

FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

**SISTEMAS INSULARES E ISLAS DE HÁBITAT:
FILOGEOGRAFÍA Y CONSERVACIÓN DE *ASTRAGALUS*
EDULIS BUNGE (FABACEAE), *JACOBAEA AURICULA*
(BOURG. EX COSS.) PELSER (ASTERACEAE) Y *ARENARIA*
BALEARICA L. (CARYOPHYLLACEAE).**

TESIS DOCTORAL
Sara Bethsabe Barrios de León
Salamanca, 2013

FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

SISTEMAS INSULARES E ISLAS DE HÁBITAT: FILOGEOGRAFÍA Y
CONSERVACIÓN DE *ASTRAGALUS EDULIS BUNGE* (FABACEAE), *JACOBAEA
AURICULA* (BOURG. EX COSS.) PELSER (ASTERACEAE) Y *ARENARIA
BALEARICA* (CARYOPHYLLACEAE).

Memoria que para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de
Salamanca, presenta la licenciada **Sara Bethsabe Barrios de León**

Handwritten signature of Sara Bethsabe Barrios de León in blue ink.

VºBº del director

VºBº del director

Handwritten signature of Montserrat Martínez Ortega in blue ink.

Dña. M^a. Montserrat Martínez Ortega

Handwritten signature of Julio Peñas de Giles in black ink.

D. Julio Peñas de Giles

Salamanca, 2013



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA
Campus Miguel de Unamuno
37007 Salamanca

Dña. M. Montserrat MARTÍNEZ ORTEGA, profesora titular del Departamento de Botánica de la Universidad de Salamanca y D. Julio PEÑAS DE GILES, profesor titular del Departamento de Botánica de la Universidad de Granada,

INFORMAN

En calidad de directores de la Memoria de Tesis Doctoral cuyo título es: *Sistemas insulares e islas de hábitat: Filogeografía y conservación de Astragalus edulis Bunge (Fabaceae), Jacobaea auricula (Bourg. ex Coss.) Pelsler (Asteraceae) y Arenaria balearica L. (Caryophyllaceae)*, realizada por la Licenciada en Biología Dña. Sara Bethsabe Barrios de León, consideran finalizado el trabajo y autorizan la presentación, a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Salamanca, a 18 de Octubre de 2013

Dña. M. Montserrat Martínez Ortega

D. Julio Peñas de Giles

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, Dra. M. M. Martínez Ortega y el Dr. Julio Peñas de Giles por la oportunidad que me dieron de trabajar con ellos y por la confianza que han depositado en mí al confiarme una parte de sus proyectos de investigación, sin garantía ninguna de que salieran adelante, espero haber cumplido al menos en parte sus expectativas. Este trabajo no habría salido adelante sin su apoyo.

Este estudio no hubiera sido posible sin las becas y ayudas de movilidad de las que he disfrutado, entre las que se encuentran una ayuda de movilidad para estudiantes Iberoamericanos, financiada por el Banco Santander y la beca MAE-AECID, financiada por la Agencia Española para la Cooperación Internacional. También agradezco a la Dirección General de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación por la ayuda de movilidad concedida con el fin de obtener la mención europea.

También quiero agradecer, aunque nunca podré hacerlo como se merecen, a todos ustedes, que me han acompañado en cada una de las diferentes etapas que he pasado, porque cada uno ha sido una pieza imprescindible en la historia de mi vida. Nada sería igual y yo no sería la misma si tan solo uno hubiera faltado. Gracias por compartir conmigo risas, bromas, trabajo, parrandas y de vez en cuando alguna lágrima (aunque fuera de coraje). Gracias por brindarme su apoyo incondicional y tenderme una mano amiga, solidaria, en los momentos difíciles y estar dispuestos a compartir risas y tonterías. Gracias sobre todo a mi familia y amigos cercanos por haberme soportado este año, que me ha parecido que tiene más de 365 días.

“Cuidado con lo que querés, porque algún día lo podés conseguir.
No se trata sólo de tu voluntad...
dale tiempo al tiempo” F.P

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1. – Introducción.....	2
Objetivos generales.....	9
General aims.....	10
CAPÍTULO 2.- Filogeografía de <i>Astragalus edulis</i> Bunge (Fabaceae): El impacto de los cambios en el nivel del mar durante el Cuaternario en el Mediterráneo occidental y Macaronesia.....	11
CAPÍTULO 3.- Diseñando estrategias de conservación a través de la selección de Unidades Genéticas Relevantes para la Conservación, en la especie amenazada <i>Astragalus edulis</i> Bunge.....	17
CAPÍTULO 4.- Patrones genéticos complejos en las islas de hábitat ibéricas: filogeografía de <i>Jacobaea auricula</i> (Bourq. ex Coss.) Pelser (Asteraceae).....	23
CAPÍTULO 5.- Filogeografía del endemismo tirrénico <i>Arenaria balearica</i> L.: Huellas genéticas de la historia de las islas continentales del Mediterráneo Occidental desde el Oligoceno	29
CAPÍTULO 6.- Conclusiones.....	36
SUMMARY	43

CAPÍTULO 1:
INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. Introducción

Este trabajo se encuadra dentro proyectos de investigación que se han llevado a cabo gracias a la colaboración de investigadores de las Universidades de Salamanca y Granada, con el objetivo de desarrollar herramientas que ayuden a establecer criterios de conservación de recursos fitogenéticos en poblaciones de especies con apetencias ecológicas específicas. Se recurrió a la filogeografía y sus herramientas para interpretar la huella que los diferentes fenómenos paleoclimáticos y paleogeográficos han dejado impresos en la estructura y diversidad genética de las especies objeto de estudio. Se utilizaron también los fundamentos de la teoría de islas para estudiar, tanto los patrones genéticos ancestrales como los actuales, en *Astragalus edulis*, *Jacobaea auricula* y *Arenaria balearica*.

Esta tesis doctoral se ha podido realizar gracias a la concesión de ayuda financiera del Banco Santander y la Agencia Española para la Cooperación Internacional así como a la Dirección General de Políticas Universitarias, Ministerio de Educación. Algunos capítulos se han financiado mediante contribuciones de los proyectos de la Dirección General de Investigación-Ministerio de Economía y Competitividad, referencias CGL2012-32574, CGL2010-16357 y CGL2009-07555.

ISLAS VERDADERAS VERSUS ISLAS DE HÁBITAT

Las islas constituyen unidades simples y pequeñas, con límites claramente definidos y susceptibles a ser etiquetadas. Su homogeneidad y aislamiento (transitorio o permanente) permiten estudiar respuestas ecológicas y evolutivas que la complejidad de las comunidades continentales impide dilucidar con facilidad. De manera general las islas pueden dividirse en dos clases: Islas continentales e Islas oceánicas, siendo la principal diferencia entre ambas el contacto (o falta de éste) que han tenido con las masas continentales y su biota. Algunos hábitats de tierra firme pueden ser considerados como “islas de hábitat”, y han sido definidos como parches de un tipo de hábitat particular, aislados de parches similares por zonas de hábitat totalmente diferente a ellos. Se parecen a las islas oceánicas el aislamiento espacial y la restricción de flujo genético al que se ven sometidas las especies que viven en ellas, siendo la mayor diferencia entre las “islas de hábitat” y las islas verdaderas el que las últimas que no presentan límites claros y definidos, además de estar rodeadas por hábitats que contienen especies capaces de establecer poblaciones exitosas dentro del parche. A

diferencia de los fragmentos recientes, las islas de hábitat son estables, tanto en número como en composición de especies. Este tipo de hábitat suele contener poblaciones pequeñas y con reducida capacidad de dispersión, pero que conservan su potencial de divergencia y de generación de endemismos restringidos. Existen diversos trabajos teóricos que han utilizado el modelo de islas como paradigma para explicar la forma en que las interacciones entre el flujo genético, tamaño efectivo de las poblaciones y la deriva genética influyen en los patrones de diversidad intra- e interpopulacionales, pero no tantos trabajos prácticos dedicados a comprobar la validez de las hipótesis establecidas. Tanto las islas verdaderas como los hábitats tipo isla presentan un gran potencial como laboratorios naturales para llevar a cabo estudios tanto sobre radiación adaptativa, como sobre el papel que la deriva genética y la divergencia poblacional han desempeñado en la historia evolutiva de diferentes especies de plantas vasculares.

FILOGEOGRAFÍA Y MARCADORES MOLECULARES

Las plantas recurren a estrategias de dispersión que determinan tanto la localización física y espacial de los individuos y genotipos dentro de las poblaciones, como la cantidad de intercambio genético dentro y entre poblaciones. Sin embargo, la estructura de la variabilidad genética en las poblaciones de plantas no se debe únicamente a las fuerzas contemporáneas de intercambio genético, también es producto de factores históricos. El impacto de esta historia evolutiva hace necesario el uso de estudios filogeográficos para comprenderlas. La filogeografía es una disciplina relativamente reciente, que utiliza herramientas moleculares para identificar e interpretar las señales o huellas genéticas que los cambios paleohistóricos han dejado en la diversidad y estructura genética de los individuos y poblaciones. Durante los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten el estudio de la variabilidad genética a nivel molecular, mediante el uso de marcadores específicos. Para poder reflejar las variables y procesos de interés en estudios de índole filogeográfica, las herramientas moleculares a utilizar deben ajustarse al contexto geográfico, temporal y taxonómico de los organismos investigados y a sus dinámicas, es por esto que para realizar el presente estudio se han utilizado tanto marcadores nucleares (tipo AFLP), como organelares (secuencias de ADN cloroplástico).

Los AFLPs son considerados marcadores de alta eficacia ya que permiten el análisis de un elevado número de *loci* por experimento. Son muy eficientes para realizar estudios

de diversidad a nivel específico e infraespecífico, además de ser una técnica robusta y con resultados altamente reproducibles. Su origen nuclear y dominancia los hace especialmente atractivos para la realización de estudios en los cuales los marcadores de herencia uniparental no ofrecen suficiente variabilidad siendo particularmente apropiados para los estudios en plantas con importantes procesos de hibridación.

El ADN cloroplástico (cpDNA) es una unidad de herencia simple, haploide, multicopia y no recombinante. En la mayoría de las angiospermas es únicamente transmitido por las semillas, lo que lo convierte en un buen marcador para los procesos de colonización. Debido a su modo clonal de herencia, bajas tasas de mutación y polimorfismo, el cpDNA ha sido utilizado en el estudio de los efectos genéticos de la migración y colonización durante largos períodos de tiempo ya que es capaz de revelar los principales eventos históricos de un linaje. Por otra parte, debido al alto nivel de fijación que presenta, es suficiente muestrear unos cuantos individuos para caracterizar completamente una población, a diferencia de los marcadores nucleares que suelen requerir una muestra mucho más amplia, por lo que los esfuerzos pueden centrarse en cubrir la estructura espacial del linaje estudiado.

ESPECIES SELECCIONADAS

Las especies incluidas en este estudio son típicas de sistemas insulares, bien sean islas verdaderas o islas de hábitat, tienen en común el presentar distribución natural fragmentada y disyunta, alto grado relativo de aislamiento geográfico entre poblaciones y el que no existan, hasta ahora, estudios genéticos que ayuden a dilucidar su historia evolutiva y a explicar los patrones de diversidad inter- e intrapoblacional que presentan en la actualidad. Algunas de estas especies, además, son propias de hábitats prioritarios para la conservación en Europa y están recogidos en catálogos de especies amenazadas, bajo distintas categorías y criterios de amenaza.

Astragalus edulis Bunge (Fabaceae)

Astragalus edulis (fig. 1) es una hierba anual, de tamaño variable y pelosa. Posee hojas imparipinadas, inflorescencias en racimos pedunculados, con flores papilionadas de corola blanco-amarillenta o blanco-azulada. El fruto es una legumbre glabra, péndula con quilla bien desarrollada en la línea de sutura del carpelo. El área de distribución de la especie incluye el noroeste de África, sureste de España e Islas Canarias. Habita en pastizales de zonas muy secas o semiáridas, donde las variaciones en los ciclo de

precipitaciones provocan que la especie presente importantes fluctuaciones interanuales en el tamaño de sus poblaciones. No presenta ningún tipo de reproducción asexual, ni adaptaciones obvias para la dispersión de frutos y semillas. Dado que su presencia podría estar favorecida por la alteración moderada de su hábitat, cabe pensar en una posible dispersión por el hombre y/o ganado. *Astragalus edulis* está incluida en varias listas rojas españolas con la categoría de especie “En Peligro” (EN). Algunas poblaciones ibéricas, o parte de ellas, se encuentran dentro de espacios protegidos. A pesar de que en España se han propuesto medidas para su protección no se conocen iniciativas para su protección fuera del territorio español.

Jacobaea auricula (Bourg. ex Coss.) Pelser (Asteraceae)

Jacobaea auricula (fig. 2) es una herbácea perenne, con hojas dispuestas en roseta basal, inflorescencias en capítulos, con flores amarillas. Aquenios con vilano persistente o caedizo dispersados principalmente por el viento. Número cromosómico $2n = 40$. Esta especie es un endemismo ibero-norteafricano, distribuido a lo largo de la mitad oriental de la Península Ibérica, con una sola referencia de su presencia en los alrededores de Djelfa (Argelia), donde ha sido buscada infructuosamente. Prefiere enclaves rocosos y terrenos yesosos, aunque también puede estar en hondonadas salinas. Dentro de la variación de la especie se han reconocido tres subespecies, todas ellas incluidas con categorías de amenaza en la *Lista Roja de Flora Vasculare Española* y en el *Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón*. La subespecie *sicoricus* está además catalogada en Aragón y en Cataluña como vulnerable, mientras que la subespecie *auricula* se encuentra incluida en la *Lista Roja de la Flora Vasculare de Andalucía* como “En Peligro”.

Arenaria balearica L. (Caryophyllaceae)

Arenaria balearica L. (fig. 3) es una herbácea perenne, densamente cespitosa, con hojas pequeñas dispuestas densamente en la parte inferior de los tallos. Flores generalmente solitarias color blanco. El número cromosómico de la especie es $2n=18$. Crece en taludes terrosos, oquedades al pie de roquedos y laderas frescas, en climas de influencia marítima. Es endémica de las islas del Mediterráneo Occidental Europeo. *Arenaria balearica* no parece verse afectada por la influencia humana, pudiendo incluso ser favorecida por la presencia de fuentes y depósitos de agua cercanos a los pueblos. Debido a su interés ornamental ha sido introducida y naturalizada en Gran Bretaña y Francia.



Figura 1. *Astragalus edulis* Bunge. a) vista general de la planta, con frutos casi maduros; b) detalle del fruto aún verde; c) detalle de la flor. (Fotos Sara Barrios y Santiago Andrés)

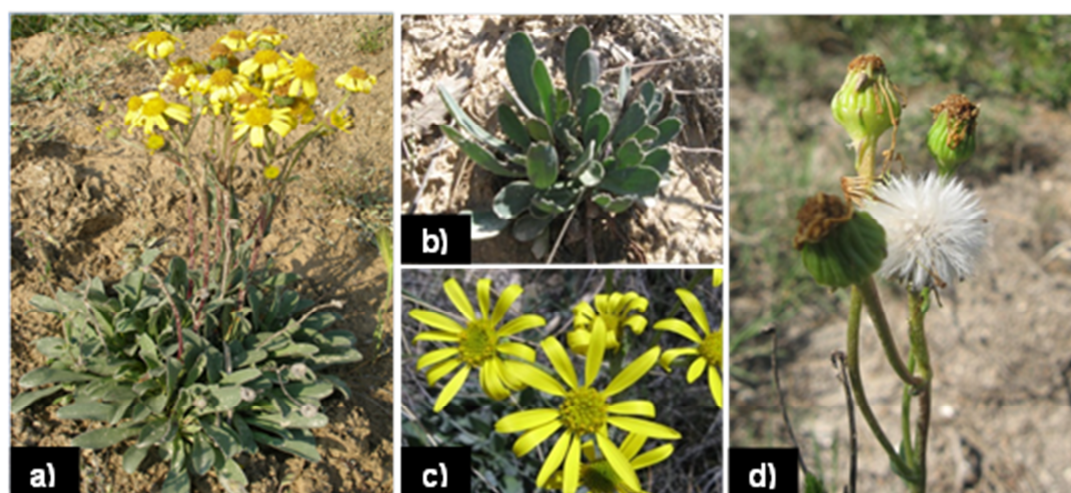


Figura 2. *Jacobaea auricula* (Bourg ex Coss) Pelser. a) vista general de la planta; b) detalle de la roseta basal; c) detalle de la flor; d) inflorescencias maduras. (Fotos Sara Barrios)



Figura 3. *Arenaria balearica* L. a) vista general de la planta; b) detalle de la flor; c) vista general de las hojas. (Fotos Sara Barrios)

ESTRUCTURA DE LA MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

La presente memoria doctoral se ha estructurado en cinco capítulos. El primero es introductorio y contiene el fundamento teórico en que se basa el resto de los capítulos. Se inicia por la biogeografía de islas y cómo los conceptos originalmente aplicados a las islas verdaderas se adecúan a los parches estables de hábitat que se encuentran en tierras continentales. Para continuar, se expone una aproximación al concepto de filogeografía y a las aplicaciones que dentro de esta disciplina tienen los marcadores moleculares, tanto nucleares como organulares. Finalmente se hace una breve descripción de las especies objeto del presente trabajo.

