

## VARIACIÓN GENÉTICA DE LOS *Lotus* L. (FABACEAE: LOTEAE) DE PINAR EN GRAN CANARIA

FELICIA OLIVA TEJERA<sup>1</sup>, JULI CAUJAPÉ-CASTELLS<sup>1</sup>, JOSÉ NARANJO SUÁ-REZ<sup>1</sup>, JOSEFA NAVARRO DÉNIZ<sup>1</sup>, JUAN RAMÓN ACEBES GINOVÉS<sup>2</sup> & DAVID BRAMWELL<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Jardín Botánico Canario Viera y Clavijo. Ap. de correos 14 de Tafira Alta. 35017. Las Palmas de Gran Canaria. España. e-mail: (foliva@grancanaria.com, julicaujape@grancanaria.com, jnaranjo@grancanaria.com, pnavarro@grancanaria.com, dbramwell@grancanaria.com)  
<sup>2</sup> Departamento de Biología Vegetal (Botánica). Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38071 La Laguna. Tenerife. España. e-mail: (jacebes@ull.es)

**Recibido:** Marzo 2004

**Palabras clave:** *Lotus*, Islas Canarias, endemismos, isoenzimas, diversificación, taxonomía.

**Keywords:** *Lotus*, Canary Islands, endemics, isozymes, diversification, taxonomy.

### RESUMEN

Hemos utilizado los datos moleculares de isoenzimas a partir de 17 *loci* en 14 poblaciones que representaban los *Lotus* endémicos del bosque de pinar en Gran Canaria (*L. genistoides*, *L. holosericeus* y *L. spartioides*, y algunas poblaciones de adscripción taxonómica ambigua, denominados como *Lotus sp.*) para entender su diversificación y relaciones sistemáticas a través de los niveles y distribución de su variación genética. Los indicadores básicos de polimorfismo isoenzimático muestran altos valores de variación que presumiblemente se han mantenido a través de un predominio de la consanguinidad para la reproducción en un contexto de estabilidad ambiental y alto flujo génico. De acuerdo con esto detectamos una considerable homogeneidad genética interpoblacional según los valores de *Fst* y de *Gst*. Aunque los valores de *Gst* aumentaron sustancialmente cuando los taxones considerados fueron reunidos en diferentes combinaciones (lo que alude a un incipiente aislamiento reproductivo), las bajas distancias genéticas revelan una estrecha relación que entra dentro del rango esperado para poblaciones co-específicas. Estos datos pueden tener implicaciones importantes sobre la taxonomía de este grupo cuando se completen los estudios morfológicos en curso.

### SUMMARY

We used molecular data from 17 isozyme *loci* in 14 populations representing four taxonomically problematic Gran Canarian pine forest endemic *Lotus* (*L. genistoides*, *L. holosericeus*, *L. spartioides*, and some populations of ambiguous taxonomic ascription, designed as *Lotus sp.*) to understand their systematic relationships through their levels of genetic variation. The basic indicators of polymorphism show overall high values of variation that have probably been maintained through a predominance of

inbreeding for reproduction in a context of environmental stability and abundant gene flow. Consistently, we detected a considerable inter-population genetic homogeneity as measured by  $F_{st}$  and  $G_{st}$ . Even though a substantial increase in the values of  $G_{st}$  occurred when taxa were grouped in pair-wise combinations (suggesting an incipient reproductive isolation), the low genetic distances reveal a tight relationship that falls within the range expected for co-specific populations. These data may have important taxonomic implications when ongoing morphological studies are completed.

## INTRODUCCIÓN

*Lotus* L. (Fabaceae: Loteae) es un género de distribución en la actualidad casi cosmopolita, con representantes en todos los continentes y con una concentración especial en las regiones mediterránea y macaronésica. Contiene alrededor de 150 especies, de las cuales unas 47 se distribuyen en la región Macaronésica. Existen 24 especies en el archipiélago canario, de las cuales 18 son endémicas según BRAMWELL (2002) y ACEBES *et al.* (2001). El género *Lotus* es de gran interés económico tanto por el valor forrajero de un gran número de sus especies, como por la utilización de otras a nivel ornamental y de jardinería.

De las 12 especies de *Lotus* con las que cuenta Gran Canaria, las seis de la sección *Pedrosia* (Lowe) Brand ex Valdés tienen considerable importancia en la biogeografía de la región Macaronésica, siendo de los pocos grupos de endemismos con representantes presentes en todos los archipiélagos (Madeira, Azores, Salvajes, Canarias e islas de Cabo Verde), así como en el “enclave macaronésico” del sur de Marruecos (SUNDING, 1979) y en la Península Ibérica (VALDÉS, 2000). Cinco de estas especies se incluyen en *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España* (BAÑARES *et al.*, 2003) en las categorías: en peligro crítico (*L. arinagensis* Bramwell, *L. kunkelii* (Esteve) Bramwell & Davis y *L. genistoides* Webb ex Pit & Proust), en peligro (*L. callis-viridis* Bramwell & Davis) y en vulnerable (*L. spartioides* Webb & Berthel.). En menor riesgo (*L. holosericeus* Webb & Berthel.) se incluye en la Lista Roja de la Flora Vascular Española (VV.AA, 2000)

Aunque algunas de estas seis especies son fácilmente reconocibles, la distinción taxonómica entre *L. holosericeus*, *L. genistoides* y *L. spartioides* no se basa en caracteres morfológicos distintivos. Parte de las dificultades de este grupo provienen del hecho de que las distribuciones ecológicas de algunos de estos taxones se solapan en zonas de pinar de Gran Canaria, lo cual supone un elemento de dificultad que se añade a su similitud morfológica. Parece claro que la confusión actual en la distinción de estos taxones es también debida a que estas especies posiblemente hayan sido mal interpretadas y nunca han sido estudiadas en profundidad (tanto taxonómicamente como nomenclaturalmente).

Este contexto de incertidumbre para estos *Lotus* endémicos de Gran Canaria sugiere que probablemente un examen con marcadores moleculares contribuya a una mejor comprensión de sus relaciones taxonómicas y de su diversificación. A diferencia de las variables morfológicas, muchos de los marcadores moleculares poblacionales se comportan como neutrales y son así menos propensos a ser influenciados por la adaptación. Por esta razón, los datos de diversidad genética a partir de marcadores moleculares poblacionales son generalmente más

adecuados que los rasgos morfológicos para comprender la diversificación post-colonizadora y las relaciones sistemáticas.

Este estudio presenta datos genéticos basados en la electroforesis de proteínas para 14 poblaciones del “complejo *Lotus* de pinar” de Gran Canaria. Nuestro objetivo específico es entender la diversificación de este complejo a través de los niveles de la distribución de la variación genética y obtener así información que puede ser relevante para clarificar u orientar aspectos taxonómicos actualmente ambiguos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Descripción y distribución de los táxones

Este trabajo se centra en las poblaciones de *Lotus* de los pinares de Gran Canaria constituidas por los taxones: *L. genistoides*, *L. spartioides* y *L. holosericeus* tal y como se consideran generalmente en la actualidad. A continuación se muestran unas pequeñas descripciones así como su corología, hábitat y ecología para cada taxon.

#### ***Lotus genistoides***

*Lotus genistoides* Webb ex Pitard & Proust, *Iles Canaries*: 166 (1908), *nom nud.*

Corología: Es una de las especies menos conocidas de Gran Canaria, cuya única localidad está en los riscos de la Caldera de Tirajana, La Culata (BRAMWELL & BRAMWELL, 2001), 1400 -1700 m.

Descripción: Arbustillo robusto, hasta 60 cm de altura, leñoso en la base, erecto o decumbente. Folíolos oblanceolados, obovados o subespatulados, hasta 1.5 cm de largo, densamente vellosos y plateados. Inflorescencias en los ápices de las ramas, pedúnculos cortos. Flores agrupadas, 6-8 en cada pedúnculo. Cáliz campanulado. Corola amarilla. Legumbres marrón-rojizas o negruzcas, hasta 2.5 cm de largo (BAÑARES *et al.*, 2003). Con n=7 (ALDRIDGE & ORTEGA, 1976); realizado con material de Guayadeque, en donde no hemos encontrado la especie.

Hábitat y ecología: sobre derrubios de ladera y andenes con suficiente suelo. Como especies acompañantes pueden citarse: *Echium onosmifolium* Webb, *Teline microphylla* (DC.) P.E. Gibbs & Dingwall, *Gonospermum ptarmiciflorum* (Webb & Berthel.) Febles, *Globularia sarcophylla* Svent., *Micromeria benthamii* Webb & Berthel., *Carlina canariensis* Pit., etc.

