

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y  
FISIOLOGÍA VEGETAL**

**ÁREA DE BOTÁNICA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio multidisciplinar sobre las especies del complejo de la serie *Fissa* del género *Delphinium* en la Península Ibérica, con especial atención a *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*: implicaciones para la conservación**

Tesis Doctoral presentada por el Licenciado **D. Rubén Ramírez Rodríguez** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 2018





La presente Tesis Doctoral está elaborada en el formato de compendio de artículos/publicaciones según la normativa aprobada por la Comisión de Doctorado y Postgrado de la Universidad de Salamanca el 15 de Febrero de 2013 y consta de las siguientes publicaciones:

**1. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) in Portugal: distribution and conservation status**

Rubén Ramírez-Rodríguez<sup>1</sup>, Leopoldo Medina<sup>2</sup>, Miguel Menezes de Sequeira<sup>3</sup>, Carlos Aguiar<sup>4</sup> & Francisco Amich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Evolution, Taxonomy, and Conservation Group (ECOMED), Department of Botany and Plant Physiology, University of Salamanca, E-37008 Salamanca, Spain; <sup>2</sup>Real Jardín Botánico CSIC, Plaza de Murillo 2, ES-28014 Madrid, Spain; <sup>3</sup>GBM, Universidade da Madeira, Centro de Ciências da vida, Grupo de Botânica da Madeira, Campus da Penteada, 9000-390 Funchal, Portugal; <sup>4</sup>Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Apartado 1172, Bragança 5301-855, Portugal.

*Anales del Jardín Botánico de Madrid* (2017) 74 (1): e056

Factor de impacto (2017): 0.500. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/ajbm.2467>

**2. Habitat distribution modelling, under the present climatic scenario, of the threatened endemic Iberian *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) and implications for its conservation**

Juan Diego Rus<sup>1</sup>, Rubén Ramírez-Rodríguez<sup>2</sup>, Francisco Amich<sup>2</sup> & Manuel Melendo-Luque<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén, Jaén, Spain; <sup>2</sup>Evolution, Taxonomy and Conservation Group (ECOMED), Department of Botany, University of Salamanca, Salamanca, Spain.

*Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* (2018) 152 (5): 891–900

Factor de Impacto (2017): 1.203. doi: 10.1080/11263504.2017.1359214

**3. Effects of local abundance on pollination and reproduction in *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae)**

Rubén Ramírez-Rodríguez & Francisco Amich

Evolution, Taxonomy and Conservation Group (ECOMED), Department of Botany and Plant Physiology, University of Salamanca, Salamanca, Spain

*Botany Letters* (2017) 164 (4): 371–383

Factor de Impacto (2017): 1.342. doi: 10.1080/23818107.2017.1383307

## AGRADECIMIENTOS

### PROVERBIO ÁRABE

No digas todo lo que sabes,  
No hagas todo lo que puedes,  
No creas todo lo que oyes,  
No gastes todo lo que tienes;

Porque:

El que dice todo lo que sabe,  
El que hace todo lo que puede,  
El que cree todo lo que oye,  
El que gasta todo lo que tiene;

Muchas veces:

dice lo que no conviene,  
hace lo que no debe,  
juzga lo que no ve,  
gasta lo que no puede.

La culminación de esta memoria doctoral ha sido posible gracias a la colaboración de un gran número de personas, relacionadas o no con el mundo de la ciencia, que me han brindado su ayuda tanto en la faceta profesional como en la personal. A todos ellos, les reitero mi agradecimiento más sincero. Querido lector/a, si usted también encuentra esas mariposas revoloteando en su cabeza, intente llegar a una de ellas y acérquese en silencio; los colores que observe en sus alas pintan la palabra **GRACIAS**.

**“Obra de modo que merezcas a tu propio juicio y a juicio de los demás la eternidad, que te hagas insustituible, que no merezcas morir.”** – Miguel de Unamuno.

**“All that was great in the past was ridiculed, condemned, combated, suppressed – only to emerge all the more powerfully, all the more triumphantly from the struggle. Let the future tell the truth and evaluate each one according to his work and accomplishments. The present is theirs, the future, for which I really worked, is mine.”** – Nikola Tesla.

**“No tengo ningún talento especial. Solo soy apasionadamente curioso.”** – Albert Einstein.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS







<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>7</b>
<b>1. Filogenia y sistemática</b>	<b>9</b>
1.1. Evolución y filogenia de las Angiospermas	9
1.2. Especies fósiles próximas a las Ranunculales	10
1.3. Filogenia del orden Ranunculales	11
<b>2. Familia Ranunculaceae</b>	<b>12</b>
2.1. Caracteres generales	13
2.2. Clasificación filogenética	13
<b>3. Tribu Delphinieae</b>	<b>16</b>
3.1. Caracteres generales	17
3.1.1. Formas biológicas	17
3.1.2. Morfología floral	18
3.1.3. Biología de la polinización	25
3.1.4. Reproducción	28
3.1.5. Reproducción vegetativa	32
3.1.6. Citogenética	33
3.1.7. Propiedades toxicológicas y farmacológicas	34
<b>4. Género <i>Delphinium</i></b>	<b>35</b>
4.1. Clasificación taxonómica	35
4.1.1. Subgénero <i>Anthriscifolium</i>	36
4.1.2. Subgénero <i>Delphinium</i>	37
4.1.3. Subgéneros <i>Delphinastrum</i> y <i>Oligophyllon</i>	38
<b>5. Serie <i>Fissa</i></b>	<b>42</b>
5.1. Especie estudiada	43
5.1.1. <i>Delphinium fissum</i> subsp. <i>sordidum</i>	43
<b>Bibliografía</b>	<b>49</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>65</b>
<b>PRIMER CAPÍTULO</b>	<b>69</b>
<i>Delphinium fissum</i> subsp. <i>sordidum</i> (Ranunculaceae) in Portugal: distribution and conservation status	



---

<b>SEGUNDO CAPÍTULO</b>	<b>83</b>
Habitat distribution modelling, under the present climatic scenario, of the threatened endemic Iberian <i>Delphinium fissum</i> subsp. <i>sordidum</i> (Ranunculaceae) and implications for its conservation	
<b>TERCER CAPÍTULO</b>	<b>111</b>
Effects of local abundance on pollination and reproduction in <i>Delphinium fissum</i> subsp. <i>sordidum</i> (Ranunculaceae)	
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>141</b>

# INTRODUCCIÓN





Las eudicotiledóneas, con más del 70% de las especies actuales de angiospermas, se originaron en la edad Barremiense (Cretácico inferior), hace 125 Ma. Es en este período, comprendido entre las edades Barremiense y Aptiense, en el que vivió una planta fósil eudicotiledónea con órganos reproductores (*Leefructus mirus*), la cual se considera el grupo hermano de las ranunculáceas ya que comparte caracteres morfológicos con ellas y esta hipótesis es además apoyada por análisis moleculares.

El orden Ranunculales es el grupo hermano del resto de las eudicotas, el cual se escindió de forma temprana del resto de los grupos hace aproximadamente 120-114 Ma. La familia Ranunculaceae también divergió relativamente temprano de las Menispermáceas (105 Ma). Ambos grupos presentan características propias de las angiospermas basales (caracteres ancestrales) así como características de las eudicotiledóneas más evolucionadas (caracteres derivados).

La tribu Delphinieae presenta flores con simetría zigomórfica y pétalos superiores nectaríferos en forma de espolón. Ambos caracteres evolucionaron conjuntamente como novedades morfológicas, las cuales pueden considerarse como una sola innovación clave, en coevolución con los potenciales polinizadores. En consecuencia, Delphinieae es la tribu más rica, con 650-700 especies que corresponden al 25% del total de especies incluidas en la familia Ranunculaceae. Además, experimentó una rápida diversificación en un marco temporal relativamente corto (32.3-27.24 Ma). Actualmente, se reconocen 4 géneros: *Aconitum*, *Gymnaconitum*, *Staphisagria* y *Delphinium* (incluye a los géneros *Aconitella* y *Consolida*).

El género *Delphinium*, con aproximadamente 350 especies, pertenece al orden Ranunculales, familia Ranunculaceae, subfamilia Ranunculoideae, tribu Delphinieae. Su centro de origen se encuentra en el suroeste de China y el este de los Sistemas del Himalaya desde donde se distribuye por las zonas templadas y frías del hemisferio Norte llegando a colonizar algunas regiones de Siberia, América del Norte, este de África y la cuenca Mediterránea.

La clasificación taxonómica que cuenta con una mayor aceptación entre los especialistas del género *Delphinium* es la propuesta por Malyutin (1987) basada en los caracteres de la semilla. Este esquema incluye 4 subgéneros: *Staphisagria*, *Delphinium*, *Delphinastrum* y *Oligophyllon*. Sin embargo, es necesario matizar este enfoque de acuerdo



con los nuevos hallazgos publicados. Así, el subgénero *Staphisagria* se reconoce nuevamente con la categoría taxonómica de “género” y la sección *Anthriscifolium* del subgénero *Delphinium* se considera actualmente como “subgénero”.

Todas las especies que comprenden los subgéneros *Delphinastrum* y *Oligophyllon* son perennes (con aproximadamente 150 especies cada uno) y la mayoría se encuentran en su lugar de origen (Asia central), aunque también cuentan con una buena representación en Siberia, América del Norte y la cuenca Mediterránea, siendo esta última un centro activo secundario de especiación, especialmente para las especies anuales del subgénero *Delphinium*. Por otro lado, algunas especies llegan de manera puntual a los trópicos, en particular al sur de India y a las montañas de las regiones centro-oeste y centro-este del continente africano.

La serie *Fissa* (subsección *Squamata*, subgénero *Oligophyllon*) consta de 7 especies y varias subespecies, con un área de distribución amplia que abarca desde Asia central y occidental hasta el sur de Europa situado en la cuenca Mediterránea. La Península Ibérica ocupa, por tanto, la posición más occidental de su área de distribución, siendo el marco geográfico seleccionado donde se encuadra esta memoria doctoral. Tres taxa endémicos y amenazados conforman la serie *Fissa* en la Península Ibérica: *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*, *D. bolosii* y *D. mansanetianum*.

Inicialmente se ha pretendido llevar a cabo un estudio detallado de la subespecie endémica *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* en el que gran parte del tiempo se ha dedicado a realizar un exhaustivo trabajo de campo, enfocado desde una óptica multidisciplinar, durante el cual se han prospectado nuevas zonas susceptibles de albergar a la subespecie, se han estudiado diferentes aspectos relacionados con su biología y ecología y se han identificado las actuales y potenciales amenazas, definido el óptimo fitosociológico y determinado el estado de conservación. Ya durante el trabajo de gabinete, se han analizado los datos obtenidos aplicando técnicas estadísticas y herramientas actuales como son los modelos de distribución de especies (MDEs).

La Biología de la conservación reúne diversas ramas del conocimiento que han sido aplicadas en cada uno de los trabajos mencionados (demografía, biología reproductiva y modelos de distribución de especies), utilizando técnicas actuales con las que poder hacer un



diagnóstico fiable y pormenorizado del estado de conservación de la subespecie *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*.

Este estudio supone la tercera tesis doctoral que aborda diferentes aspectos del género *Delphinium* en la Península Ibérica, después de las tesis doctorales de Cèsar Blanché i Vergés titulada “Revisió biosistemática del gènere *Delphinium* L. a la Península Ibèrica i a les Illes Balears” y de María Bosch i Daniel titulada “Biología de la reproducción de la tribu *Delphinieae* a la mediterrània occidental”. Así, este estudio amplía el conocimiento actual que se tiene sobre las especies de la serie *Fissa* en la Península Ibérica, desde un punto de vista pluridisciplinar, siendo de utilidad no solo para la comunidad científica sino, creemos, también para gestores y administradores de los organismos competentes en la toma de decisiones y en la planificación de las estrategias de conservación.





# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

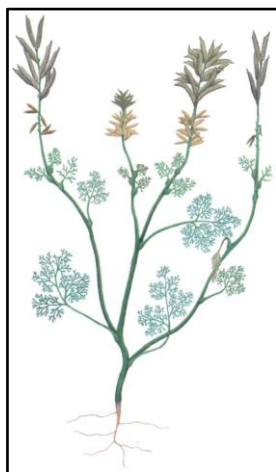


# 1. FILOGENIA Y SISTEMÁTICA

## 1.1. Evolución y filogenia de las Angiospermas

Las Angiospermas son un grupo de plantas que producen flores cuyas semillas (óvulos) están encerradas en frutos (carpelos). Es el grupo de plantas que ha colonizado y actualmente domina la mayoría de los ecosistemas terrestres. Presenta una gran abundancia y diversidad de especies (alrededor de 250000) (Palmer *et al.*, 2004). Su historia evolutiva señala eventos discontinuos de radiación desde su origen, en el Cretácico inferior (140-135 Ma), siendo especialmente significativos durante el Cretácico medio (107-93 Ma). Una posible hipótesis formulada para explicar la rápida expansión de las angiospermas es la existencia de una gran variedad de insectos polinizadores (Ren *et al.*, 2009), los cuales jugaron un papel importante en la evolución de las plantas con flores durante las edades Barremiense, Aptiense y Albiense (Cretácico medio). Por tanto, el origen de las primeras angiospermas es probable que ocurriese antes del período Cretácico.

A finales del Jurásico-principios del Cretácico surgieron las primeras angiospermas, que se sitúan en posiciones basales dentro de los árboles filogenéticos. *Archaeofractaceae* se describe como una nueva familia extinta de plantas herbáceas acuáticas en la formación de Yixian, Liaoning, China (124.6 Ma). Esta familia se considera un clado hermano del resto de las angiospermas y consta de dos especies: *Archaeofructus liaoningensis* Sun, Dilcher, Zheng et Zhou y *A. sinensis* Sun, Dilcher, Ji et Nixon (Sun *et al.*, 2002) (Figura 1).



**Figura 1.** Reconstrucción de *Archaeofructus sinensis* (Sun *et al.*, 2002).



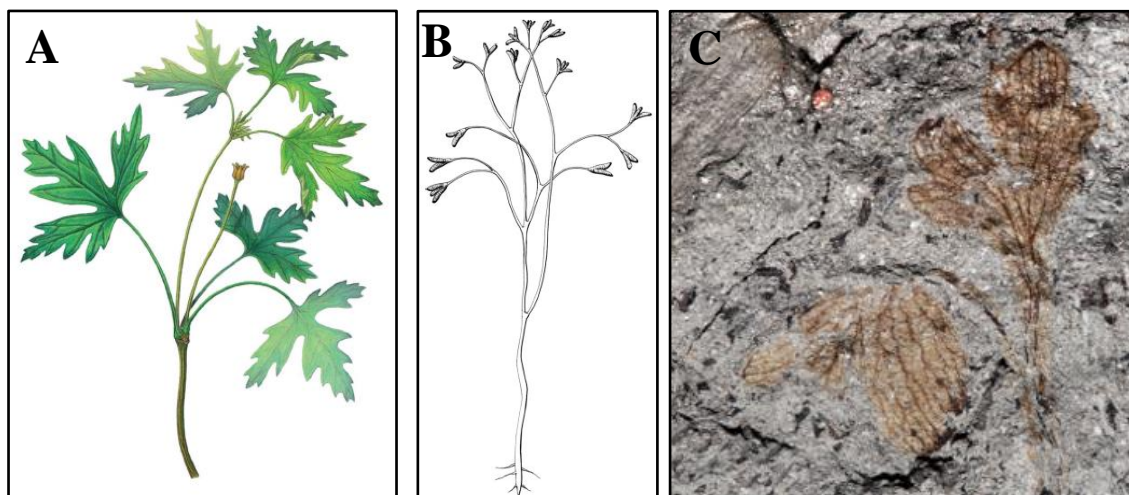
El grupo denominado ANITA es parafilético y consta de los siguientes grupos: Amborellales, Nymphaeales, Illiciales y Trimeniaceae-Austrobaileya. La filogenia más reciente de las angiospermas (APG IV, 2016) reconoce 3 órdenes basales (Amborellales, Nymphaeales y Austrobaileyales), los cuales constituyen el grupo parafilético denominado ANA. Posteriormente, surgió un grupo más amplio y diverso conocido como “las mesangiospermas”, compuesto por 5 linajes monofiléticos: Magnólidas, Chloranthales, Monocotiledóneas, Ceratophyllales y Eudicotiledóneas (APG IV, 2016).

Las Eudicotiledóneas comprenden la mayor parte de las especies actuales de angiospermas en el mundo, con más del 70% (aproximadamente 200000 especies). El término “Eudicota” fue propuesto por Doyle & Hotton (1991) para definir a este clado monofilético que se caracteriza por tener como sinapomorfía distintiva del grupo el tipo de grano de polen tricolpado (3 aperturas de tipo colpo). Los primeros registros fósiles atribuidos a eudicotiledóneas fueron pequeños granos de polen tricolpados de la edad Barremiense encontrados en el sur de Inglaterra (Hughes & McDougall, 1990) y en la costa occidental de África central (Gabón) (Doyle *et al.*, 1977). Así, el origen de las eudicotiledóneas se fija hace aproximadamente 125 Ma, al final de la edad Barremiense-principios de la edad Aptiense en el Cretácico medio, aunque probablemente apareciesen antes.

## 1.2. Especies fósiles próximas a las Ranunculales

La formación de Yixian en el noreste de China es un enclave rico en fósiles de plantas y animales (Zhou *et al.*, 2003). Sun *et al.* (2011) reportaron la presencia de una planta fósil eudicotiledónea con órganos reproductores, *Leefructus mirus* Sun, Dilcher, Wang et Chen (Figura 2A), datada hace 125.8-122.6 Ma. A partir de los análisis filogenéticos realizados y de los caracteres morfológicos, algunos de los cuales comparte con las Ranunculáceas actuales tales como nerviación palmeada de las hojas y forma parecida a las de las actuales hojas del género *Delphinium* L., estambres libres con disposición irregular, más de 2 óvulos y frutos con picos parecidos a los de los géneros *Aconitum* L. y *Delphinium*, *Leefructus mirus* se considera el grupo hermano de la familia Ranunculaceae. Asimismo, es posible que el género *Hyrantha* Krassilov et Vachrameev (Figura 2B) deba de ser considerado como una especie eudicotiledónea

próxima a las Ranunculáceas, debido a algunas características morfológicas que comparte con éstas (Dilcher *et al.*, 2007) así como el género *Potomacpnos* Jud & Hickey (Figura 2C), el cual se considera una eudicotiledónea, con algunos caracteres parecidos a los helechos y ciertas similitudes con las actuales especies de la subfamilia Fumarioideae (Papaveraceae, Ranunculales) así como con otras especies herbáceas del orden Ranunculales (Jud & Hickey, 2013).



**Figura 2.** Tres especies fósiles afines al orden Ranunculales. **A.** Reconstrucción de *Leefructus mirus* (Sun *et al.*, 2011). **B.** Reconstrucción de *Hyrcantha decusata* (Leng et Friis) Dilcher, Sun, Ji et Li comb. nov. (Dilcher *et al.*, 2007). **C.** Holotipo de *Potomacpnos apeleutheron* Jud & Hickey (Jud & Hickey, 2013).

### 1.3. Filogenia del orden Ranunculales

Las eudicotiledóneas basales constan de 5 grupos monofiléticos (Ranunculales, Proteales, Trochodendrales, Buxales y Gunnerales), los cuales se separaron relativamente rápido en el tiempo (APG IV, 2016). El orden Ranunculales es el grupo hermano del resto de las eudicotas y se escindió de forma temprana hace aproximadamente 120-114 Ma (Anderson *et al.*, 2005), por lo que presenta características de las angiospermas basales así como de las eudicotiledóneas más evolucionadas. Por el momento se desconocen las sinapomorfías que definen a las Ranunculales, lo que hace aún más interesante su estudio.

La familia Eupteleaceae (2 especies) es la primera que diverge, siendo el grupo hermano del resto de las Ranunculales. Posteriormente, se escinde la familia Papaveraceae (750 especies) y finalmente el clado principal, el cual consta de 5 familias: Circaeasteraceae (2 especies), Lardizabalaceae (50 especies), Menispermaceae



(450 especies), Berberidaceae (650) y Ranunculaceae (ver el siguiente apartado). Así, las circaeasteráceas son el grupo hermano de las Lardizabaláceas ya que comparten el mismo tipo de desarrollo del endosperma (endosperma celular). Por otro lado, las familias Menispermaceae, Ranunculaceae y Berberidaceae forman un mismo clado debido a que comparten el mismo tipo de desarrollo del endosperma (endosperma nuclear) y presentan alcaloides bencilisoquinolínicos. Estas dos últimas familias divergieron de las Menispermáceas hace 105 Ma, siendo las Berberidáceas el grupo hermano de las Ranunculáceas con las cuales comparte caracteres como hábitat generalmente herbáceo, rizoma no tuberoso y episperma (tegumento externo) constituido por 4 o más capas celulares (Wang *et al.*, 2016).

Por último, 3 familias dentro del orden Ranunculales (Papaveraceae, Menispermaceae y Ranunculaceae) adquieren simetría floral zigomorfa (simetría bilateral) a través de 3 procesos independientes (Damerval & Nadot, 2007).

## 2. FAMILIA RANUNCULACEAE

La familia Ranunculaceae consta de 59 géneros y aproximadamente 2500 especies (Tamura, 1995). Las ranunculáceas presentan características florales que se consideran ancestrales y derivadas dentro del clado de las eudicotiledóneas, siendo una de las familias que más pronto divergieron (Sun *et al.*, 2011; APG IV, 2016, Wang *et al.*, 2016). A través de su estudio, podemos profundizar y llegar a entender cuáles fueron los pasos claves dados durante la evolución para que las eudicotiledóneas adquiriesen simetría bilateral o zigomorfa.

Las Ranunculáceas se encuentran principalmente en las regiones templadas, árticas y alpinas del Hemisferio Norte, aunque su distribución es prácticamente cosmopolita (Stevens, 2001). La mayoría son plantas herbáceas (anuales, bianuales o perennes), excepto los géneros *Xanthorhiza* Marshall y *Clematis* L. Este último género se considera más evolucionado ya que posee caracteres avanzados como hojas compuestas y opuestas y el tallo lignificado debido a que son plantas trepadoras y bejucos (Johansson & Jansen, 1993).



