

**ESTRUCTURA ESPACIAL DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DE
ERYSIMUM ALBESCENS (CRUCIFERAE) EN GRAN CANARIA:
IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN *EX SITU* EN
BANCOS DE GERMOPLASMA.**

BLAS VILCHES, ALICIA ROCA, JOSÉ NARANJO, BERNARDO NAVARRO,
DAVID BRAMWELL Y JULI CAUJAPÉ-CASTELLS

Jardín Botánico Canario «Viera y Clavijo», Apdo. 14 de Tafira Alta. 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, España.

Recibido: Marzo 2004.

Palabras claves: *Erysimum albescens*, Gran Canaria, estrategias de muestreo, conservación *ex situ*, variabilidad genética, marcadores moleculares (isoenzimas), autocorrelación espacial.

Key words: *Erysimum albescens*, Gran Canaria, sampling strategy, *ex situ* preservation, variation genetic, molecular markers (isozymes), spatial autocorrelation.

RESUMEN

Ante la continua pérdida de diversidad genética que se viene observando en las poblaciones naturales a causa de la continuada acción antrópica sobre el medio ambiente, se hace necesario tomar algunas medidas urgentes que nos permitan la conservación de las especies más amenazadas fuera de su hábitat natural para poner remedio a un problema que puede acarrear consecuencias muy negativas para su diversidad. Este trabajo sugiere una estrategia de muestreo que nos permite sistematizar gran parte del proceso de conservación *ex situ* de la variabilidad genética del endemismo grancanario *Erysimum albescens* en los bancos de germoplasma. La aplicación del análisis de autocorrelación espacial a marcadores moleculares poblacionales (isoenzimas) en 8 poblaciones detectó cierto grado de estructuración genética a corta distancia en este endemismo grancanario, lo cual nos permitió estimar el diámetro de las áreas genéticamente homogéneas. Con ello, obtenemos una indicación del tamaño de las áreas donde es máxima la probabilidad de muestrear individuos emparentados. La aplicación de esta metodología a las tres poblaciones seleccionadas para representar el 99% de la variabilidad genética detectada en este endemismo nos permite establecer que las recolecciones tendrían que realizarse a intervalos de unos 6, 15 y 27 metros (dependiendo de la población) para garantizar que las semillas recolectadas no están emparentadas genéticamente.

SUMMARY

In the face of the continued loss of genetic diversity that anthropic activities are causing on natural populations, it is necessary to undertake urgent measures that allow us to conserve threatened species out of their natural areas of occurrence and lessen the negative consequences of habitat degradation on their diversity. This investigation suggests a sampling strategy that aims at the systematisation of a large part of the decision process involved with the *ex situ* preservation to the Gran Canarian endemic

Erysimum albescens in germplasm banks. The application of spatial autocorrelation to population molecular markers (isozymes) on eight populations of this endemic resulted in the detection of some degree of short-range genetic structuring that allowed us to estimate the diameter of genetically homogeneous areas. This provides an indication of the size of the areas where the probability of sampling related individuals is maximised. The application of this methodology to the three populations selected to represent 99% of the molecular variation detected suggests that the collections should be undertaken at intervals of roughly 6, 15 and 27 meters (depending on the population) to warrant that the seeds collected are not related by descent.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los niveles y distribución de la diversidad genética en poblaciones naturales de plantas es un requisito previo importante para diseñar estrategias de muestreo encaminadas a la conservación *ex situ* en bancos de germoplasma (HAMRICK *et al.*, 1991; FRANKEL *et al.*, 1995; CHAMBERLAIN, 1998; FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000; BATISTA *et al.*, 2001).

El banco de germoplasma del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" (en adelante JBCVC) representa el recurso de conservación vegetal *ex situ* más importante de Macaronesia. Puesto que la misión de un departamento de este tipo no consiste meramente en acumular semillas, sino en garantizar la representación de la variabilidad genética de las poblaciones naturales amenazadas, parece claro que la estimación de los niveles de variación genética debe ser un cometido inherente a su actividad. Muchas veces el material acumulado en bancos de semillas carece de esta información básica, lo cual puede resultar en colecciones genéticamente poco representativas que, aunque sean numéricamente muy abundantes, tienen una utilidad muy limitada de cara a eventuales reforzamientos o reintroducciones poblacionales (CAUJAPÉ-CASTELLS & PEDROLA-MONFORT, 2004).

Con objeto de evitar este efecto indeseable, planteamos un esfuerzo colaborador para complementar la experiencia del Banco de Germoplasma con la información derivada de marcadores moleculares poblacionales. Esta colaboración se inició efectivamente con las especies del género *Erysimum* endémicas de Macaronesia (VILCHES *et al.*, 2002), aunque se tiene en mente extenderla muy pronto a otros géneros de plantas cuya conservación *ex situ* sea objeto de interés para: 1) establecer una metodología formal de muestreo de variación genética de poblaciones naturales canarias para su conservación en el banco de germoplasma; y 2) evaluar la proporción de variación genética que el banco de germoplasma del JBCVC representa.

