	0,54	0,12
LP	29,00	4,00	10,00	7,00	1,22

Tabla 28 - Estadísticos descriptivos de los individuos del estuario del río Mira Desviación Ν Mínimo Máximo Media Típica 22.00 2.50 19.00 9.27 4.58 Lp 7.12 Llh 22.00 8.00 33.00 16.70 22.00 1.90 6.70 3.74 1.51 Le1 22.00 8.00 45.80 20.39 10.40 Le 22.00 26.50 93.00 57.77 16.10 Sen 22.00 22.22 88.89 41.21 20.17 Les 21.00 0.70 8.00 1.91 1.55 21.00 Des 1.00 3.00 2.19 0.68 Es 21.00 3.00 8.00 5.00 1.26 Fes 21.00 1.00 2.24 0.62 4.00 Lbe 21.00 1.50 2.00 1.86 0.23 Abe 21.00 1.00 2.00 1.31 0.33 Lbm 21.00 2.00 2.81 0.66 4.00 Abm 21.00 1.67 1.00 2.50 0.37 Lbi 21.00 3.00 5.00 4.17 0.66 Abi 21.00 2.00 4.00 2.64 0.65 Lk 21.00 4.50 7.00 5.90 0.58 Pk 21.00 0.33 0.50 0.40 0.08 LP 21.00 3.00 7.00 4.26 1.04

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Típica
Lp	17,00	2,00	8,00	4,88	1,79
Llh	14,00	3,00	17,30	9,57	3,91
Α	13,00	1,20	3,00	1,94	0,58
Le1	15,00	7,00	22,00	13,61	4,28
Le	13,00	12,50	44,00	27,83	9,02
Sen	17,00	17,78	40,00	26,67	6,09
Les	14,00	1,00	2,50	1,50	0,51
Des	16,00	1,00	3,00	1,84	0,72
Es	17,00	3,00	9,00	6,00	1,47
Fes	17,00	2,00	3,00	2,12	0,33
Lbe	15,00	1,50	2,50	1,93	0,26
Abe	14,00	1,00	2,50	1,71	0,47
Lbm	17,00	2,00	4,00	2,68	0,58
Abm	17,00	1,00	3,50	1,85	0,61
Lbi	15,00	3,00	5,00	3,97	0,52
Abi	16,00	2,50	3,50	2,94	0,25
Lk	16,00	5,00	6,50	5,88	0,47
Pk	17,00	0,33	0,67	0,49	0,16
LP	16,00	4,00	7,00	5,28	1,09

Tabla 30 - Estadísticos descriptivos de los individuos del estuario del río Guadiana Desviación Ν Mínimo Máximo Media Típica Lр 2,00 5,00 7,00 6,00 1,41 Llh 16,00 14,15 2,62 2,00 12,30 Α 2,00 2,20 3,00 2,60 0,57 Le1 2,00 14,00 24,80 19,40 7,64 2,00 77,20 63,60 Le 50,00 19,23 33,33 Sen 2,00 31,11 35,56 3,14 Les 2,00 1,00 1,00 1,00 0,00 Des 2,00 2,00 2,00 2,00 0,00 Es 2,00 5,00 6,00 5,50 0,71 Fes 2,00 2,00 3,00 2,50 0,71 Lbe 2,00 1,50 2,00 1,75 0,35 Abe 2,00 1,00 2,00 1,50 0,71 Lbm 2,00 2,50 2,50 2,50 0,00 Abm 2,00 1,50 2,00 1,75 0,35 Lbi 2,00 4,00 4,50 4,25 0,35 Abi 2,00 3,00 3,00 3,00 0,00 Lk 2,00 6,00 6,00 6,00 0,00 Pk 0,50 2,00 0,67 0,58 0,12 LP 5,00 5,00 5,00 0,00 2,00





**Figura 21** – Gráficas hechas a partir de los estadísticos básicos de los caracteres cuantitativos para la playa (Praia de Veiga, Viana do Castelo) y estuários (Aveiro, Tejo, Sado, Mira, Formosa). **A**: Mínimo; **B** – Máximo; **C**- Media; **D** – Desviación Típica.

El test de Kolmogorov-Smirnov mostró que solo dos de los diecinueve caracteres cuantitativos tienen una distribución normal, la "longitud del escapo hasta la primera ramificación" (Le1) y la "longitud del escapo total" (Le). Igualmente, después de aplicar la transformación logarítmica, además de los caracteres ya referidos, solo tres presentaban una distribución normal, los caracteres de la hoja: la "longitud del pecíolo de la hoja" (Lp), la "longitud del limbo de la hoja" (Llh) y la "anchura máxima de la hoja" (Alh) (Tabla 31).

Dada la característica de no-normalidad de las variables, se comprobó con el test no paramétrico de la varianza de Kruskal-Wallis, que todas las variables eran significativas [ Lp (H = 67,151 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Llh (H = 77,206 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Alh (H = 60,676 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Le1 (H = 56,296 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Le (H = 106,282 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Sen (H = 42,345 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Les (H = 49,316 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Des (H = 65,443 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Es (H = 57,885 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Fes (H = 31,077 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Lbe (H = 44,608 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Abe (H = 32,493 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Lbm (H = 25,810 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Abm (H = 33,642 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Lbi (H = 32,070 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Abi (H = 24,194 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Lk (H = 46,172 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); Pk (H = 50,593 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919); LP (H = 54,848 >  $X^2_{0,05[9]}$ = 16,919)] al menos para una populación o especie referencia. La transformación logarítmica aplicada no ha homogeneizado las variables tal y como se esperaba (Tabla 31). No obstante, el ACP tipificado paliará este problema de homoscedasticidad.

Tabla 31 - Descrip	tivos estadísticos o	de las variables est	tudiadas tras su tr	ansformación logarí	tmica
Código de las Variables	Media	Desviación típica	Nº de casos (UTO's)	Valor Mínimo	Valor Máximo
Lp	0.8682	0.2128	196	0.1761	1.3010
Llh	1.1372	0.2019	196	0.5682	1.5378
Alh	0.5814	0.1399	196	0.3010	0.9777
Le1	1.2559	0.1999	196	0.8062	1.6702
Le	1.6668	0.1921	196	1.1303	1.9823
Sen	0.1573	0.0503	196	0.0682	0.2945
Les	0.4332	0.1644	196	0.2041	1.0607
Des	0.5006	0.1718	196	0.3010	1.2553
Es	0.7941	0.0933	196	0.6021	1.0000
Fes	0.4840	0.0622	196	0.3010	0.6990
Lbe	0.4777	0.0473	196	0.3010	0.6767
Abe	0.4008	0.0602	196	0.3010	0.6021
Lbm	0.5780	0.0717	196	0.3979	0.7782
Abm	0.4146	0.0714	196	0.3010	0.6021
Lbi	0.7014	0.0443	196	0.6021	0.8293
Abi	0.5806	0.0493	196	0.4472	0.6990
Lk	0.8293	0.0351	196	0.6990	0.9031
Pk	0.1570	0.0394	196	0.1239	0.2227
LP	0.7723	0.0777	196	0.6021	0.9542

A fin de entender la relación entre las tres especies de contraste se aplicó una análisis en componentes principales –ACP- tipificado a partir de las mediciones hechas para los 196 individuos (de referencia y de los estuarios/playa).

Los 171 valores de correlación entre las parejas variables consideradas (Tabla 32) no han mostrado niveles de significación destacables para un test de dos colas, salvo para 60 parejas de valores (35,09% de los coeficientes calculados), lo que indica que 111 parejas de valores han resultado no significativos (valor crítico  $r_{0,05(2),194}=0,141$ ). Así pues, las parejas de variables que han mostrado coeficientes de correlación altamente significativos ( $r_{x,y}$  > valor crítico  $r_{0,001(2),194}=0,234$ ) son: Lp-Llh, Lp-Alh, Lp-Le1, Lp-Le, Llh-Alh, Llh-Le1, Llh-Le, Llh-Sen, Alh-Le1, Alh-Sen, Le1-Le, Le1-Les, Le-Sen, Le-Les, Les-Des, Les-Lbe, Les-Lbm, Les-Lbi, Des-Lbe, Des-Abe, Des-Lbm, Des-Lbi, Lbe-Abe, Lbe-Lbi, Abe-Lbm, Abe-Abm, Abe-Lbi, Abe-Abi, Lbm-Abm, Lbm-Lbi, Lbi-Abi, Lbi-Lk, Lk-LP y Pk-LP.

			ción entre la: ; = 0.183 (**)										. Valores cr	íticos calcula	ados por inte	erpolación l	ineal (Zar, 2	2010):
1 0.05(2)	Lp	Llh	Alh	Le1	Le	Sen Sen	Les	Des Des	Es Es	Fes	Lbe	Abe	Lbm	Abm	Lbi	Abi	Lk	Pk
Llh	0.6813***																	
Alh	0.6088***	0.8165 ***																
Le1	0.6333***	0.5537 ***	0.4387 ***															
Le	0.6966***	0.7033 ***	0.6178 ***	0.7583 ***														
Sen	0.211 **	0.3289 ***	0.3211 ***	0.1269 ns	0.2482***													
Les	0.1581*	-0.0278ns	0.064 ns	0.2865 ***	0.2568***	-0.1043ns												
Des	0.1226ns	-0.0683ns	0.0271 ns	0.2148 **	0.2185**	0.0173ns	0.7248***											
Es	0.0059ns	0.1155ns	0.0881 ns	-0.0533 ns	-0.0803ns	0.2259 **	-0.4317ns	-0.4289ns										
Fes	-0.0317ns	0.0535ns	0.0016 ns	-0.0088 ns	-0.0091ns	0.0166ns	0.0749ns	0.1318ns	0.0684ns									
Lbe	-0.0187ns	-0.1914ns	-0.1542 ns	0.033 ns	-0.0906ns	-0.180 <i>2</i> ns	0.3048***	0.3338***	-0.1357ns	0.035 ns								
Abe	0.0303ns	-0.0267ns	0.0061 ns	0.1321 ns	0.0564ns	-0.0945ns	0.1864**	0.3107***	0.0731ns	0.0705ns	0.514 ***							
Lbm	0.192 **	0.0971ns	0.1219 ns	0.171*	0.2269**	-0.0219ns	0.3***	0.2998***	-0.1074ns	0.167*	0.209 **	0.2953 ***						
Abm	0.1732*	0.2101 **	0.2325 **	0.1492*	0.201**	0.1077ns	-0.0367ns	0.1496*	0.2033 **	0.0871ns	0.0402ns	0.3145 ***	0.2923***					
Lbi	0.114ns	0.0415ns	0.0228 ns	0.1854 **	0.0655ns	-0.1998ns	0.2995***	0.2539***	-0.2212ns	0.0899ns	0.2529 ***	0.2995 ***	0.3531***	0.026 ns				
Abi	-0.0575ns	0.0455ns	0.0224 ns	0.1316 ns	0.0534ns	-0.163 ns	0.0135ns	0.0812ns	0.0572ns	0.064 ns	0.1408ns	0.2852 ***	0.0743ns	0.0978 ns	0.2572 ***			
Lk	0.0599ns	-0.0193ns	-0.0991 ns	0.0428 ns	-0.0563ns	-0.0871ns	0.0048ns	-0.0715ns	-0.0163ns	0.1425 *	0.0699ns	0.039 ns	0.1162ns	0.0528 ns	0.3031 ***	0.012ns		
Pk	0.0804ns	0.2204**	0.1416*	0.1185ns	0.0967ns	-0.1434ns	0.057 <i>2ns</i>	-0.0421ns	-0.1354ns	-0.0059ns	-0.0837ns	0.1286ns	0.1574*	0.104ns	0.1577*	0.2213**	0.1251ns	
LP	0.0097ns	0.0801ns	-0.0416ns	0.0879ns	-0.0674ns	-0.2367ns	0.0249ns	-0.1734ns	-0.0888ns	-0.0739ns	-0.0105ns	-0.0809ns	-0.100 <i>2ns</i>	-0.2433ns	0.0913ns	0.1042ns	0.2665***	0.3182***

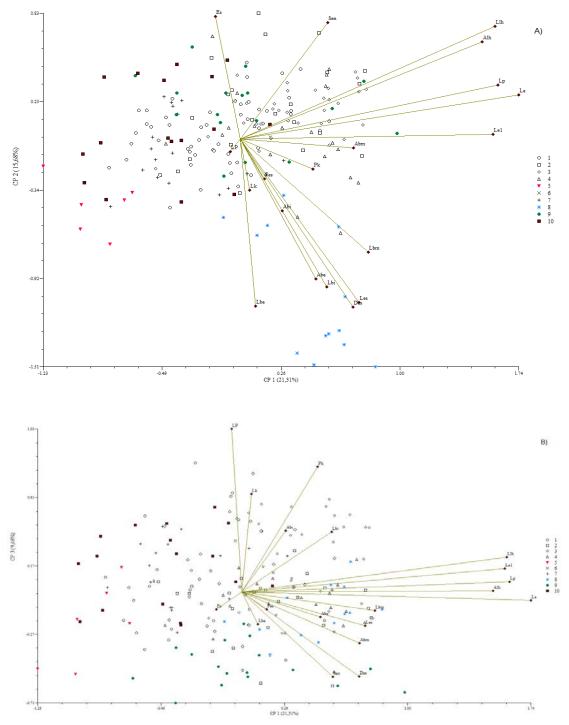
Considerando únicamente las tres primeras componentes principales calculadas, tras aplicar el criterio del modelo de palo quebrado, la variación acumulada es del 46,67% (Tabla 33). La primera dimensión (CP1 = 21,31%) muestra una ordenación marcada por la variable "longitud total del escapo"(Le) hacia su parte positiva, mientras que en su parte negativa lo hace la variable "número de espiguillas por centímetro" (Es), sin embargo a pesar de este contraste, esta componente principal reflejaría lo que se ha denominado "componente de tamaño", mientras que las otras dos (CP2 = 15,68% y CP3 = 9,68%) reflejarían "componentes de forma" debidas a las relaciones entre las variables; en la CP2 la variable "distancia máxima de las espiguillas" (Des) tiende hacia su parte negativa y se contrapone a la variable "número de espiguillas por centímetro" (Es) en su parte positiva, mientras que en la CP3, la variable "longitud de los pétalos" (LP) marca la parte positiva frente a la variable "seno del ángulo de la primera ramificación con el escapo" (Sen) que lo hace en la negativa.