## 2.1. Caracteres generales

Los caracteres morfológicos en la familia Ranunculaceae han evolucionado en muchos casos como caracteres homoplásicos, variando notablemente incluso dentro del mismo género. Así, las Ranunculáceas exhiben una amplia variabilidad en cuanto a caracteres morfológicos se refiere, como por ejemplo, en la disposición de las hojas (alternas, en roseta basal o raramente opuestas), en el tipo de perianto (homoclamídeo o heteroclamídeo), en el número de piezas florales (determinadas o variables) y en su disposición (verticiladas o en espiral), en la simetría floral (actinomorfa o zigomorfa), en el gineceo [carpelos libres (dialicarpelar o apocárpico) o carpelos soldados (gamocarpelar o sincárpico)], en el fruto (baya, aquenio, cápsula o folículo), en el grado de desarrollo del embrión subdesarrollado (embrión no diferenciado o diferenciado) (Engell, 1995), en el mecanismo de dormición de la semilla y el tipo de dormición morfofisiológica que retrasa el crecimiento del embrión (Baskin & Baskin, 1998; 2004) y en el tipo de cromosomas atendiendo al tamaño [grande (tipo T) y pequeño (tipo R)] (Castroviejo *et al.*, 1986; Johansson & Jansen, 1993; Damerval & Nadot, 2007). Cabe destacar que la disposición en espiral de las piezas florales, el elevado número de estambres y carpelos generalmente libres entre ellos son caracteres primitivos que revelan cierta antigüedad de la familia.

Asimismo, la familia Ranunculaceae posee una gran variedad de compuestos químicos o principios activos derivados del metabolismo secundario tales como: magnoflorina, flavonoides, lactonas, alcaloides diterpénicos, alcaloides bencilisoquinolínicos, ranunculina, saponinas triterpenoides, alcaloides norditerpenoides, alcaloides de tipo pirroloquinolina, cumarinas, glucósidos cardiotónicos y cianogénicos. Debido a su actividad biológica o farmacológica, se han reportado diferentes usos tales como anticancerígenos, antimicrobianos, antiinflamatorios, analgésicos, inmunomoduladores, antihipertensivos, antioxidantes, antiparasitarios y hepatoprotectores (Hao *et al.*, 2015).

## 2.2. Clasificación filogenética

En las primeras clasificaciones filogenéticas de la familia se tuvieron en cuenta únicamente caracteres morfológicos (Tamura, 1968; Thorne, 1992). Tamura (1993) se



basa en características florales y cromosómicas y Takhtajan (1997) combina caracteres morfológicos y micromorfológicos (anatomía, embriología, palinología), cariología, fitoquímica, corología y datos moleculares. Los primeros árboles filogenéticos basados en caracteres moleculares fueron realizados utilizando mapas de restricción (Johansson & Jansen, 1991; 1993; Johansson, 1995; 1998), secuencias nucleares (Kosuge *et al.*, 1995; Ro *et al.*, 1997; Lehnebach *et al.*, 2007;), secuencias nucleares y cloroplásticas (Hoot, 1995; Wang *et al.*, 2005; Hoot *et al.*, 2008), una combinación de secuencias nucleares, cloroplásticas y caracteres morfológicos (Wang *et al.*, 2009), y finalmente utilizando marcadores cloroplásticos, mitocondriales y nucleares (Cossard *et al.*, 2016) (Figura 3).

La clasificación filogenética propuesta por Wang *et al.* (2009) es la aceptada en la actualidad e incluye 5 subfamilias, consideradas por estos autores, monofiléticas dentro de la familia Ranunculaceae: Glaucidoideae, Hydrastidoideae, Coptidoideae, Thalictroideae y Ranunculoideae.

*Glaucidium* Siebold & Zucc. (Glaucidoideae) se considera el grupo hermano del resto de las Ranunculáceas (Wang *et al.*, 2009; Cossard *et al.*, 2016). Algunas de las características morfológicas, fitoquímicas y cariológicas singulares que lo diferencian del resto son: 4 pétalos, 2 carpelos ligeramente connados, semillas con amplias alas en el borde, ausencia de alcaloides bencilisquinolínicos y su número cromosómico es  $n = 10$ . *Hydrastis* J. Ellis es el segundo taxon que diverge, seguido del clado Coptidoideae, ambos apoyados con valores de confianza altos en el análisis bootstrap (Wang *et al.*, 2009). En estudios previos (Johansson & Jansen, 1993, Johansson, 1995; Ro *et al.*, 1997), *Hydrastis* fue considerado como un clado monofilético hermano del resto de las Ranunculáceas.

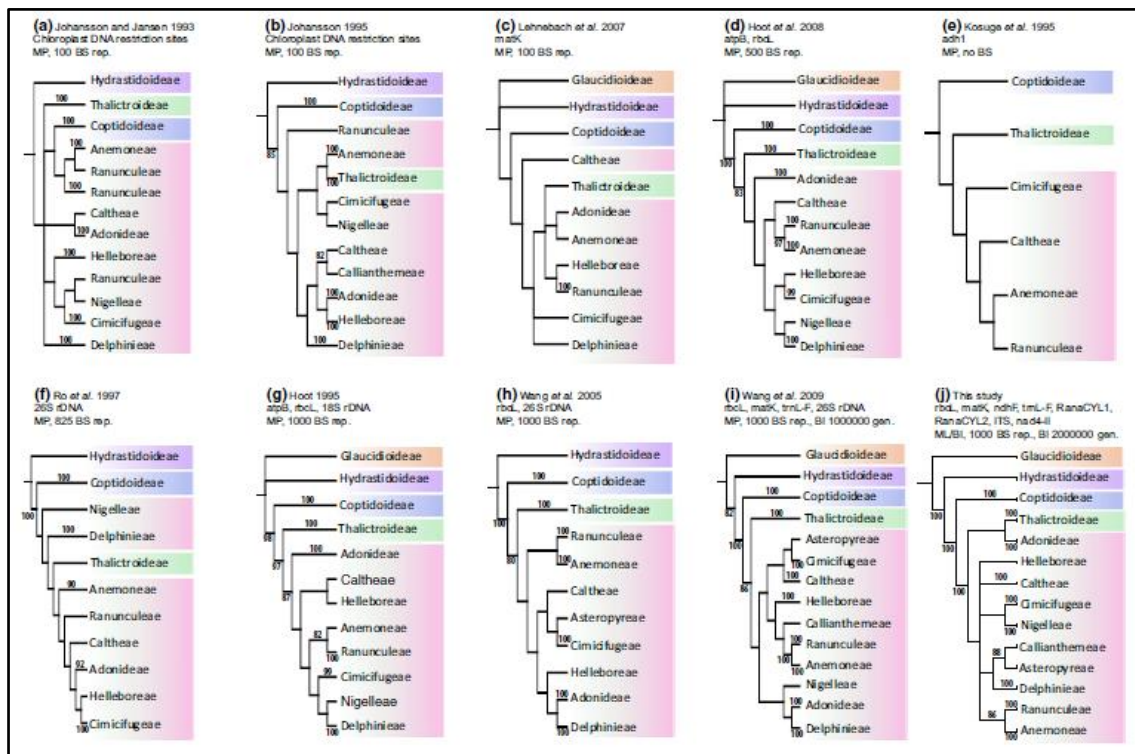
Los resultados aportados por Cossard *et al.* (2016) confirman que 4 de las 5 subfamilias propuestas por Wang *et al.* (2009) son monofiléticas, excepto Ranunculoideae. Así, sugieren que la subfamilia Ranunculoideae es parafilética y que debe de incluir a la subfamilia Thalictroideae con la categoría taxonómica de tribu.

La subfamilia Ranunculoideae se divide en 10 tribus monofiléticas, las cuales debieron de diferenciarse en un corto periodo de tiempo dada la corta longitud de las ramas interiores, confirmadas por Cossard *et al.* (2016): Adonideae, Helleboreae,





Calthaeae, Cimicifugeae, Nigelleae, Callianthemaeae, Asteropyreae, Delphinieae, Ranunculeae y Anemoneae. La tribu Delphinieae es un grupo monofilético el cual aparece como el clado hermano de Asteropyreae y Callianthemaeae en la última clasificación filogenética propuesta por Cossard *et al.* (2016). Por otro lado, la tribu Nigelleae ha variado de posición en diferentes estudios; así Hoot *et al.* (2008) y Wang *et al.* (2009) la consideran como un grupo relativamente próximo a Delphinieae mientras que para Johansson & Jansen (1993) y Johansson (1995) es el grupo hermano de Cimicifugeae.



**Figura 3.** Hipótesis filogenéticas para Ranunculaceae. **a-d.** Árboles filogenéticos basados en DNA cloroplástico. **e-f.** Árboles filogenéticos basados en DNA nuclear. **g-i.** Árboles filogenéticos basados en una combinación de DNA cloroplástico y nuclear. **j.** Hipótesis filogenéticas propuestas por Cossard *et al.* (2016). La clasificación de las subfamilias y tribus está basada en Wang *et al.* (2009). *MP* máxima parsimonia, *BS* confianza del análisis Bootstrap, *rep* número de réplicas en el análisis Bootstrap. (Cossard *et al.*, 2016).



### 3. TRIBU DELPHINIEAE

La tribu Delphinieae consta de 650-700 especies (Tamura, 1993), las cuales corresponden aproximadamente al 25% de todas las especies de la familia Ranunculaceae, siendo así la tribu más rica. Su centro de origen se encuentra en el suroeste de China y en el este de la Cordillera del Himalaya, donde existe una mayor diversidad de especies. Su distribución es principalmente holártica y se distribuye desde Eurasia (Cuenca Mediterránea, Corea, Japón y Siberia) hasta Norte América llegando unas pocas especies a los trópicos, en particular al sur de India (Billore & Singh, 1972) y a las montañas de la región centro-oeste y centro-este del continente africano (Milne-Redhead & Turrill, 1952).

La edad de divergencia estimada para Delphinieae ocurrió hace 32.3-31.4 Ma durante la edad Rupeliense (Oligoceno inferior), edad que duró desde 33.9 a 28.1 Ma (Xiang *et al.*, 2017). En un marco temporal relativamente corto de aproximadamente 5 Ma (32.3-27.24 Ma), Delphinieae experimentó una rápida diversificación (Jabbour & Renner, 2012a).

Dentro de Delphinieae se aceptan 4 géneros, después de reconocer el género *Staphisagria* J. Hill (Jabbour & Renner, 2011a), la inclusión del género *Aconitella* Spach dentro del género *Consolida* (DC.) S.F. Gray y este a su vez dentro del género *Delphinium* (Luo, 2003; Jabbour & Renner, 2011b; Jabbour & Renner, 2012a) y el incremento en la categoría taxonómica de *Aconitum* subgénero *Gymnaconitum* a la de género *Gymnaconitum* (Stapf) Wei Wang & Z.D. Chen basado en evidencias morfológicas, cariológicas y moleculares (Wang *et al.*, 2013). Así, *Staphisagria* comprende 3 especies (*Staphisagria macrosperma* Spach, *S. picta* (Willd.) F. Jabbour y *Staphisagria requienii* (DC.) Spach) cuya área de distribución es la cuenca mediterránea (Orellana *et al.*, 2009a; Orellana *et al.*, 2009b); *Aconitum* consta aproximadamente de 300 especies; *Gymnaconitum* cuenta solo con una especie endémica de la meseta Tibetana, *Gymnaconitum gymnandrum* (Maxim.) Wei Wang & Z.D. Chen, y el grupo ampliamente definido como *Delphinium* tiene aproximadamente 400 especies. Las diferencias morfológicas más relevantes entre los 4 géneros se presentan en la Tabla 1.



**Tabla 1.** Comparación morfológica de *Gymnaconitum*, *Aconitum*, *Staphisagria* y *Delphinium* (Wang *et al.*, 2013).

Carácter	<i>Gymnaconitum</i>	<i>Aconitum</i>	<i>Staphisagria</i>	<i>Delphinium</i>
Hábitat	Anual o bianual	Perenne o pseudo-anual	Anual o bianual	Anual o perenne
Sépalos	Con garras, sin espolón	Sin garras, sin espolón	Sin garras, con espolón	Sin garras, con espolón
Pétalos	Con pedicelo, con labio grande y flabelado	Con pedicelo, labio no flabelado	Unguiculado, labio no flabelado	Sésil, labio no flabelado
Estaminodios	Ausentes	Ausentes	Presentes	Presentes
Estigma	Expuesto	No expuesto	No expuesto	No expuesto
Número de carpelos	6-13	3 (6-8) o 3-5 (< 9)	3	3 (4-10) o 1
Forma de la semilla	Subglobosa	Subpiramidal	Sectorial-esferoidal	Subpiramidal a subglobosa
Tamaño de la semilla	1.5 mm	1.5-3.5 mm	> 3.0 mm	1.0-3.5 mm
Superficie de la semilla	Lamelada	Lamelada o alada	Reticulada	Lamelada o alada
Células epidérmicas de la semilla	Circular	Rectangular	Digitiforme	Rectangular

### 3.1. Caracteres generales

#### 3.1.1. Formas biológicas

La forma biológica ancestral de Delphinieae aún se desconoce, pero hay una probabilidad del 51% de que la especie fuera anual facultativa o bianual, 24% anual, 17% pseudo-anual y 8% perenne. Cuando las especies pseudo-anales fueron reclasificadas como perennes, los resultados de la inferencia arrojaron una probabilidad de 46% para las formas anuales facultativas/bianuales, 22% para las formas estrictamente anuales y 32% para las formas perennes (Jabbour & Renner, 2012a).

En la actualidad, una amplia diversidad de formas biológicas se pueden encontrar dentro de la tribu Delphinieae. Así, consta de formas anuales, anuales facultativas o bianuales, pseudo-anales y perennes (Pawlowski, 1993; Tamura, 1995).

La mayor parte de las especies de Delphinieae son plantas herbáceas perennes. Así, todo el género *Aconitum* (Wang *et al.*, 2013), y la mayor parte del género *Delphinium* (subgéneros *Delphinastrum* (DC.) Peterm. y *Oligophyllon* Dimitrova) corresponden a esta forma biológica. Por otro lado, el género *Gymnaconitum*, el género *Staphisagria*, los subgrupos *Consolida* y *Aconitella* y el resto de las especies del género



*Delphinium* incluidas en el subgénero *Anthriscifolium* (W.T.Wang) Wei Wang y el subgénero *Delphinium*, a excepción de una especie perenne (*D. balansae* Boiss. & Reut.), son bianuales o anuales.

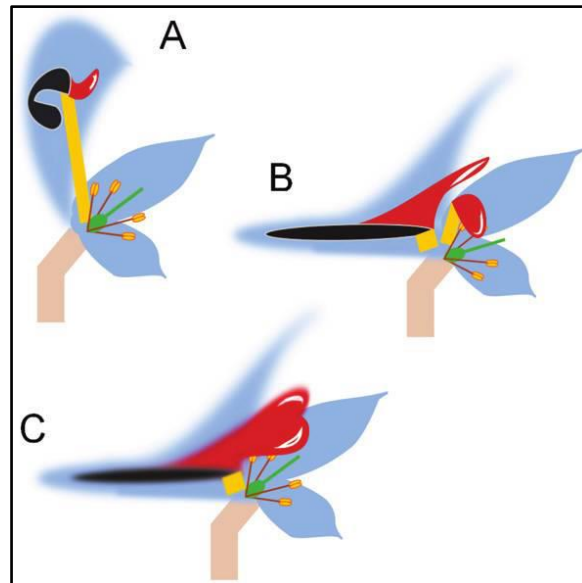
### 3.1.2. Morfología floral

#### *La flor*

La adquisición de novedades morfológicas tales como la simetría bilateral o zigomórfica y la presencia de espolones nectaríferos, las cuales evolucionaron conjuntamente, representan innovaciones claves en las flores de las especies de la tribu Delphinieae debido fundamentalmente a dos motivos: (1) ninguna de las especies de la tribu Delphinieae ha regresado a la simetría actinomorfa (Endress, 2001) y (2) experimentaron una rápida diversificación (Jabbour & Renner, 2012b).

El resto de los grupos de la familia Ranunculaceae tienen flores actinomorfas y ausencia de espolones, excepto en el caso del género *Aquilegia* L. En este sentido, cabe destacar que la transición a la zigomorfía ocurrió una sola vez en las Ranunculáceas, posiblemente en el ancestro de Delphinieae. Por otro lado, los pétalos superiores nectaríferos en forma de espolón, paralelos el uno al otro y que pueden estar fusionados o libres, también se encuentran en otros géneros incluidos en la familia Ranunculaceae con flores actinomorfas (*Aquilegia* o *Myosurus* L.), aunque no son demasiado frecuentes en las angiospermas.

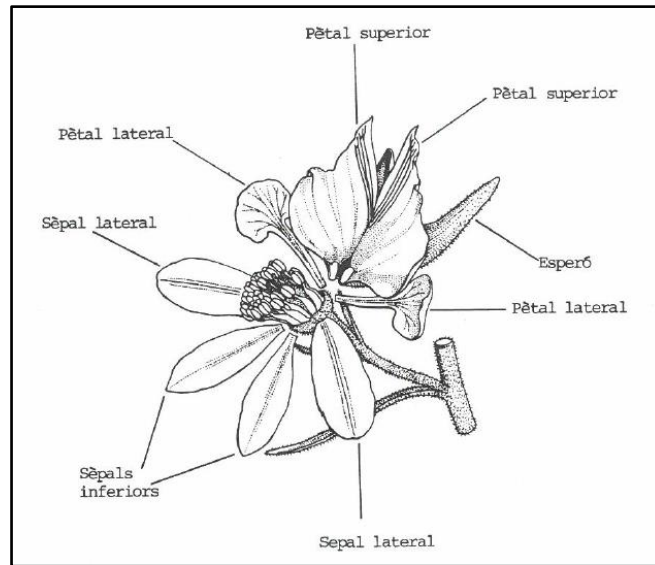
El perianto de Delphinieae consta de 2 verticilos similares en color y consistencia, dando a la flor un aspecto general petaloideo. El verticilo externo consta de 5 piezas florales: 2 sépalos ventrales, 2 sépalos laterales y un sépalo dorsal en forma de casco (*Aconitum*) (Figura 4A), en forma de espolón (*Delphinium*) o con el espolón más reducido (*Staphisagria*) (Figura 4B) o en forma de espolón con las piezas florales del verticilo interior fusionadas (*Consolida*) (Figura 4C) cuya función es la de proteger a los nectarios de la lluvia o de la sequía, bien para evitar que el néctar se diluya o se evapore. Por otro lado, el verticilo interior está formado por 1, 2 o 4 piezas florales, que corresponden a *Consolida*, *Aconitum* y *Delphinium* respectivamente, situadas en la parte dorsal de la flor. Una o dos piezas florales de este verticilo interno, situadas en la posición más dorsal de la flor, se convierten en estructuras nectaríferas incluidas dentro del sépalo superior.



**Figura 4.** Secciones longitudinales de los 3 tipos de organización del perianto en la tribu Delphinieae. **A.** tipo casco (*Aconitum*). **B.** tipo espolón (*Delphinium* y *Staphisagria*). **C.** tipo espolón con las piezas florales de la envuelta floral interna fusionadas (*Consolida*). Las piezas florales de la envuelta externa se muestran en azul. La uña, el limbo y el espolón nectarífero se muestran en amarillo, rojo y negro, respectivamente. El gineceo se indica en verde rodeado de 4 estambres (el número de estambres y ovarios no indica el número real). En **B** y **C**, parte del androceo está oculto debajo de los pétalos laterales de la envuelta interior. (Jabbour & Renner, 2012b).

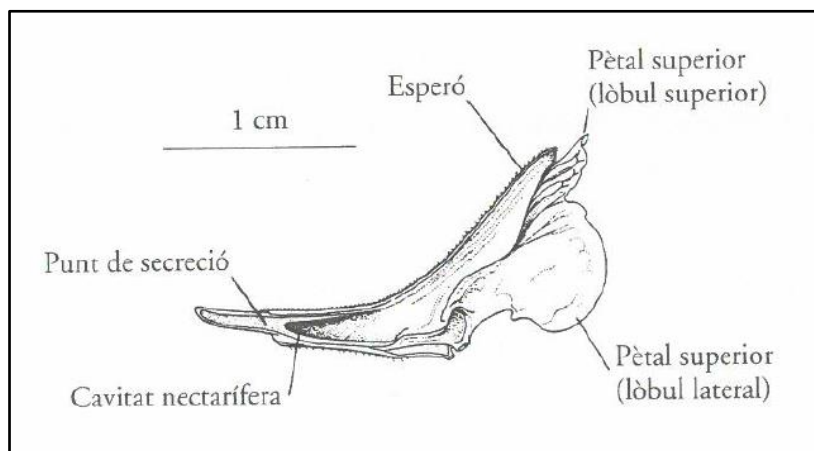
En la figura 5 se muestra en detalle la estructura floral del género *Delphinium*, el único género de la tribu que presenta 2 pétalos laterales, los cuales son buenos indicadores taxonómicos debido a la amplia variedad de formas y tamaños que exhiben (Blanché & Molero, 1986; Blanché, 1991). Su función parece ser la de servir de superficie de aterrizaje a los insectos (Laverty, 1980), aunque pueden tener otras funciones tales como cubrir los órganos sexuales, proteger a los nectarios de la lluvia y la sequía o facilitar la maduración del polen (Malyutin, 1969).

En las especies perennes, los pétalos laterales presentan una pilosidad blanquecina que les confiere una mayor vistosidad para atraer a los posibles polinizadores, pudiendo actuar también como guías de néctar para indicar la posición del néctar y el polen. Las especies anuales pierden la pilosidad pero desarrollan una amplia gama de formas, tamaños y disposiciones.



**Figura 5.** Estructura floral de una flor de *Delphinium*. (Blanché, 1991)

Los pétalos superiores (2) están incluidos dentro del sépalo superior (espolón), y son cónicos en el extremo distal por donde secretan abundante néctar (Figura 6). El nectario, propiamente dicho, se sitúa en una región más proximal, más vascularizada, que actúa como reservorio de néctar. La parte proximal del pétalo superior sobresale hacia afuera de la flor formando un lóbulo superior y un lóbulo lateral en cada pieza floral (Figura 6). En el lóbulo superior hay líneas marcadas que actúan como guías de néctar. Los lóbulos laterales están bien desarrollados en el subgénero *Delphinium*, y asumirían la función de la pilosidad en las especies perennes, actuando como guías nectaríferas.