En el segundo capítulo se presenta el estudio filogeográfico de *Astragalus edulis*, en el cual se analiza cómo han influido las principales barreras biogeográficas e historia paleogeográfica y paleoclimática en la distribución y estructura de la diversidad genética actual de la especie.

El tercer capítulo se enfoca en la conservación genética de *Astragalus edulis*. Se propone el uso de Unidades Genéticas Relevantes para Conservación para el manejo y preservación de la especie. Se combina el uso de marcadores moleculares con el estudio de parámetros ecológicos, poblacionales y datos filogeográficos, así como otros parámetros cualitativos relevantes, para detectar las poblaciones que son prioritarias y contienen la máxima diversidad genética considerando el *pool* global de la especie.

En el cuarto capítulo se revisan y estudian los factores paleohistóricos y paleoclimáticos que han determinado la estructura actual de la diversidad genética en una especie típica de islas de hábitat ibéricas (yesares y saladares), i.e., *J. auricula*. También se estudiaron los niveles de divergencia entre las poblaciones de la especie, para determinar si el patrón encontrado entre grupos genéticos es congruente con el tratamiento taxonómico intraespecífico hasta ahora utilizado.

Finalmente, en el quinto capítulo se hace una revisión del impacto que ha tenido la historia geotectónica de las islas Tirrénicas y el aislamiento, en la distribución actual y estructura genética de *Arenaria balearica*, cuya distribución incluye Mallorca, Córcega, Cerdeña y algunas islas del archipiélago Toscano. Por medio de una reconstrucción filogeográfica, se analizó el papel que han jugado los procesos de formación de islas

continentales del Mediterráneo Occidental, mediante fragmentación de microplacas tectónicas y su historia posterior, en la evolución de la especie objeto de estudio.

OBJETIVOS GENERALES

Para este estudio se han seleccionado las especies *Astragalus edulis* Bunge, *Jacobaea auricula* (Bourg. ex Coss.) Pelser y *Arenaria balearica* L., y se han utilizado marcadores hipervariables del ADN nuclear tipo AFLPs y secuencias de ADN plastidial, con el propósito de:

- Analizar la organización espacial de la diversidad genética, así como la historia evolutiva de estas especies de flora endémica, presentes en sistemas insulares del Mediterráneo Occidental y Macaronesia, a fin de tratar de identificar qué factores han modelado su actual distribución geográfica.
- Evaluar la huella que los diferentes acontecimientos paleohistóricos y paleoclimáticos acontecidos desde el Oligoceno en el área del Mediterráneo Occidental (y Macaronesia) han dejado impresos en la estructura y diversidad genética de las especies objeto de estudio.
- Explorar los patrones de diversidad y rareza genéticas, así como el grado de diferenciación inter- e intrapoblacionales en especies con distribución natural fragmentada.
- Proponer un método para la selección de unidades genéticas relevantes para la conservación de *A. edulis*, en el que se tome en cuenta la perspectiva filogeográfica, que pueda ser extendido a otros casos de especies amenazadas, con áreas de distribución relativamente amplias.

GENERAL AIMS

For this study we have selected species *Astragalus edulis* Bunge, *Jacobaea auricula* (Bourq. ex Coss.) Pelsner and *Arenaria balearica* L. and used hypervariable nuclear markers of DNA as well as plastid DNA sequences to:

- Analyze the spatial genetic diversity organization, as well as the evolutionary history of these species of endemic flora, present Western Mediterranean and Macaronesia island systems, in order to identify those factors that have shaped their current geographic distribution.
- Assess the fingerprint that Oligocene paleohistoric and paleoclimatic events in the Western Mediterranean area (and Macaronesia) have left printed in the structure and genetic diversity of the studied species.
- Explore the diversity and singularity genetic patterns, as well as the inter and intra population differentiation in species with natural fragmented distribution.
- Propose a method for the selection of relevant genetic units for the conservation of *A. edulis*, which takes into account a phylogeographic perspective and that can be extended to other threatened species with relatively wide distribution areas.

CAPÍTULO 2:

FILOGEOGRAFÍA DE *ASTRAGALUS EDULIS* BUNGE (FABACEAE): EL IMPACTO DE LOS CAMBIOS EN EL NIVEL DEL MAR DURANTE EL CUATERNARIO EN EL MEDITERRÁNEO OCCIDENTAL Y MACARONESIA

CAPÍTULO 2. Filogeografía de *Astragalus edulis* Bunge (Fabaceae): El impacto de los cambios en el nivel del mar durante el Cuaternario en el Mediterráneo occidental y Macaronesia

Los ciclos de desecación y transgresión del mar Mediterráneo durante el Messiniense, tras el cierre de la conexión con el Atlántico, permitieron intercambios de flora y fauna anteriores a la crisis de salinidad Messiniense. Luego, la apertura del Estrecho de Gibraltar provocó la extinción parcial y aislamiento de poblaciones anteriormente conectadas, promoviendo especiación por vicariacia, al menos en algunos casos documentados. Más tarde, las oscilaciones climáticas del Cuaternario también contribuyeron en el modelado de la estructura genética y distribución espacial de la biota. Otro factor que pudo tener impacto en la distribución actual de las plantas en el norte de África, es el levantamiento de la cordillera del Atlas, que puede representar una barrera para la migración de especies de tierras bajas xerófilas, sin embargo, su poder relativo a la prevención de tales migraciones aún no ha sido directamente probado. Otra barrera geográfica para la migración de plantas en Marruecos es el Corredor del Riff, que conecta el mar Pre-Mediterráneo con el Océano Atlántico, justo antes de la crisis de salinidad del Messiniense.

Astragalus edulis Bunge es una herbácea anual, cuya área de distribución incluye el sureste de la Península Ibérica, Lanzarote y Fuerteventura (en el Archipiélago Canario) y Marruecos, donde se encuentra en tres núcleos principales, separados entre sí por el Rif y las montañas del Medio Atlas. Su distribución disyunta proporciona un sistema ideal para estudiar la dinámica evolutiva post glacial de especies endémicas del Mediterráneo Occidental, presentes en ambos lados del mar de Alborán y las montañas del Atlas, y que también han colonizado las islas orientales del archipiélago canario.

Se utilizaron secuencias de ADN cloroplástico (cpDNA) y Amplificación de Fragmentos Polimórficos (AFLPs) para reconstruir los patrones filogeográficos, así como el momento y ritmo de la diferenciación intraespecífica de linajes en *A. edulis* con el objeto de: (1) identificar las áreas de supervivencia a largo plazo para *A. edulis*, (2) evaluar el impacto que las fluctuaciones en el nivel del mar durante el Cuaternario tuvo en la divergencia de las poblaciones, (3) dar una respuesta satisfactoria a la pregunta sobre de cómo tuvo lugar la colonización de las Islas Canarias por el linaje

mediterráneo *A. edulis* y explorar los mecanismos de colonización existentes entre las islas, (4) evaluar el papel que el Mar de Alborán, las montañas del Atlas, la distancia existente entre las poblaciones marroquíes orientales y occidentales y la discontinuidad entre las islas Canarias orientales y la costa marroquí han jugado en la divergencia genética de la especie estudiada.

Para cumplir estos objetivos, se muestreó material de 360 individuos, provenientes de 31 sitios de muestreo localizados a lo largo de todo el rango de distribución de la especie. El principal núcleo de población ibérica se dividió en 19 puntos de muestreo para asegurar un esfuerzo de muestreo comparable. Se extrajo ADN genómico total siguiendo el protocolo CTAB 2x y se obtuvieron perfiles de AFLP siguiendo los protocolos establecidos, con algunas modificaciones menores. Complementariamente se secuenciaron las regiones *trnG-trnS*, *trnC-rpoB* y *tabF-tabC* con el fin de explorar la variación haplotípica de la especie.

Se realizaron los siguientes análisis: Neighbour-Joining (NJ), NeighbourNet (NNet), un análisis de coordenadas principales (PCoA) y la asignación de los individuos a grupos establecidos siguiendo modelos Bayesianos. Adicionalmente se calcularon, para cada población, el índice de diversidad de Nei y el índice de rareza (DW). Finalmente, para evaluar los efectos históricos comparativos de las principales barreras biogeográficas, se llevó a cabo un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) utilizando cuatro diferentes agrupaciones. Las secuencias cloroplásticas obtenidas fueron ensambladas, editadas, alineadas y concatenadas. Los gaps mayores de un par de bases se codificaron como mutaciones de un solo paso y trataron como un quinto estado de carácter. Las repeticiones nucleotídicas fueron excluidas. Luego, para deducir la relación genealógica entre haplotipos, se construyó una red de haplotipos, utilizando el algoritmo de parsimonia estadística de Templeton. Con el programa BEAST 1.7.1 para realizar una datación intraespecífica de la divergencia de los linajes haplotípicos, para esto se utilizó GTR como modelo de sustitución, bajo un modelo de reloj molecular relajado y una distribución logarítmica normal. La distribución *a priori* de la tasa de mutación fue asumida como normal con una media de 1.16×10^{-9} sustituciones por sitio por millón de años y una amplia desviación estándar. La raíz se restringió a una edad máxima de 500 Ka, basada en el tiempo estimado de divergencia entre *A. edulis* y su especie hermana *A. boeticus*.

La reconstrucción de las líneas de costa a 21 KyBP que se presenta en este trabajo fue realizada extrayendo los datos topográficos y batimétricos del área de estudio de ETOPO, ajustando el modelo digital de elevación actual a 120 m.

Tanto los diagramas de NJ y NN, como el PCoA revelaron una estructura general de la variación genética en tres grupos principales. El agrupamiento Bayesiano dio como resultado una partición de la variabilidad en cuatro grupos. El índice de diversidad de Nei varió entre 0.04-0.20, y el DW entre 0.99 y 7.87. Los sitios de muestreo genéticamente más distintivos se encuentran en las partes centrales de la zona semidesértica de Tabernas (España) y en Fuerteventura, mientras que los valores más bajos DW se han encontrado en la parte más oriental de la población ibérica. El AMOVA señala que la discontinuidad entre las Islas Canarias y las poblaciones restantes puede haber jugado un papel importante en la conformación de la diversidad y estructura genética de la especie. La estructuración de la diversidad genética en tres grupos representa un alto porcentaje de la varianza genética total (24,70 %), se obtuvieron resultados similares para los grupos restantes.

Las regiones de cpDNA dieron como resultado una alineación de 2,545 pb. La variabilidad haplotípica de la especie fue notablemente baja. Se obtuvieron en total 7 haplotipos. La red construida con TCS marca un límite máximo de cuatro pasos. Se detectó variación haplotípica intrapoblacional en cinco sitios dentro de la Península Ibérica, que muestra dos haplotipos endémicos. Un único haplotipo endémico se encuentra en Fuerteventura y Lanzarote. De acuerdo con nuestra reconstrucción, la diferenciación entre los linajes ocurrió ca. 117 (339-10) Ka entre los haplotipos VI y VII, seguido con una división entre haplotipo V y los linajes restantes (ca. 316 ; 503-120 Ka), y entre el haplotipo II y los linajes restantes (ca. 252 ; 465 - 69 Ka). Por último, la diferenciación del linaje que contiene haplotipo III podría haber ocurrido ca. 196 (413-33) Ka. Hay un claro caso de incongruencia entre las reconstrucciones obtenidas con TCS y BEAST en base a la misma matriz de datos de secuencias de cpDNA.

La reconstrucción Bayesiana reveló un patrón que puede explicarse por la supervivencia a largo plazo de la especie en las zonas climáticamente favorecidas. También sugieren que *A. edulis* estuvo ampliamente distribuida y que los cambios climáticos posteriores

podrían haber causado la fragmentación inicial de su rango. Teniendo en cuenta sólo los datos de AFLPs se podría concluir que las poblaciones Canarias de no tienen vínculos evidentes con las poblaciones marroquíes o ibéricas. Los datos de AFLPs obtenidos sólo son compatibles con un patrón general de reducción de rango y aislamiento a largo plazo. Esto podría explicarse con la hipótesis de que *A. edulis* llegó a las Islas Canarias orientales a través de los montes submarinos que emergieron durante el período glacial, y que las poblaciones en las áreas de intervención se extinguieron en etapas interglaciares. Esta hipótesis también es congruente con el patrón filogeográfico general basado en la variación cloroplástica. Además, la estrecha relación entre los haplotipos VI y VII indica contactos antiguos entre Marruecos y las Islas Canarias, señalando al norte de África como la fuente principal de colonización de las islas. Probablemente, la región que hoy es Fuerteventura fue colonizada primero. El hecho de que las poblaciones de ambas islas compartan el mismo haplotipo y el que la composición genética global sea homogénea, indica que las poblaciones actuales pudieron probablemente haber sido parte de una sola población grande, cuando las islas, ahora separadas formaban una sola protoisla ("Mahan").

Tanto el análisis bayesiano como la reconstrucción filogenética utilizando BEAST y nuestra reconstrucción de la línea de la costa durante el LGM, sugieren que los contactos secundarios y el flujo de genes entre las poblaciones del norte de África y la Península Ibérica pueden haber existido. El conjunto de resultados obtenidos pueden representar las primeras evidencias de contactos recurrentes entre los continentes a ambos lados del Estrecho, quizás a través de los montes submarinos actualmente sumergidos en el mar de Alborán. Esto acentúa la importancia de esta área para las rutas de dispersión norte-sur (y viceversa) durante las glaciaciones del Pleistoceno. Las coincidencias temporales propuestas entre los eventos de divergencia de haplotipos y los principales eventos paleoclimáticos cuaternarios podrían inducir a error, dado los bajos niveles de apoyo obtenidos para los clados relevantes en la reconstrucción filogenética. Este problema probablemente se debe a los bajos niveles de variación haplotípica encontrados. Se necesita más evidencia para proporcionar fechas exactas, pero, en este caso, la ausencia de registros fósiles apropiados representaría una seria limitación.