#### ***Lotus spartioides***

*Lotus spartioides* Webb & Berthel., *Phyt. Canar.* 3(2): 81 (1842), t. 64 (1843)

Corología: Quizás de las especies más abundante en las cumbres del noroeste de Gran Canaria es el “corazoncillo de la cumbre”. Común localmente en el Pinar de Tamadaba (BRAMWELL & BRAMWELL, 2001), 1000-1400 m.

Descripción: Pequeño arbusto con las ramas delgadas, procumbentes o suberectas, algo leñoso en la base. Folíolos más o menos lineares o estrechamente oblanceolados, 5-15 mm de largo, cubiertos con pelos cortos, blanquecinos. Flores de color amarillo subido, 2-5 por pedúnculo. Cáliz con listas purpúreas. Legumbre marrón oscuro, de hasta 2 cm de largo (BAÑARES *et al*, 2003). Con  $2n=14$  (ORTEGA, 1976), material de Tamadaba y de la Caldera de Los Marteles.

Hábitat y ecología: Pinares y matorral de monte asociado, jarales. Es particularmente abundante en las cunetas de las carreteras. Como especies acompañantes pueden citarse: *Teline microphylla* (DC.) P.E. Gibbs & Dingwall, *Cistus monspeliensis* L., *Cistus symphytifolius* Lamarck, varias especies de *Echium*, varias especies de *Micromeria*, etc.

### ***Lotus holosericeus***

*Lotus holosericeus* Webb & Berthel., *Phyt. Canar.* 3(2): 83 (1842)

Corología: Es el más ampliamente distribuido en el centro sur de la isla, el "corazoncillo peludo", *Lotus holosericeus*, Caldera de Tirajana, común por la zona de San Bartolomé, del Paso de La Plata, Barranco de Fataga, Pilancones (BRAMWELL, & BRAMWELL, 2001), 600-1100 m (a veces hasta 1300 m).

Descripción: Como *L. spartioides* pero toda la planta cubierta con pelos largos y sedosos, y los racimos con 6-10 flores (BRAMWELL & BRAMWELL, 2001). Con  $2n=14$  (ORTEGA, 1976), material de San Bartolomé de Tirajana;  $n=7$  (BRAMWELL, HUMPHRIES, MURRAY & OWENS, 1972), material de San Bartolomé de Tirajana.

Hábitat y ecología: En claros de pinar y en los matorrales de la zona de los bosques de pino canario. Como especies acompañantes pueden citarse: *Euphorbia regis-jubae* J. Gay, *Cistus symphytifolius* Lamarck, *Echium onosmifolium* Webb, *Aeonium percarneum* (R.P. Murray) Pitard & Proust, *Micromeria benthami* Webb & Berthel., etc.

En la actualidad, los datos disponibles para estos táxones da lugar a ambigüedades, que se sintetizan en los siguientes tres puntos:

1. El nombre de *L. genistoides* se usa para referirse a las poblaciones de *Lotus* que se encuentran en los riscos de Tirajana (Cañadón del Jierro) (Webb ex PITARD & PROUST, 1908) no existe descripción original de este taxón, tan sólo existe el pliego. Además el material usado para dar su número cromosómico fue recogido en Guayadeque (ALDRIDGE & ORTEGA, 1976), un barranco de cinco kilómetros que fluye del centro de la isla hasta su costa oriental, y en el que no hemos encontrado el taxón. Este mismo autor lo cita posteriormente para la Caldera de Los Marteles (ORTEGA, 1979). El examen del material fotográfico enviado del pliego original nos muestra que se trata del material coincidente con el recolectado de los Riscos de Tirajana (Cañadón del Jierro). Existe además una cita para la Cumbre de Tirma, 25.V.1948, Sventenius (ORT: 2290, ORT: 7910) en SANTOS GUERRA & FERNANDEZ GALVÁN (1979).
2. *Lotus spartioides* está considerado como típico del pinar de Tamadaba (en el noroeste de Gran Canaria) (SUNDING, 1972) pero el material de la descripción

original (WEBB & BERTHELOT, 1842) fue recogido en la Caldera de Tirajana, al sur de Gran Canaria (*Hab. In altis montibus Canariae, ubi rupibus abruptis qui veluti parietes vorticem ingentem la caldera de Tiraxana circumclaudunt anno 1839 maio mense florentem primus invenot cl. Despréaux*).

Además, existen casos donde el material recogido en una misma área y a veces incluso por el mismo recolector, se ha identificado con diversos nombres, por ejemplo para la Caldera de los Marteles, ORTEGA, (1976 y 1979) lo dio tanto como *L. spartioides* y *L. genistoides* respectivamente y también para Pajonales KUNKEL, (1969 y 1977) dio *L. spartioides* y *L. holosericeus* respectivamente. Otras citas dadas por SANTOS GUERRA & FERNANDEZ GALVÁN (1979), dan este nombre para material recolectado en zonas bastante bajas de la isla (Ayagaures, Valle Suerte de Los Siete, 600 m., Caldera de Bandama, 500 m., Valle de Los Nueve, 200 m.).

3. Para *L. holosericeus* el material de la descripción original procede de Mogán, (*Hab. In Canariae montibus Mogan, ubi paucos tantum pedes vidit cl. Despréaux*.), pero posteriormente ha sido denominado así material de: Degollada de La Manzanilla, 1000-1200 m. (KUNKEL, 1976); de San Bartolomé de Tirajana (ORTEGA, 1976); zona de San Bartolomé-Cruz Grande-Pajonales, parte alta de Arguineguín y de Mogán hacia Ojeda (KUNKEL, 1977); Cruz Grande, 1300 m. y Cruz de San Antonio, 1200 m. (ORTEGA, 1979); entre Montaña Negra y Tirajana, Sventenius, E. (LPA: 11359); Pinar de Pajonales, Rodrigo, J.(LPA: 16134) ; Pista forestal de Pilacones, Marrero, A. (LPA: 17155, 17156); como *Lotus cf. holosericeus* Degollada de la Manzanilla, Tirajana, 1.100 m., 01.V.1959. Sventenius (ORT: 7941) (SANTOS GUERRA & FERNANDEZ GALVÁN, 1979); Llanos de La Pez, Marrero, A. (LPA: 17162, 17163); Carretera. de Chira, Marrero, A. (LPA: 17167); Fataga, Roca, A. (LPA: 11358).

Además en nuestro trabajo hemos incluido un conjunto de localidades en un grupo denominado *Lotus sp.* (Tabla 1), en donde en algunos casos existe material herborizado y citas bibliográficas a las que se han dado diferentes nombres a las mismas localidades. Estas poblaciones de adscripción taxonómica incierta se localizan en:

- Caldera de Los Marteles:  
*L. spartioides*: (ORTEGA, 1976); Sventenius, E. (LPA: 11380, 11381); Marrero, A. (LPA: 15585, 15586).  
*L. genistoides*: (ORTEGA, 1979)
- Pajonales:  
*L. spartioides*: (SANTOS GUERRA & FERNÁNDEZ GALVÁN, 1979); Kunkel, G. (LPA: 15165); (KUNKEL, 1969)  
*L. holosericeus*: (KUNKEL, 1977); Rodrigo, J. (LPA: 16134).
- Roque Nublo:  
*L. spartioides*: (SANTOS GUERRA & FERNÁNDEZ GALVÁN, 1979);  
*Lotus sp.* Oliva, F.(LPA: 19760).
- Canal de La Mina  
*Lotus sp.* Oliva, F.(LPA: 19762)
- Presa de Las Niñas  
*Lotus sp.* Oliva, F.(LPA: 19761).

Los tres grupos de poblaciones actualmente asignados a las especies *L. genistoides*, *L. spartioides* y *L. holosericeus*, junto con el grupo taxonómicamente indefinido de *Lotus sp.* constituyen un complejo que nosotros hemos denominado “complejo *Lotus* de pinar”.

## Muestreo

Se recogieron un total de 600 muestras correspondientes a 14 poblaciones (en principio independientes) que representan el área de distribución de los tres táxones seleccionados en la isla de Gran Canaria (Figura 1, Tabla 1). En total, se muestrearon: una población de *L. genistoides*, seis de *L. holosericeus*, dos de *L. spartioides* y cinco poblaciones de categoría taxonómica indeterminada que hemos denominado *Lotus sp.*.