Erysimum parece un buen modelo para iniciar esta línea, ya que su problemática taxonómica es bien conocida por el personal investigador del JBCVC, y los resultados de las técnicas moleculares pueden también contribuir a clarificarla. En este artículo, usamos datos moleculares a nivel poblacional para ofrecer indicaciones para el muestreo de la variación genética en poblaciones endémicas de Gran Canaria pertenecientes al género *Erysimum* (Cruciferae). Nuestros objetivos son, en primer lugar, comprender el mantenimiento de la variabilidad genética en este taxón. Y en segundo lugar, diseñar una estrategia de muestreo de germoplasma (conservación *ex situ*) que represente la variabilidad

genética de las poblaciones y minimice la probabilidad de recolectar individuos genéticamente emparentados. Estos resultados son parte de una investigación más amplia sobre la diversificación poblacional de *Erysimum* en el archipiélago canario que servirá también para revisar su taxonomía desde una perspectiva multidisciplinar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Las primeras referencias de las poblaciones de *Erysimum* en Gran Canaria se refieren a *Dichroanthus mutabilis* (L'Hér.) Webb & Berth. var. *albescens* Webb & Berth. “*in rupibus altissimis Canariæ propè crucem quæ in summitate est montis Saucillo, non longè à nivis apothecis.*”

Esta variedad ha sido rescatada (BRAMWELL, 2004) y elevada a rango de especie, basándose en la forma de las hojas planas y ocasionalmente dentadas, la inflorescencia más densa, el estilo más largo y las semillas de color marrón oscuro, refiriéndose a estas plantas con el epíteto de *Erysimum albescens* (Webb & Berth.) Bramwell.

De esta manera *Erysimum albescens* queda como un endemismo exclusivo de la isla de Gran Canaria, separándose de las plantas de la isla de La Palma que hasta ahora venían siendo reconocidas como *Erysimum scoparium subsp. lindleyi* (Webb. ex Christ) G.Kunkel.

En Gran Canaria, este taxon es común localmente en hábitats abiertos secos y en pinares de la región Central, en altitudes comprendidas entre 1.400 y 1.800 m.

Muestreo

Se muestrearon un total de 200 individuos correspondientes a 8 poblaciones de la zona central de la isla de Gran Canaria. Las coordenadas UTM de las localidades muestreadas (reflejadas en la Figura 1 y en la Tabla 1) fueron consignadas para saber su posición exacta y facilitar posteriores muestreos y monitoreos. La elección de estas localidades se llevo a cabo describiendo un anillo circular imaginario alrededor del área de distribución del taxon que incluyera los límites altitudinales superior e inferior. Una vez seleccionadas las poblaciones, a cada planta muestreada se le asignó un par de coordenadas cartesianas para identificar su posición relativa respecto al resto de individuos muestreados en su misma población.

El material recolectado para realizar los análisis electroforéticos consistió en hojas frescas de los individuos seleccionados. Se elegía una pequeña cantidad de hojas que eran retiradas cuidadosamente de las plantas y guardadas en bolsas herméticas de plástico. Cada bolsa estaba codificada con un número único que nos sirvió para identificar a cada individuo muestreado.

Estas muestras se mantuvieron en frío con la ayuda de neveras portátiles y bloques refrigerantes mientras se estaba realizando la toma y recogida de material. Posteriormente, todo este material fue almacenado a -80° C en un ultracongelador en los laboratorios moleculares del JBCVC, para luego utilizarlo en la preparación de los extractos proteicos y su posterior análisis.

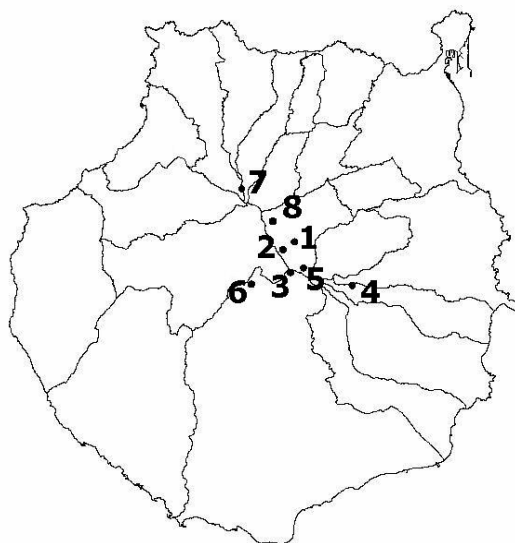


Figura 1. Localización geográfica de las ocho poblaciones de *Erysimum sp* estudiadas. Los números asociados a los puntos de muestreo coinciden con los de la Tabla 1.

Nº y NOMBRE POBLACIÓN	CÓDIGO	ALTITUD	U.T.M.	X int.
1. Codesal Cueva Grande	CG	1.300 m	28RDR 4495	2,64 m
2. Ctra. Cueva Grande - Ayacata	AY	1.550 m	28RDR 4295	9,06 m
3. Mirador de los Pechos	MP	1.825 m	28RDR 4393	14,76 m
4. Encima de Cazadores	EC	1.225 m	28RDR 4991	27,06 m
5. Ctra. Cazadores sobre Los Marteles	CC	1.700 m	28RDR 4493	19,30 m
6. Carretera de Ayacata	CA	1.200 m	28RDR 4092	11,12 m
7. Montañón Negro	MN	1.550 m	28RDS 3900	4,29 m
8. Las Lagunetas	LL	1.225 m	28RDR 4297	6,03 m

Tabla 1. Detalles del muestreo realizado para este trabajo. X int corresponde al tamaño de las áreas homogéneas estimado mediante autocorrelación espacial.

Análisis electroforético

Los extractos proteicos se llevaron a cabo machacando una pequeña porción de las hojas recolectadas en un mortero, al que se le añadió tampón de extracción (SHIELDS *et al.*, 1983). El extracto resultante se adsorbió en patillas de papel Whatman nº 3 de 4 mm x 6 mm, que fueron almacenadas a -80°C hasta que se utilizaron para realizar los análisis.