El mar de Alborán, las montañas del Atlas y la gran extensión entre las poblaciones orientales y occidentales en Marruecos fueron identificados como barreras secundarias

para el flujo genético, sin embargo, cuando el impacto de estas barreras es considerado en conjunto, es notorio que han jugado un importante papel en el modelado de la estructura genética actual de *A. edulis*. Parece que, a pesar de que el Mar de Alborán ha tenido algún impacto sobre la estructura genética de la especie, no ha impedido por completo el flujo genético durante el Pleistoceno. La cordillera del Atlas, el extremo oriental del Rif y el Medio Atlas son barreras que no representan obstáculos importantes para intercambio genético de las especie. La presencia de dos haplotipos endémicos en las poblaciones marroquíes M4 y M5 sugiere aislamiento a largo plazo entre ellas. El cronograma de reloj molecula confirma el aislamiento a largo plazo de M5, lo que sugiere que podría representar al menos una zona de refugio secundaria para la especie. Nuestros datos podrían confirmar la hipótesis que se ha planteado de la existencia de zonas de refugio a baja altura alrededor de las montañas del Atlas para las hierbas anuales

La Península Ibérica contiene tanto los sitios de muestreo que presentan los valores máximos de diversidad y rareza, como aquellos para los que estos valores son mínimos. Esto, sumado al hallazgo de dos haplotipos endémicos, indican que la parte central de la población ibérica puede representar áreas de supervivencia *in situ* a largo plazo. Las subpoblaciones ibéricas orientales podrían ser producto de eventos de dispersión individuales ya que su extremadamente baja diversidad genética y la rareza que muestran podrían ser productos de los cuellos de botella genéticos a los que se han visto sometidas. En Marruecos, las poblaciones del noreste presentan valores contrastantes, máximos y mínimos, de diversidad y singularidad, lo que indica supervivencia a largo plazo en una población, mientras que la otra podría ser el resultado de un evento puntual de dispersión, siendo la primera el área de origen. Este patrón a pequeña escala de colonización de este a oeste, junto con los bajos valores de diversidad y rareza que se encuentran en la Península Oriental Ibérica y en los sitios de muestreos Marroquies, parece indicar que la colonización histórica de la especie hacia el este podría haberse visto afectada por los efectos fundador y cuellos de botella genéticos.

CAPÍTULO 3:

DISEÑANDO ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN A TRAVÉS DE LA SELECCIÓN DE UNIDADES GENÉTICAS RELEVANTES PARA LA CONSERVACIÓN, EN LA ESPECIE AMENAZADA *ASTRAGALUS EDULIS* BUNGE

CAPÍTULO 3. Diseñando estrategias de conservación a través de la selección de Unidades Genéticas Relevantes para la Conservación, en la especie amenazada *Astragalus edulis* Bunge

Es ampliamente reconocido que la mejor manera de conservar las especies, comunidades y ecosistemas, es preservando tanto su hábitat como los procesos ecológicos que las rodean. Sin embargo, el rápido incremento en los niveles de pérdida de hábitat hace que este tipo de estrategias de conservación sean cada vez menos eficientes para asegurar la supervivencia de las especies vegetales, es por esto que actualmente se hacen necesarias aproximaciones que se enfoquen en la composición genética de las mismas. Para que los programas de conservación sean efectivos, deben intentar identificar unidades de manejo que reflejen la importancia evolutiva de los linajes. Con este fin se han propuesto numerosos estimadores, como: Unidades Evolutivas Significativas (ESUs); Unidades de Manejo (Mus); Unidades de Conservación Operativas (OCUs); Unidades Geográficas y Evolutivas Fundamentales (FGEUs); Unidades Funcionales de Conservación (FCUs). Todos ellos intentan dar una respuesta satisfactoria a las preguntas de cuántas y cuáles poblaciones de una especie deben ser priorizadas con fines de conservación. Recientemente se introdujo el concepto de Unidades Genéticas Relevantes para la Conservación (RGUCs, por sus siglas en inglés), cuyo fin es ayudar en la identificación de las poblaciones que presentan mayor singularidad genética, basándose en la idea de que los alelos raros son esenciales en la conservación, debido a que representan productos evolutivos únicos, capaces de proporcionar a las especies características ventajosas que las ayuden a enfrentar exitosamente los cambios ambientales. Una de las principales ventajas de este aproximamiento es que permite la priorización objetiva de poblaciones particulares en especies vegetales que se encuentran catalogadas como de bajo riesgo, particularmente en taxones que poseen numerosos individuos y poblaciones, lo que hace difícil, la protección y monitoreo de todo su rango de distribución.

En España, *A. edulis* se encuentra catalogado como especie en peligro, según las categorías UICN, y se encuentra incluido en varias listas rojas nacionales y regionales; sin embargo no ha sido catalogado bajo ninguna categoría UICN a nivel mundial. Algunas de las poblaciones ibéricas de la especie se encuentran incluidas en la red Natura 2000, y de manera parcial en la red RENPA, pero ninguna de las poblaciones

canarias o marroquíes se encuentran protegidas. Para las poblaciones españolas se han propuesto medidas de conservación, pero su abundancia, relativamente alta en la península, junto con su distribución dispersa en Marruecos y las Islas Canarias impide el manejo y conservación de la especie en todo su rango de distribución.

En este estudio se utilizaron marcadores tipos AFLP, secuencias de ADN cloroplástico (cpDNA) y datos ecológicos para diseñar una estrategia de conservación adecuada para *A. edulis*. Debido a que el área de distribución de la especie es disyunta y a que previamente han sido descritos interesantes patrones biogeográficos para la misma, la principal información filogeográfica también ha sido tomada en cuenta para la selección de RGUCs. Los objetivos específicos de este estudio son: (1) Evaluar la distribución de la diversidad genética entre las poblaciones, subpoblaciones y/o núcleos geográficos de la especie; (2) Encontrar el número mínimo de poblaciones que deben ser preservadas con el objetivo de capturar un porcentaje representativo de la variabilidad genética de *A. edulis*; (3) Identificar las poblaciones que deben ser priorizadas con el fin de preservar la mayor singularidad genética y variabilidad geográfica tanto para la conservación *ex situ* como *in situ* de la especie.

Se obtuvo material vegetal proveniente de 17 núcleos poblacionales a lo largo de todo el rango de distribución de la especie. En todos los casos el número de individuos muestreados por población o subpoblación fue proporcional al tamaño del núcleo. Para asegurar el muestreo correcto de la principal población Ibérica (IP), esta fue dividida en 19 sitios de muestreo, luego estos sitios se reagruparon en 6 subpoblaciones para asegurar la homogeneidad del tamaño muestral. Debido al reducido número de individuos encontrados en dos sitios de muestreo marroquíes, geográficamente muy cercanos, estos también fueron reagrupados en un núcleo poblacional. Paralelo al muestreo, se midieron variables cualitativas para examinar la posible existencia de patrones de rareza entre poblaciones. Para apoyar la evaluación del estatus de conservación de las poblaciones estudiadas, se aplicaron los siguientes parámetros: Tamaño relativo, abundancia local, grado de vulnerabilidad y estatus legal de las poblaciones.

Se extrajo ADN genómico total y se obtuvieron AFLPs siguiendo protocolos establecidos. Los productos de las amplificaciones selectivas fueron separados en un secuenciador de electroforesis capilar en la unidad de genómica de la Universidad

Politécnica de Madrid. Adicionalmente se secuenciaron tres regiones cloroplásticas, para explorar la variación haplotípica y complementar la información obtenida con los AFLPs.

Con el fin de evaluar la estructura genética de la especie se realizaron un filograma sin enraizar, utilizando el método de Neighbour Joining (NJ), un análisis de coordenadas principales (PCoA) y un análisis de la varianza molecular (AMOVA). Este último se llevó a cabo primero considerando a todas las poblaciones como un solo grupo, y luego dividiendo las variación en tres grupos geográficos predefinidos, con el objetivo de evaluar la existencia de estructura genética entre estos grupos. Adicionalmente se calcularon para cada población o punto de muestreo, tanto el índice de diversidad de Nei y como el índice de rareza (*frequency down-weighted marker values*; DW). Para finalizar, se calculó el número de alelos raros (N_r), como una medida adicional de rareza. Las secuencias de cpDNA se editaron y concatenaron para luego construir un red de haplotipos sin enraizar que fue utilizada para inferir las relaciones genealógicas existentes entre haplotipos.

Para seleccionar las FGUCs se compararon los valores de pérdida de los alelos raros con los valores de subdivisión inter poblacional. Primer, se utilizó el coeficiente de diferenciación (F_{ST}) para estimar el número total de poblaciones que deben ser priorizadas, de acuerdo con la expresión $P = 1 - F_{ST}^n$. Luego, utilizando las frecuencias medias de los alelos raros y sus probabilidades de pérdida asociadas, se calculó el valor de p , según la ecuación $L = (1-p)^{2N}$. Para cada uno de los alelos raros, se calcularon las probabilidades de pérdida observadas (L_o) y esperadas (L_e). Luego, el logaritmo natural de esos valores fue plotado y utilizado para calcular las respectivas regresiones lineales. El valor de R se calculó como el cociente entre la pendiente de ambas líneas de regresión. Para terminar, se utilizó la información obtenida de las secuencias cloroplásticas (capítulo 2), junto con un set de parámetros cualitativos para determinar que poblaciones de la especie merecen prioridad con fines de conservación.

Cerca de la mitad de las poblaciones de *A. edulis* presentan poblaciones relativamente grandes, pero la mayoría con números reducidos de individuos. En la Península Ibérica casi todas las poblaciones son grandes, con alta abundancia local y con un hábitat moderadamente conservado, sin embargo la mayoría de poblaciones marroquíes son pequeñas y con reducida abundancia local, siendo su hábitat mucho más vulnerable.

Las poblaciones canarias presentan una combinación de rareza y vulnerabilidad moderada o aceptable.

Los AFLPs detectaron bajos niveles de diversidad genética intrapoblacional en *A. edulis*, el índice de diversidad de Nei varió entre 0.066 y 0.155. La diversidad total de la especie fue 0.108. En cuanto a la rareza, las poblaciones genéticamente más singulares son la AE16 (CI), mientras que los menores valores de DW se encontraron en la parte este de la península (población AE6).

Tanto el filograma de NJ como el PCoA revelaron una estructura genética bien definida según grupos geográficos sin embargo el PCoA no apoya la relación cercana entre e las muestras de Marruecos y de las Canarias sugerida por el NJ, mientras que señala una relación cercana entre los individuos ibéricos y marroquíes. El AMOVA de todas las muestras como un grupo revela que la variabilidad genética entre individuos es significativamente mayor que entre poblaciones. El AMOVA jerárquico confirma la división de las poblaciones en los tres grupos geográficos sugeridos por el resto de análisis.

Según nuestros resultados el número mínimo de poblaciones a preservar, para mantener el 99.9% de la diversidad genética de la especie, es 6. Se encontraron un total de 273 alelos raros, 66 de los cuales son exclusivos de IP, 78 de M y 57 de CI. El valor de R, considerando a la especie como un solo grupo es $R = 0.354$. Este valor, calculado para cada una de las áreas geográficas es: $IP = 0.407$, $M = 0.355$ and $CI = 0.293$. La proporción óptima de poblaciones a ser elegir de cada grupo, con propósitos de conservación puede expresarse como 0.45: 0.34: 0.21.

Aunque la comparación de niveles de variabilidad genética entre estudios basados en marcadores dominantes puede ser difícil, los niveles de variación en la especie estudiada parecen ser similares a los encontrados en otras especies anuales, con áreas de distribución comparables a la de *A. edulis*, esto indica que las diferencias relativas en la diversidad poblacional no son un artefacto producto del número de muestras por poblaciones. Los niveles de diversidad obtenidos también son comparables a los encontrados en herbáceas Mediterráneas perennes, herbáceas perennes pertenecientes a *Astragalus*, e incluso a árboles que habitan el Mediterráneo Occidental.

Para la selección de RGUCs, considerando los valores de diversidad y rareza de cada una de las poblaciones, junto con el número mínimo de poblaciones a priorizar de cada

grupo geográfico, se recomendó inicialmente como poblaciones (y subpoblaciones) a considerar como de interés prioritario: AE1, AE4 y AE5 (IP), AE8 y AE9 (M) y AE16 (CI). AE4 y AE5 muestran los valores máximos de diversidad y rareza en la Península Ibérica y trabajar en ellas podría garantizar la conservación de dos haplotipos ibéricos endémicos, además de los haplotipos comunes. Al seleccionar AE1, se conservaría además otro haplotipo endémico. En las islas Canarias, la población AE16 posee los valores más altos de diversidad y singularidad, así como el único haplotipo presente en el grupo. En el caso de Marruecos, la selección de RGUCs es más complicada. Dentro de este grupo geográfico, las poblaciones AE8 y AE9 son las que presentan los mejores valores de diversidad y singularidad, pero dos de los haplotipos endémicos de la zona no están representados en ellas. Es por esto, que la priorización de las poblaciones AE10 y AE11 sería más adecuada, si se toma en cuenta la historia evolutiva de la especie. Debido a que las poblaciones marroquíes de esta especie muestran valores moderados de diversidad y rareza, la decisión de que poblaciones deberían ser consideradas como prioritarias con fines de conservación podría ser más acertada al basarse en la consideración de los haplotipos raros o restringidos, por lo tanto se sugiere que las poblaciones AE10 y AE20 deben ser priorizadas sobre AE8 o AE9.

El método utilizado en este estudio para la elección de RGUCs se basa no solamente en las aproximaciones descritas por otros autores, también se toma en consideración información filogeográfica y ecológica, lo que lo hace más intuitivo y, probablemente, más útil. La identificación de las poblaciones altamente representativas, basada en datos genéticos, es esencial en el diseño de un plan de conservación apropiado, especialmente si se considera que la especie se incluye bajo una de las categorías más bajas de protección de la UICN, y el que su amplia rango de distribución dificulta el tomar medidas para su protección.

CAPÍTULO 4:

**PATRONES GENÉTICOS COMPLEJOS EN LAS
ISLAS DE HÁBITAT IBÉRICAS: FILOGEOGRAFÍA
DE *JACOBAEA AURICULA* (BOURG. EX COSS.)
PELSER (ASTERACEAE)**

CAPÍTULO 4. Patrones genéticos complejos en las islas de hábitat ibéricas: Filogeografía de *Jacobaea auricula* (Bourg. ex Coss.) Pelser (Asteraceae)

La Península Ibérica es una región de transición, cuya heterogeneidad fisiográfica ha determinado la historia evolutiva de los linajes de flora que la habitan. Según Barron *et al.*, durante el Paleógeno la flora ibérica estuvo dominada por elementos paleotropicales, pero durante el Neógeno hubo un desplazamiento o desaparición de la flora subtropical y el afianzamiento de la mediterránea. Durante el Mioceno y Plioceno se dio una reducción gradual de la diversidad vegetal, acompañada por la expansión de taxones mediterráneos, sobre todo en las tierras bajas de la Península Ibérica. En el Plioceno Superior se iniciaron los ciclos glaciares e interglaciares, causando la alternancia de flora cálida-húmeda y esteparia mediterráneas. A partir del Pleistoceno medio el ritmo de estas oscilaciones se aceleró, provocando que la distribución y abundancia de las comunidades vegetales cambiaran dramáticamente al afectar de manera cíclica al rango geográfico de especies y ecosistemas. Así, durante los períodos en que las condiciones ecológicas eran desfavorables, el rango geográfico de las especies se contrajo, causando aislamiento y divergencia, mientras que en los períodos con condiciones adecuadas, estos rangos se expandían, permitiendo el contacto secundario entre poblaciones. A las zonas en las que una especie permanece durante el período de máxima contracción de rango se las conoce como refugios. En la Península Ibérica se han encontrado múltiples zonas con patrones de diversidad que parecen ser resultado de los ciclos de expansión y contracción del rango de distribución de las especies.

Jacobaea auricula (Bourg. ex Coss.) Pelser (\equiv *Senecio auricula* Bourg. ex Coss.) es un endemismo íbero-norteafricano, edáficamente restringido a enclaves rocosos y terrenos yesosos, desde los 5 hasta los 900 m de altitud, que conforman un enorme archipiélago de “hábitats isla” en la Península Ibérica. Actualmente se reconocen tres subespecies, que han sido descritas sobre la base de caracteres morfológicos, y que además parecen estar asociadas con la distribución geográfica de las poblaciones. Todas las subespecies se encuentran incluidas bajo la categoría de vulnerable (VU) en la *Lista Roja de Flora Vasculares Española* y en el *Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón* (Anexo III), la

subsp. *auricula* se encuentra además incluida en la *Lista Roja de la Flora Vasculare de Andalucía* como “En Peligro”.