**Figura 6.** Sección longitudinal de una flor de *Delphinium halteratum* subsp. *verdunense* (Balb.) Graebn. & P. Graebn para ver en detalle el pétalo superior (Blanché, 1991).

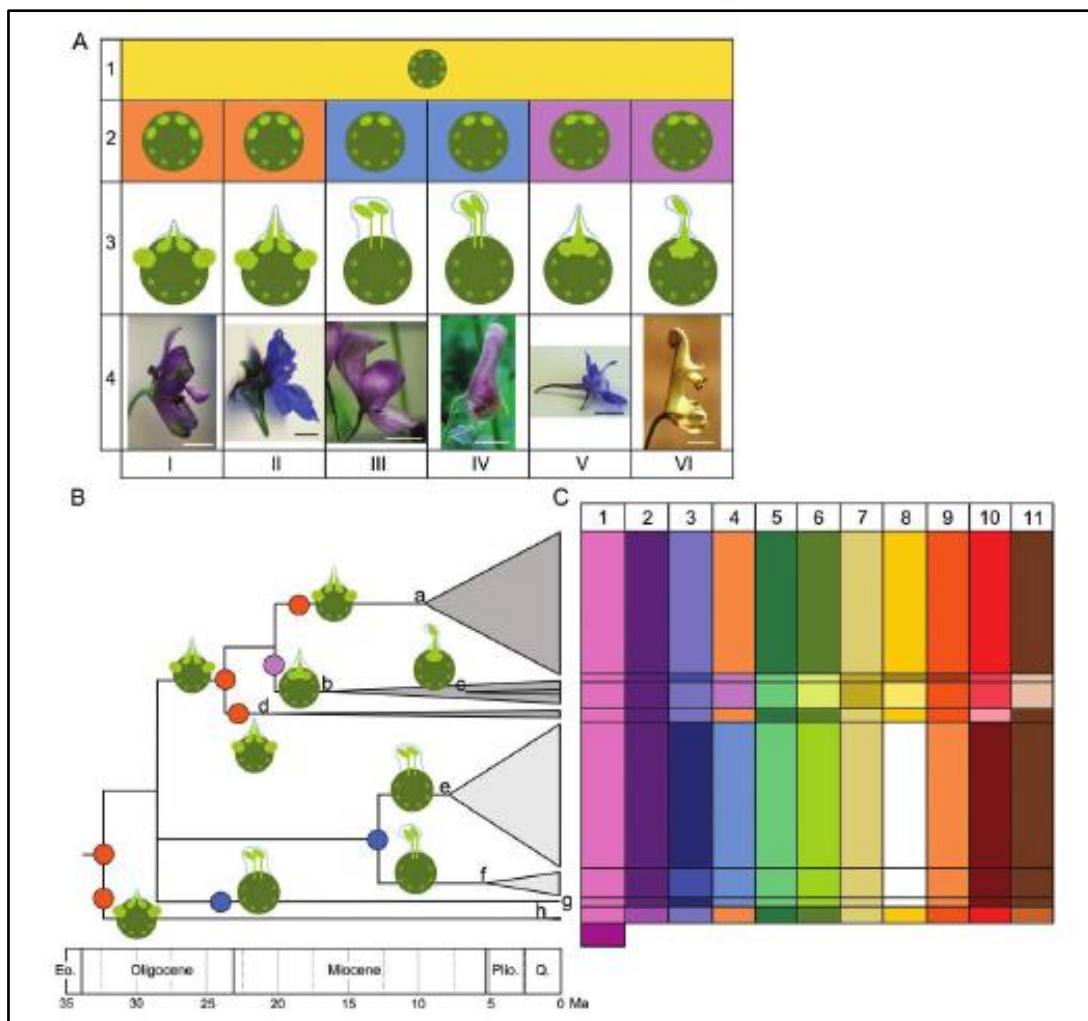


### *Evolución del perianto*

El inicio del desarrollo de los órganos florales, cuya disposición es helicoidal, sucede en el primer cuarto del proceso (Jabbour *et al.*, 2009). Aunque el tiempo que transcurre en la iniciación de sépalos, pétalos y estambres es el mismo, la velocidad de crecimiento durante esta fase de inicio es diferente, siendo el inicio de los pétalos más rápido que el de los sépalos y el de los estambres más rápido que el de los pétalos. Así, los primordios de los estambres se diferencian en las partes del estambre (filamento y antera) antes que los primordios de los pétalos que sufren un retraso en su desarrollo (Jabbour & Renner, 2012b). En este sentido, el desarrollo de los espolones nectaríferos es anterior al desarrollo del espolón (sépalos dorsal). La presencia de dos espolones nectaríferos libres y paralelos entre sí es un fenómeno evolutivo apenas sin precedentes dentro del grupo de las angiospermas, solamente encontrado en el género *Diascia* Link & Otto (Scrophulariaceae) (Vogel, 1984). De esta forma, la adquisición de la zigomorfía, la cual es imperfecta debido a la disposición en espiral de los primordios de los pétalos en la fase inicial del desarrollo floral, ocurre durante las fases tardías de la organogénesis mediante el crecimiento unidireccional de los pétalos debido a la expresión de los genes homólogos de *Cycloidea* (Jabbour *et al.*, 2014). Así, los pétalos abaxiales se reducen mientras que los pétalos adaxiales crecen desarrollándose estructuras petaloideas. Este hecho sucede en aquellas familias donde predominan las flores actinomorfas como en el caso de las Ranunculáceas (Endress, 1999).

En la figura 7A-7C se muestran los 6 tipos de organización del perianto y las secuencias en el desarrollo floral de Delphinieae. Asimismo, un total de 11 caracteres, 9 relacionados con el perianto, uno con los estambres y otro con los carpelos fueron estudiados por Jabbour & Renner (2012b). Como se puede observar, todas las flores de Delphinieae son zigomórficas (Figura 7A-7C, caracter 1), siendo la zigomorfía menos pronunciada en *Staphisagria* (Figura 7A-7C, caracter 2). El sépalos dorsal se diferencia en 3 formas: (1) casco más o menos hemisférico en *Aconitum* subgénero *Aconitum* y en *Gymnaconitum gymnantrum*; (2) casco cónico-cilíndrico en *Aconitum* subgénero *Lycocotnum* (DC.) Peterm., y en el subgrupo *Aconitella* incluido en el género *Delphinium* y, (3) la forma de espolón en el género *Staphisagria*, en los subgéneros *Delphinastrum*, *Oligophyllon* y *Delphinium* del género *Delphinium* y en el subgrupo *Consolida* incluido en el género *Delphinium* (Figura 7A-7C, caracter 3). La reducción de 4 primordios del verticilo interior del perianto a 2 en diferentes fases del desarrollo

floral evolucionó dos veces en *Aconitum* y *Gymnaconitum* y en los subgrupos *Consolida* y *Aconitella*, aunque en estos dos últimos casos los dos primordios del verticilo interior se fusionan (Figura 7A-7C, caracteres 4, 5, 6 y 7). El número de lóbulos en el conjunto de los órganos del verticilo interior del perianto se dividen en 3 (*Aconitum* y *Gymnaconitum*), 4 (*Delphinium* subgrupo *Consolida*) y 5 (*D.* subgrupo *Aconitella*) (Figura 7A-7C, caracter 8). En cuanto a la forma de los órganos nectaríferos, la mayoría presentan el limbo largo y la uña corta, excepto en *Aconitum* y *Gymnaconitum* que es al contrario. El subgrupo *Aconitella* es el único caso en donde ambos fenotipos pueden ocurrir (Figura 7A-7C, caracter 9). El número de estambres es mayor en *Aconitum*, *Gymnaconitum* y en las formas perennes de *Delphinium* (subgéneros *Delphinastrum* y *Oligophyllon*) que en las formas anuales como *D.* subgénero *Delphinium* o *D.* subgrupos *Consolida* y *Aconitella* (Figura 7A-7C, caracter 10). Finalmente, el número de carpelos, en general, es 3 o más, excepto en *D.* subgrupo *Consolida* que únicamente posee 1 carpelo (Figura 7A-7C, caracter 11).







**Figura 7. A.** Esquema de los seis tipos (I-VI) de organización del perianto en Delphinieae y 3 fases diferentes de sus respectivos estados de desarrollo. El desarrollo de los primordios del verticilo interior (verde claro) se muestra sobre el meristemo floral (disco verde oscuro). La línea azul representa la forma del sépalo superior en la flor adulta. Tipo I: *Staphisagria*; tipo II: *Delphinium*; tipo III: *Aconitum* subg. *Aconitum* y *Gymnaconitum*; tipo IV: *Aconitum* subg. *Lycocotnum*; tipo V: *Delphinium* subgrupo *Consolida*; tipo VI: especies consideradas anteriormente como *Aconitella*, incluidas primeramente en *Consolida* y posteriormente en el género *Delphinium*. Las especies corresponden, de izquierda a derecha, a: *Staphisagria macrosperma*, *Delphinium grandiflorum* L., *Aconitum napellus* L., *Aconitum lycocotnum* subsp. *moldavicum* (Hacq.) Jalas, *D. ajacis* L. y *D. anthoroideum* Boiss. Barra de escala: 4-I a 4-V, 1 cm; 4-VI, 4 mm. **B.** Tipos de perianto en Delphinieae y se muestra la reconstrucción más parsimoniosa de los cambios que suceden en la segunda fase de desarrollo del verticilo interior. La filogenia y la datación del reloj molecular se obtienen de Jabbour & Renner (2012a). a. *Delphinium* subg. *Delphinastrum* y *Oligophyllum*; b. *Consolida*; c. *Aconitella*; d. *Delphinium* subg. *Delphinium*; e. *Aconitum* subg. *Aconitum*; f. *Aconitum* subg. *Lycocotnum*; g. *Aconitum* subg. *Gymnaconitum* = *Gymnaconitum gymnantrum*; h. *Staphisagria*. **C.** Matriz con los diferentes caracteres estudiados y sus estados relativos: 1. Simetría floral: actinomorfa (rosa oscuro), zigomorfa (rosa claro); 2. Grado de zigomorfa: fuerte (morado oscuro), leve (morado claro); 3. Forma del sépalo superior: casco más o menos hemisférico (azul oscuro), casco cónico o cilíndrico, sacciforme (azul), espolón (azul claro); 4. Categoría del perianto, en relación con el verticilo interior, en la segunda fase del desarrollo: 4 órganos desarrollados (naranja), 2 órganos desarrollados (azul), 2 órganos desarrollados fusionados (morado); 5. Número de primordios del verticilo interior en desarrollo: 4 (verde oscuro), 2 (verde claro); 6. Número de órganos del verticilo interior en el estado adulto: 4 (verde oscuro), 2 (verde), 1 (verde claro); 7. Fusión de los dos órganos dorsales del verticilo interior: sí (beige oscuro), no (beige claro); 8. Número de lóbulos, claramente visibles desde el exterior de la flor, en el conjunto de órganos del verticilo interior: 5 (marrón), 4 (amarillo), 3 (amarillo claro); 9. Forma de los órganos nectaríferos: uña corta y limbo largo (naranja oscuro), uña larga y limbo corto (naranja claro), grupo en el cual ocurren ambos fenotipos (marrón); 10. Número medio de estambres: aproximadamente 15 (rojo muy claro), 15-25 (rojo claro), 20-40 (rojo), 25-50 (rojo oscuro); 11. Número de carpelos: 3 o más (marrón oscuro), 3 (marrón) y uno (marrón claro). (Jabbour & Renner, 2012b).

### ***La inflorescencia***

A diferencia de la mayor parte de los géneros de la familia Ranunculaceae, los cuales presentan inflorescencias determinadas o definidas (Tamura, 1995), en la tribu Delphinieae (y también en la tribu Cimicifugeae) el tipo de crecimiento de la inflorescencia es ilimitado o indeterminado (Takhtajan, 1991), siendo el racimo con un eje principal bien marcado en las especies perennes y la panícula en las especies anuales los tipos de inflorescencias más frecuentes. Este tipo de crecimiento se considera filogenéticamente más evolucionado con respecto al anterior debido a las siguientes ventajas adaptativas señaladas por Stebbins (1974) y Weberling (1989):



1. La producción de un menor número de flores por unidad de tiempo favorece la colonización de hábitats más secos en donde los recursos son constantes pero limitados y en determinadas temporadas la cantidad de precipitación suele ser escasa.
2. La mayoría de las especies de Delphinieae son polinizadas por abejorros (género *Bombus* Latreille). Con el fin de reducir las probabilidades de autogamia, las flores eclosionan de forma progresiva en una secuencia lenta para evitar que haya demasiadas flores abiertas al mismo tiempo.
3. Así, el periodo de floración se alarga en el tiempo, especialmente en las especies anuales, aumentando las probabilidades de cruzamiento entre los diferentes individuos al estar las flores más tiempo expuestas a los potenciales polinizadores.
4. El tamaño de la inflorescencia y el número de flores que produce depende de y estará condicionado por la disponibilidad de recursos y por los factores ambientales.

### ***Recompensas florales***

#### ***Polen***

El polen porta el gameto masculino por lo que juega un papel fundamental en el mecanismo de reproducción sexual, pero también constituye una fuente proteica y de energía para algunos insectos (Harborne, 1982).

El polen de la tribu Delphinieae es bastante similar en cuanto a forma y tamaño: es tricolpado, isopolar, de simetría radial, con contorno triangular o redondeado en sección ecuatorial y elipsoidal en sección polar.

En general, el número de estambres así como el número de granos de polen por antera es alto. La mayor producción de polen por antera fue registrada en las especies del género *Aconitum*, seguido de los subgéneros *Delphinastrum* y *Oligophyllum* del género *Delphinium* (formas perennes), del género *Staphisagria*, de *Delphinium* subgénero *Delphinium* (formas anuales) y finalmente del subgrupo *Consolida* (Bosch *et al.*, 2001). Así, *Aconitum* es el género más primitivo, si se asume la tendencia, al menos en las especies de la cuenca Mediterránea occidental estudiadas por Bosch (1999), de



una reducción en el número de estambres, y por lo tanto en la producción polínica total por flor. En consecuencia, se reducen las probabilidades de contacto entre estambre-estigma, reduciendo así las probabilidades de autogamia y geitonogamia aunque también se reduce la cantidad de polen ofertada a los polinizadores como recompensa.

### *Néctar*

El néctar es la principal recompensa que ofrecen las flores a los polinizadores y se produce en unas glándulas especializadas denominadas nectarios, los cuales secretan esta solución azucarada compuesta principalmente por azúcares, monosacáridos (glucosa y fructosa) y disacáridos (sacarosa), así como otros componentes en menor cantidad (otros glúcidos, aminoácidos, lípidos, enzimas...) (Kearns & Inouye, 1993).

Las especies de la tribu Delphinieae estudiadas por Bosch (1999) producen una gran cantidad de néctar. Hay una gran diferencia entre el volumen de néctar producido al final de la floración entre las especies perennes (5.6-17.9  $\mu$ l) y las especies anuales (1.0-3.7  $\mu$ l). Las especies de *Consolida* producen un volumen de néctar similar a las especies anuales del subgénero *Delphinium*. Las especies del género *Staphisagria*, a pesar de tener el espolón más corto, secretan más néctar (3.4-3.7  $\mu$ l) que las especies anuales del subgénero *Delphinium*.

La concentración de azúcares en el néctar para los taxa estudiados por Bosch (1999), medido en condiciones de invernadero (mismo valor obtenido en campo), se encuentra entre el 40-60%, un porcentaje elevado y similar entre las especies perennes y anuales. Sin embargo, los taxa con un volumen de néctar mayor también lo tienen más diluido y viceversa.

La transformación de piezas florales en estructuras especializadas (nectarios) y la elevada producción de néctar con un alto porcentaje de azúcares, nos indican que las especies de la tribu Delphinieae son muy nectaríferas, siendo el néctar la recompensa principal para los potenciales polinizadores.

### **3.1.3. Biología de la polinización**

Uno de los tipos de polinización más frecuentes en las flores hermafroditas es la polinización entomófila. En el caso de las especies que comprenden la tribu



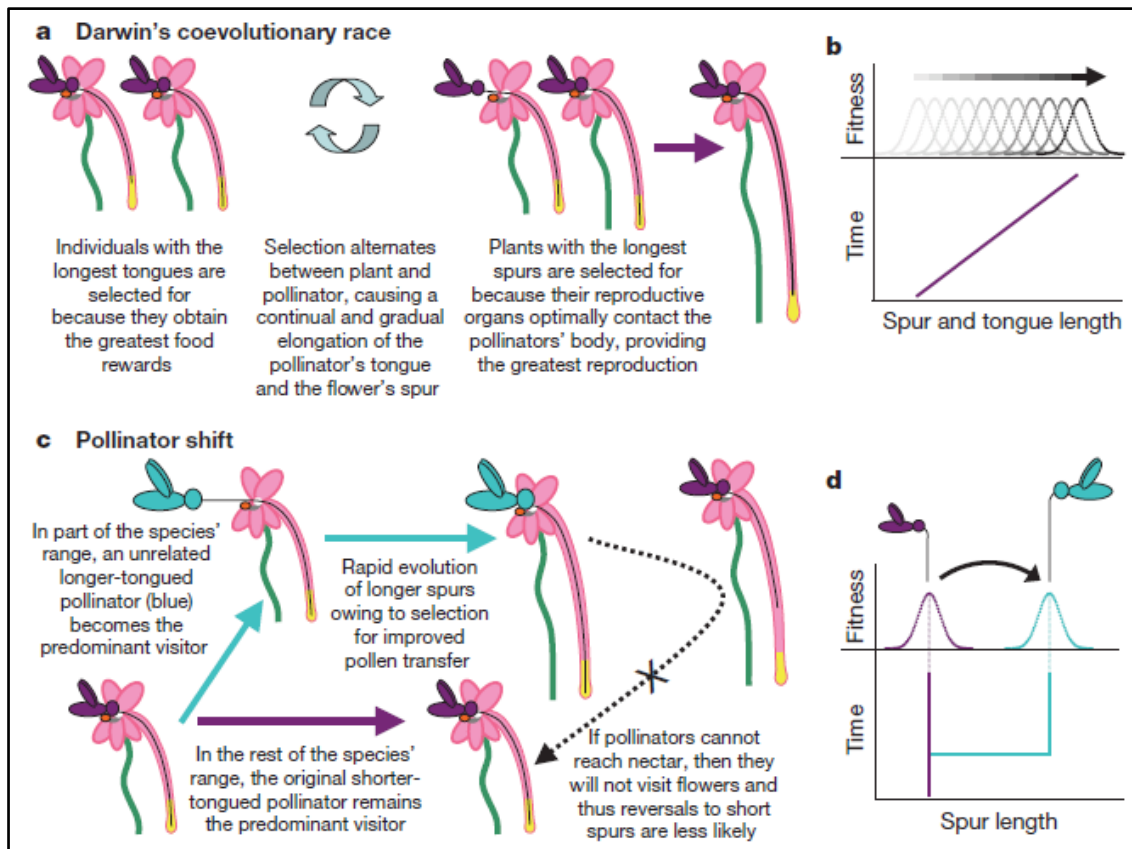
Delphinieae, la mayoría son polinizadas principalmente por abejorros (Jabbour & Renner, 2012b). Algunas características florales de Delphinieae están asociadas con la polinización entomófila y apuntan concretamente al denominado “síndrome de polinización por abejorros” (Faegri & Van der Pijl, 1979), como posteriormente confirmaron Müller (1883) y Jabbour & Renner (2012b). Estas características florales son: colores vistosos (amarillos o azules), numerosos estambres, producción de cantidades elevadas de néctar en estructuras especializadas (nectarios), los cuales se encuentran ocultos con el fin de forzar a los insectos a realizar ciertos movimientos, guías de néctar, mecanismos que dificultan o evitan la autogamia como la separación temporal en los órganos de reproducción (dicogamia), madurando en este caso los estambres antes que el pistilo (proterandria) y la separación espacial entre los estambres y el pistilo (herkogamia), resistencia mecánica para la apertura de la corola y pétalos laterales cuya función parece ser la de servir de estructuras de aterrizaje a los insectos (Lavery, 1980).

La adquisición de la simetría zigomórfica y el desarrollo de los pétalos superiores en espolones nectaríferos supusieron novedades adaptativas consideradas como innovaciones clave para la tribu Delphinieae, y evolucionaron conjuntamente con aquellos polinizadores los cuales fueron capaces de adaptarse a estas nuevas formas florales (Pellmyr, 1984). Este fenómeno, conocido como coevolución (Macior, 1974; Faegri & Van der Pijl, 1979; Kevan & Baker, 1983), tiene como finalidad, por un lado, optimizar al máximo los procesos de recolección de polen y néctar por parte de los polinizadores, y por otro lado, desde el punto de vista de la planta, asegurar la reproducción alogámica y fecundación cruzada entre individuos diferentes. De acuerdo con esto, se sugiere una teoría evolutiva que ocurre en las flores de Delphinieae y comúnmente en las angiospermas (Renner, 2006), la cual expone que uno de los dos espolones nectaríferos contiene una menor cantidad de néctar debido a que el polinizador una vez que visita la flor va a explorar ambos para conseguir una mayor cantidad de alimento, lo que supone un ahorro de energía para la planta ya que la producción de néctar tiene un coste energético elevado.