En el análisis hemos utilizado la técnica de electroforesis de isoenzimas en gel horizontal de almidón para estudiar los genotipos multilocus de las muestras en cinco enzimas codificados por genes asociados al DNA nuclear y mitocondrial. Estos enzimas fueron resueltos en dos sistemas tampón de gel/electrodo (SHIELDS *et al.*, 1983): Histidina 7.0 (sistema E en SHIELDS *et al.*, 1983) y Morfolina – Citrato 6.1 (CLAYTON Y TRETIAK, 1972), utilizando agua como sistema de refrigeración y una concentración de almidón al 11% aproximadamente. En el gel de Histidina 7.0 se resolvieron los enzimas *Fosfoglucoisomerasa* (PGI, E.C.5.3.1.9.) y *Fosfoglutomutasa* (PGM, E.C.5.4.2.2.) (primera y segunda capa respectivamente), y en el gel de Morfolina – Citrato 6.1 se resolvieron los enzimas *Fosfogluconato deshidrogenasa* (6PGD, E.C.1.1.1.44), *Isocítrico deshidrogenasa* (IDH, E.C.1.1.1.42) y *Malato deshidrogenasa* (MDH, E.C.1.1.1.37) (primera, segunda y tercera capa respectivamente).

Autocorrelación espacial

La evaluación de la estructura genética de la variación isoenzimática detectada en el espacio poblacional y la estimación del tamaño de las áreas donde es más probable encontrar individuos emparentados genéticamente se realizó a través de la técnica estadística de la autocorrelación espacial.

La autocorrelación espacial puede definirse como la relación entre los valores de una variable en función de la distribución de los puntos del espacio donde esa variable adquiere un valor determinado (GRIFFITH, 1987). En nuestro caso, las variables son cada uno de los alelos detectados en los individuos analizados, y las unidades espaciales son las coordenadas que definen la posición relativa de esos individuos en las poblaciones donde fueron muestreados.

Para los análisis de autocorrelación espacial incluidos en este trabajo, se construyeron matrices de conectividad entre los individuos de una misma población con las coordenadas cartesianas generadas a partir del muestreo. Los genotipos individuales se re-codificaron de manera que, para cada alelo incluido en los análisis, los individuos homocigotos recibieron un valor de frecuencia de 1.0, los heterocigotos que contienen el alelo una frecuencia de 0.5 y los individuos que carecían del alelo una frecuencia de 0.0 (HEYWOOD 1991). Los *loci* monomórficos no fueron considerados por no contener información relevante para este tipo de análisis y, en los *loci* polimórficos, solamente utilizamos los alelos con frecuencia poblacional igual o mayor que 0.05. En los *loci* dialélicos que cumplieron este requisito, solamente consideramos uno de los alelos, ya que el otro proveería información redundante. En los *loci* con tres o más alelos, se consideraron todos menos uno, ya que su vector de genotipos podría ser deducido a partir de los vectores de los demás alelos y aportaría también información redundante.

Usamos el estadístico denominado 'I de Moran' (MORAN, 1948) como coeficiente de autocorrelación espacial. Este índice (que notaremos IM) se calcula

en base a la co-variación en el mapa de muestreo poblacional de los valores de cada una de las variables utilizadas y varía de -1 a +1, con un valor esperado de $E(IM) = -1/(n-1)$ (ODEN, 1984), donde "n" es el tamaño de la muestra correspondiente. Cuando $IM > 0$ para una variable, se dice que ésta exhibe autocorrelación espacial positiva, lo que significa que los puntos que presentan valores similares para esa variable tienden a estar yuxtapuestos en el espacio poblacional. Cuando $IM < 0$, se dice que la variable presenta autocorrelación espacial negativa. En este caso, los puntos con valores similares para la variable tienden a estar separados en el espacio. Con la codificación de genotipos utilizada, IM es idéntica al coeficiente de relación por descendencia ρ de WRIGHT (1922), según COCKERHAM (1969) y BARBUJANI (1987).

Para esta investigación, todos los correlogramas (esto es, las representaciones de los valores de IM en el espacio) se calcularon para cada una de cinco clases de distancia. Las matrices de distancia geográfica entre pares de individuos, las desviaciones del valor esperado de IM para cada clase de distancia y las significaciones globales de los correlogramas fueron calculadas utilizando el programa SAAP (WARTENBERG, 1989).

En las poblaciones con autocorrelación espacial positiva, interpolamos el punto de intercepción del correlograma total promedio y del correlograma significativo promedio con el valor "0" del eje Y para estimar el tamaño de las áreas genéticamente homogéneas (SOCAL, 1979).

Pruebas de Germinación

En las pruebas de germinación se han utilizado semillas recolectadas durante los muestreos (2198/B población de Ayacata) y semillas que se encuentran almacenadas en el banco de germoplasma, (1923/B población de Artenara y 615/B población de Los Pinos de Gáldar, conservadas a -5° C de temperatura y entre un 3 – 6 % de humedad), como puede verse en la Tabla 2.

En estas pruebas, para romper la dormición de las semillas se utilizaban distintos tratamientos, con el objeto de aumentar la capacidad germinativa en las semillas. Procurando aplicar el tratamiento más adecuado en cada caso según las especies a estudiar (IBGRP, 1985 a y b; ISTA, 1985; DURANT-ALTISENT Y PEREZ-GARCIA, 1984). Los ensayos se realizaron bajo condiciones constantes controladas de luz y temperatura en la que se quiere ver la diferencia de germinación entre semillas recogidas directamente del campo y semillas almacenadas en el Banco de Semillas del JBCVC. Para la luz se mantuvo un fotoperíodo de 18 horas de luz por 6 de oscuridad (18/6), siendo la fuente luminosa utilizada 6 tubos fluorescentes (F36W/840). La temperatura programada fue de 24° C en el periodo de luz y 19° C para el periodo de oscuridad. Para el mantenimiento de estas condiciones, las pruebas se llevaron a cabo en una cámara germinadora (MOD. G.V.-1200). Los ensayos tuvieron una duración máxima de 25 días, anotando diariamente las semillas germinadas para cada ensayo. Así podemos ver la evolución de la germinación, como varía el porcentaje de germinación con respecto al tiempo. A las semillas se les realizó una prueba tipo, colocándolas en una placa de Petri de 9 mm de diámetro, sobre un papel de filtro (Whatman) humedecido con 4 ml de agua destilada. El número de semillas elegido para cada prueba por placa fue de 25, (realizando una repetición de cada

ensayo, no siendo necesario hacer más repeticiones ya que los resultados obtenidos fueron similares).