No se dispone de suficientes datos filogeográficos empíricos en plantas que crezcan en islas edáficas, donde tanto el aislamiento por distancia, como el efecto fundador están teóricamente asociados. Se ha seleccionado *J. auricula* como especie modelo y se han empleado marcadores tipo AFLP y secuencias de ADN cloroplástico, para: (1) Estudiar e interpretar los patrones filogeográficos intraespecíficos en *J. auricula*; (2) Explorar los patrones de diversidad y rareza genéticas, así como el grado de diferenciación interpoblacional, para tratar de determinar el impacto que su distribución en islas edáficas ha podido tener en la estructura y variabilidad genética actuales; (3) Estudiar los niveles de divergencia entre grupos genéticos y ver si el patrón obtenido es congruente con el tratamiento taxonómico intraespecífico al uso.

Se recolectó y secó material vegetal de 285 individuos provenientes de 31 puntos de muestreo en la Península Ibérica. Adicionalmente se seleccionó una muestra de herbario de la especie *Jacobaea othonnae* para ser utilizada como grupo externo en los análisis de haplotipos cloroplásticos. Para asegurar la monofilia del grupo, se secuenció la región ITS en 6 muestras al azar que se analizaron junto con dos secuencias análogas obtenidas de GeneBank. Se extrajo ADN genómico según el protocolo 2x CTAB. Para la obtención de los perfiles de AFLPs se siguió el protocolo de Vos *et al.*, con modificaciones menores. Los productos de la PCR selectiva se separaron en un secuenciador de electroforesis capilar en la Unidad de Genómica de la Universidad Politécnica de Madrid. Adicionalmente se secuenciaron tres regiones de ADN cloroplástico: *trnQ-5'rpS16*, *psbA-3'trnK-matK* y *rpl16*, en un total de 75 individuos. Los productos de PCR purificados se analizaron en un secuenciador automático de electroforesis capilar en la Unidad de Genómica de la Universidad Politécnica de Madrid.

Se realizaron los siguientes análisis: Neighbour-Joining (NJ), NeighbourNet (NNet), un análisis de coordenadas principales (PCoA) y la asignación de los individuos a grupos establecidos siguiendo modelos Bayesianos. Adicionalmente se calcularon, para cada población, el índice de diversidad de Nei y el índice de rareza. Finalmente, se realizó un análisis molecular de la varianza (AMOVA) examinando cinco agrupaciones

jerárquicas. Las secuencias cloroplásticas obtenidas fueron ensambladas, editadas, alineadas y concatenadas. Los *gaps* se trataron como *missing data* en los análisis ulteriores y no se encontraron inversiones. Finalmente se construyeron una red de haplotipos, usando el algoritmo de parsimonia de Templeton y un árbol filogenético apoyado en el análisis bayesiano, ambos con *J. othonnae* como grupo externo.

Tanto los diagramas de NJ como NNet revelaron que la variación genética de la especie se divide en 7 grupos principales mientras que el agrupamiento bayesiano arrojó como resultado que la mejor partición de la variación genética es en cuatro grupos. El PCoA muestra resultados muy similares a los encontrados por el análisis bayesiano. Al representar las subespecies tradicionalmente aceptadas en el diagrama de PCoA se puede observar que existe una falta de ajuste entre la estructura genética hallada con AFLPs y la estructura taxonómica al uso. El AMOVA jerárquico señala que la estructura genética encontrada por medio del análisis bayesiano representa la mejor partición de la diversidad genética de la especie. En términos generales la diversidad genética es más alta en las poblaciones de la zona norte de la Península que en las del sur. La población que presenta el segundo grado más alto de singularidad genética es la número 9, situada al noreste de la Península. Las secuencias de cpDNA dieron como resultado un total de 16 polimorfismos y 9 haplotipos. La red de haplotipos construida muestra una clara separación entre los haplotipos [VIII + IX] y el resto. Se detectó variación haplotípica intra-poblacional en tres de los 31 puntos de muestreo, siendo los haplotipos más frecuentes el I y el III. Se encontraron tres haplotipos endémicos en el noreste de la península. La diversidad haplotípica es mayor hacia el norte que hacia el sur de la Península Ibérica. La reconstrucción bayesiana realizada es congruente con la red de haplotipos.

La red de haplotipos y el árbol filogenético sugieren una diferenciación inicial en dos linajes intraespecíficos, uno distribuido en el sur de la Península, y otro que no parece geográficamente restringido. La pérdida de contacto entre éstos es probablemente anterior a las oscilaciones climáticas del Pleistoceno. Aunque la ausencia de puntos de calibración externos ha impedido llevar a cabo la datación de la filogenia intraespecífica de *J. auricula*, se puede afirmar que la distribución geográfica de los haplotipos ancestrales I y VIII se ajusta a la distribución de las zonas que en el Mesiniense estaban ocupadas por comunidades mediterráneas xerofíticas similares a las que ahora albergan

poblaciones de *J. auricula*, lo cual apoyaría la hipótesis de que la divergencia entre los dos linajes pudo deberse a supervivencia diferencial del taxón en puntos geográficamente aislados, cuando la Península ibérica estuvo ocupada por masas discontinuas de aguas salobres epicontinentales. Aunque las pulsaciones climáticas pleistocénicas no parecen haber tenido un gran impacto en las poblaciones del sur, sí podrían haber promovido la diferenciación de haplotipos en el norte peninsular, donde las contracciones de área habrían podido permitir la diferenciación de haplotipos endémicos. La composición genética actual de la especie parece encontrarse bien estructurada desde el punto de vista geográfico, el análisis de los datos permite abordar la hipótesis de la existencia de una vía de contacto antigua entre las poblaciones del interior ibérico, línea que coincide con las tierras siempre emergidas durante el Tortonense. Las características genéticas de la población 9 indican que puede tratarse de una población relictica, quizás producto de una reducción drástica del rango de distribución del linaje haplotípico [VIII+IX]. La estructura espacial que reflejan los patrones genéticos parece ser producto de las contracciones de rango en conexión con máximos glaciares, seguidas de recolonizaciones postglaciares más o menos rápidas, pero también de fragmentaciones de rango, contactos secundarios, colonizaciones a más o menos larga distancia y situaciones de restricción del flujo genético. La distribución de la diversidad genética intraespecífica parece responder a las oscilaciones climáticas del Plioceno-Pleistoceno y a los ciclos de expansión y contracción de área asociados a ellas.

Debido a que *J. auricula* se encuentra en islas edáficas, se espera *a priori* una alta divergencia poblacional, sin embargo los niveles de variación genética encontrados son más bajos que los hallados para otras especies de plantas, mientras que los niveles de rareza son comparativamente elevados y, al contrario que los de diversidad, no están distribuidos de acuerdo a un patrón geográfico. Estos patrones pueden tener que ver con razones paleohistóricas y paleoclimáticas, aunque la baja disponibilidad de hábitat favorable para la especie no parece haber limitado de modo drástico sus movimientos de dispersión a escala histórica. Los análisis de estructura genética muestran que existe cierto grado de estructuración genética dentro de *J. auricula*, lo que indica cierto grado de aislamiento entre poblaciones. Sin embargo los niveles de divergencia encontrados para la totalidad de la especie (F_{ST} : 0.325) no son altos, es posible que *J. auricula* posea cierta capacidad de dispersión a media o larga distancia y que esto haya facilitado el

intercambio genético entre poblaciones. En conclusión, parece que la estructuración y variación de la variabilidad genética en *J. auricula* responde, tanto a un patrón histórico, como a un modelo clásico de islas de hábitat. Por último, si este resultado es aceptado, habría que revisar la evaluación del grado de amenaza de la especie en el conjunto de su distribución ibérica.

Los datos obtenidos en este estudio no parecen apoyar la coincidencia entre el tratamiento taxonómico infraespecífico aceptado para la especie y la organización de la variación genética. En este trabajo no se han llevado a cabo estudios morfológicos detallados, pero la revisión, tanto de material de herbario como de especímenes frescos en campo, no hizo evidentes las diferencias morfológicas asociadas a la distribución geográfica de las subespecies. Además, los recuentos de cromosomas realizados confirman que el número cromosómico es constante en todas las subespecies ($2n=40$). Considerando lo expuesto, se puede concluir que no parece apropiado el reconocimiento de taxones infraespecíficos dentro de *J. auricula*

CAPÍTULO 5:

FILOGEOGRAFÍA DEL ENDEMISMO TIRRÉNICO

***ARENARIA BALEARICA* L.: HUELLAS
GENÉTICAS DE LA HISTORIA DE LAS ISLAS
CONTINENTALES DEL MEDITERRÁNEO
OCCIDENTAL DESDE EL OLIGOCENO**

CAPÍTULO 5. Filogeografía del endemismo tirrénico *Arenaria balearica* L.: Huellas genéticas de la historia de las islas continentales del Mediterráneo Occidental desde el Oligoceno

Dentro de la cuenca mediterránea las islas constituyen importantes puntos calientes de diversidad, debido a sus altos niveles de endemismo y número de especies. Las altas tasas de diversificación que frecuentemente se encuentran en las islas han sido explicadas aludiendo a diferentes procesos como la radiación adaptativa, predominante en islas oceánicas y la divergencia poblacional, en el caso de fragmentos continentales. En la cuenca Mediterránea, las Islas Tirrénicas (Baleares, Córcega, Cerdeña y Sicilia) son identificadas como uno de los 10 hotspots de diversidad vegetal de la Región. Tanto las islas Baleares, Córcega, Cerdeña como el Archipiélago Toscano muestran una gran complejidad paleogeográfica y paleoclimática, hecho que ha provocado que la historia de la flora que las pueblan sea muchas veces producto de eventos de fragmentación y divergencia poblacional. Pero existen además acontecimientos climáticos que han podido afectar en gran medida a la historia evolutiva de la flora vascular del Mediterráneo Occidental, como el levantamiento del estrecho de Gibraltar y la consecuente desecación del mar Mediterráneo, que permitió la formación de puentes de tierra que facilitaron intercambios de flora y fauna. La crisis de salinidad del Messiniense fue seguida por el establecimiento del régimen climático mediterráneo en el Plioceno y más tarde, por los ciclos glaciares del Plio-Pleistoceno, fenómenos que influyeron de manera determinante en la supervivencia, distribución geográfica y diversificación de un gran número de linajes. Durante los máximos glaciares el nivel del mar llegó a ser entre 120 y 150 m menor que en la actualidad de manera que, al parecer, se establecieron conexiones directas entre las actuales islas de Córcega y Cerdeña y con la Península Itálica. Algunas islas, como Montecristo y Capraia permanecieron sin unión alguna con el continente mientras que la isla de Tavolara estuvo unida a Cerdeña durante los máximos glaciares. Las Baleares, también se vieron afectadas por las fluctuaciones en el nivel del mar, que provocaron períodos de conexión y desconexión entre islas.

Arenaria balearica L. es un endemismo tirrénico, que se encuentra de forma natural en las islas de Mallorca, Córcega, Cerdeña y en algunas islas del Archipiélago Toscano.

Se trata de una herbácea perenne, más o menos cespitosa, sin especializaciones evidentes para la dispersión de sus semillas a larga distancia. Su número cromosómico es $2n = 18$. Esta especie crece habitualmente en la base de roquedos y peñascos calizos o en laderas frescas y húmedas. Muchas especies endémicas del Mediterráneo tienen en común su presencia en hábitats rocosos y protegidos, en comunidades con niveles bajos de presión. Este tipo de ambientes se caracterizan por tener una distribución fragmentada, albergar altos niveles de endemismo y porque representan refugios de taxones relícticos.

En el presente estudio se utilizaron marcadores tipo AFLP y secuencias de ADN cloroplástico para analizar la organización espacial de la diversidad genética, así como la historia evolutiva del endemismo tirrénico *Arenaria balearica*, a fin de tratar de aclarar si la actual distribución de la especie en diversas islas del Mediterráneo Occidental se debe a evolución disyunta o, si dicha distribución se explica mejor por causas biológicas o antropogénicas. Se pretende llevar a cabo una reconstrucción filogeográfica que permita conocer detalles sobre la diversificación espacial y temporal de las poblaciones de *A. balearica*, para reconocer el papel que realmente han jugado los procesos de fragmentación de área en la evolución de la especie objeto de estudio.

La reconstrucción de las líneas de costa para el Mediterráneo Occidental a 21 KyBP que se presenta en este trabajo fue realizada extrayendo los datos topográficos y batimétricos del área de estudio de ETOPO, ajustando el modelo digital de elevación actual a 120 m.

Se recolectó y secó material vegetal de 213 individuos provenientes de 29 puntos de muestreo. Los pliegos de referencia fueron depositados en los herbarios de las Universidades de Salamanca, Granada y/o Cagliari. Adicionalmente, se seleccionaron tres muestras de la especie *A. bertolonii*, para ser utilizada como grupo externo en los análisis de haplotipos cloroplásticos. También se secuenció la región ITS en 28 muestras de *A. balearica* y en diversas muestras de las especies *A. bertolonii*, *Arenaria funiculata*, *Arenaria tejedensis* y *A. suffruticosa*. Se encontró que el grupo de estudio es claramente monofilético. El ADN genómico se extrajo usando el protocolo 2x CTAB con modificaciones. Para la obtención de los perfiles de AFLPs se siguió el protocolo de Vos *et al.*, con modificaciones menores. Los productos de la PCR selectiva se separaron

en un secuenciador de electroforesis capilar en la Unidad de Genómica de la Universidad Politécnica de Madrid. Se secuenciaron tres regiones ADN cloroplástico en un total de 52 individuos. Los productos de PCR se purificaron y analizaron en un secuenciador automático de electroforesis capilar de la Unidad de Genómica de la Universidad Politécnica de Madrid.

Como primer acercamiento a las relaciones genéticas globales y a la estructura de los datos, se realizaron los análisis de Neighbour-Joining (NJ) y NeighbourNet (NNet). Adicionalmente se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA), y como estimación complementaria, la asignación de los individuos a grupos establecidos siguiendo modelos Bayesianos. Adicionalmente se calcularon el índice de diversidad de Nei y el índice de rareza (*frequency down-weighted marker values*, DW). Finalmente se realizaron análisis moleculares de la varianza (AMOVA), examinando cinco tipos de agrupaciones jerárquicas. Las secuencias de cpDNA fueron ensambladas, editadas, alineadas y concatenadas. Los *gaps* mayores a un par de bases se codificaron como mutaciones de un solo paso y trataron como un quinto estado de carácter. Se construyó una red de haplotipos en la que se usó *A. bertolonii* como grupo externo, usando el algoritmo de parsimonia de Templeton.

Según el NJ, la diversidad genética actual de la especie se estructura de manera general en dos grandes grupos, sin embargo PCoA muestra un escaso grado de estructuración de la variación genética de la especie. Hay una falta de ajuste entre los resultados obtenidos con el NJ y PCoA, ya que el segundo indica cierto grado de diferenciación entre las poblaciones de Mallorca y las de Córcega, pero no de las de Cerdeña. El agrupamiento bayesiano señala que la mejor partición de la variación genética es en cuatro grupos uno de los cuales se encuentra representado en todas las islas y prácticamente en todas las poblaciones. Este análisis muestra también que han debido existir importantes contactos secundarios entre las poblaciones de Córcega y Cerdeña. El AMOVA jerárquico señala que la estructura genética encontrada por medio del análisis NJ representa la mejor partición de la diversidad genética de la especie. En líneas generales, los valores mayores de rareza y diversidad se presentan en las poblaciones de la isla de Córcega, mientras que en las de Mallorca, en general, diversidad y singularidad son bajas. La concatenación de las regiones de cpDNA dio como resultado un alineamiento de 2422 pb, con un total de 33 polimorfismos y 12

haplotipos. La red de haplotipos construida presenta una topología en forma de estrella, con un haplotipo central a partir del cual parecen haber derivado los demás; este haplotipo está presente en todas las islas. El resto de haplotipos son mucho menos frecuentes, siendo el más derivado el VI. Los haplotipos derivados son endémicos de una isla y, por lo general, endémicos de una única población. Se detectó además variación haplotípica intra-poblacional en 6 de los 28 puntos de muestreo. La diversidad haplotípica mayor se presenta en Cerdeña y la menor en Mallorca.