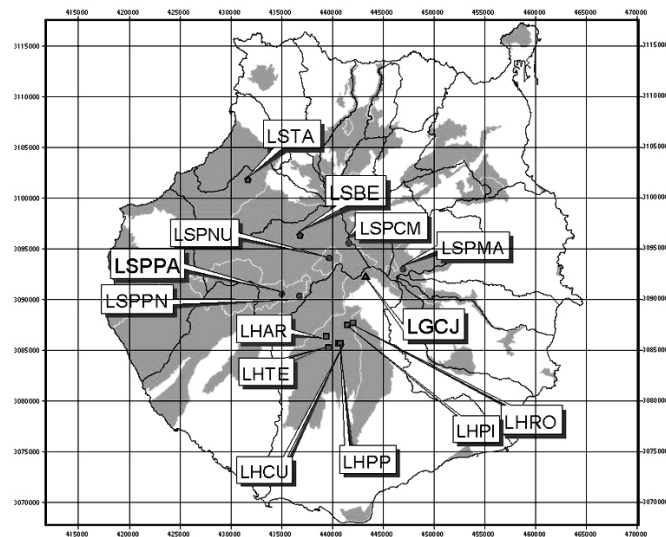


Figura 1. Mapa de las localidades muestreadas del complejo *Lotus* de pinar en Gran Canaria. Los números se corresponden con la Tabla 1.

En estas 5 poblaciones se reflejaron 3 subgrupos (a: Canal de La Mina, Caldera de Los Marteles, b: Roque Nublo y c: Presa de Las Niñas y Pajonales).

Como la mayoría de poblaciones diana ocupan una gran extensión, cada muestreo fue precedido de un examen visual de la población que nos dio una idea de su tamaño y del área que ocupaba. Todos los muestreos se realizaron a través de transectos, en los cuales se subdividió el área estimada en varios puntos muestrales. En cada uno se recolectaron de 5 a 10 individuos separados en el espacio. Puesto que uno de los objetivos fundamentales del trabajo es clarificar las relaciones entre los taxones estudiados, este proceder garantiza la detección de variabilidad genética informativa en caso de que exista. Los tamaños muestrales guardan relación con el tamaño estimado de las poblaciones diana. El muestreo de hojas para análisis isoenzimático fue realizado en el periodo

correspondiente a la formación de primordios foliares nuevos que son los que muestran mayor actividad enzimática (desde enero a marzo).

Las muestras de hoja fueron depositadas en bolsas de plástico numeradas que se cerraron herméticamente y se guardaron en una nevera de campo hasta llegar a los laboratorios moleculares del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo", donde se depositaron en ultracongeladores a  $-80^{\circ}$  C. hasta su utilización para preparar extractos proteicos.

ESPECIE/POBLACIÓN	CÓDIGO	N	U.T.M.
<i>L. genistoides</i>			
1. Cañadón del Jierro	LG CJ	50	28RDR 433 923
<i>L. holosericeus</i>			
2. Barranco del Arco	LHAR	75	28RDR 394 863
3. Cruz de la Umbría	LHCU	15	28RDR 406 856
4. Pílancones	LHPI	30	28RDR 415 874
5. Pino Pílancones	LHPP	25	28RDR 408 856
6. Degollada de Rosiana	LHRO	25	28RDR 420 876
7. Las Tederas	LHTE	10	28RDR 396 852
<i>L. spartioides</i>			
8. Roque Bentayga	LSBE	30	28RDR 368 963
9. Tamadaba	LSTA	100	28RDS 317 018
<i>Lotus sp.</i>			
10. Canal de la Mina	LSPCM	50	28RDR 417 955
11. Caldera de los Marteles	LSPMA	50	28RDR 470 929
12. Roque Nublo	LSPNU	50	28RDR 397 940
13. Pajonales	LSPPA	25	28RDR 351 905
14. Presa de las Niñas	LSPPN	65	28RDR 368 903

Tabla 1. Datos del muestreo efectuado en este trabajo. Los números de población corresponden a la Figura 1. N: Tamaño de la muestra.

### Análisis isoenzimáticos

Los extractos proteicos se obtuvieron machacando las hojas en morteros de vidrio y utilizando un tampón de extracción (SHIELDS *et al.*, 1983) adecuado para preservar la actividad enzimática y prevenir la oxidación de las enzimas. Los extractos se absorbieron en papel Whatman nº 3 de 4 mm. x 6 mm. y se almacenaron en el ultracongelador a  $-80^{\circ}$  C, hasta el momento de la electroforesis. La electroforesis fue realizada en gel horizontal de almidón al 12% p/v. Se han usado 2 sistemas tampón gel/electrodo (SHIELDS *et al.*, 1983) para resolver 8 sistemas enzimáticos: 1) Histidina 7.0 (sistema E en SHIELDS *et al.*, 1983), donde se resolvieron los *loci Fosfoglucoisomerasa* (PGI, E.C.5.3.1.9),

*Fosfoglucomutasa* (PGM, E.C.5.4.2.2.) *Isocítrico deshidrogenasa* (IDH, E.C.1.1.1.42 y *Esterasa* (EST, 3.1.1.1); y 2) Morfolina Citrato 6.1 (CLAYTON & TRETIAK, 1972), donde se ensayaron *Fosfogluconato deshidrogenasa* (6PGD, E.C.1.1.1.44), *Shikímico deshidrogenasa* (SKD, E.C.1.1.1.25), *Malato deshidrogenasa* (MDH, E.C.1.1.1.37) y el *Enzima Máfico* (ME, E.C.1.1.1.40). Para cada enzima, las denominaciones de los *loci* y los alelos siguieron las secuencias alfabética y numérica, respectivamente.

Las movilidades enzimáticas intra-poblacionales, inter-poblacionales e inter-específicas fueron determinadas a través de la comparación de variantes alélicas en el mismo gel. La metodología usada para la preparación de las muestras, de los geles y de los tampones gel/electrodo se describe detalladamente en CAUJAPÉ-CASTELLS *et al.* (en prensa).

### Análisis de datos

Los descriptores elementales de variabilidad isoenzimática poblacional [ $n^{\circ}$  medio de alelos por *locus* ( $A$ ), porcentaje de *loci* polimórficos ( $P$ ), desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg, heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ )] fueron calculados en el programa BIOSYS-1 versión 1.7 (SWOFFORD & SELANDER, 1989). Todos los cálculos fueron hechos a nivel de especie y de población a partir de los datos genotípicos correspondientes a cada *locus*. El número efectivo de alelos ( $A_e$ ), las estimaciones del flujo génico entre poblaciones y el test de neutralidad de Ewens-Watterson fueron calculados en POPGENE VERSION 1.32. (1997).

Los estadísticos  $F$  de WRIGHT (1951) se calcularon para todos los *loci* mediante el programa POPGENE VERSION 1.32. (1997). Los estadísticos de diversidad genética interpoblacional de NEI (1973) también estiman las componentes intra e interpoblacional de la variación genética detectada. A nivel conceptual, son análogos a los de WRIGHT, aunque su método de derivación y estimación es diferente. Estos estadísticos fueron estimados mediante el programa GeneStat-PC 3.31 (LEWIS & WHITKUS, 1993).

Las distancias ( $D$ ) e identidades ( $I$ ) genéticas de NEI (1978) para todos los pares de combinaciones de las poblaciones muestreadas se calcularon por medio del análisis de los genotipos en el programa BIOSYS-1 VERSION 1.7 (SWOFFORD & SELANDER, 1989).

La probabilidad de pérdida  $L$  (es decir, la probabilidad de que una muestra de tamaño  $N$  no contenga un alelo con frecuencia poblacional  $p$ ) fue estimada usando la expresión:  $L = (1-p)^{2N}$  (BENGTSSON *et al.*, 1995) para los alelos que: 1) tenían una frecuencia total menor de 0.5, y 2) estaban presentes en el 50% o menos de todas las poblaciones muestreadas. Se calcularon y representaron las probabilidades de pérdida esperada  $L_e$  (asumiendo que los alelos tenían su frecuencia media total en cada una de las poblaciones consideradas) y las probabilidades de pérdida observadas  $L_o$ . Estos valores fueron utilizados para dos análisis de regresión lineal, donde la frecuencia de cada alelo se representó en el eje X, y el  $-\log(L_o)$  y  $-\log(L_e)$  se representaron en el eje Y. Siguiendo a BENGTSSON *et al.* (1995), se obtuvo un valor de representatividad muestral ( $R$ ) dividiendo la pendiente de la línea de regresión observada (basada en los valores de  $L_o$ ) por la pendiente de la línea de regresión



esperada (basada en los valores de  $L_e$ ). Este valor se interpreta como la probabilidad de representar todos los alelos raros incluidos en las estimaciones muestreando una sola población al azar. Los cálculos de rareza alélica fueron realizados con todas las poblaciones muestreadas y con las asignadas a *L. holosericeus* y a *Lotus sp.*

El almacenamiento de los datos genotípicos individuales, los cálculos de probabilidad de pérdida y la obtención de los formatos necesarios para la implementación de estos datos en los programas usados para estimar los parámetros de variabilidad genética fueron llevados a cabo con el programa Transformer-1 (CAUJAPÉ-CASTELLS, 2001).