LOCALIDAD	Nº B.S	ESPECIE	TRATAMIENTO	GERM.	C.V	Tm.
Ayacata (GC)	2198/B	<i>Erysimum albescens</i>	Prueba tipo: - Papel + 4 ml H2O(Luz/osc=18/6- T=21°C)	96%	13,26	7,54
Artenara (GC)	1923/B	<i>Erysimum albescens</i>	Prueba tipo: - Papel + 4 ml H2O(Luz/osc=18/6- T=21°C)	88%	10,68	9,36
Pinos de Gáldar (GC)	615/B	<i>Erysimum albescens</i>	Prueba tipo: - Papel + 4 ml H2O(Luz/osc=18/6- T=21°C)	74%	9,00	11,11

Tabla 2.- Tratamiento aplicado y resultados obtenidos en las pruebas de germinación para las muestras de *Erysimum albescens* de Gran Canaria. CV: Coeficiente de Velocidad; Tm: Tiempo medio de germinación.

RESULTADOS

Los 5 enzimas analizados en las 8 poblaciones muestreadas resultaron en la interpretación de 11 *loci* isoenzimáticos y 26 alelos (Tabla 3). El número de alelos que satisficieron los criterios de autocorrelación espacial descritos en Métodos (Tabla 4) varió entre 9 alelos en Las Lagunetas y en Mirador de los Pechos y 5 alelos en Ayacata y Codesal de Cueva Grande. La proporción de alelos que resultaron en correlogramas significativos en las ocho poblaciones sujetas a análisis varió entre el 57,14 % (cuatro alelos de siete en Carretera a Cazadores) y el 11,11 % (un alelo de nueve en Las Lagunetas). Para la primera clase de distancia, la proporción de alelos que exhibió valores positivos significativos de IM varió desde 42,86 % en las poblaciones CA y CC (promedio de IM = 0,17 y 0,12 respectivamente) a 0 % en EC y MN (promedio de IM = -0,03 y 0,03 respectivamente). Los valores medios totales de IM en la primera clase de distancia no fueron positivos en todos los casos, y variaron desde IM = -0,07 en CG a IM = 0,17 en AY y MP. Todos los valores medios significativos de IM en la primera clase de distancia fueron positivos, variando desde 0,03 en MN a 0,57 en MP. La caída media del valor de IM entre la primera y segunda clase de distancia para los correlogramas significativos fue de 0,27 unidades de IM (entre 0,02 unidades de IM en la EC a 0,67 unidades de IM en AY y CG). Como se muestra en la Fig. 2, las medias de los correlogramas significativos por población exhibieron un patrón de decrecimiento progresivo en los valores de IM con las clases de distancia, especialmente acusado en las poblaciones MP, CA y CC.

Locus/alelo	CG	AY	MP	EC	CC	CA	MN	LL
PGM-1	15	15	25	35	30	23	23	23
a	0,433	0,533	0,500	0,500	0,950	0,548	0,455	0,522
b	0,567	0,467	0,500	0,500	0,050	0,452	0,545	0,478
PGM-2	15	15	25	35	30	23	24	23
a	0,000	0,000	0,000	0,014	0,033	0,000	0,000	0,196
b	0,733	0,833	0,880	0,943	0,967	1,000	1,000	0,804
c	0,267	0,167	0,100	0,043	0,000	0,000	0,000	0,000
PGM-3	15	25	25	35	30	23	24	23
a	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b	0,933	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
c	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
IDH-1	15	25	25	35	30	23	24	23
a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
PGI-1	15	25	25	35	30	23	24	23
a	0,400	0,300	0,280	0,129	0,233	0,043	0,104	0,522
b	0,600	0,700	0,720	0,871	0,767	0,957	0,896	0,478
MDH-1	15	25	25	35	30	23	24	22
a	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b	0,000	0,000	0,040	0,043	0,400	0,239	0,174	0,341
c	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,045
d	0,733	0,700	0,640	0,957	0,367	0,500	0,457	0,295
e	0,267	0,300	0,320	0,000	0,233	0,261	0,370	0,318
MDH-2	15	25	25	35	30	23	24	23
a	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b	1,000	1,000	0,880	0,957	0,900	0,826	0,870	0,957
c	0,000	0,000	0,120	0,043	0,100	0,174	0,130	0,043
MDH-3	15	25	25	35	30	23	24	22
a	0,867	0,640	0,980	1,000	1,000	0,978	0,957	0,727
b	0,133	0,360	0,020	0,000	0,000	0,022	0,043	0,273
6PGD-1	15	25	25	35	30	23	24	21
a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,905
b	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,095
6PGD-2	15	25	25	35	30	23	24	21
a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,905
b	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,095
6PGD-3	15	25	25	35	30	23	24	23
a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabla 3.- Frecuencias génicas de los alelos detectados en las 8 poblaciones de *E. albescens* muestreadas. Los números enteros indican el tamaño muestral. Los códigos de las poblaciones corresponden a la Tabla 1.