Los paleoendemismos tirrénicos ofrecen múltiples posibilidades para llevar a cabo estudios que podrán llegar a demostrar la validez de las hipótesis que atribuían un origen precuaternario a muchas de las especies que se consideran paleoendémicas. Los datos obtenidos para *A. balearica* parecen apoyar su carácter paleoendémico y que su actual distribución disyunta en las islas de Mallorca, Córcega, Cerdeña, Tavolara y Montecristo (las poblaciones de Capraia no han podido ser incluidas en este trabajo), puede explicarse sobre la base de la disgregación del Macizo Hercínico, acontecida a comienzos del Oligoceno. Los datos procedentes del análisis de AFLPs indican que existe un bajo grado de organización de la variabilidad genética intraespecífica, y en especies con limitada capacidad de dispersión como *A. balearica*, se esperarían encontrar niveles significativos de divergencia entre poblaciones, especialmente en aquellas que permanecen o han permanecido en aislamiento. Los resultados están también en correspondencia con la obtención de bajos niveles de divergencia en las diferentes agrupaciones poblacionales ensayadas en el AMOVA. Los resultados obtenidos a partir de las secuencias de cpDNA son congruentes con lo anterior. La forma en estrella de la red de haplotipos sugiere que todos los haplotipos actuales de *A. balearica* han derivado de un único haplotipo ancestral. El que este haplotipo ancestral esté bien representado en todo el rango de distribución de la especie sugiere una posible huella oligocénica. Los haplotipos endémicos de cada una de las tres islas mayores, habrían derivado *in situ* a partir del haplotipo ancestral y de forma independiente unos de otros. De los datos obtenidos a partir de AFLPs no es posible inferir episodios interinsulares claros de dispersión a larga distancia, además, la topología en estrella de la red haplotípica parece poco compatible con la existencia de este tipo de eventos. Los resultados hallados parecen concordar con un escenario en el que las poblaciones de *A. balearica* habrían sufrido fragmentación antigua. Estas poblaciones podrían haber obtenido refugio en habitats de relativa estabilidad ambiental a lo largo del Cuaternario.

Sin embargo, llama la atención los bajos niveles de variación haplotípica encontrados, pero se ha propuesto que muchos paleoendemismos tirrénicos presentan bajos niveles de variación morfológica interpoblacional, pese a que sus poblaciones llevan largo tiempo aisladas, lo que podría estar en consonancia con que esas especies muestren bajas tasas de evolución molecular. Esta afirmación parece verse respaldada por los resultados obtenidos en este trabajo. En el caso de *A. balearica* los resultados obtenidos sugieren la existencia de contactos secundarios recurrentes entre las islas de Córcega y Cerdeña, posiblemente en momentos posteriores a su disgregación de Mallorca, pero que no podemos datar con exactitud, razón por la que esos contactos podrían ser Messinienses o Cuaternarios.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

CAPÍTULO 6. Conclusiones

Se han llevado a cabo estudios filogeográficos y de biología de conservación, utilizando AFLPs y secuencias de ADN plastidial, para *Astragalus edulis* Bunge (Fabaceae), especie que se distribuye en las islas más orientales del Archipiélago Canario (Lanzarote y Fuerteventura), Marruecos y en el sureste de la Península Ibérica, de los cuales se concluye que:

1. Las variaciones en el nivel del mar producto de los pulsos glaciales del Pleistoceno debieron afectar de manera sucesiva a las áreas de transición Mediterráneo–Macaronésicas, y parecen haber contribuido de manera decisiva a modelar tanto la estructura como la diversidad genética actual de la especie.
2. No se han hallado evidencias genéticas de eventos de dispersión recientes (ni únicos, ni múltiples) a larga distancia desde Marruecos hacia las Canarias orientales. Sin embargo, no puede descartarse la existencia de estos eventos en tiempos remotos, durante los que diversos islotes –hoy sumergidos– situados entre las costas canaria y marroquí, estuvieron emergidos y pudieron haber facilitado intercambios de flora entre ambos territorios. Los datos disponibles (conexión antigua entre las poblaciones Canarias y M4) no permiten distinguir con claridad esta hipótesis, de la de que haya podido existir una fragmentación del rango antiguo de distribución de la especie en la transición Mediterráneo–Macaronésica.
3. Los resultados obtenidos mediante el análisis de AFLPs y haplotipos de ADN plastidial para *A. edulis*, son congruentes con la hipótesis de que las islas de Lanzarote y Fuerteventura emergieron como una única unidad, una protoisla conocida con el nombre de Mahan, y que permanecieron conectadas entre sí durante largos períodos de tiempo.
4. Se han hallado evidencias de intercambio genético de *A. edulis* entre el norte de África y el continente europeo, que quizás tuvieron lugar a través del mar de Alborán. Los islotes, en su mayor parte hoy sumergidos, presentes en la región, podrían haber actuado como pasaderas (*stepping stones*) que facilitaron contactos entre esas áreas. Los datos obtenidos confirman la hipótesis de que las plantas anuales tienden a mostrar mayores niveles de flujo genético que las

perennes, a través de la barrera biogeográfica que representa el área Estrecho de Gibraltar-Mar de Alborán.

5. Sobre la base de los datos obtenidos utilizando marcadores del ADN nuclear hipervariable tipo AFLP, se ha procedido a la selección de RGUCs (*relevant genetic units for conservation*). Los datos obtenidos indican que, si se pretende preservar el 99.9 % de la diversidad genética global de *A. edulis*, es necesario conservar *in situ* o *ex situ* al menos seis poblaciones (o subpoblaciones). Se calcularon las probabilidades de pérdida de alelos raros, a fin de poder seleccionar aquellas poblaciones que en particular deberían ser protegidas (o recogidas para conservación *ex situ*) sobre la base de una composición alélica singular. Dichas probabilidades de pérdida indican que la proporción de poblaciones (o subpoblaciones) que deben ser preservadas de cada uno de los tres núcleos geográficos principales en los que *A. edulis* se encuentra distribuido son: 45% de la Península Ibérica : 34% de Marruecos : 21% de las islas Canarias.
6. Considerando los niveles de diversidad y rareza alélicas hallados a nivel poblacional, la proporción óptima de poblaciones que deberían ser muestreadas de cada grupo geográfico, su singularidad haplotípica y diversos aspectos, tanto ecológicos, como referidos a medidas legales de protección que las afectan, las poblaciones que se recomienda priorizar son: AE1, AE4 y AE5 de la Península Ibérica, AE10 y AE11 de Marruecos y AE16 de las islas Canarias.

Por otra parte, se ha llevado a cabo un estudio filogeográfico, utilizando AFLPs y secuencias de ADN plastidial, para *Jacobaea auricula* (Bourq. ex Coss.) Pelsner (Asteraceae), endemismo ibérico restringido a determinadas islas edáficas, el cual permite concluir que:

7. El análisis filogenético de las mencionadas secuencias, indica una diferenciación intraespecífica en dos linajes principales iniciales, separados por un número relativamente elevado de pasos de parsimonia, hecho que sugiere que la pérdida de contacto entre ambos debe ser muy antigua, probablemente anterior a las pulsaciones climáticas del Plio-Pleistoceno. Este patrón se interpreta como una fragmentación de área antigua, quizás miocénica, seguida de supervivencia diferencial del taxón en zonas geográficamente separadas. Los resultados

- obtenidos del análisis de AFLPs apoyan este patrón hallado en datos de secuencias plastidiales, pero sugieren una historia evolutiva aún más compleja.
8. La complicada organización espacial de la variabilidad genética intraespecífica en *J. auricula* indica supervivencia en múltiples áreas refugio y en períodos paleohistóricos diferentes. Además, parece implicar diversos procesos: contracciones de rango en conexión con máximos glaciares, seguidas de recolonizaciones postglaciares más o menos rápidas, pero también fragmentaciones de área quizás muy antiguas, contactos secundarios entre linajes, y/o colonizaciones a más o menos larga distancia así como situaciones de restricción del flujo genético.
 9. El hecho de que *J. auricula* crezca en islas edáficas, y la consecuente baja disponibilidad de hábitat favorable para la especie que haya podido darse a escala paleohistórica, no parecen haber limitado de modo drástico su capacidad histórica de dispersión.
 10. Los datos genéticos obtenidos no apoyan que exista coincidencia entre el tratamiento taxonómico infraespecífico hasta el momento aceptado para *J. auricula* y la organización de la variación genética tal como se deriva del análisis de AFLPs. Esto indica que debe replantearse la evaluación del grado de amenaza de la especie en sentido amplio.

Por último, se ha llevado a cabo un estudio filogeográfico, utilizando AFLPs y secuencias de ADN plastidial, para *Arenaria balearica* L. (Caryophyllaceae), especie restringida a islas continentales del Mediterráneo Occidental, como resultado del cual se ha hallado que:

11. Ambas fuentes de datos sugieren congruentemente que, en el pasado, debió existir un área de distribución continua de este paleoendemismo tirrénico (o de sus ancestros) y que su actual distribución es producto de la posterior fragmentación de su rango de distribución, quizás consecuencia de la disgregación y desplazamiento relativo de las microplacas Corso-Sardo-Calabrense, por un lado y Balear-Cabilia, por otro.
12. Se confirma la existencia de contactos secundarios recurrentes, bien messinienses, bien cuaternarios, entre las islas de Córcega y Cerdeña, que permitieron intercambios florísticos entre una y otra. Sin embargo, no se ha

encontrado evidencia de este tipo de contactos secundarios entre estas islas y Mallorca.

13. Se han hallado bajas tasas de evolución molecular en *A. balearica*, que están en consonancia con la existencia de bajos niveles de variación morfológica interpoblacional, pese a que las poblaciones de esta planta llevan largo tiempo aisladas. Este resultado apoya la hipótesis de que los paleoendemismos tirrénicos, presentan bajas tasas de mutación asociadas a estasis morfológica.

CHAPTER 6. Conclusions

Phylogeographic and conservation biology studies conducted using AFLP data and plastid DNA sequences for *Astragalus edulis* Bunge (Fabaceae), a species distributed on the easternmost Canary Islands (Lanzarote and Fuerteventura), Morocco and in the southeast of the Iberian Peninsula, allow the following conclusions:

1. The successive Quaternary sea level oscillations have probably contributed in a decisive way to shaping both structure and current genetic diversity of *A. edulis* in the Mediterranean-Macaronesian transition area.
2. Genetic evidence of recent long-distance dispersal events (single or multiple) from Morocco to the Eastern Canary Islands has not been found. However, the existence of these events in ancient times cannot be discarded. When several seamounts, now submerged, located between the Canary Islands and Moroccan coasts, were emerged they could have facilitated exchanges of flora between both territories. The available data (i.e., ancient connection between the Canarian populations and M4) do not allow differentiation of this hypothesis from the one that proposes that a fragmentation of a formerly more continuous range of the species in the Mediterranean-Macaronesian transition may have happened.
3. Obtained results from the analysis of AFLPs and cpDNA haplotypes for *A. edulis* are consistent with the hypothesis that Lanzarote and Fuerteventura

islands emerged as a single unit, a proto-island known as Mahan, and remained connected for a long time.

4. Evidence of genetic exchange between North Africa and Europe has been found. This exchange perhaps took place across the Alboran Sea. Islets present in the region, most of them today submerged, could have served as stepping stones, which facilitated contacts between those areas. The data obtained confirm the hypothesis that annual plants tend to show higher levels of gene flow than the perennial ones, through the biogeographic barrier represented by the Alboran Sea-Strait of Gibraltar area.
5. On the basis of the data obtained using DNA hypervariable nuclear markers, RGUCs (relevant genetic units for conservation) have been selected. The data indicate that, if it is intended to preserve the 99.9% of the overall genetic diversity of *A. edulis*, it is necessary to conserve *in situ* or *ex situ* a minimum of six populations (or sub-populations). Rare alleles loss probabilities were calculated, in order to select those populations which deserve to be protected (or collected for *ex situ* conservation) on the basis of its unique allelic composition. These rare alleles loss probabilities indicate that the proportion of populations (or subpopulations) that must be preserved in each of the three main geographical cores in which *A. edulis* grows are: 45% for the Iberian Peninsula; 34% of Morocco; 21% of the Canary Islands.
6. Taking into account the diversity and allelic rarity values found at the population level, the optimal proportion of populations that should be sampled from each geographical group, the presence of endemic haplotypes, as well as ecological and legal measures of protection affecting them, populations recommended to prioritize are: AE1, AE4 and AE5 (Iberian Peninsula); AE10 and AE11 (Morocco) and AE16 (Canary Islands).

Additionally, a phylogeographic study, using AFLPs and cpDNA sequences has been carried out for *Jacobaea auricula* (Bourq. ex Coss.) Pelsner (Asteraceae), an Iberian endemic restricted to edaphic islands. It allows the conclusions:

7. Phylogenetic analysis of above mentioned sequences indicate an intraspecific differentiation in two initial main lineages, separated by a relatively large number of steps of parsimony. This suggests that the loss of contact between

these two lineages must be very old, probably previous to the Plio-Pleistocene climatic oscillations. This pattern can be interpreted as an ancient, –perhaps Miocene– area fragmentation, followed by differential survival of the taxon in geographically separate areas. The AFLP results support this pattern, originally found in sequences data, but they suggest an even more complex evolutionary history.

8. The complex spatial organization of intraspecific genetic variability in *J. auricula* indicates survival in multiple refuge areas in different paleohistoric periods. Additionally, it seems to involve several processes: range contraction associated with glacial maxima, followed by more or less fast post-glacial recolonizations, but also ancient area fragmentations, secondary contacts between lineages, and/or more or less long-distance colonization and restriction of gene flow situations.
9. The fact that *J. auricula* grows in edaphic islands and the consequent hypothetic low availability of favorable habitat for the species in a paleohistoric scale, do not seem to have dramatically limited the historical dispersion ability of the species.
10. Genetic data do not support the coincidence between the infraspecific taxonomic treatment accepted until now for *J. auricula* and the structure of genetic variation, as derived from AFLP analysis. It is therefore necessary to reconsider the evaluation of the threat degree for this species.

Finally, a phylogeographic study, using AFLPs and cpDNA sequences, has been carried out for *Arenaria balearica* L. (Caryophyllaceae), a species restricted to continental Islands in the Western Mediterranean. This suggests:

11. In the past, this Thyrrenic paleoendemic species (or its ancestors) showed a continuous distribution area. The current distribution of *A. balearica* is a product of subsequent range fragmentation, due perhaps to the disintegration and relative movements of the Corsican-Sardinian-Calabrian microplate, on the one hand, and Balearic-Kabylies microplate, on the other.
12. The existence of recurrent secondary contacts (Messinian or Quaternary), between Corsica and Sardinia, allowed floristic exchanges between both islands.

However, there is no evidence of this kind of contact between these islands and Majorca.

13. Low rates of molecular evolution have been found in *A. balearica*, which are consistent with low levels of morphological inter-population variation, despite the fact that the populations of this plant have been isolated for a long time. This result supports the hypothesis that Tyrrhenian paleoendemic species present low mutation rates, associated with morphological stasis.

SUMMARY

1. Introduction

This work is framed within research projects that have been developed thanks to the collaboration of Universidad de Salamanca y Universidad de Granada researchers. Philogeography and its tools have been used in order to interpret the fingerprint that different paleoclimatic and paleogeographic phenomena have left printed in the structure and genetic diversity of the species that are being studied. Theoretical island fundamentals were also used to study ancestral, as well as current, genetic patterns in the species *Astragalus edulis*, *Jacobaea auricula* and *Arenaria balearica*.