<b>Tabla 33</b> - Valores propios y sus porcentajes correspondientes a las tres primeras componentes principales (vectores propios). En negrita los valores de las componentes del vector con más importancia en la componente principal correspondiente.							
	CP1	CP2	CP3				
Valor propio	4.04840358	2.97956875	1.83962837				
Percentaje	21.3074	15.6819	9.6823				
Porcentaje acumulado	21.3074	36.9893	46.6716				
Lp	1.6148	0.3550	0.0648				
Llh	1.5980	0.7418	0.2228				
Alh	1.5164	0.6407	0.0073				
Le1	1.5857	0.0304	0.1504				
Le	1.7449	0.2915	-0.0533				
Sen	0.5507	0.7679	-0.5462				
Les	0.7440	-1.0814	-0.2180				
Des	0.7085	-1.1119	-0.5424				
Es	-0.1541	0.8073	-0.1124				
Fes	0.1519	-0.2659	-0.1132				
Lbe	0.0970	-1.1043	-0.2084				
Abe	0.4738	-0.9258	-0.1609				
Lbm	0.8026	-0.7483	-0.1196				
Abm	0.7112	-0.0598	-0.3290				
Lbi	0.5428	-0.9791	0.3873				
Abi	0.2649	-0.4766	0.3933				
Lk	0.0588	-0.3377	0.6302				
Pk	0.4568	-0.2009	0.8057				
LP	-0.0605	-0.0837	1.0471				

Como puede apreciarse en la ordenación obtenida con las dos primeras componentes principales (Figura 22A), las especies de contraste se disponen separadamente, en líneas generales. *L. humile* (8) se posiciona en el cuarto cuadrante, *L. vulgare* (10) se posiciona entre

los cuadrantes segundo y tercero, y *L. narbonense* (9), entre el primero y segundo. En la ordenación obtenida entre las componentes principales primera y tercera (Figura 22B), las especies de contraste *L. humile* y *L. narbonense* tienden a aproximarse, separándose de *L. vulgare*, que ocupa nuevamente los cuadrantes segundo y tercero. El resto de las poblaciones, quedan enmarcadas básicamente en la dispersión que representan las especies de contraste, si bien los ejemplares de Praia da Veiga, (Viana do Castelo) (5), siempre aparecen en extremo izquierdo, sugiriendo una población separada, y algunos de Aveiro (1), Mira (2) y/o Sado (3) exceden la dispersión de las especies de contraste.

Como muestran los vectores direccionales de las variables, la CP1 reflejaría una componente de tamaño, ya que las variables se proyectan hacia su porción positiva con excepción de las variables "número de espiguillas por centímetro" (Es) y "longitud de los pétalos" (LP) cuyos ángulos grandes indicarían baja correlación con esta dimensión. La CP2 descompondría formas con variables de las brácteas muy correlacionadas entre sí frente a ejemplares con "número de espiguillas por centímetro" (Es) y "ángulos de la primera ramificación" (Sen) con valores elevados. La CP3 resalta la relación entre las variables relativas a las flores, como "longitud del cáliz" (Lk) y su proporción respecto del limbo (Pk) con la "longitud" y "anchura de las brácteas internas" (Lbi, Abi).



**Figura 22** - Ordenaciones (biplot) obtenidas a partir del ACP tipificado: **A)** Plano compuesto por la CP1 y CP2 (36,99%). **B)** Plano compuesto por la CP1 y CP3 (30,99%). Leyenda de las poblaciones y especies de contraste: 1: Aveiro; 2: Mira; 3: Sado; 4: Tejo; 5: Praia da Veiga, Viana do Castelo; 6: Guadiana; 7: Formosa; 8: *L. humile* (estrellas azules); 9: *L. narbonense* (rombos verdes); 10: *L. vulgare* (cuadrados marrones).

En primer lugar se aplicó este análisis al conjunto de especies de contraste para comprobar si eran discriminadas adecuadamente, para posteriormente comprobar las asignaciones de los individuos muestreados en los diferentes estuarios/playa portugueses. En segundo lugar se

aplicó un AD, considerando un cuarto grupo, que se corresponde con los individuos de Praia da Veiga (Viana do Castelo).

Tras la exploración de los datos con el ACP comentado anteriormente, se aplicó un análisis discriminante (AD) al conjunto de especies de contraste para comprobar si eran discriminadas adecuadamente, para posteriormente comprobar las asignaciones de los individuos muestreados en los diferentes estuarios/playa portugueses. En segundo lugar se aplicó un AD, considerando un cuarto grupo, que se corresponde con los individuos de Viana.

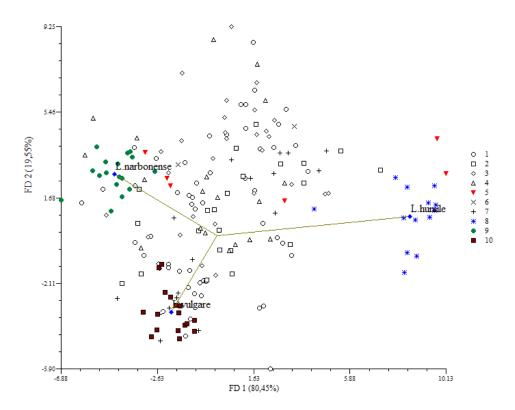
La discriminación entre las tres especies de contraste es perfecta ( $\Lambda$  de Willks = 0,004, para el estadístico  $X^2$  = 196,086 >  $X^2_{0,05,38}$  = 53,384) resumiendo la primera función discriminante – FD1– (primera dimensión o primera variable canónica) el 80,45% de la variación entre los grupos, mientras que la segunda función discriminante recopila el restante 19,55%, ambas con autovalores significativamente distintos de 0, con valores de correlación canónica de 0,984 y 0,939, respectivamente. Las correlaciones de las variables originales con las funciones discriminantes se presentan en la tabla 34. Así, las variables que discriminan en la primera dimensión (FD1) son: Les, Es, Des, Pk, Lbi, Lbe, y Abi; mientras que las variables que lo hacen en la segunda son: Lk, LP, Le, Sen, Alh, Fes, Abm, Llh, Le1, Lbm, Abe y Lp.

correlaciones de	<b>Tabla 34</b> - Matriz de estructura que recoge las correlaciones de las variables originales con las funciones discriminantes.							
Variables	FD1	FD2						
Les	0,427	-0,265						
Es	-0,261	-0,060						
Des	0,226	-0,217						
Pk	0,225	-0,093						
Lbi	0,176	0,027						
Lbe	0,074	0,028						
Abi	0,055	-0,044						
Lk	0,126	0,452						
LP	0,038	0,375						
Le	0,064	-0,271						
Sen	-0,141	0,233						
Alh	-0,031	-0,185						
Fes	0,026	-0,181						
Abm	0,021	-0,164						
Llh	-0,052	-0,141						
Le1	0,097	-0,128						
Lbm	0,110	-0,119						
Abe	0,069	-0,111						
Lp	0,043	-0,075						

Aunque las funciones de identificación (también de clasificación o asignación –Anexo 3–han asignado los ejemplares dudosos a uno de los tres grupos de especies de contraste (Tabla 35), puede apreciarse una clara concentración entre *L. narbonense* y *L. vulgare* de muchos de

éstos, mientras que los individuos de Praia da Veiga (Viana do Castelo), lo hacen entre *L. humile* y *L. narbonense* (Figura 23).

Tabla 35 - Matriz de clasificación (tabla de confusión).								
	Grupos de especies de contraste							
Especies/Estuarios y Playa	L. vulgare	L. humile	L. narbonense	Totales				
L. vulgare	17	0	0	17				
L. humile	0	13	0	13				
L. narbonense	0	0	17	17				
Praia da Veiga, Viana do Castelo	0	3	3	6				
Aveiro	19	7	26	52				
Tejo	9	1	10	20				
Sado	6	4	20	30				
Mira	8	6	8	22				
Formosa	8	6	3	17				
Guadiana	0	1	1	2				
Totales	67	41	88	196				



**Figura 23** - Ordenación obtenida a partir de las dos funciones discriminantes (FD) basado en las tres especies de contraste (*Limonium humile*, *L. narbonense* y *L. vulgare*) cuyos centroides se han representado con rombos azules. Leyenda de las poblaciones y especies contraste: 1: Aveiro; 2: Mira; 3: Sado; 4: Tejo; 5: Praia da Veiga, Viana do Castelo; 6: Guadiana; 7: Formosa; 8: *L. humile* (estrellas azules); 9: *L. narbonense* (rombos verdes); 10: *L. vulgare* (cuadrados marrones).

Los resultados obtenidos muestran que existe diferenciación morfológica entre los ejemplares estudiados, pudendo ser atribuidos inicialmente a tres especies: *L. vulgare, L. humile* y *L. narbonense*, dada la clara la discriminación entre *L. humile* y las otras dos especies, y entre *L. vulgare* y *L. narbonense*. De hecho, de un total de 149 individuos analizados pueden ser atribuidos 50 a *L. vulgare*, 28 a *L. humile* y 71 a *L. narbonense*. A partir de siete caracteres (Les, Es, Des, Pk, Lbi, Lbe y Abi) se discriminaron los individuos de *L. humile* y de doce (Lk, LP, Le, Sen, Alh, Fes, Abm, Llh, Le1, Lbm, Abe y Lp) *L. narbonense* y *L. vulgare*.

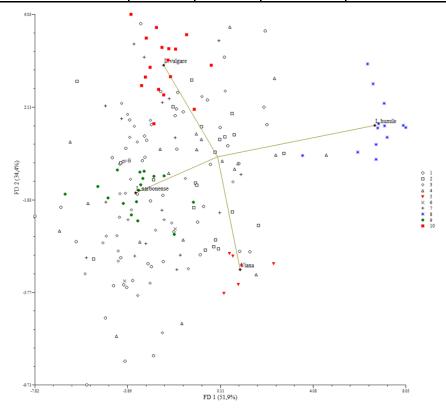
La discriminación entre las tres especies de contraste iniciales a las que se ha añadido la población de Praia da Veiga (Viana do Castelo) por haberse destacado en el ACP, es perfecta ( $\Lambda$  de Willks = 0,001, para el estadístico  $X^2$  = 271,977 >  $X^2_{0,05,60}$  = 78,082) resumiendo la primera función discriminante –FD1– el 51,9% de la variación entre los grupos, la segunda función discriminante –FD2–el 34,4%, y la tercera función –FD3–, el 13,7% restante, cuyos valores propios son significativamente distintos de 0, con valores de correlación canónica de 0,972, 0,946 y 0,872, respectivamente. Las correlaciones de las variables originales con las funciones discriminantes se presentan en la tabla 36. Así, las variables que discriminan en la primera dimensión (FD1) son: Les, Es, Des, Lbi, Pk, Lbm, y Lbe; en la segunda (FD2): son: Lk, LP y Fes; mientras que en la tercera: Le, Sen, Le1, Llh, Alh, Lp, Abm, Abi y Abe.

<b>Tabla 36</b> - Matriz de estructura que recoge las correlaciones de las variables originales con las funciones discriminantes.						
Variable	FD1	FD2	FD3			
Les	0,489	-0,116	0.275			
Es	-0,349	-0,022	0.162			
Des	0,304	-0,106	0.303			
Lbi	0,221	0,063	0.060			
Pk	0,211	-0,114	-0.145			
Lbm	0,151	-0,096	0.073			
Lbe	0,097	0,056	0.051			
Lk	0,140	0,360	-0.244			
LP	0,037	0,343	-0.146			
Fes	0,041	-0,231	-0.169			
Le	0,082	-0.073	0.573			
Sen	-0,189	-0.094	0.437			
Le1	0,125	0.022	0.407			
Llh	-0,073	-0.026	0.345			
Alh	-0,042	-0.074	0.345			
Lp	0,052	0.038	0.307			
Abm	0,029	-0.100	0.179			
Abi	0,067	0.020	0.159			
Abe	0,090	-0.062	0.132			

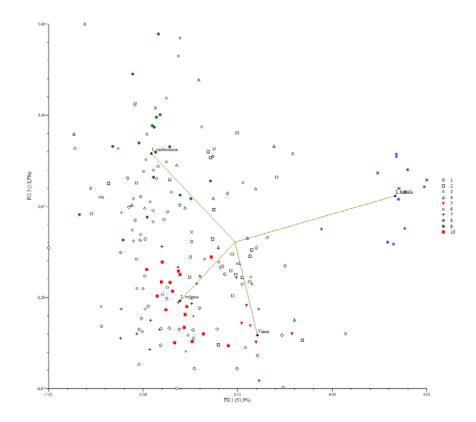
Las funciones de identificación (Anexo 3) han asignado los ejemplares dudosos a uno de los cuatro grupos de contraste (Tabla 37), pudiéndose apreciar una asignación a la población de Praia da Veiga (Viana do Castelo) de ejemplares que anteriormente se repartieron entre las

otras tres especies de contraste, disminuyendo claramente las asignaciones a *L. humile* (Figura 24 y 25).