En este sentido, cabe destacar la relación coevolutiva que existe entre la longitud del espolón nectarífero de la planta y la longitud de la probóscide del animal, explicadas a través de dos hipótesis evolutivas que muestran dos patrones de evolución diferentes:



1. La primera hipótesis evolutiva propuesta por Darwin (1862) y posteriormente elaborada por Wallace (1867) manifiesta que tanto los espolones nectaríferos como la probóscide del animal se encuentran involucrados en una “carrera” coevolutiva. Estos autores sugieren que en una población dada, las plantas que tengan una mayor longitud del espolón tienen una ventaja selectiva respecto a otras con menor longitud porque sus órganos reproductores entran en contacto con el cuerpo del polinizador, y de esta manera logran una mejor eficiencia reproductora. Así, los polinizadores con una longitud mayor en la probóscide son capaces de obtener una mayor cantidad de néctar (Figura 8a). Ambos caracteres coevolucionan gradualmente en función de los cambios en los picos adaptativos y en las tendencias evolutivas (Figura 8b).
2. Whittall & Hodges (2007) propusieron la hipótesis del “desplazamiento del polinizador”, siendo corroborado por Ennos (2008). En ambos trabajos se seleccionó como modelo de estudio el género *Aquilegia*, cuyas flores tienen diferentes longitudes en el espolón (corta, media y larga) de acuerdo con las diferentes probóscides de sus polinizadores (abejas, colibríes y esfíngidos), respectivamente. En el caso de Delphinieae, el patrón de equivalencia es similar pero con solo dos posibles desplazamientos de los polinizadores: de abejas a colibríes en Norte América y de abejas a esfíngidos en África, Europa y Asia. La hipótesis se desarrolla en un escenario nuevo para la planta debido a la colonización de un nuevo hábitat o a cambios producidos en la abundancia de los polinizadores. Así, un posible cambio en los vectores de polinización (abejas por colibríes) hace que la longitud del espolón deba adecuarse a la longitud de la probóscide (Figura 8c). El modelo es unidireccional, es decir, el aumento en la longitud del espolón impide que pueda ser polinizada por abejas ya que no pueden acceder al néctar e impide que se seleccione nuevamente la longitud corta del espolón. La hipótesis predice que la longitud del espolón evolucionará a través del tiempo en función de la longitud de la probóscide del polinizador (hasta una longitud máxima que corresponde al tamaño del cuerpo del polinizador para no comprometer la estabilidad durante el vuelo), en picos adaptativos relativamente estables (Figura 8d) que conducen al aislamiento reproductivo y posteriormente a una nueva especie.



**Figura 8.** Dos hipótesis diferentes para explicar la evolución de espolones nectaríferos excepcionalmente largos. El modelo de “carrera” coevolutiva de Darwin (a, b), el cual plantea un aumento gradual tanto en la probóscide del polinizador como en el espolón nectarífero de la planta, y el modelo del desplazamiento del polinizador (c, d), donde la longitud del espolón evoluciona debido a un cambio de polinizador con una probóscide más larga. Estos modelos difieren en si los picos adaptativos aumentan constantemente (b), o si se fijan relativamente a un óptimo basado en la longitud de la probóscide del hipotético polinizador (d). Ambos modelos también se diferencian en si la longitud del espolón ocurre gradualmente (b) o de manera puntual (d). (Whittall & Hodges, 2007).

### 3.1.4. Reproducción

#### *Frutos*

En general, el tipo de fruto en Delphinieae es el folículo. Cuando este madura, pierde agua y se abre a través de una sutura ventral. Al menos las especies distribuidas en el occidente de la cuenca Mediterránea presentan un mecanismo de postcarpotropismo ya señalado por Bosch (1999). Al inicio, cuando el ovario acaba de ser fecundado, el ángulo que forman los folículos es de 45° (Figura 9A). Posteriormente, cuando las piezas florales se caen, los frutos realizan un movimiento ascendente para disponerse en paralelo con respecto a la inflorescencia y en vertical con respecto al

suelo (Figura 9B). En caso de que la inflorescencia sea torcida o doblada debido al paso de algún animal o al efecto de algún factor ambiental (lluvia, viento, etc...), los frutos modifican su posición para mantenerse siempre verticales con respecto al suelo.



**Figura 9.** A. Folículos dispuestos formando un ángulo de aproximadamente 45°. B. Folículos dispuestos en paralelo con respecto a la inflorescencia y en vertical con respecto al suelo.

### *Morfología de las semillas*

Una amplia variedad morfológica de semillas se encuentra dentro de la tribu Delphinieae (Malyutin, 1987; Trifonova, 1990; Bosch, 1999). Las semillas del género *Aconitum*, el grupo más primitivo, son subpiramidales con alas longitudinales más o menos desarrolladas. Su tendencia evolutiva es hacia formas subcónicas de sección circular, reduciendo las alas longitudinales y desarrollando anillos transversales (Cappelletti & Poldini, 1984). El género *Gymnaconitum* presenta semillas subglobosas, características de las especies anuales de Delphinieae.

Para las especies de *Delphinium* en la Península Ibérica y Baleares, Blanché (1991) clasificó las semillas en 4 tipos diferentes: subpiramidales (*Delphinium* subgrupo *Consolida* y subgénero *Delphinastrum*), acampanadas (subgénero *Oligophyllon*), subglobosas (subgéneros *Delphinium* y *Anthriscifolium*) y sectoesferoidales (subgénero *Staphisagria* reconvertido a género (Jabbour & Renner, 2011a)).



Las semillas subpiramidales son lisas y tienen unas pequeñas expansiones en forma de alas que recuerdan al carácter primitivo presente en el género *Aconitum*. Las semillas acampanadas poseen una pequeña cavidad umbilical protegida por escamas libres entre sí dispuestas helicoidalmente, estrechas y numerosas en la serie *Pentagyna* y amplias y en menor número en la serie *Fissa*. Las semillas sectoesferoidales tienen una ornamentación reticulada o rugosa, conformada por una serie de crestas y valles en la superficie del episperma. Las semillas subglobosas tienen escamas soldadas y la cavidad umbilical es más profunda que en las semillas acampanadas (Blanché, 1991; Bosch, 1999).

Desde un punto de vista evolutivo, las semillas de Delphinieae tienden a disminuir el espesor de la testa de la semilla debido a una reducción en el tamaño de las células. Por el contrario, las células epidérmicas experimentan un engrosamiento en las paredes celulares y un cambio en la disposición (de tangencial a radial). Por lo tanto, y en líneas generales, el tamaño de la semilla disminuye progresivamente pero aumenta la ornamentación del tegumento seminal o episperma (Trifonova, 1990). Como excepción a esta tendencia, cabe destacar el género *Staphisagria* en el cual ocurre lo contrario, esto es, se incrementa notablemente el tamaño de la semilla y se reduce la ornamentación del episperma (Kirolova, 1988).

### ***Mecanismos de dispersión de las semillas***

Los mecanismos de dispersión de las semillas en Delphinieae son diversos y de acuerdo con Bosch (1999) se pueden diferenciar 2 fases: una primera que corresponde con la salida de la semilla del folículo, y una segunda en la que la semilla se aleja de la planta madre.

En la primera fase, la semilla puede caer de los folículos de varias formas: mediante boleocoria debido a la agitación que produce el viento en la inflorescencia o por el paso de algún animal que entre en contacto con la misma, creando un efecto “catapulta”, lo cual puede liberar las semillas a distancias de hasta 5 metros (Blanché, 1991), y mediante el efecto de la gravedad (barocoria) en el género *Aconitum* (Kadota, 1987) y en el género *Staphisagria*.





Con respecto a la segunda fase, la semilla se aleja de la planta madre a través de los siguientes vectores o mecanismos: (1) el viento (anemocoria) dispersa más fácilmente las semillas de aquellas especies que parecen tener adaptaciones morfológicas (alas longitudinales, expansiones laminares, anillos membranosos laterales o formas subglobosas) para este tipo de dispersión, (2) el agua (hidrocoria) puede dispersar las semillas de las especies que puedan flotar en el agua, (3) los animales (zoocoria) pueden transportar las semillas que presenten expansiones laminares o escamas membranosas que permitan a las semillas adherirse al cuerpo del animal (epizoocoria), (4) un caso particular de zoocoria es en la que intervienen las hormigas en la dispersión (mirmecocoria), observado en *Delphinium nuttallianum* Pritz. ex Walp. = *D. nelsonii* (Turnbull *et al.*, 1983), y (5) la morfología de algunas semillas que presentan numerosas escamas membranosas imbricadas pueden favorecer la dispersión ya que aumentan la elasticidad de las semillas y rebotan cuando caen del folículo (efecto muelle).

### ***Germinación de las semillas***

Las tasas de germinación de las semillas para las especies del género *Aconitum* estudiadas por Bosch (1999) fueron, en general, bajas. Sin embargo, algunas especies tienen un porcentaje de germinación elevado, como por ejemplo, 98% en *A. lycoctonum* L. (Vandelook *et al.*, 2009), 90.8% en *A. sinomontanum* Nakai (Dosmann, 2002), 76.67% en *A. deinorrhizum* Stapf (Sood & Thakur, 2011), 92% en *A. heterophyllum* Wall. ex Royle (Verma *et al.*, 2009) y 70-80% en *A. napellus* subsp. *castellanum* Molero & C. Blanché (Herranz *et al.*, 2010a).

En *Delphinium*, el período de germinación en las especies perennes es más lento que en las especies anuales. El mayor porcentaje de germinación ocurre en las semillas de las especies anuales del subgénero *Delphinium* junto con el subgrupo *Consolida* del género *Delphinium* (Svensson & Wigren, 1986). El género *Staphisagria* tiene un período de germinación más largo que las especies anuales (Bosch, 1999).

*Gymnaconitum gymnandrum*, a pesar de ser una especie anual, presenta una tasa de germinación menor al 50% (Zhao *et al.*, 2008).

En líneas generales, las especies perennes que comprenden la tribu Delphinieae presentan algún nivel de dormición morfofisiológica en sus semillas, siendo en la



mayoría de los casos la estratificación en frío a 5°C el tratamiento más efectivo para romper esa dormición (Baskin & Baskin, 1998). Así, en el caso del género *Aconitum*, se ha documentado dormición morfofisiológica profunda, es decir, las semillas requieren estratificación en frío para romper la dormición y crecer sin que el ácido giberélico promueva la germinación, en *A. lycoctonum* (Vandelook *et al.*, 2009) y dormición morfofisiológica intermedia, es decir, las semillas requieren estratificación en frío para perder la dormición y que crezca el embrión, aunque puede ser sustituida por el ácido giberélico, en *A. napellus* subsp. *castellanum* (Herranz *et al.*, 2010a) y *A. heterophyllum* (Pandey *et al.*, 2000). Por otro lado, en *Delphinium* también se ha constatado dormición morfofisiológica profunda en *Delphinium tricornem* Michx. (Baskin & Baskin, 1994) así como dormición morfofisiológica intermedia en *D. fissum* subsp. *sordidum* (Cuatrec.) Amich, E. Rico & J. Sánchez (Herranz *et al.*, 2010b) y *D. bolosii* C. Blanché & Molero (Blanché *et al.*, 2014).

### 3.1.5. Reproducción vegetativa

El ciclo vital de las especies perennes consta de dos etapas: una de reposo o latencia del rizoma y otra de crecimiento vegetativo y reproductivo. En la fase de latencia, que puede durar 3 o 4 meses, únicamente el rizoma del individuo perdura permaneciendo en un estado de dormición hasta que las condiciones sean favorables para desarrollar la parte vegetativa (hojas) y la parte reproductiva (flores, frutos y semillas). Como se ha mencionado líneas arriba, la tasa de germinación de las semillas en las especies perennes es generalmente baja. Así, la reproducción vegetativa juega un papel importante en la conservación y en el aumento de las poblaciones.

Las especies del género *Aconitum* se reproducen vegetativamente a través de segmentos laterales que produce la raíz madre en el verano, es decir, raíces colaterales nuevas que se formarán cada año en detrimento de la raíz madre (Kadota, 1987; Bosch & Waser, 1999; Chung & Park, 2000). Como curiosidad, cabe destacar que *Aconitum columbianum* Nutt. tiene unos órganos adicionales de multiplicación vegetativa denominados “bulbillos” que crecen en las axilas de las hojas, se caen al suelo, crecen y dan lugar a nuevos individuos (Brink, 1980).

En *Delphinium*, la reproducción vegetativa ocurre por multiplicación o fragmentación del rizoma. Lewis & Epling (1959), Richter *et al.* (1994) y Koontz *et al.*



(2001) observaron en especies americanas, *D. gypsophilum* Ewan, *D. viridescens* Leib. y *D. luteum* A. Heller respectivamente, estos mecanismos de reproducción vegetativa. Por otro lado, se ha comprobado que *D. elatum* L. puede reproducirse a través de esquejes (Bassett & Bassett, 2007) mientras que *D. bolosii* puede generar dos individuos de la fragmentación vertical del rizoma (Bosch, 1999).

### 3.1.6. Citogenética

La mayoría de las especies de la tribu Delphinieae presentan un cariotipo asimétrico, bimodal, compuesto por un número básico de cromosomas de  $n = 8$  (Bosch *et al.*, 2016), en el que se distinguen 2 tipos de cromosomas por su tamaño: 2 pares de cromosomas largos, con trozos pequeños de ADN conectados denominados satélites, más o menos simétricos (metacéntricos o submetacéntricos), siendo el segundo par el más variable por lo que resulta un buen marcador evolutivo para la tribu (Blanché, 1991; Giménez, 1995), y 6 pares de cromosomas progresivamente más cortos y asimétricos (acrocéntricos, subacrocéntricos o telocéntricos) (Bosch, 1999; Wang *et al.*, 2013).

Algunas excepciones con respecto al número cromosómico, más o menos estable que define a la tribu, ocurren en algunas especies del género *Aconitum* como por ejemplo, *A. napellus* y *A. anthora* L. (Bosch, 1999) y *A. crassiflorum* Hand-Mazz. (Yang, 2001) las cuales son tetraploides ( $2n = 32$ ), en algunas especies perennes del género *Delphinium* como *D. montanum* DC. in Lam. & DC. que es tetraploide ( $2n = 32$ ) (Jankun, 1973; Blanché, 1991) y *D. bolosii* dispoloide ( $2n = 18$ ) (Blanché & Molero, 1983) con una población, Mura, diploide ( $2n = 16$ ) (Blanché *et al.*, 2014), en *Staphisagria macrosperma* se han observado diferentes números cromosómicos:  $2n = 16$ , diploide (Blanché 1991),  $2n = 18$ , dispoloide (Constantinidis & Kamari, 1995; Bosch, 1999) y  $2n = 32$ , tetraploide (Lewitsky, 1931), estando posiblemente relacionada la condición tetraploide con formas usadas en jardinería, en diferentes especies del género *Consolida* con casos de disploidía ascendente ( $2n = 18$ ) en *C. oliveriana* (DC.) Schrödinger (Giménez, 1995), disploidía descendente ( $2n = 14$ ) en *C. persica* (Boiss.) Schrod. (Hong, 1986) y dotaciones cromosómicas de  $2n = 24, 26$  en *C. ajacis* (L.) Schur = *D. ajacis* (Brouland *et al.*, 1976; Chen *et al.*, 2003), respectivamente, y en *Aconitella* con diferentes dotaciones cromosómicas:  $2n = 12$  en *A. hohenackeri* (Boiss.) (Giménez,



1995) y  $2n = 18$  en *A. scleroclada* (Boiss.) (Hong, 1986) y *A. sternocarpa* (M. Hossain & P.H. Davis) Soják (Giménez, 1995).

En la tribu Delphinieae, dos vías evolutivas se pueden diferenciar: (1) en las especies perennes adquiere mayor relevancia la poliploidia frente a la disploidía que ocurre en las especies anuales, y (2) en los géneros *Aconitum* y *Delphinium*, la disploidía es principalmente ascendente mientras que en los géneros *Consolida* y *Aconitella* puede ser tanto ascendente como descendente (Bosch, 1999; Bosch *et al.*, 2016).

Las dos tendencias evolutivas que sigue la tribu Delphinieae son, por un lado, aumentar la asimetría del cariotipo, y por el otro, reducir el tamaño de los cromosomas alcanzando su máxima expresión en las especies anuales (Stebbins, 1971; Trifonova, 1990; Bosch, 1999).

### 3.1.7. Propiedades toxicológicas y farmacológicas

La tribu Delphinieae se caracteriza por tener una gran riqueza en alcaloides diterpénicos y flavonoides (Lin *et al.*, 2014). Algunos alcaloides que contiene el género *Delphinium* son la grandiflorina, delfinina, geyerlina, licoctonina, elatina, nudicaulina y barbinina (Manners *et al.*, 1995; 1998). Para el género *Aconitum* se pueden citar algunos alcaloides tales como aconitina, pseudoaconitina, mesaconitina, hipaconitina, hetidina, atidina y heteratisina (Wang *et al.*, 2006). La mayoría de los alcaloides son tóxicos y en grandes dosis afectan al sistema nervioso central y al corazón (Wada *et al.*, 2005), causando importantes pérdidas económicas en el ganado de los Estados Unidos (Manners *et al.*, 1995, 1998; Ralphs *et al.*, 2002).

Ambos, alcaloides diterpénicos y flavonoides, poseen un amplio rango de actividad biológica y farmacológica por lo que ampliamente se han usado estas plantas con fines medicinales o terapéuticos, especialmente en la medicina tradicional asiática (Xiao, 1980). Algunas especies del género *Delphinium* se utilizan para tratar una serie de enfermedades o síntomas como la artritis, artralgia, mialgia, diarrea, lesiones internas, dolor de muelas, úlceras, mordeduras de serpientes y la enfermedad de Parkinson (Hao *et al.*, 2015). Diferentes especies del género *Aconitum* exhiben propiedades antiinflamatorias, analgésicas, astringentes, antipiréticas, antidiarreicas, antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, antirreumáticos, antitumorales, antiepilépticas, cardiotónicas y vermífugas (Nyirimigabo *et al.*, 2014).

## 4. GÉNERO *DELPHINIUM*

El género *Delphinium* fue denominado así por Dioscórides (según Cadevall & Sallent (1951)) debido a la semejanza de los botones florales a la silueta de un delfín (Figura 10).



**Figura 10.** Botón floral en las primeras fases de su desarrollo (A) y en su etapa final antes de la apertura floral (B).

Pertenece a la familia Ranunculaceae, subfamilia Ranunculoideae, tribu Delphinieae y comprende aproximadamente 350 especies. Además, los géneros *Consolida* y *Aconitella* (52 especies) se consideran actualmente subgrupos incluidos en el género *Delphinium* (Jabbour & Renner, 2011b). Los últimos estudios publicados (Jabbour & Renner, 2011b; 2012a; Xiang *et al.*, 2017) indican que el grupo *Delphinium* no es monofilético. Su centro de origen se encuentra en las altas montañas de los sistemas del Himalaya (Asia central), en donde hay un mayor número de especies (150) (Wang & Warnock, 2001). Desde aquí, las especies del género *Delphinium* se distribuyen principalmente por las zonas templadas y frías del hemisferio Norte de manera desigual (Malyutin, 1987; Blanché, 1991). Así, un 20% se encuentran en América del Norte, menos del 1% en África, un 26% en Europa y la cuenca Mediterránea, un 53% en Asia (9% en el norte de Asia, 21% en Asia central (Sistemas del Himalaya) y 23% en Asia oriental (China)) (Verlaque & Aboucaya, 2001).

### 4.1. Clasificación taxonómica

Diversas aportaciones históricas han contribuido a mejorar el conocimiento sobre el género *Delphinium*, compiladas en la revisión biosistemática realizada por Blanché (1991) para el género en la Península Ibérica e Islas Baleares. De todos los



esquemas taxonómicos propuestos, la clasificación realizada por Malyutin (1987), basada en los caracteres de la semilla, es la aceptada por la mayoría de los especialistas y se incluyen los siguientes subgéneros: *Staphisagria*, *Delphinium*, *Delphinastrum* y *Oligophyllon*. Cabe recordar, como ya mencionamos anteriormente, que *Staphisagria* ha sido reconocido nuevamente con la categoría taxonómica de género apoyado por evidencias morfológicas, cariológicas, fitoquímicas y filogenéticas (Jabbour & Renner, 2011a) así como la sección *Anthriscifolium*, que se incluía dentro del subgénero *Delphinium* (Wang, 1962, 1979), se reconoce actualmente como el subgénero *Anthriscifolium* apoyado por estudios morfológicos, cariológicos y filogenéticos (Xiang *et al.*, 2017).

#### 4.1.1. Subgénero *Anthriscifolium*

El subgénero *Anthriscifolium* comprende dos especies anuales: *Delphinium anthriscifolium* Hance con 3 variedades descritas (*D. anthriscifolium* var. *anthriscifolium*, *D. anthriscifolium* var. *savatieri* (Franchet) Munz y *D. anthriscifolium* var. *majus* Pampanini) y *D. callichromum* Q.L. Gan & X.W. Li. La primera especie se distribuye en la zona cálida del centro y sur de China y en el norte de Vietnam (Wang & Warnock, 2001) y la segunda en la provincia de Hubei, China (Gan & Li, 2017).

*Delphinium* subgénero *Anthriscifolium* es el linaje que primero se escinde del resto de las especies de *Delphinium* hace 22.66 Ma (Jabbour & Renner, 2012a), expandiéndose por Asia hace 20.7 (26.6-14.9) Ma.

Como se menciona anteriormente, evidencias morfológicas, cariológicas y moleculares apoyan el cambio de categoría taxonómica. Así, algunos caracteres morfológicos que difieren de la sección *Delphinium* son: la forma de la hoja (pinnaticompuesta), la forma del pétalo lateral (bífida), el folículo (ampliamente divergente), la superficie de la semilla (escumulosa con escamas dispuestas helicoidalmente en la parte superior y dispuestas concéntricamente en la parte inferior) y el tamaño de la semilla (2.0-2.5 mm) (Blanché, 1990; Vural *et al.*, 2012). En cuanto al cariotipo, se caracteriza por tener 2 pares de cromosomas largos (metacéntricos o submetacéntricos) y los otros 6 pares más cortos (acrocéntricos) (Yuan & Yang, 2008). Asimismo, diferentes estudios (Jabbour & Renner, 2012a; Wang *et al.*, 2013; Xiang *et al.*, 2017) rechazan la monofilia del subgénero *Delphinium*.



#### 4.1.2. Subgénero *Delphinium*

La sección *Delphinium* consta de 18 especies, 17 de ellas anuales y una perenne, con una morfología floral similar al resto de las especies anuales (*Delphinium balansae*), relictas de la cordillera del Atlas (Norte de África) donde crece a una altitud de 2400-2800 m. (Muntz, 1967). Este tipo de hábitat a una elevada altitud y con temperaturas bajas favoreció el establecimiento de la forma perenne a partir de la evolución de un ancestro anual. Su área de distribución principal se encuentra en la cuenca Mediterránea y en la región Irano-Turaniana llegando marginalmente a las regiones saharo-arábica y circumboreal (Blanché, 1990).

Recientemente, Xiang *et al.* (2017) incluyen un nuevo género monotípico (*Pseudodelphinium* H. Duman, Vural, Aytaç & Adıgüzel) dentro del subgénero *Delphinium*, con una única especie, *P. turcicum* H. Duman, Vural, Aytaç & Adıgüzel (Vural *et al.*, 2012), la cual se distribuye en la región Irano-Turaniana desde donde se extiende hacia el oeste ocupando la cuenca Mediterránea, centro secundario de diversificación de las especies anuales (Verlaque & Aboucaya, 2001; Orellana *et al.*, 2009a; Jabbour & Renner, 2011b). Su forma biológica (anual) y la forma de la semilla (esféricas con anillos transversales) son algunos de los caracteres morfológicos que comparte con el subgénero *Delphinium* (Blanché, 1990; Vural *et al.*, 2012; Espinosa *et al.*, 2017).