This doctoral thesis was realized due to the financial aid grant from *Banco Santander* and *Agencia Española para la Cooperación Internacional*. Additionally, some chapters have been financed through contributions of the projects from the Dirección General de Investigación-Ministerio de Economía y Competitividad, references CGL2012-32574, CGL2010-16357 y CGL2009-07555.

Islands constitute simple and small units, with clearly defined limits, that are susceptible to be labeled. Its homogeneity and isolation (transitory or permanent) have allowed the study of ecological and evolutionary answers that the continental communities' complexity makes difficult to elucidate. In a general way, islands can be divided in two classes: continental islands and oceanic islands, being the main difference between them the contact (or the lack of it) that has had with the continental masses and its biota. Some mainland habitats can be considered as "habitat islands", or patches of a particular kind of habitat, isolated from similar patches by habitat zones that are totally different. Resemble oceanic islands because its spatial isolation and in the restriction of genetic flow in which the species that live in it have been submitted, being the main difference between this "habitat islands" and the real islands the fact that the first do not present clear and defined limits, and are surrounded by habitats with species that are capable of establishing successful populations within de patch.

Despite the recent fragments, the habitat islands are stable, in number and species composition. This kind of habitat usually hosts small populations, with reduced dispersion capacity, but which do preserves its divergence potential. There is a certain number of theoretical works that have used the islands model as paradigm to explain the way in which the interactions between the gene flow, effective population size and

genetic drift influence the patterns of intra and inter population diversity, but not so many practical works dedicated to prove the validity of the established hypothesis.

Plants turn to strategies of dispersion that determine physic and spatial localization of the individuals and genotypes within the populations, as well as the quantity of genetic exchange within and between populations. However, the structure of genetic variability in plant populations is not due only to the contemporary forces of genetic exchange, is also product of historical factors. The impact of this evolutionary history makes the use of phylogeographic studies necessary to understand it. Phylogeography is a relatively recent discipline, it uses molecular tools to identify and interpret the signs or genetic fingerprints that paleohistorical changes have left in the diversity and genetic structure of individuals and populations. Recently some technics have been developed to the study of genetic variability in a molecular level, by means of specific markers. To reflect the interesting processes in phylogeographical studies, the molecular tools to be used must be adjusted to the characteristics of the studied organisms and its dynamics. ecause of that, and in the present study nuclear (AFLP) and organular (cpDNA sequences) were used.

The species included in this study are typical of insular systems, which can be true islands or habitat islands, which have in common the presence of disruptive distribution, high level of geographical isolation between populations and no presence of it, until now, genetic studies that help to elucidate its evolutionary history and to explain the inter and intrapopulational diversity patterns that currently present. Some of this species, besides, belong to priory habitats to conservation in Europe and are gathered in catalogs of threatened species, under different threat categories and criteria.

Astragalus edulis Bunge (Fabaceae)

Astragalus edulis is an annual herbaceous, of variable size. It has imparipinnate leaves, inflorescence in stalked clusters, with papilionate flowers of white yellowish or white blue corolla. The fruit is a legume, with a well-developed keel in the suture line of the carpel. The distribution area of the species includes northeast Africa, Southeast of Spain and Canary Islands. *A. edulis* grows in pastures of dry zones, the variations in rainfall of the zones in which it inhabit provoke that the species present important year-on-year fluctuations in its population sizes. It does not show any kind of asexual reproduction,

nor obvious adaptations for the dispersion of fruits and seeds. Due to its presence could be favored by the moderate alteration of its habitat; it is possible to think in human or cattle dispersion. *Astragalus edulis* is included in several Spanish red lists as “in danger” (EN). Some iberian populations, or at least part of them, are in protected areas. Despite some proposals to its protection in Spain, there are not known initiatives for its protection outside Spanish territory.

Jacobaea auricula (Bourq. ex Coss.) Pelsner (Asteraceae)

Jacobaea auricula is a perennial herb, with leaves arranged in basal rosette, inflorescence in capitula, with yellow flowers. Achenes with pappus persistent or deciduous, dispersed mainly by wind. Chromosome number $2n = 40$. This species is an Ibero-North-African endemism, distributed along the oriental half of the Iberian Peninsula, with one reference of its presence in the surrounding of Djelfa (Algeria). It inhabit in rocky places and gypsum grounds, although it can also found in saline depressions. Within the species variation, there are three recognized subspecies, all of them included as vulnerable (VU) in the *Lista Roja de Flora Vasculare Española (Red List of Spanish Vascular Flora)* and the *Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón (Species Catalog of Aragon Endangered Species)*. The subspecies *sicoricus* is also cataloged in Aragón and Cataluña as vulnerable, while the subspecies *auricula* is included in the *Lista Roja de la Flora Vasculare de Andalucía (Red List of Andalucía Vascular Flora)* as “endangered”.

Arenaria balearica L.

Arenaria balearica L. is a perennial herb, with small leaves disposed densely in the inferior part of the stem. Flowers are generally lonely and white colored. The chromosome number of the species is $2n = 18$. It grows in terrain slopes, cavities at the foot of crags and fresh hillsides, in climates with maritime influence. It is endemic from the islands of European Occidental Mediterranean. *Arenaria balearica* seems to not be affected by the human influence, and it can be favored by the presence of fountains and water deposits near the towns. Due to its ornamental interest, it has been introduced and naturalized in Great Britain and France.

The present doctoral thesis has been structured in five chapters. The first ones is an introduction and contain the theoretical basis in which the rest of the chapters are based on. It begins with island biogeography and how the original concepts applied to real

islands have been adapted to explain the ecology of stable patches of or “island habitats”. To continue, there is an approximate of the concept of phylogeography and the applications that within this discipline have the molecular markers. Finally there is a brief description of the object species of the present work.

In the second chapter, there is a phylogeographical study of the species *Astragalus edulis*. In this chapter is analyzed how the main biogeographical barriers and the paleogeographic and paleoclimatic history have influenced in the distribution and structure of the actual genetic diversity of the species.

Third chapter is focused in conservation of *Astragalus edulis*. It is proposed the use of Relevant Genetic Units for Conservation for the management and conservation of the species. It is combined the use of molecular markers with the study of ecological, population and phylogeographic data parameters as well as other relevant qualitative parameters, to detect the priority populations and those who contain the maximum genetic diversity considering the global pool of the species.

In the fourth chapter the paleohistorical and paleoclimatic factors are studied that have determined the actual genetic diversity structure within a typical species of the iberian habitat islands, i.e., *J. auricular*. Also the levels of divergence in between populations of a species were also studied, to determine if the found pattern in genetic groups is congruent with the intraspecific taxonomic treatment used until now.

Finally, in the fifth chapter there is a revision of the impact that the geotectonic history and isolation of Thyrrenic islands has had in the actual distribution and genetic structure of *Arenaria balearica*, which distribution includes Majorca, Corsica, Sardinia and some Tuscan archipelago islands. By a phylogeographic reconstruction, it was analyzed the role that has played the formation process of Western Mediterranean islands in the evolution of the studied species.

GENERAL AIMS

For this study we have selected species *Astragalus edulis* Bunge, *Jacobaea auricula* (Bourq. ex Coss.) Pelsner and *Arenaria balearica* L. and used hypervariable nuclear markers of DNA as well as plastid DNA sequences to:

- Analyze the spatial genetic diversity organization, as well as the evolutionary history of these species of endemic flora, present Western Mediterranean and Macaronesia island systems, in order to identify those factors that have shaped their current geographic distribution.
- Assess the fingerprint that Oligocene paleohistoric and paleoclimatic events in the Western Mediterranean area (and Macaronesia) have left printed in the structure and genetic diversity of the studied species.
- Explore the diversity and singularity genetic patterns, as well as the inter and intra population differentiation in species with natural fragmented distribution.
- Propose a method for the selection of relevant genetic units for the conservation of *A. edulis*, which takes into account a phylogeographic perspective and that can be extended to other threatened species with relatively wide distribution areas.

2. Range-wide phylogeography of *Astragalus edulis* Bunge (Fabaceae): The impact of Quaternary sea level changes in the western Mediterranean–Macaronesian transition

The cycles of desiccation and transgression of the Mediterranean Sea in the Messinian period, after the closure of the connection to the Atlantic, enabled interchanges of lineages of flora and fauna that predated the Messinian salinity crisis. After this, the opening of the Strait of Gibraltar caused partial extinction and isolation of previously connected populations and seems to have promoted vicariant speciation at least in some documented cases. The Quaternary climatic oscillations have also contributed to model the genetic structure and spatial distribution of biota and have eventually led to speciation. One more event that may have had impact on the current distribution of plants in Northern Africa is the uplift of the Atlas Mountains, that may represent a formidable barrier for the migration of lowland xerophytic species, but its relative power at preventing such migrations has not been directly tested yet. Another

geographical barrier for plant migration in Morocco is the Rifian Corridor, which connected the pre-Mediterranean sea with the Atlantic Ocean just before the Messinian salinity crisis and represented a strong barrier for the migration of plants both before and after the Messinian age.

Astragalus edulis Bunge is an annual herbaceous, that shows highly disjunct distribution area that include the southeastern part of the Iberian Peninsula, Lanzarote and Fuerteventura, and Morocco, where is distributed in three population cores that are roughly separated by the Rif and Middle Atlas Mountains. This strikingly disjunct distribution provides an ideal system to investigate the postglacial evolutionary dynamics of Western Mediterranean endemic species present at both sides of the Alboran Sea and Atlas mountains, which has also colonized the easternmost islands of the Canary Archipelago.

In this work we use sequencing of chloroplast DNA (cpDNA) regions and amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting to reconstruct the phylogeographic patterns and the timing and tempo of differentiation of intraspecific lineages within *A. edulis*. Our objectives are: (1) identify long term survival areas for *A. edulis*; (2) evaluate the impact of the sea level fluctuations during the Quaternary succession of glacial cycles on population divergence; (3) give a satisfactory answer to the question on how the colonization of the Canary Islands by the Mediterranean lineage *A. edulis* took place and explore mechanisms of inter-island colonization; (4) asses the role that the Alboran Sea, Atlas mountains, the extension between the easternmost and westernmost Moroccan populations and the discontinuity between the eastern Canary Islands and the Moroccan coast have played in the genetic divergence within the study species.

To meet these objectives, leaf material from 31 sampling sites, along the entire distribution range of *A. edulis*, was collected and dried in silica gel. The main Iberian population core was decomposed in 19 sampling sites to secure a comparable sampling effort. Total genomic DNA was isolated from crushed dried leaf material following the 2x CTAB protocol. AFLP profiles were obtained following established protocols with minor modifications. To complement the information given by the dominant markers, the *trnG-trnS*, *trnC-rpoB* and *tabF-tabC* regions were sequenced to explore haplotype variation.

As approach to the main genetic structure of the species, following analyses were conducted: Neighbour-Joining (NJ), an unrooted NeighbourNet (NN) and a Principal Coordinate Analysis (PCoA). As an estimate of the population genetic structure, a model-based Bayesian assignment was performed. As indicators of genetic diversity, Nei's gene diversity index and frequency down-weighted marker values per population or sampling site (DW) were calculated and finally, to test the comparative historical effects of the main biogeographical barriers, a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) was performed for four different groupings. cpDNA sequences from the three regions were concatenated and gaps longer than one base pair was coded as single-step mutations and treated as a fifth character state, mononucleotide repeats of different sizes were excluded. To infer the genealogical relationships among haplotypes, was constructed an unrooted haplotype network, using the statistical parsimony algorithm as implemented in TCS 1.21. Further phylogenetic analyses were conducted using BEAST 1.7.1 with GTR as substitution model. The evolution rate was modeled in a relaxed molecular clock framework with an uncorrelated lognormal distribution for the substitution rate variation and a coalescent model with constant size assumed as tree priors. The prior distribution of the mutation rate was given as a normal distribution with a mean 1.16×10^{-9} substitutions per site per million years and a wide standard deviation of half the mean. The root was constrained to a maximum age of 500 Ka, based on the divergence time estimations of *A. edulis* from its sister species *A. boeticus*. To map the past and current shorelines in detail, the present-day topographic and bathymetric data covering the area were extracted from the ETOPO1. This model was built from numerous global and regional data sets, and is available in "Bedrock". Estimates of exposed land area at LGM with respect to the present-day are the result of raising 120 m the values of the Digital Elevation Model.

NJ and NN diagrams, as well as PCoA, revealed an overall structure of genetic variation into three main groups. Bayesian clustering conducted resulted in a best partition of four clusters. Nei's gene diversity index ranged from 0.04 to 0.20, and DW varied from 0.99 to 7.87. The genetically most distinctive sampling sites were found in the central parts of the semidesertic area of Tabernas (Spain) and in Fuerteventura, while the lowest DW values have been found at the easternmost part of the large Iberian population. AMOVA analysis demonstrates that the discontinuity between the Canary

Islands and the remaining populations may have played an important role shaping the genetic diversity and structure in *A. edulis*. The genetic structure in three groups accounts comparatively for a high amount of the total genetic variance (24.70%) and similar results are obtained for the remaining geographical groupings tested.

cpDNA regions resulted in an alignment of 2545 bp. Haplotype genetic variability within *A. edulis* was remarkably low; all mutations together defined a total of 7 haplotypes. TCS inferred a parsimony network with a maximum limit of four steps. Intrapopulation haplotype variation was detected in five sampling sites within the Iberian population, which shown two endemic haplotypes as well as the western Moroccan populations. A single endemic haplotype was found in Fuerteventura and Lanzarote. According to our reconstruction, differentiation among lineages occurred ca. 117 (339-10) Ka between haplotypes VI and VII, followed with a split between haplotype V and the remaining lineages (ca. 316; 503–120 Ka), and between haplotype II and the remaining lineages (ca. 252; 465–69 Ka). Last, the differentiation of the lineage that contains haplotype III could have occurred ca. 196 (413–33) Ka. There is a clear case of incongruence between the reconstructions obtained with TCS and BEAST based on the same cpDNA sequence data matrix.

Bayesian reconstruction revealed a pattern that may be explained by long-term survival in climatically favored areas. It also suggest that *A. edulis* was once broadly distributed and that posterior climatic changes could have caused an initial range fragmentation. Considering only the AFLP data would lead to the conclusion that the Canarian populations of *A. edulis* do not show evident ties with the Moroccan or Iberian populations. In fact, the obtained AFLP data are only compatible with a general pattern of range constriction and long term isolation, which could be explained by the hypothesis that *A. edulis* reached the easternmost Canary Islands through seamounts that were emerged during glacial periods, and later populations in the intervening areas went extinct at interglacial stages. This hypothesis is also congruent with the general phylogeographic pattern based on cpDNA variation. Additionally, the well supported close relationship between haplotypes VI and VII indicates ancient contacts between Morocco and the Canary Islands, which points to North Africa as the primary source area for the initial colonization of the islands. Probably the region that today is Fuerteventura could have been colonized first. The fact that the populations from both islands share the same endemic haplotype and that the overall genetic composition is

highly homogeneous, indicates that the currently separate populations could be a single big one when the present day separate islands were a single protoisland (Mahan).

Bayesian analysis, phylogenetic reconstruction using BEAST and our reconstruction of the coast line during LGM, suggests that secondary contacts and gene flow among populations from North Africa and the Iberian Peninsula may have existed. Considering the available data sources as a whole, our results may represent the first evidences of recurrent contacts between these continents on the Mediterranean side to the east of the Strait, maybe through the today submerged seamounts in the Alboran sea, which stresses the significance of this area at facilitating north–south (and vice versa) dispersal routes during the Pleistocene glaciations. The proposed temporal matches between haplotypic divergence events and the main Quaternary palaeoclimatic events could be misleading, given the low Bayesian support levels obtained for the relevant clades in the phylogenetic reconstruction. This problem is probably due to the low levels of haplotypic variation found. Further evidence is needed to provide accurate dates but, in this case, the absence of appropriate fossil records will represent a serious limitation.