	Grupos de especies de contraste y poblaciones				
Especies/Estuarios y Playa	L. vulgare	L. humile	L. narbonense	Praia da Veiga, Viana do Castelo	Total
L. vulgare	17	0	0	0	17
L. humile	0	13	0	0	13
L. narbonense	0	0	17	0	17
Praia da Veiga, Viana do Castelo	0	0	0	6	6
Aveiro	19	1	20	12	52
Mira	8	0	7	7	22
Sado	5	0	22	3	30
Tejo	3	2	11	4	20
Guadiana	0	0	2	0	2
Formosa	8	0	4	5	17
Total	60	16	83	37	196



**Figura 24** - Ordenación obtenida a partir de las dos primeras funciones discriminantes (FD) basado en las tres especies de contraste (*Limonium humile*, *L. narbonense* y *L. vulgare*) más la población de Praia da Veiga, Viana do Castelo (triángulos invertidos rojos), cuyos centroides se han representado con rombos negros. Leyenda de las poblaciones y especies contraste: 1: Aveiro; 2: Mira; 3: Sado; 4: Tejo; 5: Praia da Veiga, Viana do Castelo; 6: Guadiana; 7: Formosa;: *L. humile* (estrellas azules); 9: *L. narbonense* (rombos verdes); 10: *L. vulgare* (cuadrados rmarrones).



**Figura 25** - Ordenación obtenida a partir de la primera y tercera funciones discriminantes (FD) basado en las tres especies de contraste (*L. humile*, *L. narbonense* y *L. vulgare*) más la población de Praia da Veiga, Viana do Csatelo (triángulos invertidos rojos), cuyos centroides se han representado con rombos negros. Leyenda de las poblaciones y especies contraste: 1: Aveiro; 2: Mira; 3: Sado; 4: Tejo; 5: Praia da Veiga, Viana do Castelo; 6: Guadiana; 7; Formosa; 8: *L. humile* (estrellas azules); 9: *L. narbonense* (rombos verdes); 10: *L. vulgare* (cuadrados marrones).

Las 3 especies continúan claramente distintas y Praia Viana (Viana do Castelo) es claramente distinta de las 3 especies de contraste

Ahora los 149 individuos son asignados del siguiente modo: 43 a *L. vulgare*, 3 a *L. humile*, 60 a *L. narbonense* y 37 a Praia da Veiga (Viana do Castelo). Siete caracteres (Les, Es, Des, Lbi, Pk, Lbm y Lbe) discriminaron los individuos de *L. humile*, nueve (Le, Sen, Le1, Llh, Alh, Lp, Abm, Abi y Abe) el *L. vulgare* de Viana, y tres (Lk, LP, Fes) el *L. narbonense*.

## 5. Discusión y Conclusiones

El género *Limonium* Miller presenta una sistemática y taxonomía complexa debido a los distintos modos de reproducción, que sus especies pueden realizar, sexual y/o apomixia facultativa, además de que puedan presentar mecanismos de hibridación, seguido de poliploidización (Baker, 1966; Lledó *et al.*, 2005). En consecuencia, muchas especies presentan poca diferenciación morfológica, estando descrito un número elevado de microespecies, tornando difícil esclarecer la taxonomía de este género.

En este estudio que pretendió aclarar la identidad de ejemplares afines al *taxon L. vulgare*, la mayoría provenientes de estuarios, tal como las especies que usamos como referencia, *L. vulgare*, *L. humile* y *L. narbonense*, que crecen en saladares costeros (Erben, 1993). Solo una pequeña población de individuos fueran encontrados en una playa (Praia da Veiga, Viana do Castelo), en condiciones lodosas similares a las que se observan en los saladares lodosos. La mayoría de los individuos analizados están presentes en los estuarios al sur del país, probablemente porque estos estuarios tienen una mayor dimensión, y están también mejor conservados que los estuarios atlánticos, estos últimos, con mayor presión antrópica (ALFA, 2004). La excepción a esto es el gran estuario de la ría de Aveiro, que se encuentra bien conservado (ICNB, 2011), en que algunas poblaciones eran mayores que las otras, como la población de Boco, y por eso, fue posible amuestrar mayor número de individuos.

Atendiendo al análisis de los 19 caracteres considerados para los 196 individuos podemos afirmar que algunos caracteres de la parte vegetativa están significativamente correlacionados entre sí, (r<sub>0.001(2),194</sub> = 0.234), como la longitud del escapo de una planta, la longitud del escapo hasta la primera ramificación, el ángulo entre el escapo y la primera ramificación, la longitud del peciolo de la hoja, la longitud de la hoja y la anchura de la hoja. Por consiguinte, podemos afirmar, por ejemplo, que cuanto mayor es la longitud del escapo de una planta, mayor la longitud del escapo hasta la primera ramificación. Entre los caracteres de la parte reproductiva de la planta, la longitud de las espigas también está significativamente correlacionada con otros caracteres los que no están necesariamente altamente o simplemente correlacionados con los ya mencionados atrás. Así, cuanto mayor es la longitud de las espigas mayor resulta la mayor distancia entre espiguillas y mayor la longitud de cada una de las brácteas. La longitud de la bráctea interna aumenta con la anchura de la bráctea interna y con la longitud del cáliz. Cuanto mayor la longitud de los pétalos mayor la proporción de limbo en el cáliz.

Las especies *L. vulgare*, *L. humile* y *L. narbonense* están morfológicamente muy relacionadas (Erben 1993). Pero, en este estudio, mediante el análisis discriminante, usando una combinación de 19 caracteres, fue posible distinguir los individuos analizados pertencientes a estas 3 especies. Queda claro que *L. vulgare* y *L. narbonense* están más correlacionadas entre si que con *L. humile*, que se queda mas alejado, tal como demuestran estudios de filogenia molecular (Palacios *et al.* 2000; Lledó *et al.* 2005; Palop-Esteban *et al.*, 2011). Los caracteres que más peso tuvieran en la función discriminante fueron longitud de las espigas, número de espiguillas por cm, mayor distancia entre espiguillas, longitud de la bráctea

externa, longitud y anchura de bráctea interna, y proporción del limbo. Erben (1993), en la descripción que hace de *L. humile* no se refiere al número de espiguillas por cm, ni a proporción de limbo del cáliz. Los caracteres que separan *L. vulgare* y *L. narbonense* son la longitud del escapo, la longitud del escapo hasta la primera ramificación, ángulo entre el escapo y la 1ª ramificación, la longitud y anchura de la hoja, el número de flores por espiguilla, la anchura de bráctea externa, la anchura y longitud de la bráctea media, la longitud del cáliz y la longitud de los pétalos. Erben (1993), compara el *L. vulgare* con *L. narbonense*, afirmando que lo primero es más pequeño, enumerando algunos caracteres, pero no utiliza dos de los aquí estudiados, numero de flores por espiguilla y longitud de los pétalos, para distinguir estas especies.

El análisis de un total de 149 individuos provenientes de herbarios y de los recolectados en la costa portuguesa, muestra que 50 pueden ser atribuidos a *L. vulgare*, 28 a *L. humile* y 71 a *L. narbonense*. Aunque la mayor parte de los individuos de las poblaciones se hayan asignado a *L. narbonense*, en este estudio no han sido encontradas poblaciones puras. En las poblaciones de Aveiro (50%), Tejo (50%) y Sado (67%) la mayoría de los individuos fueron asignados a *L. narbonense*; en Praia da Veiga (Viana do Castelo) y Guadiana los individuos se reparten en igual número entre *L. vulgare* y *L. narbonense*; en ría Formosa la mayor parte de los individuos fueron clasificados como *L. vulgare* (47%) y por fin, en la población de Mira, los individuos se distribuyen entre las 3 especies.

Cuando juntamos la población de Praia da Veiga, Viana do Castelo, a las especies referencia, por quedarse más aislada de las restantes poblaciones, resulta que permanece claramente diferenciada, y también que Praia da Veiga (Viana do Castelo) es claramente distinta de aquellas especies. Como antes, *L. humile* sigue más alejado, restando *L. vulgare*, *L. narbonense*, y los individuos de la población de Praia da Veiga (Viana do Castelo) más relacionados entre sí. *Limonium humile* se mantiene separado, por los mismo caracteres, excepto la longitud de la bráctea media que ahora remplaza la anchura de la bráctea media. *Limonium narbonense* se distingue de las restantes especies por la longitud del escapo, la longitud del escapo hasta la primera ramificación, el ángulo entre el escapo y la primera ramificación, las hojas, y la anchura de las tres brácteas. *Limonium vulgare* se separa de la población de Praia da Veiga (Viana do Castelo) por los caracteres: números de flores por espiguilla, longitud de los pétalos y longitud del cáliz.

En esta nueva situación, la mayoría de los individuos que se asignaban a *L. humile* (18) pasó a asignarse a Praia da Veiga (Viana do Castelo) que pertenecen respectivamente, al estuario de la ría de Aveiro (6) y al estuario del rio Mira (6). También 10 individuos antes clasificados como *L. narbonense* se agruparon ahora con Praia da Veiga, Viana do Castelo. La mayoría eran del estuario de la ría de Aveiro (6) que es, en este estudio, el estuario más cercano a Praia da Veiga, Viana do Castelo. Apenas 3 individuos antes identificados como *L. vulgare* fueron añadidos a Praia da Veiga, Viana do Castelo. Esto sugiere que los ejemplares de la población de Praia da Veiga (Viana do Castelo) son más parecidos a *L. humile* y *L. narbonense*, que a *L. vulgare*. Con esta nueva distribución de los individuos de las poblaciones

por las especies referencia, 60 pertenecen a *L. narbonense*, 43 pertenecen a *L. vulgare* y solo 3 a *L. humile.* 

Con la nueva clasificación, existen ahora dos poblaciones puras: Praia da Veiga (Viana do Castelo) (6 individuos), que fue añadida a las especies referencia, y Guadiana (2 individuos) solo con individuos de *L. narbonense*. Los restantes estuarios/playa presentan individuos morfológicamente asignados a las especies *L. narbonense* y *L. vulgare*, y morfológicamente similares a los de la población de Praia da Veiga (Viana do Castelo); excepto Aveiro y Tejo, que también presentan individuos de *L. humile*. Como dantes, los individuos se asignan mayoritariamente, pero en porcentajes diferentes, a *L. narbonense* en los estuarios de la ría de Aveiro (38%), del rio Tejo (55%) y del Sado (73%); a *L. vulgare* en la ría Formosa (47%); y en lo estuario del Mira a *L. narbonense* (32%), *L. vulgare* (36%) y "morfo-tipo de Praia da Veiga (Viana do Castelo)" (32%).

El mayor número de individuos agrupados en las especies de control que pasa a asignarse a Praia da Veiga (Viana do Castelo) proceden de Aveiro (12) y Mira (7). Aveiro es el estuario, del conjunto en estudio, más cercano de Praia da Veiga (Viana do Castelo), pero el estuario del Mira se sitúa a 500 km. Los únicos estuarios con la presencia de *L. humile* son Aveiro y Tejo, con una distancia de 250 km. Además de estos dos estuarios, el Sado, muy cercano al del río Tejo, y el Guadiana, a 250 km, del que solo se analizaron dos individuos, tienen también una fuerte presencia del *L. narbonense*. Los estuarios con mayor presencia de *L. vulgare* son Aveiro, Mira y Formosa. Los dos últimos están cercanos entre sí, pero muy distantes del primero. Considerando todos los caracteres, para la mayoría de las poblaciones no parece existir una correlación entre taximetría y distribución geográfica. Esto es, poblaciones más cercanas no son necesariamente más semejantes, así como, las poblaciones más alejadas no son obligatoriamente más distintas. Al igual que sucede en otros estudios morfométricos realizados por Dawson & Ingrouille (1995) para *L. vulgare* y *L. humile*, no encontraron que la variación morfológica estuviera correlacionada con un patrón geográfico.

En 13 individuos obtenidos por germinación de semillas procedentes de dos de los estuarios (Aveiro y Tejo) y caracterizados citológicamente, se observó que la mayoría eran tetraploides, 2n = 4x = 36 cromosomas, siendo algunos aneuploides tetraploides 2n = 4x = 35 y 2n = 4x = 38. Según varios autores, L. vulgare sería tetraploide (Ingrouille, 1984, 1990; Erben, 1993) con 2n = 4x = 36 cromosomas, así como L. narbonense (Erben, 1993; Artelari, 1992). Pero, Georgakopoulou et al. (2006), observaron individuos hexaploides (2n = 6x = 54 cromosomas) y octoploides (2n = 8x = 72 cromosomas) en poblaciones naturales. Es un hecho que en diferentes especies poliploides, se han observado diferentes números de cromosomas en la misma especie, población o en el mismo espécimen (Dolcher y Pignatti 1967, 1971; Diana 1995; Castro y Rosselló, 2007). El caso de polimorfismo más extremo fue reportado para la especie L. bonifaciense Arrigoni & Diana, endémica de Córcega, en que más del 50% de las plántulas presentaban mixoploidia (diferentes niveles de ploidia) (Diana, 1995). Así, de acuerdo con Pignatti (1972), Ingrouille (1984) y Dawson (1990) existen individuos tetraploides en L. humile, aunque el ultimo autor también ha observado individuos aneuploides tetraploides,

aneuploides hexaploides y hexaploides con 2n = 38, 39, 49, 50, 51, 52, 54 cromosomas, respectivamente. A pesar del polimorfismo cromosómico descrito para las especies referencia, los individuos analizados presentan niveles de ploidía (tetraploide o aneuploide tetraploide) similares a los descritos para los testigos.

Considerando los aspectos reproductivos, las especies referencia tienen sistemas de cruzamiento diferentes. Las especies *L. vulgare* y *L. narbonense* presentan heterostilia dimórfica y dimorfismo polínico-estigmático, este último mecanismo asociado a un sistema de autoincompatibilidad esporofítica (Baker, 1948, 1966). La presencia de flores con heterostilia y combinaciones polínico-estigmáticas autoincompatibles determinan la fecundación cruzada (*L. vulgare* - Baker 1948, 1966 y Dawson y Ingrouille, 1995; *L. narbonense* - Georgakopoulou *et al.*, 2006). En contraste, *L. humile* es una especie homostílica con flores monomórficas, una condición rara en el género *Limonium*, presentando apenas estigmas papilosos compatibles con polen tipo B (combinación autocompatible), por lo que se reproduce por autofecundación (Dawson & Ingrouille, 1995).