## RESULTADOS

### Patrones electroforéticos

Todas las interpretaciones de los gels correspondientes a cada uno de los ocho enzimas ensayados se dibujaron en la matriz del programa Transformer-1 (CAUJAPÉ-CASTELLS, 2001), una nueva herramienta informática de análisis genético poblacional creada en el Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" (JBCVC) para facilitar el almacenamiento de los datos genotípicos individuales y acelerar considerablemente su análisis genético.

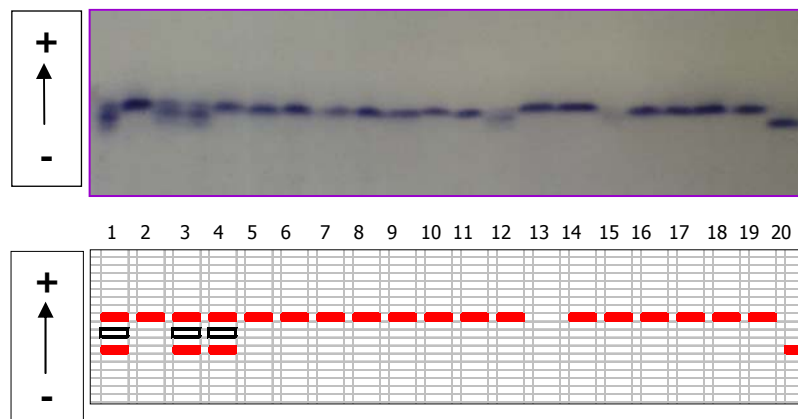


Figura 2. Fotografía de la resolución media de la enzima *IDH* (arriba) y su correspondiente interpretación en Transformer-1 (debajo). Se aprecian 3 individuos heterocigotos en los individuos 1, 3 y 4

La enzima *IDH* (Fig. 2) mostró una única zona de actividad enzimática en la zona inferior de la región anodal del gel, que fue designada como un *locus* segregante (*Idh-1*) donde se detectaron un total de cuatro alelos. Este *locus* mostró el patrón de intensidades esperado en un enzima dimérico con herencia

mendeliana codominante. Esto significa que los individuos heterocigotos exhibieron tres bandas, de las cuales la intermedia (correspondiente al heterodímero) fue más intensa que la de cada una de los extremos (correspondientes a los homodímeros) y equidistante respecto a ellas.

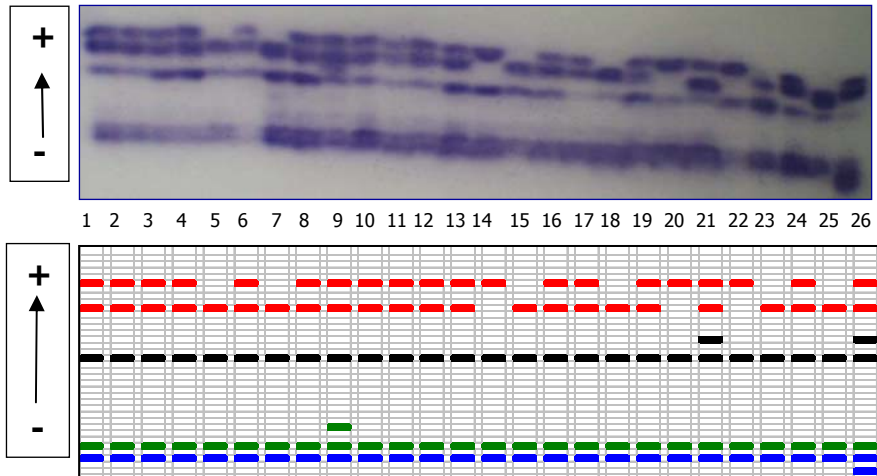


Figura 3. Fotografía de la resolución media de los tres *loci* interpretados en la enzima *PGM* (arriba) y su correspondiente interpretación en Transformer-1 (debajo). Se observan varios individuos heterocigotos en cada uno de los diferentes *loci* (simbolizados por diferentes colores en Transformer-1) y también bandas débiles asociadas al *locus* *Pgm-3* (ver texto).

La enzima ***PGM*** (Fig. 3) mostró tres regiones de actividad que fueron designadas como tres *loci* putativos (*Pgm-1*, *Pgm-2* y *Pgm-3*) con seis, cuatro y cinco alelos, respectivamente. Los alelos detectados en los *loci* *Pgm-1* y *Pgm-2* exhibieron una migración similar en la zona superior de la región anodal del gel, que era en todos los casos bien diferenciable de la zona de migración de *Pgm-3* (más inferior). En algunos casos, se detectaron bandas débiles cerca de las correspondientes a la expresión de los alelos del *locus* *Pgm-3*. El origen de estas bandas es incierto y podría corresponder a: 1) restos de duplicaciones para el enzima *PGM* ó 2) a la actividad de otros enzimas que compiten por alguno de los sustratos que se utilizan en la tinción correspondiente a *PGM*. Estas bandas fueron dibujadas en Transformer-1 (CAUJAPÉ-CASTELLS, 2001) pero no interpretadas.

### Niveles de variación genética

La interpretación genética de las 8 enzimas examinadas permitió la resolución de 17 *loci* putativos, ninguno de los cuales fue monomórfico en todas las poblaciones. De los 70 alelos detectados (la tabla de frecuencias alélicas está a disposición previa petición por escrito a los autores), las poblaciones LGCJ (*L. genistoides*), LSTA (*L. spartioides*), LSPCM y LSPPN (*Lotus sp.*) poseen un alelo exclusivo cada una (*Mdh-4c*, *6Pgd-4d*, *Pgm-1g* y *Mdh-1e*, respectivamente). Detectamos alelos exclusivos compartidos entre los pares de poblaciones LGCJ-

LSPPN (*Est-3e*), LSPCM-LSPPA(*Idh-1d*), LHAR-LHCU (*6Pgd-4a*), LHAR-LSTA (*Pgi-1b*), LSPCM-LSPMA (*Pgm-2e*), y LHRO-LSPCM (*Skd-2a*). Los 60 alelos restantes fueron compartidos por diversas combinaciones de las 14 poblaciones examinadas. No detectamos alelos diagnósticos (es decir, alelos monomórficos para un taxon que no fueran compartidos por otros taxones), ni alelos presentes exclusivamente en todas las poblaciones de cada taxon.

Población	$A_i$	$A_e$	$P$	$H_o$	$H_e$	$F$	$t$
<i>L. genistoides</i>	2.2 (0.3)	1.2 (0.3)	52.9	0.091 (0.028)	0.135 (0.034)	0.329	0.505
<i>L. holosericeus</i>	2.2 (0.2)	1.2 (0.3)	55.9	0.089 (0.029)	0.161 (0.038)	0.404	0.435
<i>L. spartioides</i>	2.1 (0.3)	1.3 (0.3)	58.8	0.112 (0.032)	0.160 (0.039)	0.273	0.584
<i>Lotus</i> sp.	2.2 (0.2)	1.3 (0.4)	55.3	0.111 (0.036)	0.181 (0.045)	0.380	0.452
Promedio Total	2.2 (0.2)	1.3 (0.3)	55.9	0.100 (0.032)	0.166 (0.040)	0.372	0.467

Tabla 2. Promedios de los indicadores básicos de la variabilidad isoenzimática para las 14 poblaciones del complejo de *Lotus* de pinar.  $A_i$ : número medio de alelos por *locus*;  $A_e$ : número efectivo de alelos;  $P$ : proporción de alelos polimórficos (un *locus* se considera polimórfico cuando la frecuencia de su alelo más común es menor de 0.95);  $H_o$  y  $H_e$ : heterozigosidades observada y esperada;  $F$ : índice de fijación;  $t$ : tasa de reproducción cruzada [ $t=(1-F)/(1+F)$ ]. Los valores entre paréntesis son las desviaciones típicas.