The Alboran Sea, the Atlas Mountains and the large extension between eastern and western Moroccan populations were identified as secondary barriers for genetic flow, nevertheless when the impact of these barriers is simultaneously considered, appear that them have mainly shaped genetic diversity within *A. edulis*. It seems that even if the Alboran Sea has had some impact shaping genetic diversity in the species, has not completely prevented gene flow during the Pleistocene, while the Atlas mountain range and the easternmost end of the Rif plus Middle Atlas barriers do not represent important obstacles for genetic exchange within the species. The maintenance of two endemic haplotypes in Moroccan populations M4 and M5 suggests long term isolation between them. The molecular-clock chronogram confirms the long term isolation of M5, suggesting that could represent at least a secondary refugial area for the species. In annual herbs, it has been hypothesized the existence of refugial areas at low altitudes around the Atlas Mountains, our data would confirm that. The Iberian Peninsula contains both, the sampling sites for which maximum diversity together with maximum rarity have been found, and those for which these values are minimum. These values, and the finding of two endemic haplotypes, indicate that the central parts of the large Iberian population may represent long term in situ survival areas for *A. edulis*. The easternmost Iberian subpopulations could be product of single dispersal events and the

extremely low genetic diversity and rarity that they display could be signatures of genetic bottlenecks. In Morocco, the northeastern populations contrastingly contain maximum and minimum values of diversity and singularity, indicating long term survival in one population and that the other could be a result of a single dispersal event, being the first one the source area. This fine scale west to east colonization pattern, along with the low values of diversity and rarity found in the easternmost Iberian and Moroccan sampling sites, may indicate that the eastwards colonization history of the species might be affected by founder effects and genetic bottlenecks.

3. Designing conservation strategies through the selection of Relevant Genetic Units for Conservation in the endangered species *Astragalus edulis* Bunge

It is widely accepted that the best way to preserve plant species, communities and ecosystems is conserving both, habitat and ecological processes. However, the increasing levels of habitat loss make this kind of conservation strategy no longer sufficient to ensure the survival of world's plant species. Thus, an approach more focused on species and their genetic composition is required. Effective conservation programs should try to identify management units that reflect the evolutionary importance of lineages within the species. In this sense several estimators, as Evolutionary Significant Units (ESUs); Management Units (MUs); Operational Conservation Units (OCUs); Fundamental Geographic and Evolutionary Units (FGEUs); Functional Conservation Units (FCUs), have been assayed to try to give a satisfactory answer to the question on how many and which populations ought to have conservation priority. Recently was introduced the concept of Relevant Genetic Units for Conservation (RGUCs), that helps to identify the most singular populations based on the idea that rare alleles are essential in conservation, because they represent unique evolutionary products that could provide the species with advantageous properties to cope with eventual environmental shifts. One of the main advantages of this conservation genetic approach is that allows objective prioritization of particular populations of plants under low-extinction risk categories, particularly in taxa that have many populations and individuals, which makes difficult or unaffordable active protection and monitoring of the entire distribution area of the species.

In Spain *A. edulis* is considered under International Union for the Conservation of Nature (IUCN) category of extinction risk as an endangered species and it is included in several national and regional red lists; nonetheless has not yet been assessed for the global scale IUCN Red List. Some locations of the plant in the Iberian Peninsula are included in Natura 2000 network and slightly in the RENPA Network, but others are out of such protected zones and none of the places in the Canary Islands or Morocco are effectively protected. Additional conservation measures have been proposed for the populations in Spain, but its high relative abundance in the Iberian Peninsula, as well the fact that the plant is scattered in Morocco and the Canary Islands, precludes management of the whole distribution range of the species.

In this study we have used AFLPs, sequences of cpDNA and field data to design a management strategy for the endangered species *A. edulis*. Considering the disjunct distribution area and the interesting biogeographic patterns previously described for this species, the main phylogeographic information is also taken into consideration to design a conservation genetic strategy through the selection of RGUCs. Our specific aims are: (1) Evaluate the distribution of the genetic diversity among the different populations, subpopulations and/or geographic cores; (2) Assess what is the number of populations that should be sampled or preserved in order to capture a representative percentage of the genetic variation of *A. edulis*; (3) Identify which populations should be prioritized to better represent the genetic singularity and geographic variability for *ex situ* and *in situ* conservation.

Leaf material from 17 population cores was sampled throughout the entire distribution range of the plant. In all cases the number of individuals collected per population or subpopulation was proportional to core size. To achieve a correct sampling of the main Iberian population (IP), it was decomposed into 19 sampling sites then; those sites were regrouped into 6 subpopulations to warrant homogenous sampling sizes. As only very few individuals were found in two geographically close sampling sites from Morocco, they were regrouped into one population core. In parallel with the plant material sampling, some qualitative variables were measured in order to examine the existing patterns of rarity among locations. Thus, to support the evaluation of the conservation status of the studied populations, the following parameters were applied: Relative population size, local abundance, vulnerability and legal status. Total genomic DNA

extraction and the AFLP procedure were performed following established protocols. Selective amplification products were separated on a capillary electrophoresis sequencer at the genomic department of the Universidad Politécnica de Madrid. Three cpDNA regions were explored in search of haplotype variation to complement the information given by the mainly nuclear AFLPs.

To evaluate the genetic structure parameters, the following analyses were performed: an unrooted phylogram based on Nei's and Li genetic distances, using the Neighbour-Joining (NJ) clustering method, Principal Coordinate Analysis (PCoA) and an analysis of molecular variance (AMOVA). The last one was first conducted considering all populations belonging to the same group and, second, partitioning genetic variation into portions assignable to differences among three predefined groups, in order to test the existence of genetic structure among geographical divisions. Additionally were calculated the Nei's gene diversity index and the frequency down-weighted marker values per population or sampling site (DW), for each population. Finally, the number of rare alleles (N_r) was calculated as an additional measure of rarity. cpDNA sequences were assembled and edited and an unrooted haplotype network constructed and used to infer the genealogical relationships among haplotypes.

To the selection of RGUCs, the values of the probability of loss of rare alleles are compared with those of the degree of inter-population subdivision. First, the population differentiation coefficient (F_{ST}) is used to estimate the total number of populations that should be targeted according to the equation $P = 1 - F_{ST}^n$. Second, using the mean frequencies of rare bands and their associated probabilities of loss, frequency p was calculated using the expression $L = (1-p)^{2N}$. For each rare allele the observed (L_o) and expected (L_e) probabilities of loss were calculated. The negative natural logarithms of those values were plotted and used to calculate the respective linear regressions. The representative R value was calculated as the quotient between the slope of the expected regression line and the slope of the observed regression line. Finally, the available information on cpDNA sequences (Chapter 2), together with the set of qualitative parameters were considered to establish which populations of *A. edulis* deserve conservation priority.

Approximately half of the populations of *A. edulis* show large relative population sizes ($> 1 \text{ km}^2$) the other ones have small sizes ($< 1 \text{ km}^2$). But most of them have a low number of individuals (< 1.000 individuals), and present moderate habitat vulnerability. Most of Iberian populations have large sizes, high local abundances and acceptable or moderate habitat quality. Most of the Morocco populations have small populations with reduced local abundances and moderate or critical vulnerability. Canary Islands populations present a combination of the rarity forms, and moderate or acceptable vulnerability. A total of 1134 polymorphic and reliable bands were obtained, with an insignificant final error rate (1.67%). AFLPs detected low levels of intrapopulation genetic diversity for *A. edulis*. Nei's gene diversity index ranged from 0.066 to 0.155. The total species diversity was 0.108. Regarding rarity, the genetically most distinctive population seems to be AE16 in Fuerteventura, while the lowest DW values have been found in the easternmost part of the large Iberian population (AE6).

Both the unrooted NJ tree and the PCoA revealed a well-defined genetic structure of populations in correspondence with geographic groups. The same geographical groups are revealed by the PCoA, but in this case the apparently close relationship between some of the Moroccan and all the Canarian samples suggested by NJ does not seem to be supported, while an affinity between the Moroccan and the Iberian individuals is suggested. AMOVA analysis of the entire data set as a single group reveals that the genetic variation among individuals is meaningfully higher than the variation among populations. The results of the hierarchical AMOVA confirm the division of populations into the three geographic groups found by NJ and PCoA analyses.

According to our results, the 99.9% of the species overall genetic diversity through the entire distribution range of *A. edulis* would be represented by six populations. This should be the minimum number of populations to be targeted in order to accomplish suitable conservation objectives. There were found 273 rare alleles, 66 of which were exclusive to IP, 78 M and 57 to CI. The representative R value considering *A. edulis* as one group was $R = 0.354$. This value, calculated independently for each geographic area, were: $IP = 0.407$, $M = 0.355$ and $CI = 0.293$. The optimal proportion of populations to be sampled for conservation purposes from each geographical group can be expressed as 0.45: 0.34: 0.21. Although we are aware of the fact that estimates of the level of genetic variation are difficult to compare across studies based dominant

markers, the levels of genetic variation in *A. edulis* appear to be similar to that found in other outcrossing annual species, showing more or less comparable distribution areas to that of *A. edulis*, indicating that relative differences in population diversity are not an artifact of the number of sample per population. The obtained diversity levels are also comparable to those shown by other Mediterranean perennial herbs, perennial herbs belonging to the same genus, or even long-lived trees from the Western Mediterranean region.

The selection of RGUCs has allowed the estimation of the number of populations that should be targeted to sample a 99.9% of the total genetic diversity of *A. edulis*. Considering the diversity and rarity values found for each population based on AFLP data and also this optimal proportion of populations to be sampled for conservation purposes from each geographical group, we would initially recommend the selection of populations (or subpopulations) AE1, AE4 and AE5 (IP), AE8 and AE9 (M) and AE16 (CI) as of priority interests. Subpopulations AE4 and AE5 show maximum diversity and rarity values within the Iberian distribution range of the species and their sampling may warrant conservation of two Iberian endemic, apart from the widely distributed ones. Selecting AE1, would additionally contribute to the conservation of another endemic haplotype. Within the Canary Islands, population AE16 shows comparatively the highest values of singularity and diversity; as well as the unique endemic haplotype of the CI. For Morocco the selection of RGUCs is more complicated. Within this geographic area, populations AE8 and AE9 presents the highest values of singularity and diversity, but two of the endemic haplotypes from N Africa would not be represented. Therefore protection of populations AE11 and AE10 would be also highly desirable as the evolutionary history based on cpDNA of *A. edulis* would be taken into account. Given that the Moroccan populations of this species show medium values of genetic diversity and rarity, the decision on which population deserve priority for conservation purposes would be more correct if it is based on the consideration of rare or restricted haplotypes. Therefore, AE10 and AE11 should be prioritized over AE8 or AE9.

Followed method to choose RGUCs is based not only on the approach indicated by previous authors, but on the consideration of complementary phylogeographic and ecological data and is, therefore, more comprehensive and also probably more useful. The identification of these highly representative populations based on genetic data is essential to design appropriate conservation guidelines, especially considering that this

species is included in one of the lower threat UICN categories because it presents a relative high number of populations and also effective number of individuals (at least in the large Spanish main population), which makes difficult the protection of the entire distribution range of the species.

4. Genetic complex patterns in Iberian habitat islands: Phylogeography of *Jacobaea auricula*(Bourg. ex Coss.) Pelser (Asteraceae)

The Iberian Peninsula is a transitional region; its physiographic heterogeneity has determined the evolutionary history of the flora lineages that inhabit there. According to Barron *et al.*, during the Paleogene the Iberian flora was dominated by paleotropical elements, but along the Neogene there was a displacement or disappearing of the subtropical flora and a strengthening of the Mediterranean one. During the Miocene and Pliocene there was a gradual reduction of vegetal diversity, and an expansion of Mediterranean taxa, mostly in lowlands of the Iberian Peninsula. In the upper Pliocene, glacial and interglacial cycles started, promoting the alternation of the warm-humid flora and Mediterranean steppe. From middle Pleistocene, the rhythm of these oscillations accelerated, provoking the drastic change in the distribution and abundance of plant communities by affecting in a cyclic way the geographical range of species and ecosystems. So during the periods in which ecological conditions were not favorable, the geographic range of the species was contracted, causing isolation and divergence, but in the periods with adequate conditions, ranges expanded again, allowing the secondary contact between populations. Zones in which a species survive in the periods of maximum range contraction are called refuges. There are multiple refugia within the Iberian Peninsula, with diversity patterns that appear to be the result of expansion and contraction cycles of distribution range of several species.

Jacobaea auricula (Bourg. ex Coss.) Pelser (\equiv *Senecio auricula* Bourg. ex Coss.) is an iberian-northafrican endemism. This taxon presents three recognized subspecies, which have been described on morphological characters basis, besides they seem to be associated with their geographical distribution. All subspecies are included as vulnerable (VU) in several red lists.

There is not enough phylogeographic empirical data in plants that grow in edaphic islands, where the isolation by distance, as well as the founding effect are theoretically associated. *J. auricula* has been selected as model species, and markers such as AFLP and chloroplast DNA have been used to: (1) Study and interpret the intraspecific phylogeographic patterns in *J. auricula*; (2) Explore diversity patterns and genetic singularity, as well as inter-population differentiation level, to try to determine the impact that its disjunct distribution has been in its current genetic structure and variability; (3) Study the divergence levels among genetic groups and check if the obtained pattern is congruent with the intraspecific taxonomic classification.

Plant material from 285 individuals belonging to 31 sampling points was collected and dried in silica gel. Additionally, an herbaria sample of *Jacobaea othonnae* was selected to be used as outgroup in the chloroplastic haplotypes analysis. To ensure the groups' monophyletic status, we sequenced the ITS region in 6 random samples, that were then analyzed together with two analog sequences obtained from GeneBank. Genomic DNA was extracted according to 2x CTAB protocol. To obtain AFLPs profiles the Vos *et al.* protocol was used, with minor modifications. Selective PCR products were separated in a capillary electrophoresis sequencer at the Genomic Unit of *Universidad Politécnica de Madrid*. Additionally, three cpDNA regions were sequenced in 75 individuals. Purified PCR products were analyzed in an automatic sequencer at the same Genomic Unit.

Following analyses were carried out: Neighbour-Joining (NJ), NeighbourNet (NNet), a principal coordinate analysis (PCoA) and assignment of the individual to established groups following the Bayesian models. Additionally Nei's diversity index and DW were calculated for each population. Finally, a molecular analysis of variance (AMOVA) was realized, examining five hierarchical aggregations. Chloroplast sequences were assembled, edited, aligned and concatenated. Gaps were treated as missing data in the further analysis and there were no inversions found. Finally a construction of an haplotype network, using the Templeton parsimony algorithm, and a phylogenetic tree based on the Bayesian analysis were built, both with *J. othonnae* as outgroup.

NJ and NNet diagrams revealed that the genetic variation of the species is divided in 7 main groups while the Bayesian algorithm threw as a result that the best partition of the genetic variation is in four groups. PCoA shows very similar results to those found in

the Bayesian analysis. By representing the traditionally accepted subspecies in the PCoA diagram it can be noticed that there is a lack of adjustment between the genetic structure found with AFLPs and the taxonomic structure being used. Hierarchic AMOVA analyses points out that the genetic structure found by the Bayesian analysis represents the best partition of the genetic diversity of the species. In general terms, the genetic diversity is higher in populations of north areas of the peninsula than those of the south. The population that presents the second highest grade of genetic singularity is number 9, located at northeast of the Peninsula. The cpDNA sequences gave a result of 16 polymorphisms and 9 haplotypes. Haplotype network shows a clear separation between haplotypes [VIII + IX] and the other ones. An intra-population haplotypic variation was detected in three of the 31 sample sites, being I and III most frequent ones. Three endemic haplotypes were found in the northeast of the Peninsula. Haplotypic diversity is higher to north than south of the Iberian Peninsula. The built Bayesian reconstruction is congruent with the haplotype network.