A pesar de, no haber sido estudiada la heterostilia y el dimorfismo polínico-estigmático en todos los individuos analizados, porque no tenían flores en condiciones para efectuar este análisis, la mayoría de los individuos presentaron heterostilia dimorfa con flores del tipo "Pin" (81.7%) y "Thrum" (6.5%). Las combinaciones polínico-estigmáticas más frecuentes son del tipo tipo A (26%) o B (62%) (autoincompatibles), estando en menor porcentaje las otras dos combinaciones, C (0.7%) y D (11.1%) (autocompatibles). Esto sugiere que la fecundación cruzada queda favorecida aunque también pueda existir autofecundación (Baker 1948, 1953ab, 1966). Al nivel de las poblaciones individuales se destaca que Aveiro, Mira y Sado son los únicos estuarios que presentan la combinación D además de las combinaciones A y B, o solo B, en el caso de Sado, lo que significa que las plantasde estas poblaciones se podrán reproducir por fecundación cruzada o por autofecundación en el seno de las mismas. A pesar de que la muestra sea pequeña, los individuos de Praia da Veiga (Viana do Castelo), mayoritariamente homostílicos y con combinación polínico-estigmático son del tipo B, sugiere que en esta población se presenta autofecundación (Baker 1948, 1953ab, 1966).

Resumiendo, según el hábitat, los individuos en estudio tienen el mismo tipo de hábitat que las especies de referencia, *L. vulgare*, *L. humile* y *L. narbonense*, excepto los individuos de la playa Praia da Veiga (Viana do Castelo). La distribución geográfica de los individuos estudiados es más amplia que la de *L. vulgare* y la de los híbridos *L.humile* x *L. vulgare* o *L. vulgare* x *L. narbonense*. Las análisis de los caracteres morfológicos clasifican, mayoritariamente, tres poblaciones como *L. vulgare* (Aveiro, Mira y Formosa), cuatro como *L. narbonense* (Aveiro, Tejo, Sado, Guadiana) y una (Praia da Veiga, Viana do Castelo) como la población de Praia da Veiga, Viana do Castelo. Solo un individuo de Aveiro y dos de Tejo fueron asignados a *L. humile*. Esto sugiere que los individuos de Praia da Veiga (Viana do Castelo) son diferentes de los restantes estudiados, y que no pueden ser atribuidos a ninguna de las tres especies *L. vulgare*, *L. humile* y *L. narbonense*. Partiendo del estudio cromosómico y las análisis de heterostilia y dimorfismo polínico-estigmático, todos los individuos estudiados

son más afines a *L. vulgare* o *L. narbonense*, a excepción de los individuos de Praia da Veiga (Viana do Castelo).

A pesar de que se han descrito híbridos basados en las características morfológicas entre *L. humile* x *L. vulgare* para Beira Alta y Beira Litoral, y *L. vulgare* x *L. narbonense* para Baixo Alentejo (Erben, 1993), los resultados obtenidos no sostienen su existencia en las marismas que prospectamos. Además, este estudio muestra que muy pocos individuos han sido atribuidos a *L. humile*. La mayoría de las poblaciones serían mixtas, al contener *L. narbonense* y *L. vulgare*, si bien en Tejo y Aveiro estarían presentes las 3 especies. Consecuentemente en teoría podrían existir híbridos entre estas especies al reproducirse sexualmente por fecundación cruzada, *L. vulgare* y *L. narbonense*. De acuerdo con Palop-Esteban *et al.*, (2011) en el este de España parece que estas especies no comparten la misma área de distribución, por lo que la hibridación entre ellas parece ser improbable. No obstante, estas especies están filogenéticamente aparentadas y corresponden a un grupo monofilético separado de la gran mayoría de las especies incluidas en la Sect. *Limonium* (Palácios, *et al.* 2000; Lledó *et al.* 2005), por lo que no se puede descartar su posible capacidad de hibridar.

Los resultados de este estudio permiten concluir que existen dos nuevas especies para la flora de Portugal Continental, *L. humile* y *L. narbonense*, y sugiere que los individuos de la población Praia da Veiga (Viana do Castelo) pueden ser una nueva especie para la flora portuguesa.

## 6. Perspectivas futuras

En el futuro se pretende ampliar las metodologías usadas en este trabajo a los demás estuarios de Portugal, aún no prospectados. Es necesario también, estudiar más individuos que tengan la misma distribución ecológica que los individuos de la playa Praia da Veiga (Viana do Castelo), pues la amuestra en estudio era muy pequeña, tanto en Portugal como en el norte de España.

También, se pretende testar la ocurrencia híbridos entre las especies *L. vulgare*, *L. humile* y *L. narbonense* experimentalmente, así como, avaluar la hipotética ocurrencia de estés híbridos en las poblaciones naturales mixtas. Esto podrá ser confirmado por medio de análisis genéticas usando marcadores moleculares, ya desarrollados para *L. vulgare* y *L. narbonense* (Palacios *et al.*, 2000; Palop-Esteban *et al.* 2011), y análisis citogenéticas a través de GISH (Hibridación Genómica In Situ).

# 7. Bibliografía

- ALFA (2004) Tipos de Habitat Naturais e Semi-Naturais do Anexo I da Directiva 92/43/CEE (Portugal Continental): Fichas de Caracterização Ecológica e de Gestão para o Plano Sectorial da Rede Natura 2000. Relatório. Lisboa
- Amich F, Garcia-Barriuso M, Crespi A, Bernardos S (2009) Taxonomy, morphometric circumscription and karyology of the Mediterranean African representatives of *Ophrys* sect. *Pseudophrys* (*Orchidaceae*). Plant Biosystems 143:47-61 DOI 10.1080/11263500802633485
- Arrigoni PV, Diana S (1993) Contribution à la connaissance du genre *Limonium* en Corse. Candollea 48(2):631–677
- Arrigoni PV, Diana S (1999) Karyology, chorology and bioecology of the genus *Limonium* (*Plumbaginaceae*) in Sardinia. Plant Biosystems 133:63-71

  DOI 10.1080/11263509909381533
- Artelari R (1992) Reports 51-55. In: Kamari G, Felber F, Garbari F (eds.): Mediterranean chromosome number reports 2. Flora Mediterranea 2:229-232
- Baker HG (1948) Dimorphism and Monomorphism in the *Plumbaginaceae*.1. A Survey of the Family. Annals of Botany 12:207-219
- Baker HG (1953a) Dimorphism and Monomorphism in the *Plumbaginaceae*.2. Pollen and Stigmata in the Genus Limonium. Annals of Botany 17:433-445
- Baker HG (1953b) Dimorphism and Monomorphism in the *Plumbaginaceae*.3. Correlation of Geographical Distribution Patterns with Dimorphism and Monomorphism in *Limonium*. Annals of Botany 17:615-627
- Baker HG (1966) The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems. I. The *Plumbaginaceae*. Evolution 20:349-368
- Brullo S, Pavone P (1981) Chromosome numbers in the Sicilian species of *Limonium* Miller (*Plumbaginaceae*). Anales Jardín Botânico de Madrid 37:535–555
- Caperta AD, Rosa M, Delgado M, Karimi R, Demidov D, Viegas W, Houben A (2008)

  Distribution patterns of phosphorylated Thr 3 and Thr 32 of histone H3 in plant mitosis and meiosis. Cytogenet Genome Res 122:73-79

  DOI 10.1159/000151319
- Castro M, Rossello JA (2007) Karyology of *Limonium* (*Plumbaginaceae*) species from the Balearic Islands and the western Iberian Peninsula. Botanical Journal of the Linnean Society 155:257-272
- Costa JC, Aguiar C, Capelo JH, Lousã M, Neto C (1998) Biogeografia de Portugal Continental. Quercetea 0:5-56
- Costa JC, Neto C, Aguiar C, Capelo J, Santo DE, Honrado J, Pinto-Gomes C, Monteiro-Henriques T, Sequeira M, Lousã M, Lopes MC, Arsénio P, Jardim R, Alves P, Antunes JC, Pereira MD, Silva V, Ribeiro S, Gaspar N, Alves HN, Meireles C, Caraça R, Pereira EP, Martins M, Bingre P, Vila-Viçosa C, Mendes P, Canas RQ, Ferreira RP, Bellu A,

- Almeida JD, Caperta A, Vasconcelos T, Geraldes M, Almeida D, Gutierres F, Pinto JR, Mesquita S (2012) Vascular Plant Communities in Portugal (Continental, the Azores and Madeira). Global Geobotany (aceptado para publicación)
- Cowan R, Ingrouille MJ, Lledó MD (1998) The taxonomic treatment of agamosperms in the genus *Limonium* Mill. (*Plumbaginaceae*). Folia Geobotanica 33:353–366
- Crespo MB, Lledó MD (1998) El Género *Limonium* Mill. (*Plumbaginaceae*) en la Comunidad Valenciana: Taxonomía y Conservación. Colección Biodiversidad 3, Generalitat Valenciana, Valencia
- Darwin C (1877) The Different Forms of Flowers on Plants of The Same Species. Murray, London
- Dawson HJ (1990) Chromosome numbers in two Limonium species. Watsonia 18:82-84
- Dawson HJ, Ingrouille MJ (1995) A biometric survey of *Limonium vulgare* Miller and *L. humile*Miller in the British Isles. Watsonia 20:239–254
- Diana S (1995) Variabilita` cariologica in *Limonium bonifaciense* Arrigoni et Diana (*Plumbaginaceae*). Bolletino della Societá Sarda di Scienza Naturali 30:531–544
- Directiva 92/43/CEE, del Consejo de 21 de mayo de 1992 relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres.
- Dolcher T, Pignatti S (1967) Numeri cromosomici di alcune specie mediterranee del genere Limonium. Nuovo Giornale Botanico Italiano 101:294–295
- Dolcher T, Pignatti S (1971) Un'ipotesi sull'evoluzione dei Limonium del bacino mediterraneo. Nuovo Giornale Botanico Italiano 105:95–107
- Erben M (1978) Die Gattung *Limonium* im südwestmediterranen Raum. Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München 14:361–626
- Erben M (1979) Karyotype differentiation and its consequences in Mediterranean *Limonium*. Webbia 34:409–417
- Erben M (1993) *Limonium* Mill. In: Castroviejo S, Aedo C, Cirujano S, Lainz M, Montserrat P, Morales R, Garmendia FM, Navarro C, Paiva J, Soriano C (eds.) Flora Iberica 3:2–143
- Erben M (1999) Limonium nydeggeri—eine neue Art aus Sudwestportugal. Sendtnera 6:103–107
- Foucart T (1982) Analyse Factorielle. Programmation sur Micro-ordinateurs. 2éme Edition. Masson, Paris
- Franco JA (1984) Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Vol II. 3 vols. Lisboa: Edição do Autor
- Georgakopoulou A, Manousou S, Artelari R, Georgiou O (2006) Breeding systems and cytology in Greek populations of five *Limonium* species (*Plumbaginaceae*). Willdenowia 36(2): 741-750
- Gómez-Campo C (2002) Long Term Seed Preservation: The Risk of Selecting Inadequate

  Containers is Very High. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid: (Monographs
  ETSIA, 163) pp 1-9

- Goodall D (1954) Objective methods for the classification of vegetation. III. An essay in the use of factor analysis. Australian Journal of Botany 2:304-324 DOI http://dx.doi.org/10.1071/BT9540304
- Greuter W, McNeill J, Barrie FR, Burdet HM, Demoulin V, Filgueiras TS, Nicolso DH, Silva PC, Skog JE, Trehane P, Turland NJ and Hawksworth, DL (2000) (eds): International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code) adopted by the XVI International Botanical Congress, St Louis, Missouri, July-August 1999. Regnum Vegetabile 138. Koeltz Scientific Books, 61453 Königstein, Germany. ISSN 0080-0694. ISBN 3-904144-22-7
- Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC (1998) Multivariate Data Analysis. 5th Edition.

  Prentice Hall Inc., New Jersey
- Holmgren PK, Holmgren NH, Barnett LC (1990) Index Herbariorum. Part I: The Herbaria of the World, ed. 8. *Regnum Vegetabile* 120:1–693
- Hooker JD (1876) *Plumbaginaceae*. In: Bentham G and Hooker JD (eds): *Genera Plantarum ad Exemplaria Imprimis in Herbariis Kewensibus Servata*. Vol 2:623–628. Reeve & Co, London, UK
- ICNF (2011) Ficha Técnica. Proposta de classificação da ria de Aveiro como sítio de importância Comunitária. ICNF [on line] http://www.icnf.pt/NR/rdonlyres/3A797B04-9EF8-454E-92C4-B0024D187663/0/Anexo1\_RELATORIO\_SitioRAveiro\_Set2011.pdf
- Ingrouille MJ (1984) A taxometric analysis of *Limonium* (*Plumbaginaceae*) in western-Europe. Plant Systematics and Evolution 147:103-118
- Ingrouille MJ, Stace CA (1985) Pattern of variation of agamospermous *Limonium* (*Plumbaginaceae*) in the British-Isles. Nordic Journal of Botany 5:113-125
- Jardim R, Menezes de Sequeira M, Capelo J, Costa JC (2007) *Limonium lowei*, um novo nome para o endemismo porto-santense Statice pyramidata Lowe (Plumbaginaceae). Silva Lusitana 15 (2): 277-278
- Jolliffe IT (2002) Principal Component Analysis. 2nd Edition, Springer Verlag, New York. (E-Book: http://site.ebrary.com/id/10047693?ppg)
- Karis PO (2004) Taxonomy, phylogeny and biogeography of *Limonium* sect. *Pteroclados* (*Plumbaginaceae*), based on morphological data. Botanical Journal of the Linnean Society 144:461-482
- Kubitzki K (1993) *Plumbaginaceae*. In: Kubitzki K, Rohwer JG and Bittrich V (eds.): The Families and Genera of Vascular Plants, vol 2: 523–530. Springer, Berlin, Germany
- Lauranson J, Vekemans X, Lefebvre C, Jay M (1995) Flavonoid Profiles Variation in Armeria maritima (Mill.) Willd. Biochemical Systematics and Ecology 23:319-329 DOI 10.1016/0305-1978(95)97456-7
- Legendre P, Legendre L (1998) Numerical Ecology. 2n<sup>d</sup> Edition, Elsevier Science B. V., Amsterdam. 853 pp.
- Letz DR, Dancák M, Danihelka J, Šetzarhanová P (2012) Taxonomy and distribution of Cerastium pumilum and C. glutinosum in Central Europe. Preslia 84: 33-69

- Lledó MD, Crespo MB, Cameron KM, Fay MF, Chase MW (1998) Systematics of *Plumbaginaceae* based upon cladistic analysis of rbcL sequence data. Systematic Botany 23:21-29
- Lledó MD, Crespo MB, Fay MF, Chase MW (2005) Molecular phylogenetics of *Limonium* and related genera (*Plumbaginaceae*): biogeographical and systematic implications.