Durante la edad Chattense (24.27 Ma) en el Oligoceno superior se originó el subgénero *Delphinium* en el este de Asia. En esta época tuvieron lugar varios procesos geomorfológicos como el comienzo de la elevación de la meseta Iraniana (Mouthereau *et al.*, 2011) y la rápida elevación de la meseta Tibetana (Shi *et al.*, 1999) lo que ocasionó la reducción del mar Paratetis (Liu & Dong, 2013) y la desertificación de Asia central durante el Oligoceno superior-Mioceno inferior (25-22 Ma) (Qiang *et al.*, 2011). En consecuencia, estos eventos dieron lugar a la formación y posterior expansión de desiertos y estepas en donde los diferentes grupos de plantas, como es el caso del subgénero *Delphinium*, tuvieron que adaptarse a este tipo de ambientes secos.

El subgénero *Delphinium* se diferencia en la región Irano-Turaniana en el Mioceno superior (8.45 Ma) y migra hacia los Balcanes e Italia (7.06 Ma). Durante la edad Tortoniense (~11-7 Ma) en el Mioceno superior, el mar de Tetis occidental fue



sustituido por la Península Arábiga y el mar Paratetis se redujo aún más (Barrier & Vrielynck, 2008) modificando el transporte de la humedad atmosférica. Asimismo, se produce un enfriamiento global que reduce la temperatura de los océanos hace 7-5.4 Ma (Herbert *et al.*, 2016). Estos fenómenos desencadenaron una disminución de las precipitaciones en la cuenca Mediterránea (Van Dam, 2006), favoreciendo así la expansión y diversificación de las especies del subgénero *Delphinium*.

La llegada del subgénero *Delphinium* al norte de África desde los Balcanes e Italia tuvo lugar hace 5.40 Ma, coincidiendo con la crisis de salinidad del Messiniense (5.96-5.33 Ma) (Krijgsman *et al.*, 1999; Duggen *et al.*, 2003). Durante este período, las especies del subgénero *Delphinium* pudieron expandirse y ampliar así sus rangos de distribución. Después de colonizar el norte de África se dispersó hacia la Península Ibérica en el Plioceno superior (2.71 Ma), después de producirse la apertura del estrecho de Gibraltar (~5 Ma). Ambos continentes están separados por tan solo una distancia de 14.4 km.

#### 4.1.3. Subgéneros *Delphinastrum* y *Oligophyllon*

Los subgéneros *Delphinastrum* y *Oligophyllon* tienen más de 150 especies cada uno, todas ellas perennes. La mayoría de las especies (173), de las cuales 150 son endémicas de China (Wang & Warnock, 2001), se encuentran en Asia central, su centro de origen. A partir de aquí, han colonizado otras regiones como Siberia (60 especies), la cuenca Mediterránea (60 sp.) y América del Norte (70 sp.) (Verlaque & Aboucaya, 2001). Más de la mitad de los taxa de *Delphinium* que existen en Norte América se encuentran en California (Warnock, 1990). De manera puntual, unas pocas especies llegan a los trópicos, en particular al sur de India (Billore & Singh, 1972) y a las montañas de la región centro-oeste y centro-este del continente africano (Milne-Redhead & Turrill, 1952; Muntz, 1967).

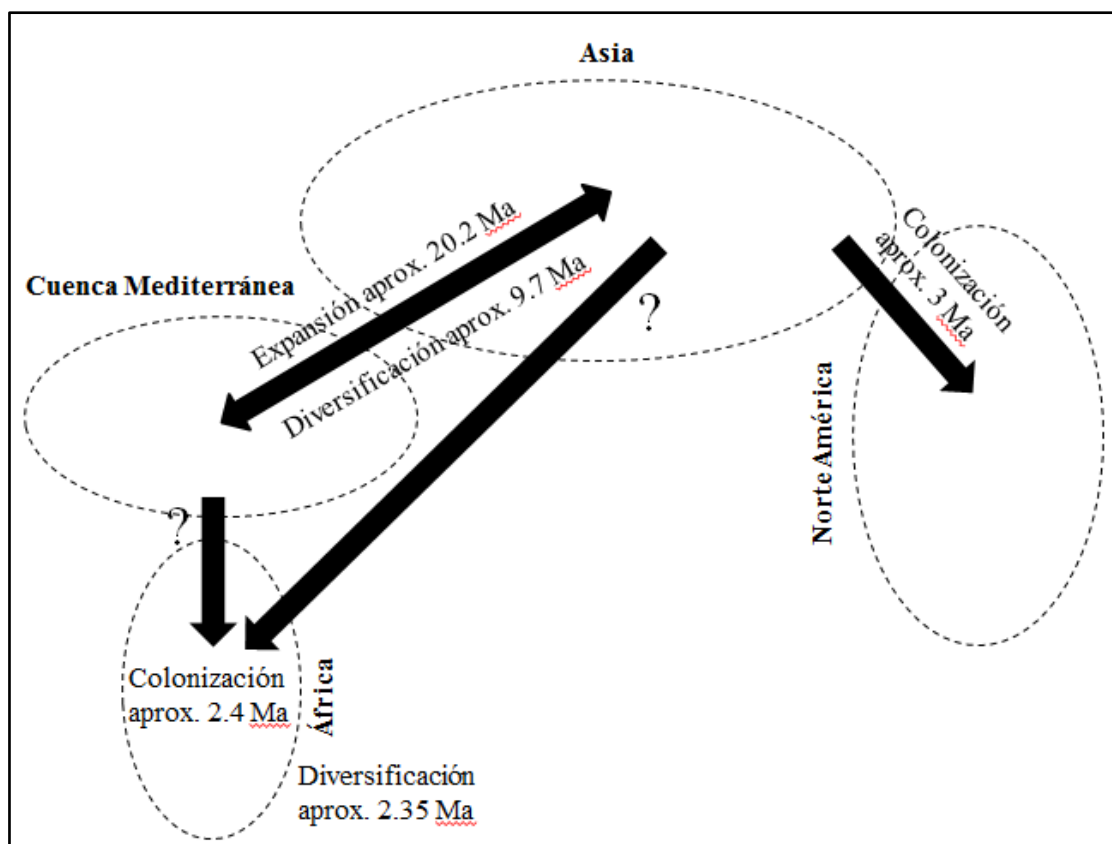
El ancestro de los subgéneros *Delphinastrum* y *Oligophyllon* se estima que se expandió por Asia hace 20.2 (24.7-14.4) Ma, donde tuvo lugar una explosión de diversificación la cual coincide con la evolución de las formas perennes en Asia durante el Mioceno superior hace 9.7 Ma (Jabbour & Renner, 2012a) (Figura 11).

La colonización de América del Norte ocurrió durante el Plioceno alrededor de 3 (4.5-1.6) Ma (Figura 11), cuando el estrecho de Bering se encontraba aún sumergido (Brigham-Grette, 2001) y la temperatura media en el punto más frío era



aproximadamente de  $-8\text{ C}^\circ$  (Vila *et al.*, 2011). Actualmente, muchas de las especies de *Delphinium* viven a una altitud entre 1000-3600 m. en las montañas de California (Warnock, 1990, 1996) con temperaturas por debajo de  $0\text{ C}^\circ$  durante 6 meses al año.

El continente Africano fue colonizado hace 2.4 (4.4-0.7) Ma durante el Mioceno superior-Plioceno (Jabbour & Renner, 2012a) (Figura 11). Durante estas épocas se sucedieron episodios de enfriamiento y aridificación (Zachos *et al.*, 2001) junto con la expansión de las sábanas (Jacobs, 2004) y la elevación del Gran Valle del Rift (Sepulchre *et al.*, 2006; Macgregor, 2015) los cuales favorecieron, al parecer, un solo evento de dispersión desde el norte de África o la Península Arábiga hasta las montañas de África oriental donde se establecieron. El grupo actual de especies afromontanas de *Delphinium* se diversificó durante el Pleistoceno hace aproximadamente 2.35 Ma (Jabbour & Renner, 2012a). La clasificación que actualmente se acepta es la de Muntz (1967) e incluye 3 especies: *D. dasycaulon* Fresen., *D. leroyi* Franch. ex Huth y *D. macrocentrum* Oliv. (Chartier *et al.*, 2016).



**Figura 11.** Eventos de colonización, expansión y diversificación de los subgéneros *Delphinastrum* y *Oligophyllon*.



Esquema taxonómico de las especies del género *Delphinium* en el mediterráneo occidental (en negrita, las especies estudiadas en esta memoria doctoral).

Género *Delphinium* L.

Subgénero *Delphinastrum* (DC.) Peterm.

Sección *Delphinastrum* DC.

Subsección *Elatoidea* Pawl.

Serie *Elata* Pawl.

*D. elatum* L.

Serie *Montana* Pawl.

*D. montanum* DC. in Lam. & DC.

*D. dubium* (Rouy & Foucaud) Pawl.

Subgénero *Oligophyllon* Dimitrova

Sección *Oligophyllon*

Subsección *Squamata* Pawl.

Serie *Fissa* Pawl.

*D. fissum* Waldst. & Kit.

subsp. *fissum*

subsp. ***sordidum*** (Cuatrec.) Amich, E. Rico & J. Sánchez

*D. bolosii* C. Blanché & Molero

*D. mansanetianum* Pitarch, Peris & Sanchis

Serie *Pentagyna* Pawl.

*D. pentagynum* Lam.

subsp. *pentagynum*

subsp. *formenteranum* N. Torres, L. Sáez, Roselló & C. Blanché

*D. emarginatum* C.B. Presl.

subsp. *emarginatum*



subsp. *nevadense* (Kunze) C. Blanché & Molero

*D. sylvaticum* Pomel

Subgénero *Delphinium*

Sección *Delphinium*

Subsección *Delphinium*

Serie *Delphinium*

*D. peregrinum* L.

Serie *Halterata* Pawl.

*D. halteratum* Sm.

subsp. *halteratum*

subsp. *verdunense* (Balb.) Graebn. & P. Graebn.

*D. gracile* DC.

Serie *Cossoniana* C. Blanché, Molero & Simon P.

*D. cossonianum* Batt.

*D. maderense* C. Blanché

Serie *Balansae* C. Blanché, Molero & Simon P.

*D. balansae* Boiss. & Reut.

Serie *Macropetala* C. Blanché, Molero & Simon P.

*D. macropetalum* DC.

*D. nanum* DC.

*D. favargeri* C. Blanché, Molero & Simon P.



## 5. SERIE *FISSA*

La serie *Fissa* pertenece a la subsección *Squamata* (sección *Oligophyllon*, subgénero *Oligophyllon*), la cual consta de aproximadamente 60 especies perennes. La serie *Fissa* comprende aproximadamente 7 especies y varias subespecies perennes que se distribuyen en Asia central y occidental y en la región Mediterránea (Malyutin, 1987).

El centro de origen de la serie *Fissa* se encuentra en las estepas y bajas montañas de Asia central desde donde dispersa por el norte de la cuenca Mediterránea expandiéndose hacia el oeste. Considerando que los sistemas montañosos de Asia central son el centro primario de diversificación, la cuenca Mediterránea ocupa una posición geográfica distal. En la región occidental de la cuenca Mediterránea se conocen actualmente 4 taxa: *Delphinium fissum* subsp. *fissum*, *D. fissum* subsp. *sordidum*, *D. bolosii* y *D. mansanetianum*.

La llegada de *Delphinium fissum* subsp. *fissum* al occidente de la cuenca Mediterránea y concretamente a la Península Ibérica, la cual representa el extremo occidental del área de distribución de las especies de la serie *Fissa*, ocurrió en el Mioceno superior durante la crisis de salinidad del Messiniense (6-5.3 Ma). Así, *D. fissum* subsp. *fissum* se expande desde la región de los Alpes Marítimos (Francia) hasta la Península Ibérica, quedando algunos individuos o poblaciones delimitados por una hipotética barrera geográfica (e.g. río Ebro) en el noreste peninsular, diferenciándose por dos posibles vías (alopátrica o simpátrica) en *D. bolosii* (Orellana *et al.*, 2007). Por otro lado, algunos individuos o poblaciones de *Delphinium fissum* subsp. *fissum* pudieron sortear esa hipotética barrera geográfica y avanzar, de acuerdo con los patrones de migración propuestos por Bocquet *et al.* (1978), y establecer poblaciones aisladas geográficamente que con el tiempo acabaron diferenciándose en *D. fissum* subsp. *sordidum* y *D. mansanetianum*.

En esta memoria doctoral se ha delimitado el marco geográfico de estudio a la Península Ibérica, en donde se encuentran 3 taxa endémicos de la serie *Fissa*, siendo objeto de estudio en esta memoria doctoral *D. fissum* subsp. *sordidum*. A continuación, se indica: sinonimia, lámina iconográfica, descripción, distribución, hábitat, amenazas y estado de conservación.

## 5.1. Especie estudiada

**5.1.1. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*** (Cuatrec.) Amich, E. Rico & J. Sánchez in *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 38: 153 (1981)

### *Sinonimia*

= *Delphinium sordidum* Cuatrecasas

= *Delphinium pentagynum* Lam. subsp. *bethuricum* (Rivas Goday) Rivas Goday

= *Delphinium pentagynum* Lam. var. *bethuricum* Rivas Goday

= *Delphinium bethuriae* Rivas Goday

**Lámina iconográfica:** Figura 13.

### *Descripción*

*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Amich García *et al.*, 1981; Blanché & Molero, 1986) (Figura 14A) es un hemicriptófito rizomatoso con cepa tuberosa pero sin túnica fibrosa (Figura 14B) que desarrolla una roseta de hojas palmatisectas con peciolo semiamplexicaule, con 3-5 segmentos divididos en lóbulos foliares linear-lanceolados de 1-4 mm de anchura (Figura 14C). Las hojas superiores tienen lóbulos lineares. Tallos simples de hasta 160 cm, estriados, no angulosos. La inflorescencia es un racimo simple, denso y pubescente, rara vez ramificada (Figura 14D), que porta entre 20-80 flores violáceo-blanquecinas o azul-violáceas de 22-26 mm sostenidas por pedicelos iguales o más cortos que las flores (Figuras 14E, 14F). Sépalos laterales (7)8-9(10) mm, ciliados, con pilosidad densa y arqueada. Espolón (13)15-16 (17) mm. La floración ocurre durante los meses de verano (Junio-Julio). La polinización es entomófila generalista (Gómez Mercado *et al.*, 1997) (Figura 14G). Es una especie principalmente alógama aunque también presenta autogamia espontánea (Bosch, 1999; Bosch *et al.*, 2001). La fructificación ocurre en Julio y Agosto (Figura 14H). El fruto es un folículo (3)8-10 mm, glabro o muy ligeramente pubescente en la proximidad del estilo, agrupados de 3 en 3 (trifolículos) (Figura 14I) los cuales contienen semillas de 2.5-3.5 mm, numerosas, negras, brillantes, no aladas y con 7-8 escamas membranosas imbricadas (Figura 14J). Se puede multiplicar vegetativamente a través de la fragmentación del rizoma. Su número cromosómico es  $2n = 16$  (Rico Hernández *et al.*, 1981).



### **Distribución**

Es un endemismo ibérico cuyo núcleo principal de distribución se localiza en el CW peninsular (Salamanca, Zamora, Cáceres y Toledo) (Amich *et al.*, 1981; Rico Hernández, 1985; Sánchez-Rodríguez, 1986; García Mateo & Pajarón, 2009), alcanzando hacia el CE el Sistema Ibérico (Corduente, Guadalajara) (Mateo Sanz & Pisco García, 1993) y hacia el sureste la Sierra Mágina (Jaén) (Cuatrecasas, 1929; Gómez Mercado *et al.*, 1997) (Tabla 3, Figura 12). Cabe mencionar que las citas que corresponden a la localidad de Almorchón (Badajoz) (Blanché, 1985) y a la localidad de Piedrabuena (Ciudad Real) (Martín-Blanco & Carrasco, 1997) son sendos errores de identificación enmendados por Carrasco *et al.* (2003) y Martín-Blanco & Carrasco (2001), respectivamente.

### **Hábitat**

El hábitat principal de esta subespecie son las formaciones de bosques caducifolios. Así, la población de Hervás (Cáceres) (Figura 15A) se encuentra como nemoral en castañares (*Castanea sativa* Mill.) (Amich García *et al.*, 1981); las poblaciones de Linares de Riofrío (Salamanca) (Rico, 1985) (Figura 15B) y de la Sierra de San Vicente (Toledo) (Figura 15C) (García Mateo & Pajarón, 2009; Fernández Pulido, 2014; Rodríguez Torres, 2015) se integran en melojares del *Quercion pyrenaicae* Willd.; la población de Béjar (Figura 15D) en claros de bosques mixtos donde los castaños se entremezclan con los melojos, y la población de Corduente (Guadalajara) (Figura 15E) crece en bosquetes caducifolios que se desarrollan en repisas umbrosas sobre el río Gallo, en un entorno dominado por *Pinus pinaster* Aiton (Mateo Sanz & Pisco García, 1993). En Villarino de los Aires (Salamanca) (Figura 15F) se desarrolla en claros y áreas insoladas del *Quercion pyrenaicae* Rivas-Goday ex Rivas-Martínez 1964 buscando refugio entre herbazales o matorrales densos (Amich García *et al.*, 1981). Asimismo, se integra en los quejigares húmedos del *Quercion broteroi* Br.-Bl., P. Silva & Rozeira 1956 em. Rivas-Martínez 1975 corr. V. Fuente 19896 en las poblaciones de Aldeadávila de la Ribera (Salamanca) (Figura 15G) y Fermoselle (Zamora). Finalmente, en la población disyunta de Sierra Mágina (Jaén) (Figura 15H) crece en comunidades dominadas por espinares caducifolios (*Crataego monogynae-Loniceretum arboreae* O. Bolòs 1954), matorrales pulviniformes (*Saturejo intricatae-Velletum spinosae* Rivas-Goday 1968 corr. Alcaraz, P. Gómez, De la Torre,



Ríos & J. Alvarez 1991) y lastonares (*Helictotricho filifolii-Festucetum scariosae* Martínez-Parras, Peinado & Alcaraz 1984) (Gómez Mercado *et al.*, 1997).

### **Amenazas**

La principal amenaza en esta subespecie es la baja tasa de reclutamiento (González-Talaván *et al.*, 2003). Así, considerando la biología intrínseca de la subespecie, hay que señalar la competencia natural que ocurre en algunas poblaciones como en Villarino de los Aires (Salamanca). Además, González-Talaván *et al.* (2003) y Gómez Mercado *et al.* (1997) observaron a lo largo de los años de estudio las mismas rosetas foliares en idéntica posición así como una gran variabilidad interanual en el número de individuos reproductores. Las actividades relacionadas con el turismo y sus consecuencias derivadas como la colecta de plantas, el pisoteo o la sobreutilización pueden llegar a ser una amenaza importante para algunas poblaciones. Como causa natural, los fuegos pueden ocurrir, como por ejemplo sucedió en la población del teso de San Cristóbal en Villarino de los Aires (Salamanca) en el verano de 2006. Finalmente, la herbivoría es una seria amenaza para las poblaciones de Sierra Mágina (Jaén) (Gómez Mercado *et al.*, 1997) y de la Sierra de San Vicente (Toledo) (García Mateo & Pajarón, 2009).

### **Estado de conservación**

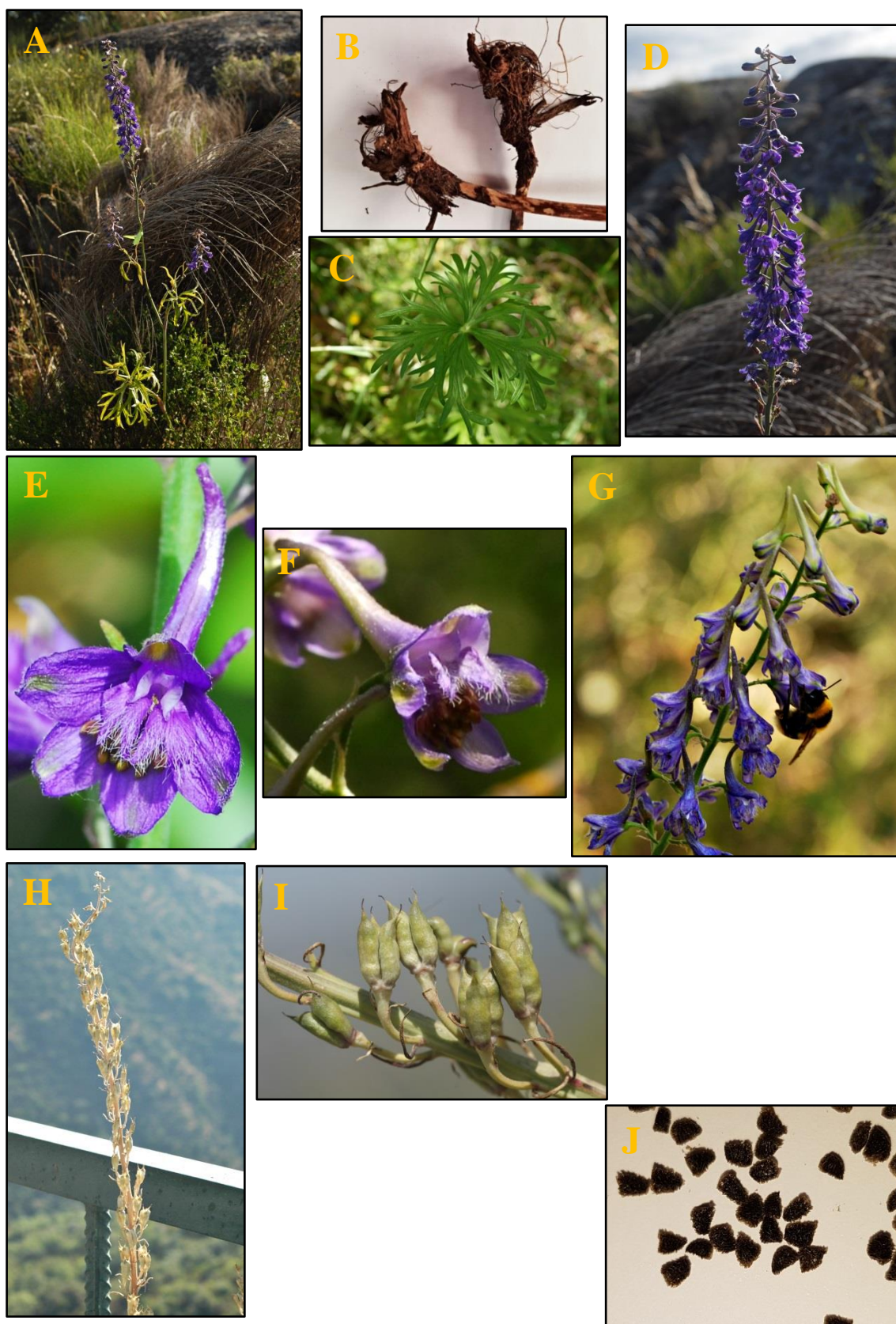
*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* está incluida en la Lista Roja de la Flora Vasculosa Española 2000 (VV.AA., 2000) bajo la categoría de En Peligro (EN) B1+2c+3d, en el Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculosa Amenazada de España (González-Talaván *et al.*, 2003) como En Peligro (EN) B2ac(ii,iii,iv); C2a(i)b y en la Lista Roja de la Flora Vasculosa Española 2008 (Bañares *et al.*, 2008) se incluye también En Peligro (EN) B2ab(v)c(iv); C2b.