Población	Clases de Distancia				
	1	2	3	4	5
Codesal Cueva Grande (5 , 1)					
Medias significativas	0,44	-0,23	-0,13	-0,27	-0,16
Medias Totales	-0,07	-0,04	-0,13	-0,14	0,02
Ø Área homogénea (m)	2	3	4	7	11
Ayacata (5, 1)					
Medias significativas	0,26	-0,41	-0,04	-0,14	-0,19
Medias Totales	-0,04	-0,12	0,04	-0,16	0,05
Ø Área homogénea (m)	6	14	20	30	52
Mirador de los Pechos (9, 3)					
Medias significativas	0,57	0,34	-0,09	-0,44	-0,59
Medias Totales	0,17	0,09	-0,04	-0,22	-0,21
Ø Área homogénea (m)	4	9	16	21	30
Encima de Cazadores (6, 1)					
Medias significativas	0,07	0,09	0,08	-0,11	-0,30
Medias Totales	-0,03	-0,03	-0,01	-0,00	-0,08
Ø Área homogénea (m)	8	12	20	32	55
Carretera a Cazadores (7, 4)					
Medias significativas	0,22	0,16	0,07	-0,14	-0,47
Medias Totales	0,12	0,07	0,01	-0,09	-0,28
Ø Área homogénea (m)	5	11	17	24	45
Carretera de Ayacata (7, 3)					
Medias significativas	0,46	0,16	-0,30	-0,33	-0,23
Medias Totales	0,17	0,02	-0,18	-0,10	-0,14
Ø Área homogénea (m)	3	6	8	11	22
Montañón Negro (7, 1)					
Medias significativas	0,03	-0,33	-0,04	0,11	0,00
Medias Totales	0,03	-0,18	-0,02	0,00	-0,04
Ø Área homogénea (m)	4	9	12	13	20
Las Lagunetas (9, 1)					
Medias significativas	0,14	-0,06	-0,32	-0,03	-0,02
Medias Totales	0,01	-0,06	-0,12	-0,06	-0,00
Ø Área homogénea (m)	4	7	9	10	26

Tabla 4.- Estadísticos de autocorrelación espacial en las ocho poblaciones analizadas. Los números entre paréntesis al lado de los nombres de las poblaciones representan el número de alelos sometidos a autocorrelación y el número de alelos que resultó en correlogramas significativos, respectivamente.

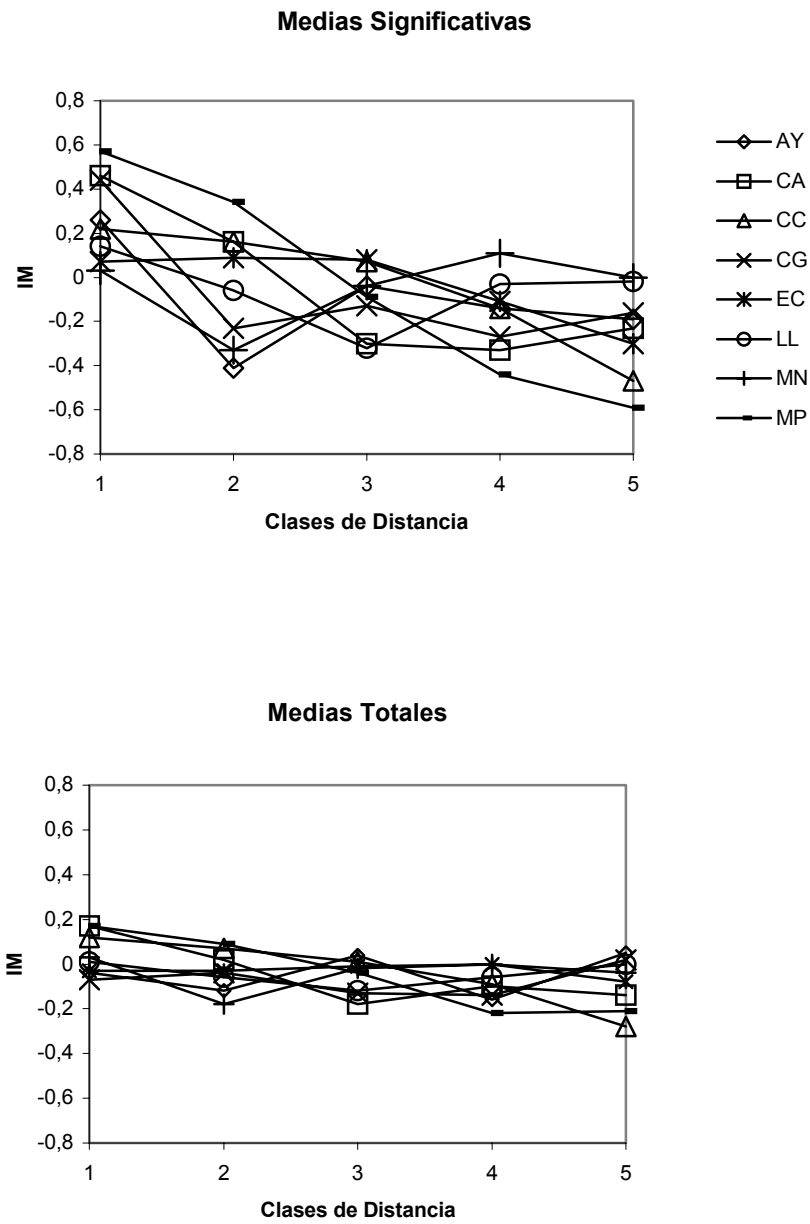


Figura 2.- Correlogramas medios significativos (arriba) y totales (debajo) para las ocho poblaciones sometidas a autocorrelación espacial.