  American Journal of Botany 92:1189-1198 DOI 10.3732/ajb.92.7.1189
- Lledó MD, Erben M, Crespo MB (2003) *Myriolepis*, a new genus segregated from *Limonium* (*Plumbaginaceae*). Taxon 52:67-73
- Lledó MD, Karis PO, Crespo MB, Fay MF, Chase MW (2001) Phylogenetic position and taxonomic status of the genus *Aegialitis* and subfamilies *Staticoideae* and *Plumbaginoideae* (*Plumbaginaceae*): evidence from plastid DNA sequences and morphology. Plant Systematics and Evolution 229:107-124 DOI 10.1007/s006060170021
- Mallo F (1985) Análisis de Componentes Principales y Técnicas Factoriales Relacionadas. Universidad de León, Secretariado de Publicaciones, León. 523 pp
- Manley BFJ (1994) Multivariate Statistical Methods. A primer. 2<sup>nd</sup> Edition. Chapman & Hall, London. 215 pp.
- McCune B, Grace JB (2002) Analysis of Ecological Communities. MjM Software Design, Gleneden Beach. 300 pp
- Monteiro-Henriques T (2010) Fitossociologia e Paisagem da Bacia Hidrográfica do Rio Paiva/Landscape and Phytosociology of the Paiva River's Hydrographical Basin Dissertação de Doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. pp.306
- Neto C, Arsénio P, Costa JC (2009) Flora e vegetação do sudoeste de Portugal Continental.

  Quercetea 9:43-144
- Palacios C, Gonzalez-Candelas F (1997) Lack of genetic variability in the rare and endangered Limonium cavanillesii (Plumbaginaceae) using RAPD markers. Molecular Ecology 6:671-675
- Palacios C, Rosselló JA, Gonzalez-Candelas F (2000) Study of the evolutionary relationships among *Limonium* species (*Plumbaginaceae*) using nuclear and cytoplasmic molecular markers. Molecular Phylogenetics and Evolution 14:232-249 DOI 10.1006/mpev.1999.0690
- Palop-Esteban M, Segarra-Moragues J, Gonzalez-Candelas F (2011) Polyploid origin, genetic diversity and population structure in the tetraploid sea lavender *Limonium narbonense* Miller (*Plumbaginaceae*) from eastern Spain. Genetica 139:1309-1322 DOI 10.1007/s10709-012-9632-2
- Pax F (1889) *Plumbaginaceae*. In: Engler A and Prantl K (eds): Die Natürlichen Pflanzenfamilien, vol 4:116–125. W. Englemann, Leipzig, Germany.

- Pignatti S (1971) Studi sui Limonium, VIII. In V. H. Heywood [ed.], Florae Europaea. Notulae systematicae ad flora Europaeam spectantes. Botanical Journal of the Linnean Society 64: 353–381.
- Pignatti S (1972) *Limonium*. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DA, Walters SM, Webb DA and Moore DM (eds): Flora Europaea, vol 3:38–50. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Podani J (1994) Multivariate Data Analysis in Ecology and Systematics: A methodological guide to the SYN TAX 5.0 package. SPB Publishing bv, The Hague, The Netherlands
- Podani J (2000) Introduction to the Exploration of Multivariate Biological Data. Backhuys Publishers, Leiden. 407 pp
- Rivas-Martínez S (2005) Avances en Geobotánica. Discurso de apertura del Curso Académico: Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. [http://www.globalbioclimatics.org]
- Rivas-Martínez S (2007) Mapa de series, geoseries y geopermaseries de vegetación de España. Memoria del mapa de vegetación potencial de España. Itinera Geobotanica 17:5-436
- Rohlf FJ (2000) NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1. User guide. Exeter Software, Setauket, New York
- Rohlf FJ (2009) NTSYSSpc: numerical taxonomy system ver. 2.21c. Exeter Software: Setauket: New York
- Rois AS, Teixeira G, Sharbel TF, Fuchs J, Martins S, Espirito-Santo D, Caperta AD (2012) Male fertility versus sterility, cytotype, and DNA quantitative variation in seed production in diploid and tetraploid sea lavenders (*Limonium* sp., *Plumbaginaceae*) reveal diversity in reproduction modes. Sex Plant Reprod 25:305-318 DOI 10.1007/s00497-012-0199-y
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W.H. Freeman, New York
- Sokal RR, Rohlf FJ (1997) Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 3th Edition. W. H. Freeman and Co. New York
- Szczepaniak M (2009) Biosystematic studies of *Elymus repens* (L.) Gould (*Poaceae*): patterns of phenotypic variation. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 78(1): 51-61
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (1972) Flora Europea. Vol 3 Cambridge University Press
- Zar JH (2010) Biostattistical Analysis. 5th Edition. Pearson Education International. New Jersey

# 8. Webgrafía

http://pt.wikipedia.org/wiki/Portugal
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/55/Provincias\_Portugal\_legenda.png
Microsoft Corporation (2008)
www.gbif.org

## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Descripción de las especies de *Limonium* de contraste según Erben (1993)

#### 1.1. Limonium vulgare Miller Gard. Dict. ed. 8 n.° 1 (1768)

- =Statice limonium var. pseudolimonium (Rchb.) Rouy in Rev. Bot. Syst. Géogr. Bot. 1(11): 167 (1903)
- =Statice limonium L., Sp. Pl. 274 (1753), p.p.
- =Statice pseudolimonium Rchb., Fl. Germ. Excurs. 191 (1831)
- =Limonium vulgare subsp. pseudolimonium (Rchb.) Gams in Hegi, III. Fl. Mitt.-Eur. 5(3): 1883 (1927)
- -Limonium serotinum sensu Erben in Mitt. Bot. Staatssamml. München 14: 411 (1978), p.p.

La indicación locotípica *de L. vulgare* son marismas, en diversas partes de Inglaterra. Esta especie es parecida con *L. narbonense* pero de menor talla. Tienen hojas de 1,5-3 cm de anchura. El escapo es ramificado en el tercio superior. La inflorescencia es más densa que el *L. narbonense*. Las ramas de primer orden miden 3-10 cm y forman un ángulo de 25º-45º. Las espigas también se encuentran en disposición más densa que *L. narbonense*. La bráctea externa mide 1,6-3.4 x 1,4-2.3 mm; la bráctea media 2-3.3 x 1,5-2.2 mm; y la bráctea interna 3,7-5,3 x 2,6-3,4 mm. El cáliz es peloso y tiene 5,5-7,2 mm. Los pétalos son de color rojo violáceo-rojizos. *L. vulgare* es tetraploide, presentando 2n=4x=36 cromosomas

Es posible observar el hibrído *L. vulgare x L.narbonense* en España, en Cádiz; y en Portugal, en Baixo Alentejo.

#### 1.2. Limonium humile Miller Gard. Dict. ed. 8 n.° 4 (1768)

- ≡Limonium vulgare subsp. humile (Mill.) Gams in Hegi, Ill. Fl. Mitt.-Eur. 5(3): 1883 (1927)
- =Statice bahusiensis Fr., Novit. Fl. Suec. Mantissa 1 10 (1832)
- =Statice limonium subsp. bahusiensis (Fr.) Hook. fil., Student Fl. Brit. Isl. ed. 2 322 (1878)
- =Statice rariflora Drejer, Fl. Excurs. Hafn. 121 (1838)
- =Limonium rariflorum (Drejer) Kuntze, Revis. Gen. Pl. 2: 395 (1891)
- =Statice remotiflora Rouy in Rev. Bot. Syst. Géogr. Bot. 1(12): 179 (1904)

El locotípico del *L. humile* es en Walton, Essex, en Reino Unido, pero se distribuí por toda la costa Atlántica Europea. En España, en Vizcaya, Lugo, Asturias (Oviedo), Cantabria (Santander). Las plantas *L. humile* son perenes, tienen hojas de 6-20 x 0,8-3 cm, oblanceoladas a oblongo-ovadas, con un ápice. Estas hojas se disponen en una roseta basal. El escapo es erecto y su tamaño varía entre 10-40 cm. La ramificación del escapo empeza en la mitad inferior. La inflorescencia es del tipo panícula sin ramas estériles. Las ramas de primer orden si disponen bilateralmente, son laxas y forman un ángulo de 30º-40º. Las espigas miden

3 a 8 cm y son densas. Las flores son envueltas por tres brácteas membranácea: bráctea externa, media e interna. La bráctea externa mide 2,8-4,1 x 2,1-3,4 mm, su parte central es carnosa y tiene un ápice que casi llega a la margen. La bráctea media mide 3-4,2 x 1,8-2,5 mm. La bráctea interna mide 4,9-6,1 x 3,1-4 mm, su parte central es carnosa y puede ter o no uno ápice pero nunca llega a la margen. El cáliz con 6.2-7.5 mm puede tener pocos o muchos pelos. Los pétalos son de color rojo violáceos y tienen 7,2-7,8 mm. El L. humile es hexaploide (2n=6x=54).

Es posible observar el hibrído *L. humile* x *L. vulgare* en España: Vizcaya, La Coruña y Cantabria; y en Potugal, en Beira Alta y Beira Litoral.

#### 1.3. Limonium narbonense Miller Gard. Dict. ed. 8 n.° 2 (1768)

- =Statice angustifolia Tausch in Syll. Pl. Nov. 2: 254 (1828)
- =Limonium angustifolium (Tausch) Turrill in Bull. Misc. Inform. Kew 1937: 252 (1937)
- =Statice limonium var. macroclada Boiss. in DC., Prodr. 12: 645 (1848)
- =Statice serotina Rchb., Iconogr. Bot. Pl. Crit. 8: 21 (1830)
- =Limonium serotinum (Rchb.) Pignatti in Giorn. Bot. Ital. 107(5): 220 (1973)
- =Limonium vulgare subsp. serotinum (Rchb.) Gams in Hegi, III. Fl. Mitt.-Eur. 5(3): 1884 (1927)

La indicación locotípica de esta especie es en lo litoral del sur de Francia pero el *L. narbonense* se distribuí por toda a costa mediterránea. En España se puede observar en Alicante, Barcelona, Castellón, Gerona, Huelva, Sevilla, Tarragona y Valencia. Las plantas son perenes, con hojas de 10-35 x 2-8 cm, oblongo-obovadas, con un ápice, se dispondo en una roseta basal. El escapo es erecto y su tamaño varía entre 25-70 cm. La ramificación del escapo empeza en la mitad superior. La inflorescencia es del tipo panícula sin o con pocas ramas estériles. Las ramas de primer orden son laxa a densamente ramificada y forman un ángulo de 45º-65º. Las espigas miden 8 a 35 mm y son compuestas por 4-7 pseudo-espiguillas por cm. Cada pseudo-espiguilla miden 5-6,5 mm y contiene 2 flores, cada una, envuelta por tres brácteas membranácea: bráctea externa, media e interna. La bráctea externa mide 1,3-2,2 x 1,5-1,9 mm, su parte central es carnosa y tiene un ápice que casi llega a la margen. La bráctea media mide 1,8-2,8 x 1,2-1,8 mm. La bráctea interna mide 3,1-4,2 x 2,4-3,1 mm, y su parte central carnosa por veces tiene ápice pero muy rudimentario. El cáliz con 4,8-5,9 mm puede ser glabro o peloso. Los pétalos son de color rojo violáceo-azulados y tienen 7-10 mm. *L. narbonense* es una especie tetraploide (2*n*=4x=36 cromosomas).