Los promedios de los indicadores básicos de polimorfismo (Tabla 2) mostraron una uniformidad notable entre los diversos grupos. Los valores promedio de  $A$  son muy parejos en todos los taxones analizados, siendo *L. spartioides* el que ostenta una mayor proporción de *loci* polimórficos ( $P = 58.8$ ). El rango de valores de la heterozigosidad observada se extendió desde  $H_o = 0.089$  en *L. holosericeus* a  $H_o = 0.112$  en *L. spartioides*. La heterozigosidad esperada ( $H_e$ ) abarcó desde  $H_e = 0.135$  en *L. genistoides* hasta  $H_e = 0.181$  en *Lotus* sp..

Los índices de fijación ( $F$ ) variaron desde  $F = 0.273$  (*L. spartioides*) hasta  $F = 0.404$  (*L. holosericeus*). Estos últimos valores son mucho más bajos que uno (que correspondería a una situación de apareamiento al azar), e indican un predominio de la autofecundación para la reproducción en las poblaciones examinadas.

Ninguna de las poblaciones examinadas mostró evidencias de un cuello de botella reciente, y todos los *loci* resueltos fueron neutrales según el test de Ewens-Watterson (datos no mostrados).

El porcentaje de variación que se explica por la diferenciación entre poblaciones (Tabla 3) fue uniformemente bajo, con valores de  $G_{st} = 0.042$  en *Lotus* sp.,  $G_{st} = 0.042$  en *L. spartioides*, y  $G_{st} = 0.081$  en *L. holosericeus*. Sin embargo, los valores de  $G_{st}$  y de  $F_{st}$  se incrementaron fuertemente cuando los taxones fueron reunidos en diferentes combinaciones (Tabla 3) ( $G_{st} = 0.293$  y  $F_{st}$

= 0.201 para todas las poblaciones,  $G_{st} = 0.297$  y  $F_{st} = 0.199$  para todas las poblaciones excepto para *L. genistoides*,  $G_{st} = 0.300$  y  $F_{st} = 0.118$  para los *L. spartioides* más *Lotus sp.*, y  $G_{st} = 0.159$ ,  $F_{st} = 0.210$  para *L. holosericeus* más *Lotus sp.*

PROMEDIO / ESPECIE	Nei (1973)			Wright (1951)		
	Hs	Dst	Gst	Fis	Fit	Fst
<i>L. spartioides</i>	0.160	0.007	0.042	0.200	0.222	0.028
<i>L. holosericeus</i>	0.159	0.014	0.081	0.385	0.451	0.108
<i>Lotus sp.</i>	0.181	0.007	0.042	0.338	0.425	0.131
<i>L. spartioides</i> + <i>Lotus sp.</i>	0.175	0.075	0.300	0.283	0.368	0.118
<i>L. holosericeus</i> + <i>Lotus sp.</i>	0.159	0.030	0.159	0.364	0.498	0.210
Todas excepto <i>L. genistoides</i>	0.168	0.071	0.297	0.326	0.460	0.199
Todas las poblaciones	0.165	0.068	0.293	0.322	0.458	0.201

Tabla 3 : Promedios de los estadísticos de estructura poblacional según Nei (1973) y Wright (1951) para el promedio de los 14 *loci* polimórficos analizados en las distintas especies de *Lotus*.

El cluster UPGMA construido con las distancias genéticas de NEI (1978) (Fig. 4) da lugar a tres grupos consistentes que contienen [*L. holosericeus*, una población de *Lotus sp* (LSPPA) y la población de *L. genistoides*], [*L. spartioides* y una población de *Lotus sp.* (LSPNU)], y [las tres poblaciones restantes designadas como *Lotus sp.* (LSPCM, LSPMA y LSPPN)].

El cálculo de las probabilidades de pérdida para los 27 alelos que satisficieron las condiciones rareza establecidas en el apartado de Material y Métodos para *L. holosericeus* y *Lotus sp.* (Tabla 4 y 5, Fig. 5) arrojó valores de representatividad  $R = 0.353$  y  $R = 0.343$  (respectivamente). Estos resultados significan que el muestreo aleatorio de una población dentro de estos grupos taxonómicos capturaría como promedio aproximadamente el 35% de los alelos raros detectados. La mayoría de estos alelos están contenidos en la población LHPI (11 de los 27) en *L. holosericeus*, y en la población LSPPN (11 de los 27) en *Lotus sp.*

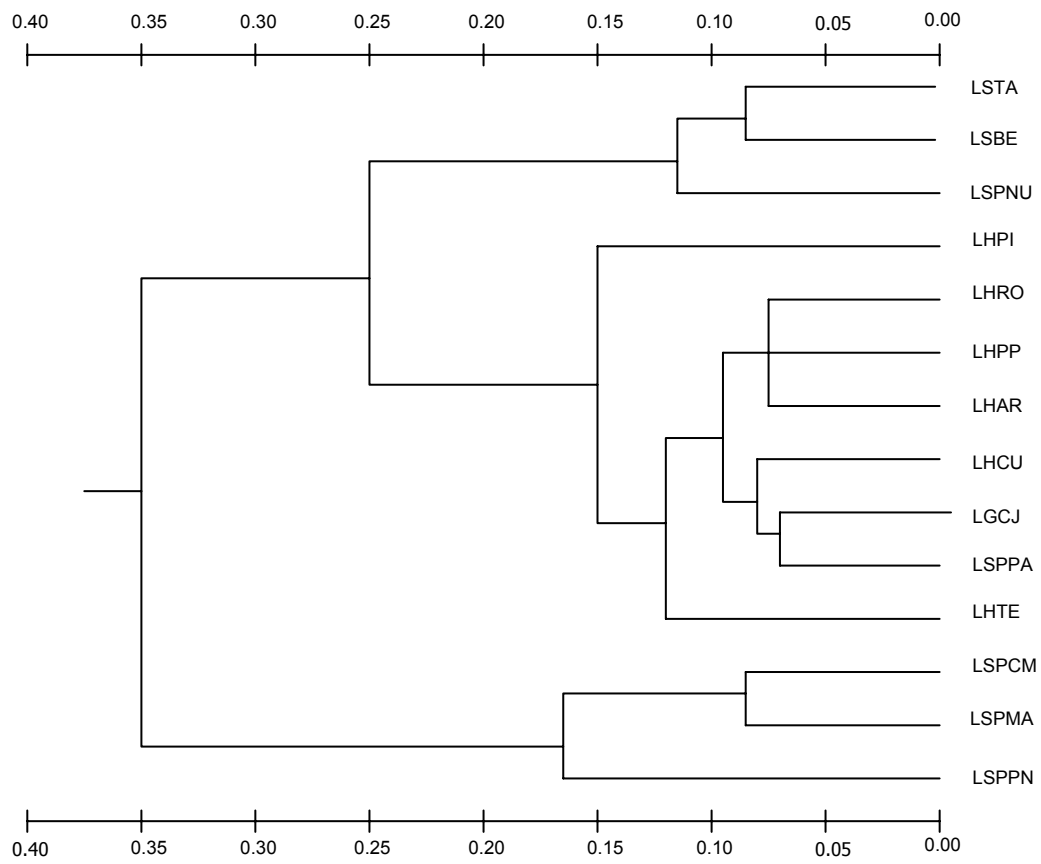


Figura 4. Cluster entre las 14 poblaciones muestreadas según la distancia de Nei (1978) y el algoritmo UPGMA.