A nivel regional, se encuentra incluida en diferentes categorías: “En Peligro de extinción” en el Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León (BOCYL, 2007), de “Interés Especial” en el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Extremadura (DOE, 2001), “Vulnerable” en el Catálogo Andaluz de Especies Amenazadas (BOJA, 2012) y “En Peligro de Extinción” en el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Castilla-La Mancha (DOCM, 2001), única Comunidad Autónoma que ha aprobado un plan de Recuperación para *D. fissum* subsp. *sordidum* (DOCM, 2002).



**Figura 13.** *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*, Villarino de los Aires, Salamanca (MA 231338, 286081): a) rizoma y parte inferior del tallo; b) racimo florífero; c) racimo fructífero; d) flor; e) folículos; f) semillas. (Blanché & Molero, 1986).





**Figura 14.** *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*. **A.** Individuo reproductor; **B.** Rizoma; **C.** Hojas basales; **D.** Racimo florífero; **E.** Flor (vista frontal); **F.** Flor (vista lateral); **G.** Racimo florífero polinizado por *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758), su principal polinizador. **H.** Racimo fructífero; **I.** Folículos agrupados de 3 en 3 (trifolículos); **J.** Semillas.



**Figura 15.** Diferentes hábitats en los que se desarrolla *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*. **A.** Hervás (Cáceres); **B.** Linares de Riofrío (Salamanca); **C.** El Real de San Vicente (Toledo); **D.** Béjar (Salamanca); **E.** Corduente (Guadalajara); **F.** Villarino de los Aires (Salamanca); **G.** Aldeadávila de la Ribera (Salamanca); **H.** Sierra Mágina (Jaén).



## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, C.L., Bremer, K. & Friis, E.M.** 2005. Dating phylogenetically basal eudicots using *rbcL* sequences and multiple fossil reference points. *American Journal of Botany* 92(10): 1737–1748.
- Amich García, F., Rico-Hernández, E. & Sánchez Sánchez, J.** 1981. Sobre *Delphinium sordidum* Cuatrec. y otras aportaciones a la flora del occidente del Sistema Central español. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 38(1): 153–164.
- APG IV.** 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2016: 181: 1–20.
- Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C. & Ortiz, S, eds.** 2008. *Lista Roja 2008 de la flora vascular española*. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). Madrid: SEBICOP.
- Barrier, E. & Vrielynck, B.** 2008. *Paleotectonic maps of the middle east*. Paris: Commission for the Geological Map of the World.
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M.** 1994. Deep complex morphophysiological dormancy in seeds of the mesic woodland herb *Delphinium tricorne* (Ranunculaceae). *International Journal of Plant Sciences* 155: 738–743.
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M.** 1998. *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego, USA.
- Baskin, J.M. & Baskin, C.C.** 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1–16.
- Basset, D. & Basset, S.** 2007. *Delphiniums*. Timber Press, Portland, OR.
- Billore, K.V. & Singh, N.P.** 1972. On an endemic species of *Delphinium* Linn. from the Western Ghats. *Indian Forester* 98: 407–408.
- Blanché, C. & Molero, J.** 1983. *Delphinium bolosii* sp. nova. Étude de sa position systématique dans la sér. Fissa B. Pawl. *Candollea* 38: 709–716.



- Blanché, C.** 1985. Una nova localitat de *Delphinium fissum* Waldst. and Kit. subsp. *sordidum* (Cuatrec.) Amich, Rico and Sánchez. Comentari sobre la seva distribució. *Collectanea Botanica* 16(1): 230–231.
- Blanché, C. & Molero, J.** 1986. *Delphinium* L. Pp. 242–251 in: Castroviejo, S., Laínz, M., López González, G., Montserrat, P., Muñoz-Garmendia, F., Paiva, J. & Villar, L. (eds.), *Flora Iberica* 1. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Blanché, C.** 1990. *Delphinium* L. subgen. *Delphinium*: Origin and evolutionary trends. *Collectanea Botanica (Barcelona)* 19: 75–95.
- Blanché, C.** 1991. *Revisió biosistemàtica del gènere Delphinium L. a la Península Ibèrica i a les Illes Balears*. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona.
- Blanché, C., Bosch, M., López-Pujol, J., Massó, S., Simon, J., Rovira, A.M. & Molero, J.** 2014. *Caracterizació biològica i citogenètica de la població retrobada de l'esperó de Bolòs (Delphinium bolosii) al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac*. VIII Monografies de Sant Llorenç del Munt i l'Obac. Barcelona: Diputació de Barcelona.
- Bocquet, G., Wilder, B. & Kiefer, H.** 1978. The messinian model – a new outlook for the floristics and systematics of the Mediterranean area. *Candollea* 38: 269–287.
- BOCYL.** 2007. Decreto 63/2007, de 14 de Junio, por el que se crean el Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León y la figura de protección denominada Microrreserva de Flora. *BOCYL (Boletín Oficial de Castilla y León. España)* 119: 13197–13204.
- BOJA.** 2012. Decreto 23/2012, de 14 de Febrero, por el que se regula la conservación y el uso sostenible de la flora y la fauna silvestres y sus hábitats. *BOJA (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía de España)* 60: 114–163.
- Bosch, M.** 1999. *Biologia de la reproducció de la tribu Delphinieae a la Mediterrània occidental*. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans, Arxius de la Secció de Ciències 120.
- Bosch, M. & Wasser, N. M.** 1999. Effects of local density on pollination and reproduction in *Delphinium nuttallianum* and *Aconitum columbianum* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 86: 871–879.



- Bosch, M., Simon, J., Molero, J. & Blanché, C.** 2001. Breeding systems in tribe Delphinieae (Ranunculaceae) in the western Mediterranean area. *Flora* 196: 101–113.
- Bosch, M., Simon, J., López-Pujol, J. & Blanché, C.** 2016. DCDB: an updated on-line database of chromosome numbers of tribe Delphinieae (Ranunculaceae). *Flora Mediterranea* 2016: 26: 191–201.
- Brigham-Grette, J.** 2001. New perspectives on Beringian Quaternary paleogeography, stratigraphy, and glacial history. *Quaternary Science Reviews* 20: 15–24.
- Brink, D.E.** 1980. Reproduction and variation in *Aconitum columbianum* (Ranunculaceae) with emphasis on California populations. *American Journal of Botany* 67: 263–273.
- Brouland, M., Guervin, C. & Le Coq, C.** 1976. Étude cytologique qualitative et quantitative de la reproduction chez le *Delphinium ajacis* L. *Revue de cytologie et de biologie végétales* 39: 121–138.
- Cadevall, J. & Sallent, A.** 1915. *Delphinium*. *Flora de Catalunya* 1: 51–53. Barcelona.
- Cappelletti, E. & Poldini, L.** 1984. Seed morphology in some European Aconites (*Aconitum*, Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution* 145: 193–201.
- Carrasco, M.A., Martín-Blanco, C.J. & Blanché, C.** 2003. *Delphinium emarginatum* subsp. *emarginatum* (Ranunculaceae), nuevo taxón para la Península Ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 60(2): 449–450.
- Castroviejo, S., Laínz, M., López González, G., Montserrat, P., Muñoz-Garmendia, F., Paiva, J. & Villar, L. (eds.).** 1986. *Flora Iberica* 1. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Chartier, M., Dressler, S., Schönenberger, J., Rojas Mora, A., Sarthou, C., Wang, W. & Jabbour, F.** 2016. The evolution of afro-montane *Delphinium* (Ranunculaceae): morphospecies, phylogenetics and biogeography. *Taxon* 65: 1313–1327.
- Chen, R.Y., Song, W.Q., Li, X.L., Li, M.X., Liang, G.L. & Chen, C.B.** 2003. *Chromosome atlas of major economic plants genome in China, Vol 3, Chromosome atlas of garden flowering plants in China*. Science Press, Beijing.



- Chung, M.G. & Park, C.W.** 2000. Notes on spatial genetic structure in a hybrid population between *Aconitum japonicum* subsp. *napiforme* and *A. jaluense* (Ranunculaceae). *Annales Botanici Fennici* 37: 243–247.
- Constantinidis, T. & Kamari, G.** 1995. Reports 401–414. Pp. 265–268 in: Kamari, G., Felber, F. & Garbari, F. (eds.), *Mediterranean chromosome number reports. Flora Mediterranea* 5: 265–268.
- Cossard, G., Sannier, J., Sauquet, H., Damerval, C., de Craene, L.R., Jabbour, F. & Nadot, S.** 2016. Subfamilial and tribal relationships of Ranunculaceae: evidence from eight molecular markers. *Plant Systematics and Evolution* 302: 419–431.
- Cuatrecasas, J.** 1929. Estudios sobre la Flora y la Vegetación del Macizo de Mágina. *Trabajos Museo Ciencias Naturales Barcelona* 12: 1–510.
- Damerval, C. & Nadot, S.** 2007. Evolution of perianth and stamen characteristics with respect to floral symmetry in Ranunculales. *Annals of Botany* 100: 631–640.
- Darwin, C.** 1862. *The various contrivances by which orchids are fertilized by insects.* John Murray, London.
- Dilcher, D.L., Sun, G., Ji, Q. & Li, H.** 2007. An early infructescence *Hyrantha decussata* (comb. nov.) from the Yixian formation in northeastern China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 9370–9374.
- DOCM.** 2001. Decreto 200/2001, de 6 de Noviembre de 2001, por el que se modifica el Catálogo Regional de especies amenazadas de Castilla la Mancha. *DOCM (Documento Oficial de Castilla la Mancha)* 119: 12825–12827.
- DOCM.** 2002. Decreto 43/2002, de 2 de Abril de 2002, por el que se aprueba el Plan de Recuperación de la especie de flora *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*. *DOCM* 47: 6347–6349.
- DOE.** 2001. Decreto 37/2001, de 6 de Marzo, por el que se regula el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Extremadura. *Diario Oficial de Extremadura (DOE)* 30: 2349–2364.
- Dosmann, M.S.** 2002. Stratification improves and is likely required for germination of *Aconitum sinomontanum*. *HortTechnology* 12: 423–425.



- Doyle, J.A., Biens, P., Doerenkamp, A. & Jardiné, S.** 1977. Angiosperm pollen from the pre-Albian Lower Cretaceous of equatorial Africa. *Bulletin des Centres de Recherches Exploration-Production Elf Aquitaine* 1: 451–473.
- Doyle, J.A. & Hotton, C.L.** 1991. Diversification of early angiosperm pollen in a cladistic context. Pp. 169–195 in: Blackmore, S. & Barnes, S.H. (eds.), *Pollen and spores: Patterns of diversification*. Oxford: Clarendon Press.
- Duggen, S., Hoernle, K., Van den Bogaard, P., Rüpke, L. & Morgan, J.P.** 2003. Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature* 422: 602–606.
- Endress, P.K.** 1999. Symmetry in flowers: diversity and evolution. *International Journal of Plant Sciences* 160 (Suppl. 6): S3–S23.
- Endress, P.K.** 2001. Origins of flower morphology. *Journal of Experimental Zoology* 291: 105–115.
- Engell, K.** 1995. Embryo morphology of the Ranunculaceae. *Plant Systematics and Evolution* S9: 207–216.
- Ennos, R.A.** 2008. Spurred on by pollinators. *Heredity* 100: 3–4.
- Espinosa, F., Deroin, T., Xiang, K.L., Wang, W., Pinedo Castro, M., Byng, J.W., Aytaç, Z., Nadot, S. & Jabbour, F.** 2017. The Turkish endemic *Pseudodelphinium turcicum* (Ranunculaceae): an unusual population of *Delphinium* with peloric flowers that has persisted in the wild for 20 years. *International Journal of Plant Sciences* 178(7). <https://doi.org/10.1086/692764>.
- Faegri, K. & Van der Pijl, L.** 1979. *The principles of Pollination Ecology*. 3<sup>a</sup> ed. Oxford: Pergamon Press.
- Fernández Pulido, L.** 2014. *Naturaleza y paisaje en la Sierra de San Vicente (Toledo)*. PhD diss., Universidad Complutense de Madrid.
- Gan, Q. & Li, X.** 2017. A new species of *Delphinium* (Ranunculaceae) from Hubei, China. *Novon: A Journal for Botanical nomenclature* 25: 430–432.
- García Mateo, R. & Pajarón, S.** 2009. *Flora y vegetación de la Sierra de San Vicente*. Diputación Provincial de Toledo.



- Giménez, M.** 1995. *Estudios citogenéticos en especies anuales de la tribu Delphinieae en Turquía*. [Tesis de Licenciatura]. Barcelona: Universitat de Barcelona. Facultat de Farmàcia. [Inèdita].
- Gómez Mercado, F., Moreno Lozano, R. & Giménez Luque, E.** 1997. Estudio de las poblaciones de *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) en Sierra Mágina (Jaén, España). *Monografías de Flora y Vegetación Béticas* 10: 101–113.
- González-Talaván, A., Bernardos Hernández, S., Delgado Sánchez, L. & Amich García, F.** 2003. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*. Pp. 672–673 in: Bañares, A., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C. & Ortiz, S. (eds), *Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Hao, D.C., Xiao, P.G., Ma, H.Y., Peng, Y. & He, C.N.** 2015. Mining chemodiversity from biodiversity: pharmacophylogeny of medicinal plants of Ranunculaceae. *Chinese Journal of Natural Medicines* 13(7): 0507–0520.
- Harborne, J.B.** 1982. *Introduction to ecological biochemistry*. Londres: Academic Press.
- Herbert, T.D., Lawrence, K.T., Tzanova, A., Peterson, L.C., Caballero-Gill, R. & Kelly, C.S.** 2016. Late Miocene global cooling and the rise of modern ecosystems. *Nature Geoscience* 9: 843–847.
- Herranz, J.M., Copete, M.A., Ferrandis, P. & Copete, E.** 2010a. Intermediate complex morphophysiological dormancy in the endemic Iberian *Aconitum napellus* subsp. *castellanum* (Ranunculaceae). *Seed Science Research* 20: 109–121.
- Herranz, J.M., Ferrandis, P. & Martínez-Duro, E.** 2010b. Seed germination ecology of the threatened endemic Iberian *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae). *Plant Ecology* 211: 89–106.
- Hong, D.Y.** 1986. Biosystematic observation on 5 species of *Consolida* (Ranunculaceae). *Acta Botanica Sinica* 28: 1–10.
- Hoot, S.B.** 1995. Phylogeny of the Ranunculaceae based on preliminary atpB, rbcL and 18S nuclear ribosomal DNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution Supplement* 9: 241–251.





- Hoot, S.B., Kramer, J. & Arroyo Mary, T.K.** 2008. Phylogenetic position of the South American dioecious genus *Hamadryas* and related Ranunculeae (Ranunculaceae). *International Journal of Plant Sciences* 169: 433–443.
- Hughes, N.F. & McDougall, A.B.** 1990. Barremian-Aptian angiospermid pollen records from southern England. *Review of Paleobotany and Palynology* 65: 145–151.
- Jabbour, F., Ronse De Craene, L.P., Nadot, S. & Damerval, C.** 2009. Establishment of zygomorphy on an ontogenic spiral and evolution of perianth in the tribe Delphinieae (Ranunculaceae). *Annals of Botany* 104: 809–822.
- Jabbour, F. & Renner, S.S.** 2011a. Resurrection of the genus *Staphisagria* J. Hill, sister to all the other Delphinieae (Ranunculaceae). *Phytokeys* 7: 21–26.
- Jabbour, F. & Renner, S.S.** 2011b. *Consolida* and *Aconitella* are an annual clade of *Delphinium* (Ranunculaceae) that diversified in the Mediterranean basin and the Irano-Turanian region. *Taxon* 60: 1029–1040.
- Jabbour, F. & Renner, S.S.** 2012a. A phylogeny of Delphinieae (Ranunculaceae) shows that *Aconitum* is nested within *Delphinium* and that Late Miocene transitions to long life cycles in the Himalayas and Southwest China coincide with bursts in diversification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 928–942.
- Jabbour, F. & Renner, S.S.** 2012b. Spurs in a spur: perianth evolution in the Delphinieae (Ranunculaceae). *International Journal of Plant Sciences* 173: 1036–1054.
- Jabbour, F., Cossard, G., Le Guilloux, M., Sannier, J., Nadot, S. & Damerval, C.** 2014. Specific duplication and dorsoventrally asymmetric expression patterns of CYCLOIDEA-like genes in zygomorphic species of Ranunculaceae. *PLoS ONE* 9(4): e95727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095727>.
- Jacobs, B.F.** 2004. Paleobotanical studies from tropical Africa: relevance to the evolution of forest, woodland and savannah biomes. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 359: 1573–1583.



- Jankun, A.** 1973. Further studies in the development of hybrid endosperm in representatives of the genus *Delphinium* L. *Acta Biologica Cracoviensia* 16: 215–225.
- Johansson, J.T.** 1995. A revised chloroplast DNA phylogeny of the Ranunculaceae. *Plant Systematics and Evolution* Supplement 9: 253–271.
- Johansson, J.T.** 1998. Chloroplast DNA restriction site mapping and the phylogeny of *Ranunculus* (Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution* 213: 1–19.
- Johansson, J.T. & Jansen, R.K.** 1991. Chloroplast DNA variation among five species of Ranunculaceae: structure, sequence divergence, and phylogenetic relationships. *Plant Systematics and Evolution* 178: 9–25.
- Johansson, J.T. & Jansen, R.K.** 1993. Chloroplast DNA variation and phylogeny of the Ranunculaceae. *Plant Systematics and Evolution* 187: 29–49.
- Jud, N.A. & Hickey, L.J.** 2013. *Potomacapnos apeleutheron* Gen. et sp. nov., a new early cretaceous angiosperm from the Potomac group and its implications for the evolution of eudicot leaf architecture. *American Journal of Botany* 100(12): 2437–2449.
- Kadota, Y.** 1987. *A revision of Aconitum subgenus Aconitum (Ranunculaceae) of East Asia*. Sanwa Shoyaku, Utsunomiya, Tokyo.
- Kearns, C.A. & Inouye, D.W.** 1993. *Techniques for pollination biologists*. Niwot, Colorado: University Press of Colorado.
- Kevan, P.G. & Baker, H.G.** 1983. Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology* 28: 407–453.
- Kirolova, D.S.** 1988. Spermoderm structure of *Delphinium* L. sect. *Staphisagria* Huth. *Ukrainian botanical journal* 45(6): 53–57.
- Koontz, J.A., Soltis, P.S. & Brunsfeld, S.J.** 2001. Genetic diversity and tests of the hybrid origin of the endangered yellow larkspur. *Conservation Biology* 15: 1608–1618.
- Kosuge, K., Sawada, K. & Denda, T.** 1995. Phylogenetic relationships of some genera in the Ranunculaceae based on alcohol dehydrogenase genes. *Plant Systematics and Evolution* Supplement 9: 263–271.



- Krijgsman, W., Hilgen, F.J., Raffi, I., Sierro, F.J. & Wilson, D.S.** 1999. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* 400: 652–655.
- Lavery, T.M.** 1980. The flower-visiting behavior of bumblebees: floral complexity and learning. *Canadian Journal of Zoology* 58: 1324–1335.
- Lehnebach, C., Cano, A., Monsalve, C., McLenachan, P., Hörandl, E. & Lockhart, P.** 2007. Phylogenetic relationships of the monotypic Peruvian genus *Laccopetalum* (Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution* 264: 109–116.
- Lewis, H. & Epling, C.** 1959. *Delphinium gypsophilum*, a diploid species of hybrid origin. *Evolution* 13: 511–525.
- Lewitsky, G.A.** 1931. The karyotype in systematics (on the base of karyology of the subfamily Helleboreae). *Trudy po Prikladnoj Botanike* 27: 187–240.
- Lin, C.Z., Zhao, Z.X., Xie, S.M., Mao, J.H., Zhu, C.C., Li, X.H., Zeren-dawa, B., Suolang-qimei, K., Zhu, D., Xiong, T.Q. & Wu, A.Z.** 2014. Diterpenoid alkaloids and flavonoids from *Delphinium trichophorum*. *Phytochemistry* 97: 88–95.
- Liu, X.D. & Dong, B.W.** 2013. Influence of the Tibetan Plateau uplift on the Asian monsoon-arid environment evolution. *Chinese Science Bulletin* 34: 4277–4291.
- Luo, Y.** 2003. *Taxonomic revision of Aconitum L. (Ranunculaceae) from Sichuan, with a study on the phylogeny of this genus based on molecular evidence*. Ph.D dissertation, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, China.
- Macgregor, D.** 2015. History of the development of the East African Rift System: A series of interpreted maps through time. *Journal of African Earth Sciences* 101: 232–252.
- Macior, L.W.** 1974. Behavioural aspects of coadaptation between flowers and insect pollinators. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 760–769.
- Malyutin, N.I.** 1969. On the biological significance of the floral pigments. *Botanicheskii Zhurnal (Moscow and Leningrad)* 54(7) 1050–1053.
- Malyutin, N.I.** 1987. The system of the genus *Delphinium* (Ranunculaceae) based on the morphological features of seeds. *Botanicheskii Zhurnal (Moscow and Leningrad)* 72: 683–693.