**Anexo 2.** Análisis Discriminante utilizando las especies de contraste *L. humile*, *L. narbonense* y *L. vulgare*.

## 2.1. Coeficientes de las funciones de clasificación en el AD.

	Especies	de contraste	
Variables	L. humile	L. narbonense	L. vulgare
Lp	-1,960	-2,841	-2,249
Llh	-,744	,182	,198
Alh	12,287	7,997	7,070
Le1	,576	1,093	,970
Le	-,997	-,787	-,997
Sen	,244	16,466	-2,623
Les	52,059	25,999	31,370
Des	-19,624	-9,789	-11,318
Es	-4,482	6,702	6,599
Fes	11,174	7,404	,086
Lbe	22,778	17,018	20,619
Abe	-59,578	-49,935	-52,180
Lbm	-16,312	-9,027	-11,918
Abm	29,261	15,752	18,907
Lbi	29,705	17,846	21,989
Abi	37,652	34,219	37,849
Lk	113,530	80,828	103,345
Pk	383,423	256,962	179,084
LP	-4,071	1,760	5,735
(Constante)	-591,601	-342,897	-458,557

**2.2.** Asignación de los individuos de las poblaciones a uno de los tres grupos considerados (*Limonium humile -8-, L. narbonense -9-,* y *L. vulgare -10-*), y sus estadísticos.

						mayor		Se	egundo grupo m	nayor	Puntuaciones	discriminantes
Estuarios/ Playa	Número de caso	Grupo real	Grupo pronosticado	P(D>0 G=g	gl	P(G=g   D=d)	Distancia de Mahalanobis al cuadrado hasta el centroide	Grupo	P(G=g   D=d)	Distancia de Mahalanobis al cuadrado hasta el centroide	Función 1	Función 2
	1	test	10	,000	2	1,000	25,272	8	,000	83,672	2,354	5,900
	2	test	9	,007	2	,750	9,949	10	,250	12,150	-3,624	,298
	3	test	10	,141	2	1,000	3,915	9	,000	37,797	-,583	1,996
	4	test	10	,927	2	1,000	,151,	9	,000	41,429	-2,383	3,345
	5	test	8	,000	2	,839	30,363	10	,161	34,199	3,291	,882
	6	test	9	,015	2	1,000	8,423	10	,000	27,926	-1,738	-1,898
	7	test	10	,000	2	1,000	16,542	8	,000	57,509	2,063	3,120
	8	test	10	,426	2	1,000	1,708	9	,000	40,459	-,980	2,559
	9	test	10	,326	2	1,000	2,241	9	,000	43,818	-,680	2,666
	10	test	10	,121	2	1,000	4,229	9	,000	38,998	-,457	2,016
	11	test	8	,000	2	1,000	35,162	9	,000	65,630	3,483	-3,984
	12	test	8	,000	2	,962	50,219	9	,038	57,199	2,717	-4,922
	13	test	9	,000	2	,844	38,951	10	,149	42,419	1,679	-1,997
	14	test	9	,000	2	1,000	20,399	10	,000	63,350	-,325	-4,402
	15	test	9	,000	2	1,000	17,970	10	,000	40,782	-,281	-2,771
	16	test	9	,000	2	1,000	37,602	8	,000	67,668	1,271	-4,743
	17	test	8	,000	2	,504	32,868	10	,496	33,437	2,909	,318
A	18	test	9	,000	2	,995	42,620	8	,005	52,571	1,913	-3,840
Aveiro	19	test	9	,000	2	1,000	71,452	8	,000	107,059	1,605	-8,552
	20	test	10	,000	2	,803	32,749	8	,197	35,027	2,676	,076
	21	test	10	,000	2	,996	31,633	8	,004	42,325	2,022	-,555
	22	test	8	,000	2	1,000	23,987	9	,000	73,252	4,038	-2,829
	23	test	9	,000	2	1,000	43,138	8	,000	76,896	1,282	-5,805
	24	test	9	,000	2	1,000	40,752	8	,000	79,736	1,080	-5,792
	25	test	9	,001	2	,970	15,016	10	,030	21,971	-,962	-1,191
	26	test	9	,007	2	1,000	9,921	10	,000	44,208	-1,413	-3,243
		test	10	,683	2	1,000	,763	9	,000	52,226	-1,176	3,680
	28	test	9	,003	2	1,000	11,688	10	,000	27,290	-1,232	-1,787
	29	test	9	,157	2	1,000	3,698	10	,000	39,017	-5,957	-1,449
	30	test	9	,142	2	1,000	3,897	10	.000	46,596	-2,669	-3,412
	31	test	9	.706	2	1.000	.697	10	.000	39,009	-5,040	-2,073
	32	test	10	,001	2	1,000	15,187	8	,000	60,305	1,897	3,198
	33	test	9	,000	2	1,000	27,656	10	,000	67,640	,440	-4,475
	34	test	10	,020	2	,968	7,798	9	,032	14,618	-3,211	,866
	35	test	9	,006	2	,719	10,192	10	,281	12,075	-2,901	,026
		test	10	,420	2	1,000	1,733	9	.000	35,823	-1,257	2,291
	<b>P P P P P P P P P P</b>		10	,720		1,000	1,700		,500	00,020	1,207	2,231

	37	test	10	,463	2	1,000	1,538	9	.000	61,441	-1,373	4,453
	38	test	9	,000	2	1,000	52,114	8	,000	78,267	1,666	
	39		9	,576	2	1,000	1.104	10	.000	33,818	-3,606	-2,208
	40	test	9	,000		,984	, -	10	,000	25,159	-,609	-1,440
		test			2		16,948			,		
	41 42	test	9	,001	2	,999 ,998	13,016	10 10	,001 .002	26,648 45,671	-1,062 1,237	-1,697
		test			2		33,171		,	,		-2,554
	43	test	9	,001	2	,994	13,318	10	,006	23,650	-1,119	
	44	test		,130	2	1,000	4,081	9	,000	29,155	-1,193	1,527
	45	test	10	,108	2	1,000	4,443	9	,000	21,709	-2,136	
	46	test	10	,180	2	1,000	3,427	9	,000	26,730	-1,635	1,565
	47	test	9	,345	2	1,000	2,128	10	,000	55,722	-3,651	-3,898
	48	test	10	,142	2	1,000	3,898	9	,000	22,855	-2,123	1,410
	49	test	10	,202	2	1,000	3,199	9	,000	37,377	-,756	
	50	test	9	,001	2	1,000	13,312	10	,000	33,859	-,892	-2,333
	51	test	8	,000	2	,929	45,265	9	,071	50,945	2,521	-3,899
	52	test	8	,000	2	,999	52,256	9	,001	65,865	3,069	-5,603
	53	test	9	,434	2	1,000	1,669	10	,000	31,475	-3,422	-2,046
	54	test	9	,000	2	,769	21,795	10	,231	24,201	-,119	-1,167
	55	test	10	,001	2	1,000	14,279	9	,000	38,020	,631	,664
	56	test	9	,054	2	,997	5,828	10	,003	17,623	-3,490	-,543
	57	test	10	,100	2	1,000	4,598	9	,000	21,022	-3,330	1,702
	58	test	10	,000	2	,993	17,675	9	,007	27,619	,118	
	59	test	8	,000	2	,957	29,491	10	,043	36,257	3,238	,403
	60	test	9	,000	2	,837	19,545	10	,163	22,823	-,400	-1,122
	61	test	9	,000	2	1,000	30,200	10	,000	60,723	,855	-3,872
	62	test	8	,000	2	1,000	27,487	9	,000	70,101	3,839	-3,215
Mira	63	test	8	,000	2	1,000	24,085	10	,000	66,856	3,844	-2,343
IVIII G	64	test	9	,000	2	1,000	43,952	8	,000	62,665	1,733	-4,929
	65	test	8	,000	2	1,000	17,735	9	,000	100,824	5,468	-3,757
	66	test	10	,002	2	1,000	12,140	9	,000	32,898	,136	,624
	67	test	9	,000	2	,999	32,164	10	,001	45,897	1,151	-2,619
	68	test	8	,000	2	1,000	37,845	9	,000	54,149	2,825	-3,180
	69	test	8	,052	2	1,000	5,904	10	,000	124,916	7,237	-2,918
	70	test	10	,007	2	1,000	10,071	9	,000	46,637	,690	1,690
	71	test	10	,001	2	,950	14,285	9	,050	20,184	-,801	-,205
	72	test	10	,040	2	1,000	6,426	9	,000	23,650	-4,199	2,126
	73	test	10	,108	2	1,000	4,451	9	,000	38,430	-,447	1,948
	74	test	9	,000	2	,983	25,576	10	,017	33,725	,466	
	75	test	9	,000	2	1,000	28,850	10	,000	111,900	-1,529	
	76	test	9	,000	2	1,000	19,455	10	,000	49,752	-,166	-3,431
	77	test	9	,000	2	1,000	69,309	8	,000	132,434	,650	-9,252
Sado	78	test	10	,003	2	,872	11,774	9	,128	15,605	-1,631	-,032
Jauo	79	test	9	,000	2	1,000	35,385	8	,000	91,646	,447	-6,000
	80	test	8	,001	2	1,000	13,863	10	,000	75,952	4,944	-1,891
	81	test	9	,000	2	,739	49,435	8	,261	50,978	2,313	-4,383
	82	test	9	,073	2	1,000	5,242	10	,000	50,485	-2,452	-3,710

	83	test	8	,000	2	1,000	29,273	10	,000	59,956	3,298	-2,270
	84	test	9	,000	2	,739	38,652	10	,257	40,768	1,638	-1,870
	85	test	9	,000	2	1,000	42,332	8	,000	58,884	1,750	-4,466
	86	test	9	,000	2	1,000	46,289	8	,000	69,080	1,667	-5,557
	87	test	8	,000	2	,677	53,666	9	,323	55,678	2,553	-5,104
	88	test	8	,001	2	1,000	15,059	10	,000	73,053	4,768	-1,844
	89	test	9	,004	2	1,000	10,910	10	,000	57,560	-1,561	-4,194
	90	test	9	,000	2	1,000	55,970	8	,000	80,718	1,767	-6,781
	91	test	10	,038	2	1,000	6,550	9	,000	39,999	-,036	1,734
	92	test	9	,000	2	,979	43,789	8	,021	50,907	2,013	-3,781
	93	test	10	,000	2	,947	18,788	9	,053	24,548	-,088	-,511
	94	test	9	,000	2	1,000	27,503	10	,000	68,928	,389	-4,572
	95	test	9	,000	2	,965	48,497	8	,035	54,589	2,176	-4,641
	96	test	9	,000	2	1,000	30,051	10	,000	79,613	,359	-5,226
	97	test	9	,057	2	1,000	5,746	10	,000	38,172	-2,124	-2,797
	98	test	9	,000	2	,825	15,659	10	,175	18,766	-1,039	-,844
	99	test	10	,050	2	1,000	5,989	9	,000	31,562	-,644	1,341
	100	test	10	,085	2	,999	4,931	9	,001	19,476	-2,580	1,238
	101	test	9	,007	2	,731	10,034	10	,269	12,028	-3,034	,071
	102	test	9	,184	2	1,000	3,381	10	.000	26,871	-4,884	-,924
	103	test	10	,131	2	1,000	4,069	9	,000	21,278	-2,529	1,435
	104	test	9	,000	2	1,000	27,017	10	,000	64,912	,434	-4,301
	105	test	10	,000	2	1,000	22,152	9	,000	44,181	1,457	,182
	106	test	10	,875	2	1,000	,266	9	,000	40,251	-1.700	2,957
	107	test	10	,000	2	,994	29,441	8	,006	39,015	2,354	,137
	108	test	9	,000	2	1,000	54,549	8	,000	135,945	-,134	-8,669
	109	test	10	,001	2	1,000	14,046	9	,000	37,278	,569	,648
	110	test	9	,000	2	,998	55,013	8	,002	66,935	2,145	-5,982
	111	test	9	,000	2	,999	15,765	10	,001	30,523	-,622	-1,971
	112	test	10	,000	2	,821	38,992	9	,137	42,567	1,890	-1,508
	113	test	9	,000	2	,982	21,798	10	,018	29,808	,032	-1,688
T-:-	114	test	9	,166	2	1,000	3,595	10	,000	61,761	-3,510	-4,331
Tejo	115	test	10	,000	2	,918	15,431	9	,082	20,252	-,710	-,331
	116	test	10	,001	2	,984	14,517	9	,016	22,768	-,516	-,130
	117	test	10	,000	2	1,000	16,988	9	,000	38,246	,829	,379
	118	test	9	,000	2	1,000	16,693	10	,000	38,144	-,436	-2,595
	119	test	8	,000	2	1,000	32,706	9	,000	56,659	2,997	-2,339
	120	test	9	,030	2	1,000	6,985	10	,000	85,550	-5,442	-5,203
	121	test	10	,007	2	,739	9,917	9	,261	12,002	-3,326	,526
	122	test	9	,392	2	1,000	1,872	10	,000	35,729	-3,174	-2,480
	123	test	9	,309	2	1,000	2,351	10	,000	62,730	-5,804	-3,564
	124	test	9	,000	2	1,000	63,426	8	,000	90,328	1,799	-7,574
	125	test	8	,001	2	1,000	13,367	10	.000	196,860	9,746	-4,300
	126	test	8	,000	2	1,000	30,807	10	,000	49,319	3,013	-1,542
Viana	127	test	9	,253	2	1,000	2,752	10	.000	51,195	-3,162	-3,679
	128	test	9	,042	2	1,000	6,340	10	.000	31,398	-2,053	-2,223