Las intercepciones del eje x (Tabla 1) para las medias de los correlogramas significativos por población abarcaron valores desde 2,64 m en CG a 27,06 m en EC (el valor medio de intercepción del eje x para todas las poblaciones analizadas fue de 11,78 m).

En cuanto a los ensayos de germinación realizados para *Erysimum albescens*, con los datos observados en estas pruebas podemos obtener una curva de germinación en la que representamos el porcentaje de semillas germinadas, frente al tiempo transcurrido desde la siembra (Figura 3), variando este porcentaje entre 96% para las semillas recolectadas en la población de Ayacata y 74% para las semillas recolectadas en los Pinos de Gáldar. También podemos calcular algunos índices relacionados con la velocidad de germinación (Tabla 2) que nos ayudarán a entender mejor la curva de germinación como son el Coeficiente de Velocidad (Cv; KOTOWSKI, 1926) con valores que van desde 13,26 en Ayacata a 9,00 en Los Pinos de Gáldar y el Tiempo medio de germinación medido en días (Tm; HARRINGTON, 1972) con valores que van desde 7,34 en Ayacata a 11,11 en Los Pinos de Gáldar.

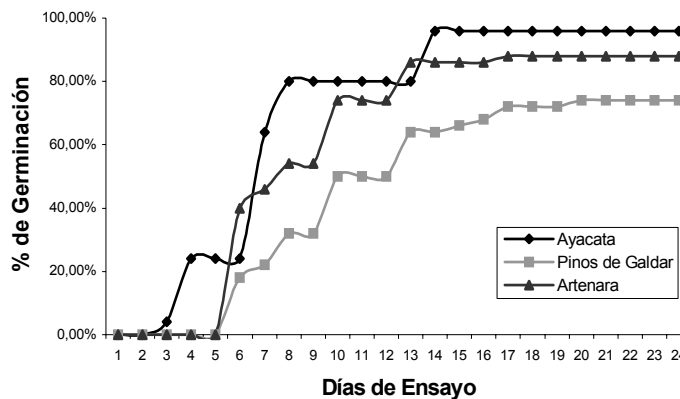


Figura 3.- Evolución en la germinación de *Erysimum albescens* en muestras de las poblaciones de Ayacata, Pinos de Gáldar y Artenara almacenadas en el banco de semillas del JBCVC. Prueba Tipo (ver Material y Métodos).

Según estos resultados, los niveles de germinación conseguidos, tanto en las muestras que estaban conservadas en la nevera (poblaciones de Pinos de Gáldar y Artenara) como en las muestras que fueron recogidas recientemente en la población natural, son bastante buenos, por lo que podemos decir que no es necesario aplicar ningún tratamiento especial para la germinación de estas semillas, ya que germinan fácilmente mediante una simple prueba tipo.

DISCUSIÓN

Estructura espacial de la variabilidad genética

La autocorrelación espacial facilita una descripción precisa de la distribución de la diversidad genética detectada en el espacio poblacional (EPPERSON, 1993). Por consiguiente, la perspectiva que provee esta técnica estadística para los análisis de datos en genética de poblaciones nos permite hacer inferencias sobre la transmisión de genes con implicaciones para la comprensión de la dinámica genética poblacional y para el muestreo destinado a conservación *ex situ* en bancos de germoplasma. Dada la importancia crucial del flujo génico para la generación, mantenimiento y conservación de la diversidad genética, los datos de autocorrelación espacial también constituyen un complemento muy valioso a los estudios reproductivos, morfológicos y demográficos necesarios para diseñar estrategias de conservación y gestión sostenible.

La detección de organización de la variabilidad genética en cortas distancias en plantas vasculares se asocia comúnmente con tres factores no necesariamente excluyentes: 1) la existencia de flujo génico de naturaleza local, que puede incluir apareamiento selectivo y capacidades limitadas de dispersión de semillas (LEVIN & KERSTER, 1974; SCHNABEL *et al.*, 1991; SHAPCOTT, 1995; CAUJAPÉ-CASTELLS & PEDROLA-MONFORT, 1997); 2) una incidencia moderada-alta de la reproducción vegetativa (SHAPCOTT, 1995; CAUJAPÉ-CASTELLS *et al.*, 1999); y 3) un predominio de los procesos estocásticos en la dinámica poblacional (TURNER *et al.*, 1982; SOKAL Y WARTENBERG, 1983). Puesto que en *Erysimum* no existe reproducción vegetativa, es probable que la estructuración detectada de la variabilidad genética sea resultado de la combinación de los factores 1) y 3).

Cuando, como en el caso de *Erysimum* en Gran Canaria, las poblaciones exhiben cierto grado de autocorrelación espacial positiva, podemos estimar el diámetro de las áreas genéticamente homogéneas. SOKAL (1979) y SOKAL y WARTENBERG (1983) interpretan la primera intercepción del eje x en los correlogramas (esto es, el punto en que el correlograma corta el eje de ordenadas por el origen) como una estimación del tamaño de las áreas homogéneas. La interpretación de este valor no significa que el intercambio reproductivo se restrinja a estas distancias (de hecho, es probable que el flujo de polen y de semillas abarque varias poblaciones), sino que las cohortes de individuos emparentados por descendencia se ubican en el espacio poblacional en un área cuyo radio es el estimado por el punto de intercepción.