- Manners, G.D., Panter, K.E. & Pellettier, S.W.** 1995. Structure-activity relationships of norditerpenoid alkaloids occurring in toxic larkspur (*Delphinium*) species. *Journal of Natural Products* 58(6): 863–869.
- Manners, G.D., Panter, K.E., Pfister, J.A., Ralphs, M.H., James, L.F.** 1998. The characterization and structure–activity evaluation of toxic norditerpenoid alkaloids from two *Delphinium* species. *Journal of Natural Products* 61: 1086–1089.
- Martín-Blanco, C.J. & Carrasco, M.A.** 1997. Fragmenta Chorologica Occidentalia, 5846-5893. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 55(1): 146–149.
- Martín-Blanco, C.J. & Carrasco, M.A.** 2001. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Cuatrec.) Amich, Rico and Sánchez (Ranunculaceae), taxon a excluir de la flora de Ciudad Real. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 58(2): 355.
- Mateo Sanz, G. & Pisco García, J.M.** 1993. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Cuatrec.) Amich, Rico and Sánchez en el Sistema Ibérico. *Acta Botanica Malacitana* 18: 286–287.
- Milne-Redhead, E. & Turrill, W.B.** 1952. *Delphinium*. Pp. 19–22 in: Turrill, W.B. & Milne-Redhead, E. (eds.). *Flora of tropical East Africa: Ranunculaceae*. London: The Crown Agents for the Colonies.
- Mouthereau, F.** 2011. Timing of uplift in the Zagros belt/Iranian plateau and accommodation of late Cenozoic Arabia-Eurasia convergence. *Geological Magazine* 148: 726–738.
- Müller, H.** 1883. *The fertilisation of flowers*. Londres: McMillan & Company.
- Munz, P.A.** 1967. A synopsis of African species of *Delphinium* and *Consolida*. *Journal of the Arnold Arboretum* 48: 30–55.
- Nyirimigabo, E., Xu, Y., Li, Y., Wang, Y., Agyemang, K. & Zhang, Y.** 2014. A review on phytochemistry, pharmacology and toxicology studies of *Aconitum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67: 1–19.
- Orellana, M.R., López-Pujol, J., Blanché, C. & Bosch, M.** 2007. Genetic diversity in the endangered dysploid larkspur *Delphinium bolosii* and its close diploid relatives in the series *Fissa* of the Western Mediterranean area. *Biological Journal of the Linnean Society* 92: 773–784.



- Orellana, M.R., Rovira, A., Blanché, C. & Bosch, M.** 2008. Effects of local abundance on pollination and reproduction in the narrow endemic endangered species *Delphinium bolosii* (Ranunculaceae). *Orsis* 23: 27–46.
- Orellana, M.R., Blanché, C., Simon, J. & Bosch, M.** 2009a. Genetic diversity within and among disjunct populations of the Mediterranean island endemic *Delphinium pictum* and *D. requienii* (Ranunculaceae). *Folia Geobotanica* 44: 47–63.
- Orellana, M.R., López-Pujol, J., Blanché, C., Rovira, A.M. & Bosch, M.** 2009b. Genetic diversity in *Delphinium staphisagria* (Ranunculaceae), a rare Mediterranean dysploid larkspur with medicinal uses. *Genetica* 135: 221–232.
- Palmer, J.D., Soltis, D.E. & Chase, M.W.** 2004. The plant tree of life: An overview and some points of view. *American Journal of Botany* 91: 1437–1445.
- Pandey, H., Nandi, S.K., Nadeem, M. & Palni, L.M.S.** 2000. Chemical stimulation of seed germination in *Aconitum heterophyllum* Wall and *A. balfourii* Stapf: Important Himalayan species of medicinal value. *Seed Science and Technology* 28: 39–48.
- Pawlowski, B.** 1993. *Delphinium* L. Pp. 257–260 in: Tutin, T.G., Burges, N.A., Chater, A.O., Edmonson, J.R., Heywood, V.H., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. & Webb, D.A. (eds.), *Flora Europaea*. 2<sup>a</sup> ed. Vol. 1. Cambridge: Cambridge University Press.
- Pellmyr, O.** 1984. The pollination ecology of *Actaea spicata* (Ranunculaceae). *Nordic Journal of Botany* 4: 443–456.
- Qiang, X., An, Z., Song, Y., Chang, H., Sun, Y., Liu, W., Ao, H., Dong, J., Fu, C., Wu, F., Lu, F., Cai, Y., Zhou, W., Cao, J., Xu, X. & Ai, L.** 2011. New eolian red clay sequence on the western Chinese Loess Plateau linked to onset of Asian desertification about 25 Ma ago. *Science China Earth Sciences* 54: 136–144.
- Ralphs, M.H., Gardner, D.R., Turner, D.L., Pfister, J.A., Thacker, E.** 2002. Predicting toxicity of tall larkspur (*Delphinium barbeyi*): measurement of the variation in alkaloid concentration among plants and among years. *Journal of Chemical Ecology* 28: 2327–2341.
- Ren, D., Labandeira, C.C., Santiago-Blay, J.A., Rasnitsyn, A., Shih, C., Bashkuev, A., Logan, M.A., Hotton, C.L. & Dilcher, D.** 2009. A probable pollination mode before angiosperms: Eurasian, long-proboscid scorpionflies. *Science* 326: 840–847.



- Renner, S.S.** 2006. Rewardless flowers in the angiosperms and the role of insect cognition in their evolution. Pp. 123–144 in: Waser, N.M. & Ollerton, J. (eds.), *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. University of Chicago Press, Chicago.
- Richter, T.S., Soltis, P.S. & Soltis, D.E.** 1994. Genetic variation within and among populations of the narrow endemic, *Delphinium viridescens* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 81: 1070–1076.
- Rico Hernández, E., Sánchez Sánchez, J. & Amich, F.** 1981. Números cromosómicos de plantas occidentales 100-107. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 38(1): 265–268.
- Rico Hernández, E.** 1985. Aportaciones y comentarios sobre la flora del centro-oeste español. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 41(2): 407–423.
- Ro, K.E., Keener, C.S. & McPheron, B.A.** 1997. Molecular phylogenetic study of the Ranunculaceae: utility of the nuclear 26S ribosomal DNA in inferring intrafamilial relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 117–127.
- Rodríguez Torres, A.** 2015. *Flora y vegetación del norte de la provincia de Toledo (Valles del Alberche y alto Tiétar)*. PhD diss., Universidad de Castilla-La Mancha.
- Sánchez Rodríguez, J.A.** 1986. Aportaciones a la Flora Zamorana, I. *Collectanea Botanica (Barcelona)* 16(2): 371–376.
- Sepulchre, P., Ramstein, G., Fluteau, F., Schuster, M., Tiercelin, J.J. & Brunet, M.** 2006. Tectonic uplift and Eastern Africa aridification. *Science* 313: 1419–1423.
- Shi, Y.F., Li, J.J., Li, B.Y., Yao, T.D., Wang, S.M., Li, S.J., Cui, Z.J., Wang, F.B., Pan, B.T., Fang, X.M. & Zhang, Q.S.** 1999. Uplift of the Qinghai-Xizang (Tibetan) Plateau and east Asia environmental change during late Cenozoic. *Acta Geographica Sinica* 54: 10–21.
- Sood, M. & Thakur, V.** 2011. Effect of light and temperature on germination behaviour of *Aconitum deinorrhizum* Stapf. *International Journal of Farm Sciences* 1(2): 83–87.
- Stebbins, G.L.** 1971. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Londres: Edward Arnold.



- Stebbins, G.L.** 1974. *Flowering plants: Evolution above the Species level*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Stevens, P.F.** 2001 (onwards). *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Accessed Apr. 2018.
- Sun, G., Dilcher, D.L., Wang, H. & Chen, Z.** 2011. A eudicot from the Early Cretaceous of China. *Nature* 471: 625–628.
- Sun, G., Ji, G., Dilcher, D.L., Zheng, S., Nixon, K.C. & Wang, X.** 2002. Archaeofractaceae, a new basal angiosperm family. *Science* 296: 899–904.
- Svensson, R. & Wigren, M.** 1986. History and biology of *Consolida regalis* in Sweden. *Svensk Botanisk Tidskrift* 80: 31–53.
- Takhtajan, A.L.** 1991. *Evolutionary trends in flowering plants*. New York: Columbia University Press.
- Takhtajan, A.L.** 1997. *Diversity and Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York.
- Tamura, M.** 1968. Morphology, ecology and phylogeny of the Ranunculaceae VIII. *Science Reports Osaka University* 17: 41–56.
- Tamura, M.** 1993. Ranunculaceae. Pp. 563–583 in: Kubitzki, K., Rohwer, J.G. & Bittrich, V. (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants II*. Springer, Berlín.
- Tamura, M.** 1995. Delphinieae. Pp. 272–312 in: Hiepko, P. (ed.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien, ed. 2, 17a IV*. Berlin: Duncker and Humblot.
- Thorne, R.** 1992. Classification and geography of the flowering plants. *Botanical Review* 58: 225–327.
- Trifonova, V.I.** 1990. Comparative biomorphological study of the taxonomy and phylogeny of the genera *Consolida* (DC.) S.F. Gray and *Aconitella* Spach. *Collectanea Botanica (Barcelona)* 19: 97–110.
- Turnbull, C.L., Beattie, A.J. & Hanzawa, F.M.** 1983. Seed dispersal by ants in the Rocky Mountains. *The Southwestern Naturalist* 28: 289–293.



- Van Dam, J.A.** 2006. Geographic and temporal patterns in the late Neogene (12-3 Ma) aridification of Europe: the use of small mammals as paleoprecipitation proxies. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 238: 190–218.
- Vandelook, F., Lenaerts, J. & Van Assche Jozef, A.** 2009. The role of temperature in post-dispersal embryo growth and dormancy break in seeds of *Aconitum lycoctonum* L. *Flora* 204: 536–542.
- Verlaque, R. & Aboucaya, A.** 2001. Position des *Delphinium* du sous-genre *Staphisagria* dans la tribu des Delphinieae Warm. (Ranunculaceae). *Bocconeia* 13: 189–200.
- Verma, N.K., Verma, A.K. & Kumar, D.** 2009. Effect of storage containers on seed germination and viability in *Aconitum heterophyllum* and *Podophyllum hexandrum* – endangered medicinal plants species of Himalayan region. *Biological Forum – An International Journal* 1(1): 8–11.
- Vila, R., Bell, C.D., Macniven, R., Goldman-Huertas, B., Ree, R.H., Marshall, C.R., Bálint, Z., Johnson, K., Benyamini, D. & Pierce, N.E.** 2011. Phylogeny and palaeoecology of *Polyommatus* blue butterflies show Beringia was a climate-regulated gateway to the New World. *Proceedings of the Royal Society B* 278: 2737–2744.
- Vogel, S.** 1984. The *Diascia* flower and its bee: an oil-based symbiosis in southern Africa. *Acta Botanica Neerlandica* 33: 509–518.
- Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. & Adigüzel, N.** 2012. A new genus and three new species from Central Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Botany* 36: 427–433.
- VV.AA.** 2000. Lista Roja de Flora Vascular Española (valoración según categorías UICN). *Conservación Vegetal* 6(extra): 11–38.
- Wada, K., Nihira, M., Hayakawa, H., Tomita, Y., Hayashida, M. & Ohno, Y.** 2005. Effects of long-term administrations of aconitine on electrocardiogram and tissue concentrations of aconitine and its metabolites in mice. *Forensic Science International* 148: 9–21.
- Wallace, A.R.** 1867. Creation by law. *Quarterly Journal of Science* S140: 471–486.





- Wang, W.T. & Warnock, M.J.** 2001. *Delphinium* L. Pp. 223–237 in: Wu, Z.Y. & Raven, P.H. (eds.). *Flora of China*, vol. 6. Science Press/Missouri Botanical Garden, Beijing/St. Louis.
- Wang, W., Li, R.Q. & Chen, Z-D.** 2005. Systematic position of *Asteropyrum* (Ranunculaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Systematics and Evolution* 255: 41–54.
- Wang, W., Lu, A-M., Ren, Y., Endress, M.E. & Chen, Z-D.** 2009. Phylogeny and classification of Ranunculales: evidence from four molecular loci and morphological data. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 11: 81–110.
- Wang, W., Liu, Y., Yu, S.X., Gao, T.G. & Chen, Z.D.** 2013. *Gymnaconitum*, a new genus of Ranunculaceae endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau. *Taxon* 62: 713–722.
- Wang, W., Dilcher, D.L., Sun, G., Wang, H.S. & Chen, Z.D.** 2016. Accelerated evolution of early angiosperms: evidence from ranunculalean phylogeny by integrating living and fossil data. *Journal of Systematics and Evolution* 54: 336–341.
- Wang, W.T.** 1962. Kriticeskij obzor roda *Delphinium* iz ljutikovych flory kitaja. *Acta Botanica Sinica* 10: 264–284.
- Wang, W.T.** 1979. *Delphinium*. Pp. 326–462 in: Lin, L. (ed.), *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*, vol. 27. Beijing: Science Press.
- Wang, Z., Wen, J., Xing, J. & He, Y.** 2006. Quantitative determination of diterpenoid alkaloids in four species of *Aconitum* by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40: 1031–1034.
- Warnock, M.J.** 1990. Revisió taxonòmica i ecològica dels *Delphinium* de Califòrnia. *Collectanea Botanica (Barcelona)* 19: 45–74.
- Warnock, M.J.** 1996. *Delphinium*. Pp. 916–922 in: Hickman, J.C. (ed.), *The Jepson manual. Higher plants of California*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California.
- Weberling, F.** 1989. *Morphology of flowers and inflorescences*. Cambridge: Cambridge University Press.



- Whittall, J.B. & Hodges, S.A.** 2007. Pollination shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature* 447: 706–709.
- Xiang, K.L., Aytaç, Z., Liu, Y., Espinosa, F., Jabbour, F., Byng, J.W., Zhang, C.F., Erst, A.S. & Wang, W.** 2017. Recircumscription of *Delphinium* subg. *Delphinium* (Ranunculaceae) and implications for its biogeography. *Taxon* 554–566.
- Xiao, P.G.** 1980. A preliminary study of the correlation between phylogeny, chemical constituents and pharmaceutical aspects in the taxa of Chinese Ranunculaceae. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 18: 142–153.
- Yang, Q.E.** 2001. Cytology of 12 species in *Aconitum* L. and of 18 species in *Delphinium* L. of the tribe Delphinieae (Ranunculaceae) from China. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 39: 502–514.
- Yuan, Q. & Yang, Q.E.** 2008. Low incidence of polyploids and high uniformity of karyotypes displayed by *Delphinium* (Ranunculaceae) in the Hengduan Mountains region of south-west China. *Botanical Journal of the Linnean Society* 158: 172–188.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E. & Billups, K.** 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292: 686–693.
- Zhao, Z.G., Meng, J.L., Fan, B.L. & Du, G.Z.** 2008. Reproductive patterns within racemes in protandrous *Aconitum gymrandrum* (Ranunculaceae): potential mechanism and among-family variation. *Plant Systematics and Evolution* 273: 247–256.
- Zhou, Z., Barrett, P.M. & Hilton, J.** 2003. An exceptionally preserved Lower Cretaceous ecosystem. *Nature* 421: 807–814.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





El objetivo principal de esta memoria doctoral es presentar un exhaustivo diagnóstico del estado de conservación de la subespecie *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*, abordando desde un enfoque multidisciplinar los aspectos más relevantes de su biología y ecología, con el fin de aportar nuevos datos que generen un mayor y de mejor calidad conocimiento científico y a su vez que esta información sea útil, en forma de dossier científico, para la toma de decisiones y planificación de las estrategias de conservación por parte de los gestores y organismos competentes. A continuación se describen brevemente los objetivos específicos analizados, los cuales corresponden a cada uno de los capítulos en los que se ha estructurado esta memoria:

### **1. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* en Portugal**

- Evaluar a nivel regional el estado de conservación actual de la única población portuguesa conocida hasta el momento.

### **2. Modelización de la distribución del hábitat de *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* bajo el actual escenario climático**

- Determinar la distribución potencial actual e idoneidad del hábitat; identificar qué factores ambientales configuran su actual y potencial distribución, y aportar información útil que se pueda aplicar en la gestión y conservación de la biodiversidad con el fin de descubrir nuevas poblaciones, priorizar áreas de conservación e identificar zonas potenciales de restauración.

### **3. Efectos de la abundancia local sobre la polinización y éxito reproductivo en *Delphinium fissum* subsp. *sordidum***

- Identificar la diversidad de polinizadores; evaluar si la abundancia y/o pureza de los plots afectan al número de posibles visitas de los polinizadores; estimar la calidad del servicio de los polinizadores basado en el polen depositado sobre los estigmas, y determinar si la abundancia y/o pureza de los plots afectan al éxito reproductivo.



# PRIMER CAPÍTVLO

*“Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) in Portugal:  
distribution and conservation status”







## ***Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) en Portugal: distribución y estado de conservación**

Rubén Ramírez-Rodríguez, Leopoldo Medina, Miguel Menezes de Sequeira, Carlos Aguiar & Francisco Amich

ISSN: 1988-3194  
ISSN: 0211-1322  
Anales del Jardín Botánico (CSIC)



Anales  
del Jardín Botánico de Madrid



CSIC  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

*Anales del Jardín Botánico de Madrid* (2017) 74 (1): e056. doi:  
<http://dx.doi.org/10.3989/ajbm.2467>

Factor de Impacto (2017): 0.500



### **Resumen**

Se ha encontrado *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* en laderas calcáreas y esquistosas en las Minas de Santo Adrião, en la región de Trás-os-Montes —cerca de Bragança, en el noreste de Portugal—. Es la primera cita de este taxon para Portugal y la localidad más occidental de su área general de distribución. Su estado de conservación, según las categorías y criterios de la UICN más recientes, debería ser de “En Peligro Crítico” en Portugal.





## *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) in Portugal: distribution and conservation status

Rubén Ramírez-Rodríguez<sup>1</sup>, Leopoldo Medina<sup>2</sup>, Miguel Menezes de Sequeira<sup>3</sup>, Carlos Aguiar<sup>4</sup> & Francisco Amich<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Evolution, Taxonomy, and Conservation Group (ECOMED), Department of Botany and Plant Physiology, University of Salamanca, E-37008 Salamanca, Spain; [rubenrr@usal.es](mailto:rubenrr@usal.es)

<sup>2</sup> Real Jardín Botánico CSIC, Plaza de Murillo 2, ES-28014 Madrid, Spain

<sup>3</sup> GBM, Universidade da Madeira, Centro de Ciências da vida, Grupo de Botânica da Madeira, Campus da Penteada, 9000-390 Funchal, Portugal

<sup>4</sup> Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Apartado 1172, Bragança 5301-855, Portugal

### Abstract

*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* has been found in calcareous and schistaceous slopes on the Mines of Santo Adrião, Trás-os-Montes region —close to Bragança, northeastern Portugal—. It is the first record of this taxon in Portugal and the westernmost locality of its general distribution area. Its conservation status, according to the most recent IUCN categories and criteria, should be “Critically Endangered” in Portugal.

**Keywords:** Critically Endangered; *Delphinium*; IUCN; Mines of Santo Adrião; Ranunculaceae; Trás-os-Montes.

### Introduction

The genus *Delphinium* L. —Ranunculaceae— is distributed throughout the temperate and cold zones of the northern hemisphere. Its primary centre of differentiation ranges from the eastern Himalaya to the southwestern China, which includes the highest number of species within —about 150 species— (Blanché, 1990; Jabbour & Renner, 2012), as well as the most primitive perennial species as pointed out by Wang (1962) and Malyutin (1973). The larger sets of species, all perennial, are found in Asia and North America. Only a few annual, biennial or perennial species, with Mediterranean affinities, occur in the Iberian Peninsula. According to Blanché & Molero (1986), 11 taxa —species and subspecies— of *Delphinium* occur in Spain. More recently, the following 2 taxa have been reported for Spain: *D. mansanetianum* Pitarch, Peris & Sanchis (Pitarch García, 2002) and *D. pentagynum* subsp. *formenteranum* N.Torres, L. Sáez, Rosselló & C. Blanché (Torres *et al.*, 2000). Likewise, *D. fissum* subsp. *fontqueri* Ascaso & Pedrol was described by Ascaso & Pedrol (1991), but later cytogenetic data (Simon *et al.*, 1995) revealed that it is *D. bolosii* C.Blanché & Molero. In



Portugal, 6 taxa —species and subspecies— occur, and only *D. pentagynum* Lam. is perennial (Sequeira *et al.*, 2011).

*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Cuatrec.) Amich, E. Rico & J. Sánchez (*D. sordidum* Cuatrec., basion.) belongs to a group of species and subspecies with oriental origin —*D.* (subgen. *Oligophyllon* Dimitrova) ser. *Fissa* B.Pawl.—, which ranges throughout the Mediterranean region, being the Iberian Peninsula one of the extremes of its area of distribution (Blanché, 1991). This taxon is close to *D. fissum* Waldst. & Kit. subsp. *fissum* —southeastern France— and *D. bolosii* —northeastern Spain, with only 6 known populations up to now (López-Pujol *et al.*, 2014)—. The genetic diversity studies carried out by Orellana *et al.* (2007) reinforce the hypothesis of Blanché (1991) about an expansion of *D. fissum* subsp. *fissum* —or an ancestor— from the Alps to the Iberian Peninsula.

*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* was until now considered as an endemic taxon of Spain (Blanché & Molero, 1986), where it is catalogued under the category of “Endangered” —EN B2ab(v)c(iv);C2b— in the *Lista roja 2008 de la flora vascular española* and its *Addendum* (Bañares *et al.*, 2008, 2010), respectively. Its occurrence in Portugal increases its distribution range to the western Iberian Peninsula; its implications, from a phytogeographical and conservational point of view, will be discussed below.

## Materials and methods

The specimens of *D. fissum* subsp. *sordidum* were collected during field trips in the municipality of Caçarelhos —Vimioso, Bragança, northeastern Portugal— on 14 June 2010 and 14 June 2016. For the identification of the species, morphological characteristics were checked and compared to those given by Blanché & Molero (1986) —perennial species, with linear-lanceolate leaf lobes, dense inflorescences, and densely pubescent flowers usually closed—; all specimens were *D. fissum* subsp. *sordidum*. The reference material was deposited in the herbaria of the University of Salamanca —SALA— and the Royal Botanic Garden of Madrid —MA.