	129	toot	9	.066	2	1,000	5,449	10	.000	35,096	-2,193	-2,541
	130	test	8	,066	2	1,000	6,173	10	.000	184,630	10,132	-2,747
		test						9	,			
	131 132	test	8	,000	2	1,000	41,929		,000	67,388	3,413	-4,836
		test	9	,017	2	1,000	8,154	10	,000	42,564	-1,694	-3,137
	133	test	10	,044	2	1,000	6,255	9	,000	26,204	-1,071	1,057
	134	test	10	,048	2	1,000	6,060	9	,000	30,228	-4,381	2,770
	135	test	9	,005	2	,964	10,765	10	,036	17,340	-1,877	-,782
	136	test	9	,000	2	1,000	27,089	10	,000	52,310	,647	-3,352
ŀ	137	test	10	,981	2	1,000	,038	9	,000	41,132	-2,089	3,209
	138	test	8	,000	2	1,000	21,863	9	,000	88,850	4,850	-3,752
	139	test	8	,000	2	1,000	36,498	9	,000	59,910	3,165	-3,651
	140	test	9	,000	2	,995	36,245	10	,004	47,125	1,497	-2,529
	141	test	8	,000	2	,991	39,628	9	,009	49,517	2,517	-2,749
	142	test	10	,672	2	1,000	,795	9	,000	35,507	-1,718	2,533
	143	test	8	,000	2	1,000	20,180	10	,000	81,360	4,506	-2,871
	144	test	8	,000	2	,998	40,949	9	,002	54,118	2,775	-3,674
	145	test	10	,342	2	1,000	2,147	9	,000	62,035	-,788	4,210
	146	test	10	,865	2	1,000	,290	9	,000	42,463	-2,526	3,478
	147	test	10	,389	2	1,000	1,887	9	,000	58,681	-2,493	4,661
ŀ	148	test	10	,801	2	1,000	,443	9	,000	37,646	-1,765	2,756
	149	test	8	,000	2	,888,	35,320	10	,112	40,002	2,579	-,987
	150	8	8	,000	2	1,000	17,939	10	,000	60,545	4,299	-1,194
	151	8	8	,604	2	1,000	1,009	10	,000	151,680	9,337	-1,442
ŀ	152	8	8	,046	2	1,000	6,169	10	,000	109,071	8,298	1,618
	153	8	8	,452	2	1,000	1,586	10	,000	158,656	9,666	-1,379
ŀ	154	8	8	,190	2	1,000	3,323	10	,000	133,382	7,902	-2,570
ŀ	155	8	8	,683	2	1,000	,762	10	,000	147,315	9,393	-,816
L. humile	156	8	8	,531	2	1,000	1,267	10	,000	155,095	9,613	-1,129
	157	8	8	,430	2	1,000	1,688	10	,000	138,458	8,391	-2,148
ŀ	158	8	8	,208	2	1,000	3,143	10	,000	123,347	8,827	,891
	159	8	8	,962	2	1,000	,078	10	,000	122,381	8,247	-,798
	160	8	8	,961	2	1,000	,081	10	,000	132,369	8,760	-,703
	161	8	8	,219	2	1,000	3,036	10	,000	166,177	9,622	-2,206
	162	8	8	,272	2	1,000	2,602	10	,000	115,264	8,414	,754
	163	9	9	,903	2	1,000	,205	10	,000	37,988	-4,426	-2,284
	164	9	9	,482	2	1,000	1,458	10	,000	53,595	-3,819	-3,710
	165	9	9	,550	2	1,000	1,195	10	.000	53,417	-3,954	-3,661
	166	9	9	,569	2	1,000	1,126	10	,000	30,791	-4,179	-1,721
	167	9	9	,931	2	1,000	,144	10	,000	46,559	-4,892	-2,798
	168	9	9	,649	2	1,000	.865	10	.000	33,187	-3,860	-2,071
L. narbonense	169	9	9	,928	2	1,000	,149	10	,000	39,941	-4,175	-2,552
	170	9	9	,032	2	1,000	6,869	10	,000	48,446	-6,877	-1,581
	171	9	9	,810	2	1,000	,422	10	.000	46,697	-5,167	-2,673
	172	9	9	,626	2	1,000	,935	10	,000	51,312	-5,474	-2,882
	173	9	9	,020	2	1,000	2,651	10	.000	27,190	-5,474 -4,657	-2,002
	174	9	9	,200 ,891	2	1,000	,230	10	.000	48,667	-4,65 <i>1</i> -4,367	-1,102

	175	9	9	,348	2	1,000	2,112	10	,000	64,654	-5,311	-3,945
	176	9	9	,200	2	1,000	3,223	10	,000	39,298	-2,728	-2,845
	177	9	9	,968	2	1,000	,065	10	,000	41,014	-4,302	-2,594
	178	9	9	,556	2	1,000	1,176	10	,000	50,167	-3,744	-3,483
	179	9	9	,805	2	1,000	,433	10	,000	52,562	-4,903	-3,261
	180	10	10	,479	2	1,000	1,473	9	,000	61,068	-1,663	4,547
	181	10	10	,377	2	1,000	1,951	9	,000	54,296	-2,884	4,459
	182	10	10	,954	2	1,000	,093	9	,000	45,489	-1,691	3,396
	183	10	10	,449	2	1,000	1,601	9	,000	38,888	-3,261	3,382
	184	10	10	,559	2	1,000	1,162	9	,000	54,249	-,977	3,731
	185	10	10	,681	2	1,000	,769	9	,000	55,995	-1,715	4,211
	186	10	10	,716	2	1,000	,668	9	,000	54,194	-1,403	3,943
	187	10	10	,937	2	1,000	,130	9	,000	41,065	-1,802	3,077
L. vulgare	188	10	10	,421	2	1,000	1,732	9	,000	60,700	-,977	4,213
	189	10	10	,817	2	1,000	,404	9	,000	41,837	-2,627	3,459
	190	10	10	,705	2	1,000	,700	9	,000	53,852	-1,326	3,881
	191	10	10	,899	2	1,000	,213	9	,000	42,286	-1,630	3,099
	192	10	10	,799	2	1,000	,450	9	,000	35,744	-2,033	2,711
	193	10	10	,592	2	1,000	1,047	9	,000	50,913	-2,657	4,162
	194	10	10	,657	2	1,000	,839	9	,000	32,422	-2,290	2,513
	195	10	10	,121	2	1,000	4,217	9	,000	20,927	-2,552	1,404
	196	10	10	,100	2	1,000	4,612	9	,000	20,358	-2,444	1,280

# **Anexo 3.** Análisis discriminante utilizando las especies de contraste *L. humile*, *L. narbonense*, *L. vulgare* y Viana.

3.1. Coeficientes de las funciones de clasificación en el AD.

	Especies of	de contraste o pobla	ciones	
Variables	L. humile	L. narbonense	L. vulgare	Viana
Lp	1,106	-,849	-,106	-,869
Llh	,308	,909	1,106	,952
Alh	-4,520	-3,132	-5,561	-2,494
Le1	-,303	,456	,309	-,012
Le	-,210	-,260	-,427	-,477
Sen	35,553	40,433	23,395	18,485
Les	20,208	7,173	9,799	11,296
Des	-3,327	,334	-,017	-1,008
Es	-4,171	7,438	7,237	1,866
Fes	6,551	,316	-8,004	17,069
Lbe	5,241	5,449	8,401	2,039
Abe	13,505	-2,465	-,918	,598
Lbm	3,193	4,187	2,969	4,876
Abm	-,215	-7,310	-5,780	-8,479
Lbi	3,735	2,184	2,901	2,302
Abi	32,853	29,294	35,138	26,299
Lk	93,755	71,317	92,261	79,903
Pk	-327,952	-208,775	-322,381	-181,244
LP	10,858	10,377	15,634	4,597
(Constante)	-366,759	-252,985	-351,426	-267,300

**3.2.** Asignación de los individuos de las poblaciones a uno de los cuatro grupos considerados (*Limonium humile* -8-, *L. narbonense* -9-, *L. vulgare* -10-, y Viana -11-), y sus estadísticos.

				(	3rupo r	nayor			Segundo grupo	mayor	Puntuac	iones discrim	inantes
Estuarios/ Playa	Número de caso	Grupo real	Grupo pronosticado	P(D>d   0	G=g) gl	P(G=g   D=d)	Distancia de Mahalanobis al cuadrado hasta el centroide	Grupo	P(G=g   D=d)	Distancia de Mahalanobis al cuadrado hasta el centroide	Función 1	Función 2	Función 3
	1	test	10	,000	3	1,000	25,778	8	,000	60,833	2,446	5,263	-3,02
	2	test	9	,018	3	,629	10,118	10	,371	11,178	-2,652	,761	,64
	3	test	10	,109	3	1,000	6,056	9	,000	33,722	-,078	1,934	-,79
	4	test	10	,009	3	1,000	11,500	9	,000	47,297	-2,484	4,536	2,46
	5	test	8	,000	3	,791	21,904	10	,209	25,104	2,345	,880	-,7
	6	test	9	,004	3	,678	13,479	11	,322	12,884	-1,802	-2,922	-1,7
	7	test	10	,000	3	,999	20,566	8	,001	33,211	2,315	2,354	-2,08
	8	test	10	,211	3	1,000	4,518	9	,000	36,412	-1,455	2,159	-2,18
	9	test	10	,003	3	1,000	14,053	11	,000	35,660	,305	1,710	-3,13
	10	test	10	,002	3	1,000	14,872	11	,000	29,090	-1,437	,736	-3,20
	11	test	11	,003	3	,987	13,876	9	,013	24,578	-2,955	-4,324	-2,97
	12	test	9	,002	3	,991	14,467	11	,009	21,833	-3,158	-4,731	-1,3
	13	test	9	,175	3	1,000	4,961	10	,000	26,806	-3,950	-1,012	-,3
	14	test	9	,019	3	1,000	9,907	10	,000	69,214	-6,544	-2,850	1,2
	15	test	9	,000	3	1,000	22,763	10	,000	67,013	-7,376	-2,292	-1,26
	16	test	9	,017	3	1,000	10,243	11	,000	57,648	-5,796	-3,837	,00
	17	test	10	,000	3	,921	18,892	9	,079	23,812	-3,589	,260	-2,7
Aveiro	18	test	11	,000	3	,992	19,203	9	,008	30,912	-3,724	-4,607	-3,5
	19	test	9	,000	3	,738	50,666	11	,262	50,651	-4,414	-8,566	-1,5
	20	test	10	,001	3	,964	16,048	9	,036	22,607	-2,803	,249	-2,5
	21	test	9	,006	3	,950	12,361	10	,050	18,248	-3,367	-,231	-1,4
	22	test	11	,408	3	1,000	2,898	9	,000	37,305	-1,008	-3,656	-3,9
	23	test	9	,000	3	,875	35,689	11	,125	37,493	-4,946	-6,312	-2,5
	24	test	9	,000	3	1,000	18,132	11	,000	38,563	-4,633	-5,474	-,9
	25	test	9	,000	3	,751	22,526	11	,166	23,463	,638	-,888	-,5
	26	test	11	,150	3	1,000	5,318	9	,000	33,691	,839	-4,337	-1,7
	27	test	10	,224	3	1,000	4,376	9	,000	51,086	-1,335	3,182	-2,7
	28	test	9	,011	3	1,000	11,126	10	,000	28,345	-,389	-1,268	,60
	29	test	9	,344	3	1,000	3,329	10	,000	30,380	-4,473	-,681	1,30
	30	test	9	,001	3	,998	17,659	11	,002	28,223	-4,365	-4,050	-2,18
	31	test	9	,731	3	1,000	1,293	10	,000	30,298	-3,347	-1,070	1,56
	32	test	10	,073	3	1,000	6,966	8	,000	49,182	,806	3,685	-,3
	33	test	9	,502	3	1,000	2,356	11	,000	56,031	-3,877	-3,612	1,90
	34	test	10	,029	3	,913	9,035	9	,087	13,734	-3,345	1,267	,16
	35	test	11	,000	3	,579	19,676	9	,393	22,537	-2,351	-1,051	-2,99

	26	toot	10	202	2	1,000	3,725	9	,000	31,916	-1,173	2,024	1 405
	36 37	test test	10 10	,293	3	1,000	7,832	9	,000	58,598	-1,173	3.347	-1,495 -3,521
	38		11	,000	3	1,000	59,303	9	,000	88,785	-5,788	-8,280	-5,339
	39	test	9	,486	3	1,000	2,443	10	,000	35,218	-3,766	-1,949	-,066
	40	test	9	,486	3	,991	14,713	11	,000	22,104	-3,546 -2,921	-1,632	-2,279
		test	11	,817	3	1,000		9				-3,273	
	41 42	test test	11	.000	3	1,000	,934 18,931	9	,000	48,531 37,922	,341 -3,737	-3,273 -4,315	-4,256 -4,301
	43	test	11	,000	3	,831	12,007	9	,169	17,269	-3,737	-2,061	-1,707
	43 44	test	10	,007	3	,979	18,948	11	,021	24,510	,299	-2,061	-3,056
	44 45	test	10	,000	3	,979	6,315	9	,002	18,867	-1,412	1,287	-3,036
	45 46	test	10	,042	3	,998	8,223	9	,002	20,238	-1,412	1,046	-1,523
	4 <del>0</del> 47		9	,042	3	,996	11,795	11	,002	20,236	-2,514	-4,582	-,833
	48	test test	10	,005	3	,990	12,661	9	,004	22,350	-3,479	.865	-,oss -2,127
	49	test	10	,003	3	1,000	9,797	9	,000	31,577	-2,641	1,424	-2,741
	50	test	11	,020	3	1,000	22,708	9	,000	44,907	-4,081	-4,106	-4,920
	51	test	9	,000	3	1,000	9,731	11	,000	24,918	-,812	-3,629	,695
	52	test	11	,000	3	1,000	25,591	9	,000	74,695	-2,998	-7,494	-5,338
	53	test	9	,688	3	1,000	1,474	10	,000	32,216	-2,682	-1,742	.672
	54	test	9	,000	3	,999	18,697	10	,000	31,960	-2,062 ,451	-,548	2,248
	55	test	10	.002	3	.997	14,445	9	.003	25,901	-,680	1,947	2,240
	56	test	9	,394	3	1,000	2,982	10	,003	23,901	-3,616	-,583	,878,
	57	test	10	,350	3	1,000	3,286	9	,000	23,876	-1,745	1,879	-,595
	58	test	10	,000	3	,708	19,434	9	,277	21,308	,007	-,330	-,917
	59	test	11	,000	3	,934	23,920	8	,052	31,242	2,431	.171	-2,775
	60	test	9	.006	3	,994	12,614	11	,005	20,995	-,813	-1,370	-,730
	61	test	9	,000	3	1,000	6,905	11	,000	28,031	-1,114	-3,174	,846
	62	test	11	,073	3	1,000	4,988	9	,000	24,454	-,554	-3,770	-2,195
	63	test	11	,021	3	,998	9,782	9	,002	24,440	,501	-2,449	-1,458
Mira	64	test	9	,009	3	1,000	11,587	11	,000	45,557	-5,033	-4,592	-,372
	65	test	11	,000	3	,993	18,559	9	,007	30,683	1,689	-3,646	,076
	66	test	10	,002	3	,999	15,233	9	,001	29,380	,452	,521	-1,095
	67	test	11	,255	3	1,000	4,063	9	,000	27,058	-,380	-3,233	-2,578
	68	test	11	,179	3	1,000	4,901	9	,000	24,977	-,313	-3,644	-2,117
	69	test	11	,536	3	1,000	2,178	9	,000	34,370	,378	-3,740	-2,669
	70	test	10	,013	3	1,000	10,847	9	,000	38,289	,774	1,643	-,874
	71	test	10	,001	3	,984	16,414	9	,016	24,662	,448	,366	-,179
	72	test	10	,001	3	,998	15,968	9	,002	28,176	-5,220	2,803	1,138
	73	test	10	,049	3	1.000	7,867	9	,000	37,517	-,706	1.684	-2,373
	74	test	9	,022	3	1,000	9,625	11	,000	24,007	-,822	-1.724	-,068
-	75	test	9	,001	3	1,000	16,847	11	,000	53,619	-3,281	-6,286	1,780
	76	test	9	,252	3	1,000	4,090	10	,000	42,193	-1,528	-2,181	2,033
Sado	77	test	9	,000	3	1,000	40,896	11	,000	67,138	-2,816	-8,538	1,979
	78	test	10	.001	3	,996	17,117	9	.004	28,040	.306	1,470	2,040