Both, the haplotype network and phylogenetic tree suggest an initial split in two intraspecific lineages, one distributed in the south of the Peninsula and the other that doesn't seem geographically restricted. The loss of contact between them is probably previous to climatic oscillations of the Pleistocene. Although the lack of external calibration points has stopped the dating of the intraspecific phylogeny of *J. auricula*, it can be assured that the geographical distribution of ancestral haplotypes I and VIII adjusts to the zone distribution which in the Messinian age were occupied by Mediterranean xerophitic communities, similar to those that now host populations of *J. auricula*, supporting the hypothesis that the divergence between the two lineages could have been due to the differential survival of the taxa in isolated geographic areas, when the Iberian Peninsula was occupied by discontinuous masses of epicontinental salt water. Even though the Pleistocene climatic pulsations do not seem to have had great impact in southern populations, they could promoted the differentiation of haplotypes in the north of the peninsula, were area contractions could have allowed the differentiation of endemic haplotypes. The actual genetic composition of the species seems to be well structured from the geographic point of view; the data analysis allows addressing the hypothesis of the existence an ancient way of contact between the populations of the central Iberian area, line which matches with the emergent lands during the Tortonian Age. Genetic characteristics of the population number 9 indicate that it could be a relict

population, maybe product of a drastic reduction in the distribution range of the haplotypic lineage [VIII+IX]. Intraspecific genetic distribution of the species appears to be product of the Pliocene-Pleistocene climatic oscillations, and their associated contractions and expansions of its distributional range.

Due to *J. auricula* is found in edaphic islands, it is expected *a priori* that shows high population divergence levels, however, the genetic variation values found are lower than those found in other plant species, while the rareness values are comparatively high and, on the contrary of the diversity levels, do not respond to a geographic distribution pattern. Found patterns may be related to paleohistoric and paleoclimate reasons, although the low habitat availability favorable for the species do not seem to be limited in a drastic manner its dispersion movements on a historic scale. Genetic structure analysis shows that there is a certain level of structure within *J. auricula*, which indicates certain grade of isolation between populations. Although the levels of divergence found for the species (F_{ST} : 0.325) are not high, it is possible that *J. auricula* has some long or medium distance dispersion capacity that has facilitated the genetic exchange between populations.

Concluding, it appears that the structure and variation of genetic variability in *J. auricular* answers to a historical pattern, as well as a classic model of habitat islands. Finally, if this result is accepted, there is a need to check the evaluation of the menace level of the species in the set of its Iberian distribution.

The data obtained do not seem to support the coincidence between the intraspecific taxonomic treatment accepted for the species and the organization of the genetic variation. In this work there were no detailed morphological studies, but the checking of herbarium and fresh specimens, did not made evident the morphological differences usually associated to the geographical distribution of the subspecies. Besides, the made chromosome recounts confirm that the chromosome number is constant in all subspecies ($2n=40$). Considering this, it can be concluded that is not appropriate the intraspecific taxa acknowledge within *J. auricula*.

5. Phylogeography of the Tyrrhenian endemic *Arenaria balearica* L.: Genetic traces of the history of the continental islands of the Western Mediterranean from the Oligocene

Within the Mediterranean Basin, islands constitute important hot spots of diversity, due to their high levels of endemism and species number. The high rates of diversification often found in islands have been explained by different processes such as adaptive radiation in, predominant in oceanic islands, and population divergence, in the case of continental fragments. In the Mediterranean basin, the Tyrrhenian Islands (Balearic Islands, Corsica, Sardinia and Sicily) are identified as one of the 10 hotspots of plant diversity in the region. Balearic Islands, Corsica, Sardinia and the Tuscan archipelago show great Paleogeographic and paleoclimatic complexity, which has caused that the story of the flora inhabiting them contains several episodes of fragmentation and population divergence events. But there are also other events that have been able to affect the evolutionary history of the vascular flora of the Western Mediterranean, such as the lifting of the Strait of Gibraltar and subsequent desiccation of the Mediterranean Sea, which allowed the formation of land bridges that facilitated exchanges of flora and fauna. The Messinian salinity crisis was followed by the establishment, in the Pliocene, of a mediterranean climate regime, and later by the Plio-Pleistocene glacial cycles, phenomena that has decisive influence in the survival, geographical distribution and diversification of a large number of lineages. During the glacial maximum, sea level came to be between 120 and 150 m lower than today, allowing the establishment of direct connections between Corsica and Sardinia and with the Italian Peninsula. Some islands, such as Montecristo and Capraia remained separated from mainland, and the island of Tavolara was linked to Sardinia during the glacial Maxima. The Balearic Islands were also affected by fluctuations in the level of the sea, which caused periods of connection and disconnection between islands.

Arenaria balearica L. is a Tyrrhenian endemism, which could be naturally found in Majorca, Corsica, Sardinia and some islands of the Tuscan archipelago. It is a perennial herbaceous, more or less caespitose, without obvious specializations for long-distance seed dispersal. Its chromosome number is $2n = 18$. This species grows usually at the base of limestone cliffs and rock face or in cool and moist slopes. Many endemic species of the Mediterranean have in common their presence in rocky protected habitats,

within communities with low levels of pressure. This type of environments are characterized by having a fragmented distribution, high levels of endemism and because they represent taxa relictic shelters.

In the present study were used AFLP markers and cpDNA sequences to analyze the spatial genetic diversity organization, as well as the evolutionary history of the Tyrrhenian endemism *Arenaria balearica*, in order to clarify if the current distribution of the species in the islands of the Western Mediterranean is due to disjunct evolution or, if such distribution is better explained by biological or anthropogenic causes. It was performed a phylogeographic reconstruction to elucidate details on spatial and temporal diversification of the populations of *a. balearica*, to recognize the role that they have played in the processes of fragmentation in the evolutionary history of the studied species.

The reconstruction of the coast lines for the Western Mediterranean at 21 KyBP, presented in this work, was carried out by extracting topographic and bathymetric data of the study area from ETOPO and adjusting the digital elevation model 120 m.

Plant material from 213 individuals from 29 of sampling points was collected and dried in silica gel. Reference specimens were deposited in the herbaria of the universities of Salamanca, Granada or Cagliari. Additionally, we selected three samples of the species *A. bertolonii* to be used as outgroup in the haplotypes analysis. There was also sequenced the ITS region in 28 samples of *A. balearica* and in several samples of the species *A. bertolonii*, *Arenaria funiculata*, *Arenaria tejedensis* and *A. suffruticosa*. There was found that the study group is clearly monophyletic. Genomic DNA was extracted using the 2 x CTAB protocol with minor modifications. To obtain the AFLPs profiles, was followed the Vos *et al.*, protocol with minor modifications. Selective PCR products were separated into a sequencer of capillary electrophoresis in the genomic unit of the Universidad Politécnica de Madrid. There was sequenced three cpDNA regions in a total of 52 individuals. PCR products were purified and analyzed in an automatic sequencer of capillary electrophoresis in the same unit.

As first approach to global genetic relationships and the structure of the data, a Neighbour Joining (NJ) and NeighbourNet (NNet) analyses were performed.

Additionally a Principal Coordinates Analysis (PCoA) was run, and as a supplementary estimate, the assignment of individuals to established groups, following Bayesian models, was done. Additionally Nei's diversity index and *frequency down-weighted marker values* (DW) were calculated. Analysis of molecular variance (AMOVA), were finally made by examining five types of hierarchical groupings. cpDNA sequences were assembled, edited, aligned, and concatenated. *gaps* greater than two pair of bases were encoded as a single-step mutations and treated as a fifth state. Then a network of haplotypes, with *A. bertolonii* as outgroup, was built, using the algorithm of parsimony of Templeton. According to the NJ, the current genetic diversity of species is divided into two large groups; however PCoA shows a low level of genetic variation in the species structure. There is a lack of adjustment between the results obtained with the NJ and PCoA, since the second indicates some degree of differentiation between populations of Majorca and Corsica, but not from Sardinian populations. Bayesian clustering indicates that the best partitioning of genetic variation is in four groups, one of which is represented in all the analyzed islands and in virtually all populations. This analysis also shows that have due be important secondary contacts between the populations of Corsica and Sardinia. Hierarchical AMOVA analyses suggest that the genetic structure found by the NJ analysis represents the best partition of the genetic diversity of the species. In general, the greatest rarity and diversity values arise in populations of Corsica, while in Majorca, in general, diversity and singularity values are low. The concatenation of cpDNA regions resulted in an alignment of 2422 bp, with a total of 33 polymorphisms and 12 different haplotypes. The built haplotype network has a star shape topology, with a central haplotype which seem to have derived the others; central haplotype is broadly distributed in all islands. The rest of haplotypes are much less frequent, being the most derived haplotype VI. All derived haplotypes are endemic to an island and, generally, to a single population. Intraspecific haplotype variation was detected in 6 of the 28 sampling points. Higher haplotype diversity values occur in Sardinia and the lowest ones in Majorca.

Thyrrhenian paleoendemisms offer multiple possibilities for carrying out studies that will prove the validity of the hypothesis that attributed a pre-Quaternary origin to many species that are considered as paleo-endemics. The data obtained for *A. balearica* seem to support its paleoendemic character and that its present disjunctive distribution, in the islands of Majorca, Corsica, Sardinia, Tavolara and Montecristo (populations of Capraia

haven't been included in this work), can be explained on the basis of the disintegration of the Hercynian Massif, that took place at the beginning of the Oligocene. AFLP data obtained indicate that there is a low degree of organization of the intraspecific genetic variability, in species with limited dispersal capacity, as *A. balearica*, would be expected to present significant levels of divergence among populations, especially in those that remain or have remained isolated. Our results are also in correspondence with the low levels of divergence obtained in the different population groups tested with AMOVA analysis. The cpDNA results are also consistent with the above described. The star shape presented by the haplotype network suggests that all current haplotypes of the studied species have been derived from a single ancestral haplotype (haplotype I). This ancestral haplotype is well represented in the entire range of distribution of the species, fact that suggests a possible Oligocene fingerprint.

Endemic haplotypes of each of the three major islands, would have derived *in-situ* from the ancestral haplotype and independently from each other. From the AFLP data obtained is not possible to infer clear inter-island episodes of long distance dispersal, the shape of the haplotype network seems too little compatible with the existence of this kind of event. The results found seem to match with a scenario in that populations of *A. balearica* would have suffered old fragmentation. These populations could have obtained refuge in habitats with relative environmental stability throughout the Quaternary period. However, because the low levels of haplotype variation found, it has been proposed that many thyrrenian paleoendemisms shows low levels of morphological inter-population variation, despite the fact that their populations have been isolated for long periods of time, fact that could be consistent with the fact that these species presents low rates of molecular evolution. This affirmation seems to be supported by the results obtained in this work. In the case of *A. balearica* our results also suggest the existence of recurrent secondary contacts between Corsica and Sardinia, possibly after their breakdown from Majorca. But was not possible to date accurately them, reason why we just suggest that those contacts could be Messinian or Quaternary.

6. Conclusions

Phylogeographic and conservation biology studies conducted using AFLP data and plastid DNA sequences for *Astragalus edulis* Bunge (Fabaceae), a species distributed on the easternmost Canary Islands (Lanzarote and Fuerteventura), Morocco and in the southeast of the Iberian Peninsula, allow the following conclusions:

1. The successive Quaternary sea level oscillations have probably contributed in a decisive way to shaping both structure and current genetic diversity of *A. edulis* in the Mediterranean-Macaronesian transition area.
2. Genetic evidence of recent long-distance dispersal events (single or multiple) from Morocco to the Eastern Canary Islands has not been found. However, the existence of these events in ancient times cannot be discarded. When several seamounts, now submerged, located between the Canary Islands and Moroccan coasts, were emerged they could have facilitated exchanges of flora between both territories. The available data (i.e., ancient connection between the Canarian populations and M4) do not allow differentiation of this hypothesis from the one that proposes that a fragmentation of a formerly more continuous range of the species in the Mediterranean-Macaronesian transition may have happened.
3. Obtained results from the analysis of AFLPs and cpDNA haplotypes for *A. edulis* are consistent with the hypothesis that Lanzarote and Fuerteventura islands emerged as a single unit, a proto-island known as Mahan, and remained connected for a long time.
4. Evidence of genetic exchange between North Africa and Europe has been found. This exchange perhaps took place across the Alboran Sea. Islets present in the region, most of them today submerged, could have served as stepping stones, which facilitated contacts between those areas. The data obtained confirm the hypothesis that annual plants tend to show higher levels of gene flow than the perennial ones, through the biogeographic barrier represented by the Alboran Sea-Strait of Gibraltar area.
5. On the basis of the data obtained using DNA hypervariable nuclear markers, RGUCs (relevant genetic units for conservation) have been selected. The data indicate that, if it is intended to preserve the 99.9% of the overall genetic

diversity of *A. edulis*, it is necessary to conserve *in situ* or *ex situ* a minimum of six populations (or sub-populations). Rare alleles loss probabilities were calculated, in order to select those populations which deserve to be protected (or collected for *ex situ* conservation) on the basis of its unique allelic composition. These rare alleles loss probabilities indicate that the proportion of populations (or subpopulations) that must be preserved in each of the three main geographical cores in which *A. edulis* grows are: 45% for the Iberian Peninsula; 34% of Morocco; 21% of the Canary Islands.

6. Taking into account the diversity and allelic rarity values found at the population level, the optimal proportion of populations that should be sampled from each geographical group, the presence of endemic haplotypes, as well as ecological and legal measures of protection affecting them, populations recommended to prioritize are: AE1, AE4 and AE5 (Iberian Peninsula); AE10 and AE11 (Morocco) and AE16 (Canary Islands).

Additionally, a phylogeographic study, using AFLPs and cpDNA sequences has been carried out for *Jacobaea auricula* (Bourq. ex Coss.) Pelser (Asteraceae), an Iberian endemic restricted to edaphic islands. It allows the conclusions:

7. Phylogenetic analysis of above mentioned sequences indicate an intraspecific differentiation in two initial main lineages, separated by a relatively large number of steps of parsimony. This suggests that the loss of contact between these two lineages must be very old, probably previous to the Plio-Pleistocene climatic oscillations. This pattern can be interpreted as an ancient, –perhaps Miocene– area fragmentation, followed by differential survival of the taxon in geographically separate areas. The AFLP results support this pattern, originally found in sequences data, but they suggest an even more complex evolutionary history.
8. The complex spatial organization of intraspecific genetic variability in *J. auricula* indicates survival in multiple refuge areas in different paleohistoric periods. Additionally, it seems to involve several processes: range contraction associated with glacial maxima, followed by more or less fast post-glacial recolonizations, but also ancient area fragmentations, secondary contacts

between lineages, and/or more or less long-distance colonization and restriction of gene flow situations.

9. The fact that *J. auricula* grows in edaphic islands and the consequent hypothetical low availability of favorable habitat for the species in a paleohistoric scale, do not seem to have dramatically limited the historical dispersion ability of the species.
10. Genetic data do not support the coincidence between the infraspecific taxonomic treatment accepted until now for *J. auricula* and the structure of genetic variation, as derived from AFLP analysis. It is therefore necessary to reconsider the evaluation of the threat degree for this species.

Finally, a phylogeographic study, using AFLPs and cpDNA sequences, has been carried out for *Arenaria balearica* L. (Caryophyllaceae), a species restricted to continental Islands in the Western Mediterranean. This suggests:

11. In the past, this Thyrrenic paleoendemic species (or its ancestors) showed a continuous distribution area. The current distribution of *A. balearica* is a product of subsequent range fragmentation, due perhaps to the disintegration and relative movements of the Corsican-Sardinian-Calabrian microplate, on the one hand, and Balearic-Kabylies microplate, on the other.
12. The existence of recurrent secondary contacts (Messinian or Quaternary), between Corsica and Sardinia, allowed floristic exchanges between both islands. However, there is no evidence of this kind of contact between these islands and Majorca.
13. Low rates of molecular evolution have been found in *A. balearica*, which are consistent with low levels of morphological inter-population variation, despite the fact that the populations of this plant have been isolated for a long time. This result supports the hypothesis that Thyrranian paleoendemic species present low mutation rates, associated with morphological stasis.