Alelo	N	P	L <sub>o</sub>	L <sub>e</sub>	Área
<i>Est 3-b</i>	1	0.008	0.984	0.910	LSPPN
<i>Idh 1-b</i>	1	0.031	0.940	0.689	LSPMA
<i>Idh 1-d</i>	2	0.030	0.885	0.694	LSPPA
<i>Mdh 1-d</i>	2	0.007	0.974	0.923	LSPPN
<i>Mdh 1-e</i>	1	0.008	0.984	0.910	LSPPN
<i>Mdh 2-c</i>	2	0.007	0.971	0.916	LSPNU
<i>Mdh 4-b</i>	1	0.007	0.986	0.920	LSPPN
<i>Mdh 4-e</i>	2	0.030	0.886	0.696	LSPCM
<i>Me 1-a</i>	1	0.002	0.997	0.980	LSPPN
<i>Me 1-b</i>	1	0.003	0.993	0.961	LSPPN
<i>Me 1-d</i>	1	0.015	0.970	0.834	LSPPN
<i>6Pgd 1-a</i>	2	0.015	0.940	0.832	LSPPN
<i>6Pgd 1-d</i>	2	0.012	0.953	0.864	LSPPA
<i>6Pgd 2-a</i>	1	0.002	0.997	0.981	LSPPN
<i>6Pgd 2-c</i>	1	0.004	0.992	0.953	LSPCM
<i>Pgi 1-e</i>	1	0.046	0.910	0.568	LSPMA
<i>Pgm 1-a</i>	2	0.006	0.976	0.930	LSPNU
<i>Pgm 1-c</i>	2	0.036	0.865	0.647	LSPPA
<i>Pgm 1-e</i>	2	0.089	0.690	0.329	LSPPN
<i>Pgm 1-f</i>	2	0.045	0.833	0.578	LSPPN
<i>Pgm 2-a</i>	2	0.022	0.915	0.766	LSPPA
<i>Pgm 2-b</i>	2	0.360	0.168	0.005	LSPNU
<i>Pgm 2-e</i>	2	0.046	0.828	0.568	LSPMA
<i>Pgm 3-d</i>	1	0.002	0.996	0.975	LSPMA
<i>Skd 1-b</i>	2	0.008	0.969	0.910	LSPNU
<i>Skd 2-a</i>	1	0.009	0.983	0.903	LSPCM
<i>Skd 2-d</i>	2	0.029	0.887	0.699	LSPMA

Tabla 4. Probabilidades de pérdida observadas y esperadas (L<sub>o</sub> y L<sub>e</sub>) para los 27 alelos que satisficieron los criterios de rareza de Material y Métodos en *Lotus sp.*. N: número de subpoblaciones donde se detectó el alelo correspondiente; P: frecuencia alélica media en las cinco zonas muestreadas. "Área" se refiere a la(s) población(es) donde el alelo correspondiente tiene una mayor probabilidad de ser detectado.

Alelo	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>L<sub>o</sub></i>	<i>L<sub>e</sub></i>	Área
<i>Est 3-b</i>	3	0.025	0.861	0.742	LHPP
<i>Idh 1-b</i>	2	0.004	0.985	0.954	LHPI
<i>Mdh 1-a</i>	2	0.013	0.948	0.851	LHCU
<i>Mdh 1-c</i>	1	0.078	0.850	0.378	LHPI
<i>Mdh 1-d</i>	1	0.006	0.989	0.935	LHPI
<i>Mdh 2-a</i>	1	0.002	0.996	0.974	LHAR
<i>Mdh 2-c</i>	2	0.007	0.974	0.923	LHPI
<i>Mdh 3-a</i>	1	0.002	0.996	0.974	LHAR
<i>Mdh 4-a</i>	3	0.021	0.883	0.779	LHTE
<i>Mdh 4-b</i>	2	0.015	0.940	0.830	LHPI
<i>Mdh 4-e</i>	2	0.020	0.924	0.790	LHPP
<i>Me 1-d</i>	3	0.020	0.883	0.780	LHAR
<i>6Pgd 1-b</i>	2	0.040	0.851	0.616	LHPI
<i>6Pgd 2-a</i>	1	0.080	0.846	0.368	LHPI
<i>6Pgd 2-c</i>	2	0.045	0.832	0.575	LHRO
<i>6Pgd 3-a</i>	3	0.042	0.772	0.597	LHPI
<i>6Pgd 4-a</i>	2	0.014	0.944	0.840	LHCU
<i>Pgi 1-a</i>	2	0.010	0.961	0.888	LHPI
<i>Pgi 1-b</i>	1	0.002	0.995	0.972	LHAR
<i>Pgi 1-e</i>	2	0.009	0.964	0.897	LHAR
<i>Pgm 1-a</i>	2	0.007	0.974	0.923	LHPI
<i>Pgm 1-c</i>	3	0.036	0.804	0.646	LHAR
<i>Pgm 3-b</i>	3	0.015	0.915	0.838	LHRO
<i>Pgm 3-d</i>	1	0.007	0.986	0.916	LHCU
<i>Skd 1-b</i>	2	0.006	0.977	0.934	LHCU
<i>Skd 2-a</i>	1	0.008	0.983	0.904	LHRO
<i>Skd 2-d</i>	1	0.004	0.993	0.959	LHPI

Tabla 5. Probabilidades de pérdida observadas y esperadas ( $L_o$  y  $L_e$ ) para los 27 alelos que satisficieron los criterios de rareza de Material y Métodos en *L. holosericeus*. *N*: número de subpoblaciones donde se detectó el alelo correspondiente; *P*: frecuencia alélica media en las cinco zonas muestreadas. "Área" se refiere a la(s) población(es) donde el alelo correspondiente tiene una frecuencia mayor.

## DISCUSIÓN

### Niveles generales de variación genética

Los valores de los parámetros del polimorfismo genético en estos *Lotus* endémicos de Gran Canaria (Tabla 2) son dos veces más altos que los valores medios calculados por HAMRICK & GODT (1989) para plantas endémicas ( $A = 1.39$ ,  $P = 0.26$ ,  $H_e = 0.063$ ). Además, son sólo levemente más bajos que los detectados por GAUTHIER *et al.* (1998) en poblaciones continentales de *Lotus alpinus* (Schleich. ex DC.) Ramond (valores medios de  $A = 2.8$ ,  $H_o = 0.219$ ,  $H_e = 0.279$ ).

Según las estimaciones de la diversidad genética media ( $H_s$ , Tabla 3) el grado de variación genética de estos grupos de *Lotus* del pinar de Gran Canaria es en todos los casos mucho más alto que las medias publicadas para Hawaii ( $H_s = 0.064$ , DEJOOE & WENDEL, 1992) o las islas de Juan Fernández ( $H_s = 0.042$ , CRAWFORD *et al.*, 2001) y está cerca del valor medio publicado para los taxones de Canarias ( $H_s = 0.137$ , FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000). A este primer nivel, nuestro estudio muestra que estas poblaciones de *Lotus* endémicos de Gran Canaria mantienen niveles sustanciales de variación genética, reforzando de esta manera la hipótesis de que la variación en los endemismos de Gran Canaria es mucho más alta que la que se encuentra en el resto de los archipiélagos oceánicos (FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000).

De acuerdo con los bajos valores de la tasa de reproducción cruzada ( $t$ ) estimados (Tabla 2), esta alta variación genética intra-poblacional se ha mantenido con un predominio de la endogamia para la reproducción en las poblaciones muestreadas. Esta estimación cuantitativa concuerda con el hecho de que las semillas de *Lotus* no recorren largas distancias sino que, al llegar las diásporas a la madurez, se desprenden por su propio peso y quedan cerca de la planta que las produce (dispersión por gravedad o barocoria). La barocoria es un método de diseminación que por sí sólo conduce únicamente a la migración de las semillas a pequeñas distancias (variables solamente en función de la inclinación del sustrato) y fomenta la aparición de vecindarios genéticos donde la reproducción se realiza entre individuos emparentados. Las estimaciones de la tasa de reproducción cruzada para estos *Lotus* endémicos del pinar de Gran Canaria son mucho más bajas que las obtenidas en la especie *L. scoparius* (Nutt.) Ottley, donde MONTALVO, CLEGG & ELLSTRAND (datos inéditos) revelan una baja incidencia de la endogamia en todas las poblaciones examinadas basándose en un estudio isoenzimático con 14 *loci*.

A nivel inter-poblacional, los altos niveles totales de polimorfismo isoenzimático se corresponden con una considerable homogeneidad genética, que se manifiesta cualitativamente en el hecho de que los alelos exclusivos son muy infrecuentes y dispersos. Cuantitativamente, la misma tendencia se hace patente a través de los bajos valores de  $G_{st}$  y  $F_{st}$  (Tabla 3). Asimismo, GAUTHIER *et al.* (1998) también detectaron una notable cohesión genética en las poblaciones diploides de *L. alpinus* ( $G_{st} = 0.030$ ).

A pesar de la baja correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica, el número estimado de migrantes por generación (datos no mostrados)



fue alto dentro de los tres conjuntos de poblaciones, y está muy por encima del umbral teórico ( $Nm = 1$ ) por debajo del cual se asume que las poblaciones evolucionan independientemente (SLATKIN, 1985, 1987, 1994). Bajo este enfoque, estos grupos de poblaciones pueden ser considerados como unidades reproductivas que han mantenido altos niveles de variación a través de un abundante intercambio genético.