	79	test	9	.014	3	1,000	10,634	11	.000	68,523	-2,379	-4,357	3,660
	80	test	11	.006	3	,998	12,554	9	,002	26,780	,495	-1,479	-1,771
	81	test	9	.070	3	1,000	7,048	11	,000	24,348	-2,804	-3,830	-,510
	82	test	9	,059	3	1,000	7,457	11	,000	42,240	-4,806	-3,487	-,528
	83	test	9	,075	3	1,000	6,915	10	,000	33,492	-3,627	-1,796	-1,119
	84	test	9	,127	3	1,000	5,702	10	,000	23,768	-3,718	-,790	-,439
	85	test	9	,001	3	1,000	15,766	11	,000	29,080	-4,305	-4,233	-1,831
	86	test	9	,000	3	1,000	18,574	11	,000	49,825	-5,614	-5,121	-,856
	87	test	9	,009	3	1,000	11,647	11	,000	34,269	-4,190	-4,692	-,740
	88	test	11	,020	3	1,000	9,788	9	,000	29,714	-1,911	-2,349	-3,746
	89	test	9	,619	3	1,000	1,781	10	,000	57,389	-4,096	-2,762	2,510
	90	test	9	,000	3	1,000	21,030	11	,000	36,405	-3,725	-6,347	-,459
	91	test	10	,122	3	1,000	5,795	9	,000	25,471	-3,550	2,087	-1,193
	92	test	9	,011	3	1,000	11,074	11	,000	30,756	-4,252	-3,575	-1,452
	93	test	9	,052	3	,965	7,730	10	,035	14,354	-3,202	,427	,596
	94	test	9	,370	3	1,000	3,145	11	,000	41,177	-3,967	-3,512	,393
	95	test	9	,640	3	1,000	1,687	11	,000	45,235	-3,647	-3,428	1,097
	96	test	9	,054	3	1,000	7,626	11	,000	51,940	-4,904	-4,382	,582
	97	test	9	,960	3	1,000	,303	10	,000	38,330	-3,727	-1,911	1,080
	98	test	9	,048	3	,994	7,904	10	,006	17,972	-2,621	,452	1,876
	99	test	10	,071	3	1,000	7,021	9	,000	22,291	-3,438	1,659	-1,249
	100	test	10	,197	3	1,000	4,682	9	,000	26,911	-,736	1,901	-,148
	101	test	9	,049	3	,956	7,872	10	,044	14,029	-3,098	,336	,327
	102	test	9	,276	3	1,000	3,871	10	,000	23,208	-3,738	-,583	,382
	103	test	10	,013	3	,997	10,697	9	,003	22,085	-3,393	1,070	-1,902
	104	test	11	,024	3	,995	9,404	9	,005	21,932	-1,708	-4,652	-2,102
	105	test	11	,000	3	,835	19,828	10	,159	25,227	,887	-,461	-1,629
	106	test	10	,019	3	1,000	9,991	8	,000	54,706	,617	4,294	1,192
	107	test	8	,000	3	,998	18,846	11	,002	30,133	4,076	-,189	-2,595
	108	test	9	,000	3	1,000	36,272	11	,000	55,201	-2,010	-8,034	1,731
	109	test	8	,000	3	,997	20,522	10	,003	32,689	2,601	1,597	2,240
	110	test	11	,000	3	,997	22,350	9	,003	36,093	1,093	-5,925	,308
	111	test	9	,206	3	1,000	4,574	10	,000	26,909	-2,201	-1,444	-,072
	112	test	9	,012	3	,997	10,867	10	,003	22,820	-,729	-,368	1,544
Tejo	113	test	9	,313	3	1,000	3,561	10	,000	23,653	-2,286	-,761	1,169
	114	test	9	,007	3	1,000	12,012	10	,000	81,314	-6,572	-3,720	1,198
	115	test	9	,005	3	,955	12,847	10	,045	18,964	-,574	-,236	,695
	116	test	10	,000	3	,697	20,626	9	,252	22,661	,165	-,398	-1,016
	117	test	11	,000	3	,889	23,277	8	,063	30,121	2,132	,017	-2,238
	118	test	11	,042	3	,992	8,198	9	,008	19,879	-1,577	-3,406	-2,376
	119	test	9	,000	3	,998	18,012	11	,002	28,718	,580	-1,380	,509
	120	test	9	,127	3	1,000	5,695	11	,000	57,330	-3,575	-4,452	2,248
	121	test	10	,005	3	,932	13,063	9	,068	18,307	-,514	,340	-,293

	122	test	9	,103	3	1,000	6,194	10	,000	48,963	-5,383	-2,297	-,116
	123	test	9	.000	3	1,000	21,410	10	.000	76.698	-6,064	-1.175	5,169
	124	test	9	,000	3	,929	41,922	11	,071	44,969	-4,686	-7,638	-1,818
	125	11	11	,781	3	1,000	1,082	9	,000	63,405	,721	-5,004	-4,685
	126	11	11	,518	3	1,000	2,270	9	,000	67,875	,721	-3,654	-5,466
	127	11	11	,494	3	1,000	2,398	9	,000	46,832	-,530	-5,224	-3,912
Viana	128	11	11	,737	3	1.000	1,268	9	.000	37,308	.142	-3,530	-3,266
	129	11	11	,535	3	1,000	2,182	9	,000	32,385	-,106	-3,654	-2,877
	130	11	11	,226	3	1,000	4,354	8	,000	57,229	2,684	-4,023	-4,148
	131	test	9	.000	3	,955	21,649	11	,045	25,687	-3,995	-5,086	-2,135
Guadiana	132	test	9	,022	3	,991	9,635	11	,009	17,005	-2,119	-3,305	-1,090
	133	test	10	.022	3	.999	9,627	9	,001	23,366	-1,635	.791	-1,851
	134	test	10	.016	3	1,000	10,281	9	,000	36,196	-4,323	2,425	-2,280
	135	test	9	,000	3	1,000	19,127	10	,000	37,299	-4,561	-1,408	-2,686
	136	test	11	,000	3	,961	19,624	9	,039	28,140	-3,779	-3,769	-3,582
	137	test	10	,307	3	1,000	3,605	9	,000	42,860	-1,765	2,785	-2,415
	138	test	11	,087	3	1,000	6,560	9	,000	27,637	-1,772	-4,136	-3,107
	139	test	9	,004	3	,968	13,564	11	,032	18,277	-3,025	-3,717	-1,850
	140	test	9	,006	3	,972	12,502	11	,028	17,480	-2,537	-2,431	-1,927
Formosa	141	test	9	,000	3	,972	30,575	11	,028	35,568	-5,305	-3,556	-3,562
	142	test	10	,036	3	1,000	8,573	9	,000	32,822	-3,565	2,026	-2,395
	143	test	11	,087	3	,999	6,565	9	,001	23,603	-,200	-2,783	-2,069
	144	test	11	,062	3	1,000	7,331	9	,000	32,741	-2,070	-4,301	-3,659
	145	test	10	,740	3	1,000	1,256	9	,000	51,905	-2,423	4,306	-1,443
	146	test	10	,122	3	1,000	5,796	9	,000	57,024	,327	4,211	,239
	147	test	10	,300	3	1,000	3,665	9	,000	60,217	-2,958	4,849	-1,736
	148	test	10	,561	3	1,000	2,057	9	,000	31,737	-1,884	2,398	-1,372
	149	test	11	,006	3	1,000	12,568	10	,000	31,006	,640	-1,002	-2,492
	150	8	8	,012	3	1,000	11,026	11	,000	37,075	3,502	-,716	,025
	151	8	8	,778	3	1,000	1,098	11	,000	88,162	7,256	-,596	1,515
	152	8	8	,072	3	1,000	6,982	10	,000	72,553	6,555	2,584	,448
	153	8	8	,546	3	1,000	2,131	11	,000	99,164	7,954	-,313	1,436
	154	8	8	,379	3	1,000	3,086	11	,000	71,171	6,465	-1,676	1,469
	155	8	8	,748	3	1,000	1,221	11	,000	92,407	7,723	-,111	,959
L. humile	156	8	8	,981	3	1,000	,178	11	,000	83,292	7,020	-,125	1,009
	157	8	8	,534	3	1,000	2,189	11	,000	62,042	5,796	-1,231	1,079
	158	8	8	,269	3	1,000	3,934	10	,000	75,609	6,638	1,810	,140
	159	8	8	1,000	3	1,000	,009	11	,000	79,580	6,718	-,004	,917
	160	8	8	,998	3	1,000	,034	11	,000	81,617	6,761	,055	1,018
	161	8	8	,662	3	1,000	1,587	11	,000	77,315	6,630	-1,101	1,556
	162	8	8	,558	3	1,000	2,070	10	,000	86,138	7,076	1,227	,349
L. narbonense	163	9	9	,371	3	1,000	3,134	11	,000	34,952	-3,605	-2,502	-,264
L. Harborionse	164	9	9	,102	3	1,000	6,195	11	,000	24,114	-2,166	-3,683	-,036

										,			
	165	9	9	,861	3	1,000	,753	10	,000	52,842	-3,473	-2,792	2,107
	166	9	9	,466	3	1,000	2,555	10	,000	27,865	-2,449	-1,394	,545
	167	9	9	,950	3	1,000	,353	10	,000	45,328	-3,374	-2,233	2,060
	168	9	9	,825	3	1,000	,902	10	,000	33,988	-3,110	-1,388	1,817
	169	9	9	,859	3	1,000	,759	10	,000	36,911	-2,780	-1,759	1,772
	170	9	9	,015	3	1,000	10,411	10	,000	48,366	-6,254	-1,617	-,051
	171	9	9	,521	3	1,000	2,254	10	,000	47,536	-4,932	-1,948	1,715
	172	9	9	,795	3	1,000	1,025	10	,000	46,238	-3,311	-2,116	2,471
	173	9	9	,091	3	1,000	6,465	10	,000	34,488	-4,465	-1,552	-,775
	174	9	9	,943	3	1,000	,388,	10	,000	50,007	-3,870	-2,631	1,678
	175	9	9	,024	3	1,000	9,449	10	,000	67,881	-3,200	-2,497	4,522
	176	9	9	,153	3	1,000	5,266	11	,000	29,948	-1,303	-2,476	,778
	177	9	9	,589	3	1,000	1,919	10	,000	41,488	-3,054	-1,633	2,670
	178	9	9	,600	3	1,000	1,870	11	,000	38,967	-3,494	-3,199	,545
	179	9	9	,192	3	1,000	4,739	10	,000	55,300	-4,174	-1,931	3,518
	180	10	10	,458	3	1,000	2,596	9	,000	64,625	-,899	4,908	-1,269
	181	10	10	,110	3	1,000	6,024	9	,000	59,508	-2,950	5,442	,533
	182	10	10	,785	3	1,000	1,069	9	,000	44,528	-1,784	4,130	,189
	183	10	10	,918	3	1,000	,505	9	,000	41,367	-2,496	3,695	-,913
	184	10	10	,247	3	1,000	4,142	9	,000	58,617	-,092	3,825	-1,830
	185	10	10	,700	3	1,000	1,422	9	,000	58,027	-1,367	4,490	-1,505
	186	10	10	,890	3	1,000	,627	9	,000	50,760	-1,509	4,022	-1,395
	187	10	10	,969	3	1,000	,248	9	,000	39,603	-1,646	3,291	-1,004
L. vulgare	188	10	10	,857	3	1,000	,768	9	,000	54,241	-1,487	4,485	-,903
	189	10	10	,568	3	1,000	2,020	9	,000	42,622	-2,104	3,143	-2,023
	190	10	10	,451	3	1,000	2,635	9	,000	48,871	-2,215	4,614	,524
	191	10	10	,909	3	1,000	,543	9	,000	34,466	-2,317	3,201	-,524
	192	10	10	,719	3	1,000	1,344	9	,000	32,507	-2,684	2,938	-,873
	193	10	10	,459	3	1,000	2,591	9	,000	56,560	-2,044	5,052	,071
	194	10	10	,683	3	1,000	1,499	9	,000	28,586	-1,839	2,477	-,543
	195	10	10	,126	3	,999	5,717	9	,001	19,814	-2,405	1,379	-,952
	196	10	10	,126	3	1,000	5,715	9	,000	23,638	-,874	1,546	-,223