Implicaciones para la conservación *ex situ* de la variabilidad genética en bancos de germoplasma

Las semillas de *Erysimum* son pequeñas y conservan su poder de germinación incluso después de un tiempo prolongado de almacenamiento. Experimentos de germinación llevados a cabo en el banco de semillas con los *Erysimum* de Gran Canaria indican niveles de germinación bastante altos (Tabla 2 – Figura 3). Esta facilidad de manejo, junto con los buenos resultados obtenidos en las pruebas de

germinación, hacen que las semillas de *Erysimum* sean adecuadas para el almacenamiento a largo plazo.

Puesto que estas características garantizan la conservación del material genético almacenado, nuestro principal objetivo a la hora de recolectar semillas para el banco de germoplasma debe ser el de representar adecuadamente la variabilidad genética que contienen las poblaciones naturales de las que provienen. En muchas ocasiones, la recolección de semillas para conservación *ex situ* se hace sin tener en cuenta ninguna estimación de la variabilidad genética, con lo cual se desconoce si las colecciones contienen los recursos genéticos que la naturaleza nos ofrece. La perspectiva de la genética de poblaciones y de la autocorrelación espacial presentadas en este trabajo nos dotan de un recurso muy potente para estimar la variabilidad genética de las poblaciones y, de esta manera, evitar que las muestras almacenadas en las colecciones de bancos de semillas presenten problemas de escasa representatividad o consanguinidad.

El valor de G_{ST} (NEI, 1973), que cuantifica la proporción de variación genética total que es atribuible a la diferenciación entre poblaciones, es muy bajo en las poblaciones de *Erysimum* analizadas ($G_{ST} = 0.120$). Esto indica que estas poblaciones son genéticamente muy homogéneas y que probablemente muestreando en muy pocas de ellas conseguiríamos representar una gran proporción de la variabilidad genética detectada. Aplicando la fórmula $P = (1 - G_{ST})^n$ (HAMRICK *et al.*, 1991) para estimar el número de poblaciones (n) necesario para representar una proporción del 99% ($P = 0.99$) de la variación isoenzimática detectada entre poblaciones ($G_{ST} = 0.120$), resulta que con 3 de las 8 poblaciones muestreadas serían suficientes. La ecuación utilizada para alcanzar este resultado mostró su robustez frente a diferentes métodos de cálculo de G_{ST} en las simulaciones llevadas a cabo por CULLEY *et al.*, (2002) y además su aplicación es apropiada en *Erysimum* porque asume niveles de diversidad genética similares entre las poblaciones consideradas. A la luz de la aparente consistencia de este resultado, y atendiendo al número de alelos detectados por población, parece acertado seleccionar LL, MP y EC para recolecciones intensivas de semillas, porque entre estas tres poblaciones podríamos capturar el 100% de alelos detectados.

Una segunda cuestión importante relativa al muestreo de germoplasma se refiere a cómo recolectar las semillas en la población natural de manera que no se generen problemas de consanguinidad si se usan las colecciones para reintroducciones o reforzamientos poblacionales. Según las estimaciones de los puntos de intercepción de los correlogramas, la probabilidad de muestrear individuos emparentados en estas tres poblaciones es máxima en un rango de 14,76 metros (en MP) a 11,12 metros (en CA) para los correlogramas significativos, y de 14,76 metros (en MP) a 19,30 metros (en CC) para los correlogramas totales (Fig. 2).

Aunque esta aproximación cuantitativa ha sido criticada por estar sujeta a cierta variación estocástica y estadística (EPPERSON, 1990), presenta utilidad para la conservación *ex situ* porque provee un valor operativo del tamaño de los vecindarios genéticos intra-poblacionales (esto es, las regiones donde existe máxima probabilidad de encontrar individuos emparentados). Puesto que el punto de intercepción para los correlogramas significativos es más conservativo (esto es,

comprende intervalos más grandes), parece aconsejable ajustarse a ésta estimación.

La aplicación práctica de este resultado es que solamente muestreando semillas en LL, MP y EC a intervalos de (al menos) 6,03, 14,76 y 27,06 metros estaremos en condiciones de asegurar que las muestras recolectadas representan la diversidad genética de las poblaciones sin crear problemas asociados a una eventual consanguinidad al ser utilizadas para reintroducciones o reforzamientos poblacionales.

La estrategia general de basar la conservación *ex situ* en el análisis espacial de los datos de variabilidad genética puede demorar las recolecciones de semillas ligeramente. No obstante, este proceder es ventajoso ya que resulta en una representación consistente de la variabilidad genética de las especies diana y minimiza la probabilidad de muestrear individuos emparentados. A todas luces, esta aproximación parece más justificada que la recolección indiscriminada de grandes cantidades de semillas que, al no haber sido muestreadas siguiendo criterios genéticos, pueden infra-representar la variación del taxón y por tanto tener muy escaso valor para eventuales reintroducciones o reforzamientos poblacionales.

AGRADECIMIENTOS

Este artículo fue redactado mientras Juli Caujapé-Castells era investigador Ramón y Cajal en el JBCVC, y agradece al Ministerio de Ciencia y Tecnología y al Cabildo de Gran Canaria la co-financiación de su contrato Ramón y Cajal. Blas Vilches Navarrete disfrutaba de una beca de investigación del Cabildo de Gran Canaria en el JBCVC. Este trabajo ha sido igualmente co-financiado con el proyecto BASEMAC del Programa de Iniciativa Comunitaria INTERREG III-B espacio Azores – Madeira – Canarias, en el que el Cabildo de Gran Canaria es Socio Coordinador.