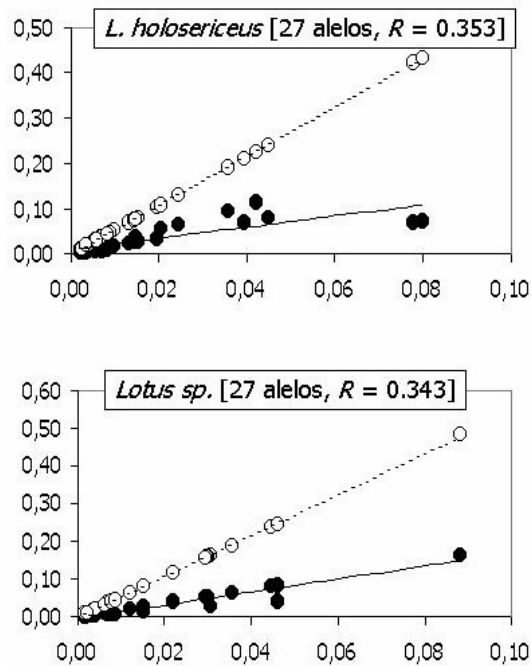


Figura 5. Regresiones de las probabilidades de pérdida observada (línea continua, círculos negros) y esperada (línea discontinua, círculos blancos) respecto a la frecuencia de los alelos raros (eje x) en los conjuntos de poblaciones correspondientes a *L. holosericeus* (arriba) y *Lotus sp.* (debajo). R se refiere al valor de representatividad para cada uno de estos grupos (ver material y métodos y resultados).

Puesto que las semillas de *Lotus* tienen poca tendencia a la dispersión a larga distancia, el flujo génico inter-poblacional debe haberse producido mayoritariamente a través del intercambio polínico. Merece la pena reseñar, sin embargo, que las distancias genéticas mucho más altas detectadas dentro de *Lotus sp.* podrían sugerir que este conjunto de poblaciones contiene entidades taxonómicas distintas o bien están en una etapa de diferenciación incipiente.

### Implicaciones taxonómicas

Como la relación entre fenotipo y genotipo es en general más simple para evidencias isoenzimáticas que para los caracteres morfológicos (GOTTLIEB, 1977), las diferencias genéticas detectadas nos pueden proporcionar una primera aproximación para determinar la coherencia taxonómica en estos grupos de *Lotus* del pinar de Gran Canaria.

La existencia de taxones diferentes es en primer lugar una cuestión de aislamiento reproductivo. Teniendo en cuenta que la fenología en todos los *Lotus* de pinar es muy similar, si los grupos de poblaciones considerados son de hecho entidades taxonómicas diferenciadas deberíamos esperar bajos niveles de flujo génico entre ellas. De acuerdo con este argumento, los valores de *Gst* experimentaron un sustancial ascenso al realizar diferentes combinaciones entre *L. holosericeus*, *L. spartioides* y *Lotus sp.*. Este resultado es significativo, pues la existencia de intercambio genético entre taxones de *Lotus* relacionados tiene precedentes, y podría también haber sido el caso en estos endemismos de Gran Canaria. Por ejemplo, MOON (2000) proporciona evidencias de que las poblaciones naturales de *L. corniculatus* var. *japonicus* Regel. en la isla de Japón probablemente se mezclaron con el *L. corniculatus* introducido como forraje.

La carencia de evidencias de aislamiento por distancia, la asociación de distancias genéticas altas con bajas distancias geográficas y el aumento sustancial de los valores de *Gst* en las combinaciones entre pares de grupos hacen alusión a un incipiente aislamiento reproductivo entre estos *Lotus* endémicos de Gran Canaria. En este contexto, la pregunta pertinente sería si la heterogeneidad genética detectada es lo suficientemente alta como para sostener la validez de estos grupos de poblaciones en diversas categorías taxonómicas. Aunque responder a esta pregunta se hace imposible sin una base morfológica sólida (OLIVA *et al.*, en prep.), nuestros valores de identidad genética proporcionan un calibre de diferenciación molecular que puede ser comparado con las revisiones de GOTTLIEB (1977) sobre las diferencias genéticas en diversas categorías taxonómicas. En la ausencia actual de cualquier dato sobre la biología poblacional para estos *Lotus* canarios, éstas comparaciones pueden ser útiles para ayudar a definir las preguntas taxonómicas significativas.

Las medias de identidad genética dentro de *L. holosericeus* ( $I = 0.986$ ), *L. spartioides* ( $I = 0.992$ ), y *Lotus sp.* ( $I = 0.896$ ) entran dentro de los valores calculados por GOTTLIEB (1977) para poblaciones co-específicas ( $I = 0.95 \pm 0.2$ ), al igual que las identidades medias entre los pares de combinaciones de *L. holosericeus*, *L. genistoides* y *L. spartioides*. No obstante, los valores de identidad de cualquiera de estos tres últimos grupos con *Lotus sp.* son considerablemente más bajos. Significativamente, las poblaciones de LSPPA y LSPNU presentan valores mucho más altos de identidad genética con cualquier población de *L. spartioides* o de *L. holosericeus* que los que tienen con otras poblaciones asignadas a *Lotus sp.*. Si quitamos estas dos poblaciones de los cálculos de identidad con los otros taxones, los valores disminuyen considerablemente a una región intermedia entre los promedios de GOTTLIEB (1977) para las poblaciones co-específicas ( $I = 0.95 \pm 0.2$ ) y especies congénicas ( $I = 0.67 \pm 0.07$ ).

Ciertamente, los valores divulgados en la revisión de GOTTLIEB (1977) podrían cambiar si fuesen actualizados. Sin embargo, asumiendo que las eventuales diferencias no serían sustanciales, nuestros datos isoenzimáticos sugieren cuatro implicaciones genéticas generales que pudieran ser orientativas taxonómicamente. Primero, *L. genistoides* está más cercano a *L. holosericeus* que varios pares de poblaciones de esta especie entre ellas, (Figura 4). En segundo lugar, *L. spartioides* y *L. holosericeus* son genéticamente muy próximos. Tercero, las poblaciones de LSPA y LSPNU (muestreados como *Lotus sp.*) son más similares a *L. holosericeus* o a *L. spartioides* que a otras poblaciones de *Lotus sp.*. Cuarto, las restantes poblaciones de *Lotus sp.* son genéticamente distintas de las otras.

### Próximas directices

Los isoenzimas han sido usados frecuentemente con éxito como sustitutos de la variación cuantitativa para clarificar problemas taxonómicos. No obstante, recientes meta-análisis (REED & FRANKHAM, 2000) denuncian una baja correlación entre estimaciones moleculares y morfológicas de variación genética ( $r = 0.217$ ). Esta comprobación estadística de que las variables moleculares no predicen con precisión los niveles de variación morfológica (y viceversa) debería impulsar a los investigadores a llevar a cabo el estudio de la diversificación biológica mediante la combinación de aproximaciones moleculares y morfológicas.

Por una parte, las variables morfológicas son necesarias para la taxonomía porque ofrecen un amplio espectro de variación que puede tener valor descriptivo. No obstante, en muchos casos esta variación es atribuible a la contribución de muchos genes (cuya herencia y relaciones son desconocidas) y a los efectos de las variables ambientales sobre ellos (BARRETT & KOHN, 1991). A consecuencia de estas características, la variación morfológica se distribuye de manera continua y es poco adecuada para el análisis estadístico. Además, la incapacidad de distinguir entre variación adaptativa y heredable (la única con valor taxonómico) reduce con frecuencia el valor taxonómico de los caracteres morfológicos.

Por otra parte, los caracteres moleculares neutrales como los isoenzimas exhiben genotipos discretos cuya herencia es bien conocida, y son por ello susceptibles de análisis estadísticos robustos. Pero aunque su utilidad para comprender los fenómenos de diversificación que dan lugar a las diferencias taxonómicas es muy grande, con frecuencia no poseen suficiente variación como para ser taxonómicamente decisivos por sí solos.

La heterogeneidad genética detectada en este trabajo ha sido útil para comprender mejor la diversificación de este grupo de *Lotus* endémicos de los pinares de Gran Canaria. A nivel taxonómico, la mayor relevancia de estos datos moleculares es que pueden orientar algunas de las cuestiones a responder por los análisis morfológicos en curso (OLIVA *et al.*, en prep.). Solamente la consideración conjunta de ambos tipos de datos podrá permitirnos hacer la hipótesis si la tríada *L. holosericeus*-*L. spartioides*-*L. genistoides* habría de ser considerada una sola entidad taxonómica y si las poblaciones de *Lotus sp.* más distintas genéticamente deberían poseer un estatus taxonómico diferenciado.

En un futuro cercano sería importante ampliar nuestros estudios con otros taxones del género *Lotus* en Canarias, y muestrear algunas poblaciones

continentales del mencionado “enclave macaronésico” de Marruecos, así como incluir otras poblaciones relacionadas con las especies estudiadas.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Cabildo de Gran Canaria la beca de investigación pre-doctoral a Felicia Oliva y el apoyo a esta investigación. Los biólogos del Jardín Botánico Canario ofrecieron sugerencias importantes y ayuda en el campo, especialmente Bernardo Navarro, Isabel Santana, Blas Vilches, Olga Fernández-Palacios y Carolina Suárez. Roque M. López, agente forestal del Gobierno de Canarias, nos ayudó a localizar algunas poblaciones. Este artículo fue escrito mientras Juli Caujapé-Castells estaba contratado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y el Cabildo de Gran Canaria, agradeciendo a ambos la co-financiación de su proyecto Ramón y Cajal.

### REFERENCIAS

- ACEBES GINOVÉS, J. R., M. DEL ARCO AGUILAR, A. GARCÍA GALLO, M<sup>a</sup>. C. LEÓN ARENCIBIA, P. L. PÉREZ DE PAZ, O. RODRÍGUEZ DELGADO & W. WILDPRET DE LA TORRE, 2001.- División Pteridophyta, Spermatophyta. En: Izquierdo I., J.L. Martín, N. Zurita, & M. Arechavaleta (eds.): *Lista de especies silvestres de Canarias (hongos, plantas y animales terrestres) 2001*. Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente. Gobierno de Canarias. pp.: 98-140.
- ALDRIDGE, A. & J. ORTEGA, 1976.- Estudios en la flora macaronésica *Bot. Macaronésica* 2: 9-18.
- BAÑARES, A., G. BLANCA, J. GÜEMES, J. C. MORENO & S. ORTIZ (eds.), 2003.- *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid, 1072 pp.
- BARRETT, S. CH. & J. R. KOHN, 1991.- Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. In *‘Genetics and conservation of rare plants’*. (Eds D Falk, K Holsinger) pp. 3–10. (Oxford University Press: Oxford).
- BENGTSSON, B. O., P. WEIBULL & L. GHATNEKAR, 1995.- The loss of alleles by sampling: a study of the common outbreeding grass *Festuca ovina* over three geographical scales. *Hereditas* 122, 221-238.
- BRAMWELL, D., 2002.- *Lotus: Pico de paloma, corazoncillos. Aguayro* 228: 42-45.
- & Z. BRAMWELL, 2001.- *Flores Silvestres de las Islas Canarias*, 4th edn, Editorial Rueda, S.L: Madrid, 437 pp.
- , C. J. HUMPHRIES, B. G. MURRAY & S. J. OWENS, 1972.- Chromosome numbers in plants from the Canary islands, *Bot. Notiser*, Vol. 124, fasc. 3: [376]-382).
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J. *et al.*, (en prensa). *Manual de electroforésis en gel horizontal de almidón*.
- 2001.- *Transformer-1. Un programa de formateo de datos y cálculos estadísticos en genética de poblaciones*.
- CLAYTON, J. W. & D. N. TRETIAK, 1972.- Amine citrate buffer for pH control in starch gel electrophoresis. *J Fish Res Board Can* 29: 1169-1172.
- CRAWFORD, D. J., E. RUIZ, T. F. STUESSY, E. TEPE, P. AQEVEQUE, F. GONZALEZ, R. J. JENSEN, G. J. ANDERSON, G. BERNARDELLO, C. M. BAEZA, U. SWENSON & O. M. SILVA, 2001.- Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation. *Amer. J. Bot.* 88: 2195-2203.
- DEJOODE, D. R. & J. F. WENDEL, 1992.- Genetic diversity and origin of the Hawaiian Island cotton, *Gossypium tomentosum*. *Amer. J. Bot.* 79: 1311-1319.

- FRANCISCO-ORTEGA, J., A. SANTOS-GUERRA, S. C. KIM & D. J. CRAWFORD, 2000.- Plant Genetic Diversity In Canary Islands: a conservation perspective. *Amer. J. Bot.* 87(7): 909-919.
- GAUTHIER, P., R. LUMARET & A. BÉDÉCARRATS, 1998.- Genetic variation and gene flow in alpine diploid and tetraploid populations of *Lotus* (*L. alpinus* (D.C.) Schleicher / *L. corniculatus* L.) I. Insights from morphological and allozyme markers. *Heredity* 80: 683-693.
- GOTTLIEB, L. D., 1977.- Electrophoresis evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64: 161-180.
- HAMRICK, J. L. & M. J. GODT, 1989.- Allozyme diversity in plant species. In Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds.) *Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources*: 43-63. Sunderland: Sinauer Associates Inc. M.A.
- KUNKEL, G., 1969.- Aliens to the Canary Flora. *Cuadernos de Botánica Canaria* 5: 27-44.
- 1976.- Gran Canaria, Tenerife y La Gomera: notas florísticas y adiciones. *Cuadernos de Botánica Canaria* 26/27: 75-81
- 1977.- Endemismos canarios. Inventario de las plantas vasculares endémicas en la provincia de Las Palmas. ICONA *Monografías* 15, 436pp.
- LEWIS & WHITKUS, 1993.- *GeneStat-PC version 3.3*. North Carolina State University. Raleigh. North Carolina.
- MOON, T. Y. 2000.- Recent Dispersal of *Lotus corniculatus* var. *japonicus* Regel Along East Coastal Areas of South Korea. *Lotus Newsletter* (USDA) 31.
- NEI, M., 1973.- Análisis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*: 3321-3323.
- 1978.- Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- ORTEGA, J., 1976.- Citogenética del género *Lotus* en Macaronesia – *Bot. Macaronésica* 1: 17-24.
- 1979.- Citogenética del Género *Lotus* en Macaronesia III. Variación en el contenido de glucósidos cianogénicos en *Lotus* de las Islas Canarias y en Macaronesia. – *Bot. Macaronésica*. 5: 9-19.
- PITARD, J. & L. PROUST, 1908.- *Les Iles Canaries. Flore de L'Archipel*. Paris.
- POPGENE VERSION 1.32., 1997.- Ag/For Molecular Biology and Biotechnology Centre (University of Alberta) and Center for International Forestry Research. Alberta, Canada.
- REED, D. H. & R. FRANKHAM, 2000.- How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55: 1095-1103.
- SANTOS GUERRA, A. & M. FERNANDEZ GALVÁN, 1979.- Plantae in loco natali ab Eric Sventenius inter annos MCMXLIII - MCMLXXI lectae, in Herbario ORT Instituto Nationalis Investigationum Agrarium (Hortus Acclimationis Plantarum Arautapae) sunt. *Index Sem. Hort. Acclim. Plant. Arautapae* 1978.
- SHIELDS, C. R., T. J. ORTON & C. W. STUBER, 1983.- An outline of general resource needs and procedures for the eletrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: Tanskley SD, Orton TJ (eds) *Isozymes in Plant Genetics Breeding, Part A*: 443-468. Elsevier Science Publishing Company Inc. New York, U.S.A.
- SLATKIN, M., 1985.- Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393-430.
- 1987.- Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.
- 1994.- Gene flow and population structure. In Real LA (ed). *Ecological genetics* 3-17. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- SUNDING, P., 1972.- The Vegetation of Gran Canaria– Oslo. I. *Mat.-Naturv. Klasse*. Serie. No. 29, 186 pp.
- 1979.- Origins of the Macaronesian Flora. In Bramwell, D. (ed.) *Plants and Islands*: 13-40. Academic Press. London.

- SWOFFORD, D. L. & R. B. SELANDER, 1989.- *BYOSYS-1*: A fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Heredity* 72: 281-283.
- VALDÉS, B., 2000.- *Lotus*. In Talavera, S., C. Aedo, S. Castroviejo, A. Herrero, C. Romero Zarco. F.J. Salgueiro & M. Velayos (eds.), *Flora Iberica, Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares, VII (II), Leguminosae (partim)*: 776-812. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- VV. AA., 2000.- Lista Roja de Flora Vascular Española (valoración según categorías UICN). *Conservación Vegetal* 6 (extra): 11-38.
- WEBB, P. B. & S. BERTHELOT, 1836-50.- *Histoire Naturelle des Iles Canaries* 3 *Phytographia Canariensis* (2/2):1-496. lam 37-136 B.
- WRIGHT, S., 1951.- The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323 - 354.