REFERENCIAS

- BARBUJANI, G., 1987.- Autocorrelation of gene frequencies under isolation by distance. *Genetics* 117: 777-782.
- BATISTA F, BAÑARES A, CAUJAPÉ-CASTELLS J, MARRERO-GÓMEZ M, CARQUÉ E, SOSA PA., 2001.- Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* (Cistaceae) from the Canary islands: Intraspecific and interspecific comparisons and implications for genetic conservation. *American Journal of Botany* 88, 1582-1592.
- BRAMWELL D., 2004.- *Simbolae Canarienses*. Bot. Macaronésica, 25: 83-86.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J. & PEDROLA-MONFORT, J., 1997.- Space-time patterns of genetic structure within a stand of *Androcymbium gramineum* (Cav.) McBride (Colchicaceae). *Heredity* 79: 341-349.
- 2004.- A sampling design for the ex-situ genetic conservation of the Ibero-Moroccan endangered endemic *Androcymbium gramineum*: implications for the assessment of a conservation strategy from a survey of genetic diversity for neutral markers. *Conservation Genetics* (en prensa).

- & MEMBRIVES N., 1999.- Contrasting patterns of genetic structure in the South African species *Androcymbium bellum*, *A. guttatum* and *A. pulchrum* (Colchicaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 591 - 605.
- CHAMBERLAIN JR., 1998.- Isozyme variation in *Calliandra calothyrsus* (Leguminosae): its implications for species delimitation and conservation. *American Journal of Botany* 85, 37-47.
- CLAYTON JW, TRETIAK DN., 1972.- Amine citrate buffer for pH control in starch gel electrophoresis. *J Fish Res Board Can* 29: 1169-1172.
- COCKERHAM, C. C., 1969.- Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-84.
- CULLEY TM, WALLACE LE, GENGLER-NOWAK KM, CRAWFORD DJ., 2002.- A comparison of two methods of calculating G_{ST} , a genetic measure of population differentiation. *American Journal of Botany* 89, 460-465.
- DURAN ALTISENT, J.M. & F. PEREZ GARCIA., 1984.- "Aspectos fisiológicos de la germinación de semillas". E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid. Tomos I y II.
- EPPERSON, B. K., 1990.- Spatial patterns of genetic variation within plant populations. pp 229-253, In *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* (A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir, eds.). Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, Massachusetts.
- 1993.- Spatial and space-time correlations in systems of subpopulations with genetic drift and migration. *Genetics* 133:711-727.
- FRANCISCO-ORTEGA J, SANTOS-GUERRA A, KIM SC, CRAWFORD DJ., 2000.- Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *American Journal of Botany* 87, 909-919.
- FRANKEL OH, BROWN AHD, BURDON JJ., 1995.- *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press, Cambridge.
- GRIFFITHS, D. A. 1987.- *Spatial autocorrelation: a primer*. Washington, dc: Association of American Geographers.
- HAMRICK JL, GODT MJW, MURAWSKI DA, LOVELESS MD 1991.- Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In *Genetics and Conservation of rare plants* (eds. Falk DA, Holsinger K), pp. 75-86. Oxford University Press, New York.
- HARRINGTON, J. F. 1972. "Seed Storage and Longevity", en T. T. Kozłowski, *Seed Biology*, Academic Press, Nueva York, vol. III, pp. 145-246
- HEYWOOD, J. S., 1991.- Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 335-355.
- IBPGR., 1985a.- Handbook of seed technology for genebanks. Vol. I: "Principles and Methodology".
- 1985b.- Handbook of seed technology for genebanks. Vol. II: "Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations".
- ISTA., 1985.- "Reglas internacionales para ensayos de semillas" Ministerio de Agricultura. Dirección General de la Producción Agraria. Madrid.
- KOTOWSKI F. Temperature relations to germination of vegetable seed. *Proc.Am.Soc.Hort. Sci.* 1926: 23:176-184
- LEVIN D. A., KERSTER, H. W., 1974.- Gene flow in plants. *Evolutionary Biology* 7: 139 - 220.
- MORAN, P.A. P., 1948.- The interpretation of statistical maps. *Journal of the Royal Statistical Society B* 37: 243- 251.
- NEI M., 1973.- Análisis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*: 3321-3323.
- ODEN, N. L., 1984.- Assessing the significance of a spatial correlogram. *Geographical Analysis* 16: 1-16.
- SCHNABEL, A., R. H. LAUSHMAN, AND J. L. HAMRICK., 1991.- Comparative genetic structure of two co-occurring tree species: *Maclura pomifera* (Moraceae) and *Gleditsia triacanthos* (Leguminosae). *Heredity* 67: 357-364.
- SHAPCOTT, A., 1995.- The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). *Heredity* 74: 28-38.

- SHIELDS CR, ORTON TJ, STUBER CW., 1983.- An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: Tanksley SD, Orton TJ (eds) *Isozymes in Plant Genetics Breeding, Part A*: 443-468. Elsevier Science Publishing Company Inc. New York, U.S.A.
- SOKAL, R. R., 1979.- Testing statistical significance of geographical variation patterns. *Systematic Zoology* 8, 227-232.
- & WARTENBERG, D., 1983.- A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. *Genetics* 105 (1): 219-237
- TURNER, M., STEPHENS, J. C. & ANDERSON, W. W., 1982.- Homozygosity and patch structure in plant populations as a result of nearest neighbor pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79, 203-207.
- VILCHES, B. et al, 2002.- La Variación genética de *Erysimum* L. (Cruciferae) en Gran Canaria. *Resúmenes del 1er. Congreso de biología de la conservación de plantas Pp. 100 Universitat de Valencia*
- WARTENBERG, D., 1989.- SAAP version 4.3. Spatial autocorrelation Analysis Program. Distributed by the author.
- WRIGHT, S.- 1922.- Coefficients of inbreeding and relationship. *American Naturalist* 56: 330-338.