We carried out a direct counting of reproductive individuals in the population. Nonetheless, we established a counting error of 15% because there are small forested areas at higher elevations where it is difficult to distinguish individual plants since they grow up in clumps and inaccessible places.



The International Union for Conservation of Nature assessment follows the latest guidelines of the IUCN (2017) and, specifically the IUCN regional guidelines (IUCN, 2012). Species conservation status was evaluated using B, C, and D criteria. The area of occupancy —AOO— was calculated with ArcGIS 10.3.1 —ESRI, Redlands, California, USA—, creating a polygon which included the population area.

### *Herbarium specimens*

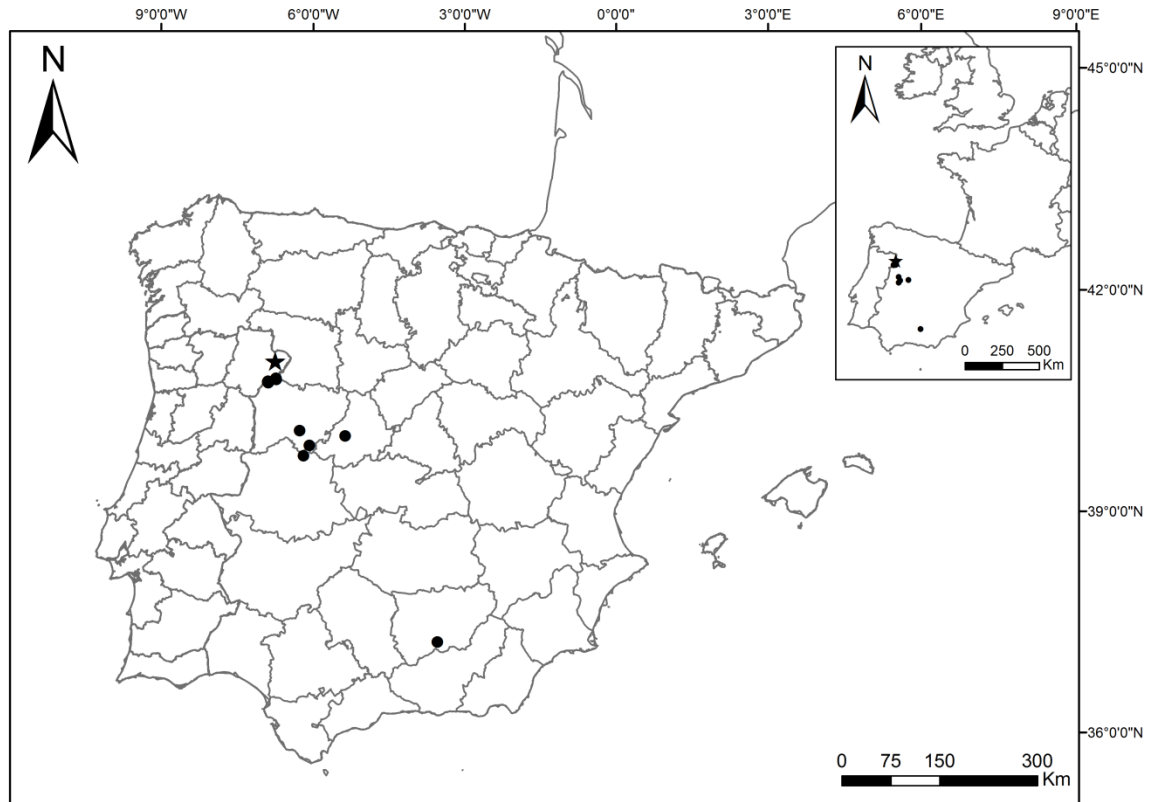
PORTUGAL. **Trás-os-Montes:** Bragança, Vimioso, Caçarelhos, Minas de Santo Adrião, 29TQG1000, contact between schist and limestones, holm-oak forest, shrubs and grassland, 538 m a.s.l. *R. Morales et al. RM 2345*, 14 June 2010, (MA 864924); *ibidem*, 29TQG1000, calcareous and schist slopes, 590 m a.s.l., *F. Amich & R. Ramírez-Rodríguez s.n.*, 14 June 2016 (SALA 158950).

### Results

*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* has been found on the Mines of Santo Adrião, in the region of Trás-os-Montes (Figure 1). The specimens collected on 14 June 2010 and 14 June 2016 were in bloom —early stage— (Figure 2a). On 22 July 2016, the population was visited again, and fructifying specimens were seen and collected (Figure 2b). The blooming period seems to be quite short, since it lasts about 4 weeks —from mid-June to mid-July.

The taxon is found on a very small area close to the Mines of Santo Adrião, which corresponds to the largest calcareous area in the northern Portugal. It lives in a holm-oak forest —*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.— in a good state of conservation, and is mainly found in bottoms and south-facing slopes. On the slate and granite zones that surround the limestone area, an extensive cork oak forest —*Quercus suber* L.— grows. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* is located on slopes orientated to the southwest, within cleared holm oak forests, at an altitude of 590 m a.s.l., occupying an approximate area of 735 m<sup>2</sup> —0.07 ha; 0.0007 km<sup>2</sup>— where 353 reproductive individuals were counted, with a rough error of the 15% in the direct counting. With *D. fissum* subsp. *sordidum* the following species could also be seen: *Quercus ilex* subsp. *ballota*, *Phillyrea angustifolia* L., *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Ruscus aculeatus* L., *Thymus mastichina* (L.) L., *Asparagus acutifolius* L., *Jasminum fruticans* L., *Vincetoxicum nigrum* (L.) Moench, *Ruta montana* (L.) L., *Melica ciliata* L., *Tamus communis* L., *Galium glaucum* L., *Allium sphaerocephalon* L., *Phagnalon saxatile*

(L.) Cass., *Sedum sediforme* (Jacq.) Pau, *Euphorbia falcata* L., *Reseda barrelieri* Bertol. ex Müll. Arg., *Ornithogalum pyrenaicum* L., *Briza maxima* L., *Hypericum perforatum* L., and *Helichrysum stoechas* (L.) Moench.



**Figure 1.** Distribution of *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* in the Iberian Peninsula and location of the first citation in Portugal —star symbol.

Although the Mines of Santo Adrião are integrated into Natura 2000 network as a Site of Community Importance —SCI— and Special Protection Areas for birds —SPA—, the area is nonetheless subject to different threats, v.gr., fire and, possibly, collecting due to its showy flowers. Due to its restricted area of occupancy and extent of occurrence, the small number of mature individuals, which might have inter-annual variation due to environmental fluctuations and its unique biology as occurs in other studied populations and the identified threats that it faces, *D. fissum* subsp. *sordidum* is to be considered “Critically Endangered” —CR B1ab(v)c(iv) + 2ab(v)c(iv);C2a(i,ii)b;D2— in Portugal.

Applying the regional criteria, the population is found approximately 30 km away from the closest population, and this does not make possible the genetic flow, pollination or seed dispersal events. Thus, the category was not moved up or down. Likewise, the current

status of *D. fissum* subsp. *sordidum* in the Iberian Peninsula does not vary in relation to the previously given for Spain —EN B2ab(v)c(iv);C2b.



**Figure 2.** *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*: **a**, inflorescence; **b**, infructescence (Mines of Santo Adrião; photos 14 Jun 2016).

## Discussion

*Delphinium* ser. *Fissa* is a group with oriental affinities. Several migration patterns can be recognized in the Iberian Peninsula according to Bocquet *et al.* (1978) during the Messinian period. *Delphinium bolosii* may have appeared by some biogeographical barrier — v.gr., Ebro River, allopatric speciation— or by variation in chromosomes —sympatric speciation— (Orellana *et al.*, 2007). Some populations of *D. fissum* subsp. *fissum* could have continued expanding to the western Peninsula and become differentiated as *D. fissum* subsp. *sordidum*. The Portuguese population increases its current distribution range to the western Iberian Peninsula (Figure 1).

With *D. fissum* subsp. *sordidum*, the number of recognized taxa —species and subspecies— of the genus in Portugal increases to 7, with only 2 perennial taxa, *D.*



*pentagynum* and *D. fissum* subsp. *sordidum*. In Spain, the main habitat of the taxon is constituted by formations of *Castanea sativa* Mill. —Hervás, Cáceres province— and *Quercus pyrenaica* Willd. —Linares de Riofrío, Salamanca province—, mainly on acidic soils. In the isolated population of Sierra Mágina —Jaén province—, it lives in communities dominated by thorny and spiky deciduous shrubs. Likewise, in Portugal, the population appears on the calcareous soils of a holm-oak forest.

The new population size, 353 reproductive individuals, implies that demographic stochasticity may not be relevant — $n > 50$ — (Menges, 1991; Lande, 1998). Environmental stochasticity should be taken into account, especially in studies related to pollination biology and reproductive success, because the closest population is approximately 30 km away, implying that the new population is, in fact, isolated. According to Ellstrand (1992), “most of the xenogamous threatened species that are separated by more than 10 km are not linked genetically through pollen flow”. On the other hand, the area has a high risk of being affected by wild fires, which might reduce the population size and deteriorate the habitat quality, creating functional barriers that could limit the availability of the pollinators that ensure outcrossing (Pisanu *et al.*, 2009).

The migration patterns of *D.* series *Fissa*, together with the small size of the populations, explain the low genetic diversity of the taxon, which can be considered depauperated (Orellana *et al.*, 2007). It would be advisable to clarify the taxonomy of the Iberian populations of this series —*D. bolosii*, *D. mansanetianum*, and *D. fissum* subsp. *sordidum*— using ETS/ITS markers (López-Pujol *et al.*, 2014).

Plant species survival can also be affected by anthropogenic threats. The collection of plants, especially of the remarkable or rare species, is a potential threat for all them. However, botanists have generally been careful with collecting activities, and these botanical tasks have had very positive results for species conservation, providing timely and accurate information (Aedo *et al.*, 2015). Moreover, we have not found evidences of herbivores, but we have observed it in other populations —v.gr., Linares de Riofrío and Sierra Mágina—. Fire is the main threat to consider, because it occurs frequently in Mediterranean ecosystems. For instance, in Villarino de los Aires —Salamanca province, Spain—, we have evidences that fire affected negatively the population during the summer of 2006 (Ramírez-Rodríguez *et al.*, unpubl.). We have not observed that an increase of the weed had a negative effect on





recruitment. On the contrary, the low recruitment of this species can be explained by its low survival rate of seedlings and saplings (Ramírez-Rodríguez *et al.*, unpubl.).

Habitat fragmentation has been shown as a critical factor for the loss of plant diversity, since it influences movement and dispersal of organisms, gene flow rates, and invasion by exotic plants, among many other factors (Heywood & Iriondo, 2003). Considering that it represents the only population currently known in Portugal, and its threat category is high, we propose to carry out intensive searches in the limestone environment of the Mines of Santo Adrião and the annual monitoring of the population, to make germination studies and apply conservation measures to avoid its extinction. We believe that a detailed study of the biology of *D. fissum* subsp. *sordidum* is necessary in order to implement a recovery plan in Portugal, as well as for the populations of Castile and Leon (Ramírez-Rodríguez & Amich, 2014). Likewise, it is interesting to continue the fieldwork directed to find new populations in the Iberian Peninsula.

### Acknowledgements

The authors thank the collaboration of the *Flora iberica* project (CGL2014-52787-C3-1-P) as well as the editor and two anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions which helped us to improve the manuscript. Moreover, we would like to express our gratitude to Sergio Fuentes and Javier García for their assistance in the field work.

### References

- Aedo, C., Medina, L., Barberá, P. & Fernández-Albert, M. 2015. Extinctions of vascular plants in Spain. *Nordic Journal of Botany* 33: 83–100.
- Ascaso, J. & Pedrol, J. 1991. De plantis vascularibus praesertim ibericis I. *Fontqueria* 31: 135–140.
- Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C. & Ortiz, S. (eds.). 2008. *Lista roja 2008 de la flora vascular española*. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal, Madrid.
- Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C. & Ortiz, S. (eds.). 2010. *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España. Adenda 2010*. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal, Madrid.



- Blanché, C. & Molero, J.** 1986. *Delphinium* L. Pp. 242–251 in: Castroviejo, S., Laínz, M., López González, G., Montserrat, P., Muñoz-Garmendia, F., Paiva, J. & Villar, L. (eds.), *Flora Iberica* 1. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Blanché, C.** 1990. *Delphinium* L. subgen. *Delphinium*: origin and evolutionary trends. *Collectanea Botanica* 19: 75–95.
- Blanché, C.** 1991. *Revisió biosistemàtica del gènere Delphinium L., a la Península Ibèrica i a les Illes Balears*. Institut d'Estudis Catalans. Arxius de la Secció de Ciències, n.º 98, Barcelona.
- Bocquet, G., Wilder, B. & Kiefer, H.** 1978. The messinian model –a new outlook for the floristics and systematics of the Mediterranean area. *Candollea* 38: 269–287.
- Ellstrand, N.C.** 1992. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos* 63: 77–86.
- Heywood, V.H. & Iriondo, J.M.** 2003. Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation* 113: 321–335.
- IUCN.** 2012. *Guidelines for application of IUCN Red List criteria at regional and national levels: version 4.0*. IUCN Species Survival Commission, Gland and Cambridge.
- IUCN.** 2017. *Guidelines for using the IUCN Red List Categories and criteria: version 12*. [<http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>].
- Jabbour, F. & Renner, S.** 2012. A phylogeny of Delphinieae (Ranunculaceae) shows that *Aconitum* is nested within *Delphinium* and that Late Miocene transitions to long life cycles in the Himalayas and Southwest China coincide with bursts in diversification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 928–942.
- Lande, R.** 1998. Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Researches on Population Ecology* 40: 259–269.
- López-Pujol, J., Bosch, M., Massó, S., Molero, J., Simon, J., Rovira, A.M. & Blanché, C.** 2014. *Estudi preliminar de variabilitat isoenzimàtica de Delphinium bolosii al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac*. Diputació de Barcelona, Barcelona.
- Malyutin, N.I.** 1973. The phylogeny and the taxonomy of the *Delphinium* L. genus. *Botanicheskii Zhurnal* 58: 1710–1722.



- Menges, E.S.** 1991. The application of minimum viable population theory to plants. Pp. 45–61 in: Falk, D.A. & Holsinger, K.E. (eds.), *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York.
- Orellana, M.R., López-Pujol, J., Blanché, C. & Bosch, M.** 2007. Genetic diversity in the endangered dysploid larkspur *Delphinium bolosii* and its close diploid relatives in the series *Fissa* of the Western Mediterranean area. *Biological Journal of the Linnean Society* 92: 773–784.
- Pisanu, S., Filigheddu, R. & Farris, E.** 2009. The conservation status of an endemic species of northern Sardinia: *Centaurea horrida* Badarò (Asteraceae). *Plant Biosystems* 143: 275–282.
- Pitarch García, R.** 2002. *Estudio de la flora y vegetación de las sierras orientales del Sistema Ibérico: La Palomita, Las Dehesas, El Rayo y Mayabona (Teruel)*. Serie Investigación n.º 38. Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón, Zaragoza.
- Ramírez-Rodríguez, R. & Amich, F.** 2014. Notes on rare and threatened flora in western-central Iberia. *Lazaroa* 35: 221–226.
- Sequeira, M., Espirito-Santo, M.D., Capelo, J. & Honrado, J. (coords.)**. 2011. *Checklist da Flora de Portugal (Continental, Açores e Madeira)*. Associação Lusitana de Fitossociologia, Lisboa.
- Simon, J., Bosch, M., Blanché, C. & Molero, J.** 1995. *Delphinium*. *Flora Mediterranea* 5: 323–331.
- Torres, N., Sáez, L., Rosselló, J.A. & Blanché, C.** 2000. A new *Delphinium* subsp. from Formentera (Balearic Islands). *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 371–377.
- Wang, W.T.** 1962. Critical review of the genus *Delphinium* from the Ranunculaceae Flora of China. *Acta Botanica Sinica* 10: 87–282.



## SEGUNDO CAPÍTULO

“Habitat distribution modelling, under the present climatic scenario, of the threatened endemic Iberian *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) and implications for its conservation”





**Modelización de la distribución del hábitat, bajo el actual escenario climático, del endemismo Ibérico amenazado *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) e implicaciones para su conservación**

Juan Diego Rus, Rubén Ramírez-Rodríguez, Francisco Amich & Manuel Melendo-Luque

*Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* (2018) 152 (5): 891–900. doi: 10.1080/11263504.2017.1359214

Factor de Impacto (2017): 1.203



**Resumen**

Se modela el hábitat potencial de una especie amenazada *D. fissum* subsp. *sordidum*, un hemicriptófito endémico con distribución disyunta en la Península Ibérica. Maxent se utilizó para predecir la idoneidad del hábitat de la subespecie relacionando información de la distribución basada en muestras de campo con variables ambientales y topográficas. Nuestros resultados sugieren que el modelo funcionó bien, prediciendo con gran exactitud la distribución actual de la especie. Las variables que más contribuyeron al modelo fueron la temperatura media del trimestre más húmedo, la precipitación del trimestre más cálido, el rango de temperatura anual y la pendiente. Estas variables poseen un significado biológico para el taxon, ya que tienen una influencia decisiva en las etapas críticas de germinación y fructificación. Las áreas de distribución actuales y potenciales identificadas por el modelo se encuentran principalmente en regiones con algún grado de protección medioambiental, con algunas excepciones. Un plan de recuperación para la especie debería ser considerado. Los modelos de distribución de especies no pueden sustituir los programas de seguimiento a largo plazo, sin embargo es una herramienta útil para identificar áreas apropiadas de presencia del taxon, y así permitir un uso eficiente de los recursos económicos y humanos.







## Habitat distribution modelling, under the present climatic scenario, of the threatened endemic Iberian *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) and implications for its conservation

Juan Diego Rus<sup>a</sup>, Rubén Ramírez-Rodríguez<sup>b</sup>, Francisco Amich<sup>b</sup> and Manuel Melendo-Luque<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén, Jaén, Spain; <sup>b</sup>Evolution, Taxonomy and Conservation Group (ECOMED), Department of Botany, University of Salamanca, Salamanca, Spain

### Abstract

We modelled the potential habitat of a threatened species *D. fissum* subsp. *sordidum*, an endemic hemicryptophyte with a disjunct distribution in the Iberian Peninsula. Maxent was used to predict the subspecies habitat suitability by relating field sample-based distributional information with environmental and topographic variables. Our results suggest that the model performed well, predicting with high accuracy the current distribution of the species. The variables that most contributed to the model were Mean Temperature of Wettest Quarter (MTWtQ), Precipitation of Warmest Quarter (PWmQ), Temperature Annual Range (TAR) and Slope (Slo). These variables are biologically significant for the *taxon*, as they have decisive influence in the critical stages of germination and fruiting. The current and potential distributional areas identified by the model fall mainly in regions with some degree of environmental protection, with some exceptions. A recovery plan for the species should be considered. Species Distribution Modelling cannot substitute long-term monitoring programmes, yet it is a useful tool for identifying appropriate areas of *taxon* occurrence, and thus allow for efficient use of the economic and human resources.

**Keywords:** Disjunct distribution area; endangered species; habitat suitability; Maxent; species distribution models; small sample size.

### Introduction

Patterns of species distribution, both on a temporal and spatial scale, are the result of historical, biological and ecological factors. The loss of biodiversity has increased in recent times, caused directly or indirectly by humans through habitat loss and fragmentation, overexploitation, the spread of invasive species and diseases, contamination and climate change (Soule, 1991). Humans may have been accelerating the rate of extinction by 100 to 1000



times the natural rate (Ricketts *et al.*, 2005), and many argue that we may be entering the Earth's 6th extinction event (Barnosky *et al.*, 2011).

Rare and endangered species are increasingly being given high priority by world conservation agencies (IUCN, 2014), and they are included into long-term goals for conservation programmes, such as identifying critical biological community or areas particularly in need of protection (Brooks *et al.*, 2002). Most species in danger of extinction are either ecologically unique or highly habitat-restricted. Conservation biology has been searching for tools to answer three fundamental questions: What, Where and How to preserve (Primack, 2006). One tool that attempts to answer these questions is Species Distribution Modelling (SDM), which predicts the distribution of potential suitable habitat for a target species by relating species occurrences to biophysical and environmental conditions in the study area (Guisan & Zimmermann, 2000).

This technique, whose use has increased in the recent years (Elith *et al.*, 2006) is being widely used in many ecological applications, for example, to locate new populations of rare and threatened species (Williams *et al.*, 2009; Babar *et al.*, 2012), to predict spatial patterns of biological invasions (Thuiller *et al.*, 2005) and endemic species habitat (Alfaro-Saiz *et al.*, 2014), to evaluate potential effects of global change in species distribution (Rocha *et al.*, 2012), to identify protected areas for species and developing effective conservation measures (Cabeza *et al.*, 2004), and to prioritize areas for reintroduction of threatened species (Martínez Meyer *et al.*, 2006; Adhikari *et al.*, 2012).

A variety of species distribution modelling methods is available to predict potential suitable habitat for a species. Comparatively, few predictive models have been used for rare and endangered plant species (Williams *et al.*, 2009) and there are fewer examples of studies using small samples sizes (Pearson *et al.*, 2007). Most species distribution modelling methods are sensitive to sample size (Wisz *et al.*, 2008). Maxent is a machine-learning method (Phillips *et al.*, 2006), which has been shown to outperform other methods and has consistently high accuracy even when limited species occurrence data are available (Elith *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2006). For this reason, it was chosen for this study. Most other methods require large numbers of presence points (Guisan *et al.*, 2006) and thus cannot accurately predict habitat distribution patterns for threatened and endangered species. Model results should be interpreted as a spatial distribution of the fundamental niche of the species



(Zaniewski *et al.*, 2002). In reality, additional factors not considered in these models (including biotic interactions, geographic barriers and history) mean that species rarely occupy all areas with suitable environments (Araújo & Pearson, 2005).

The aims of this study were to: (1) model the potential habitat of the Iberian endemic *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*, (2) identify the environmental factors associated with its habitat distribution and (3) provide information for biodiversity management in order to discover new populations, prioritize conservation sites and identify potential restoration sites.

## Materials and methods

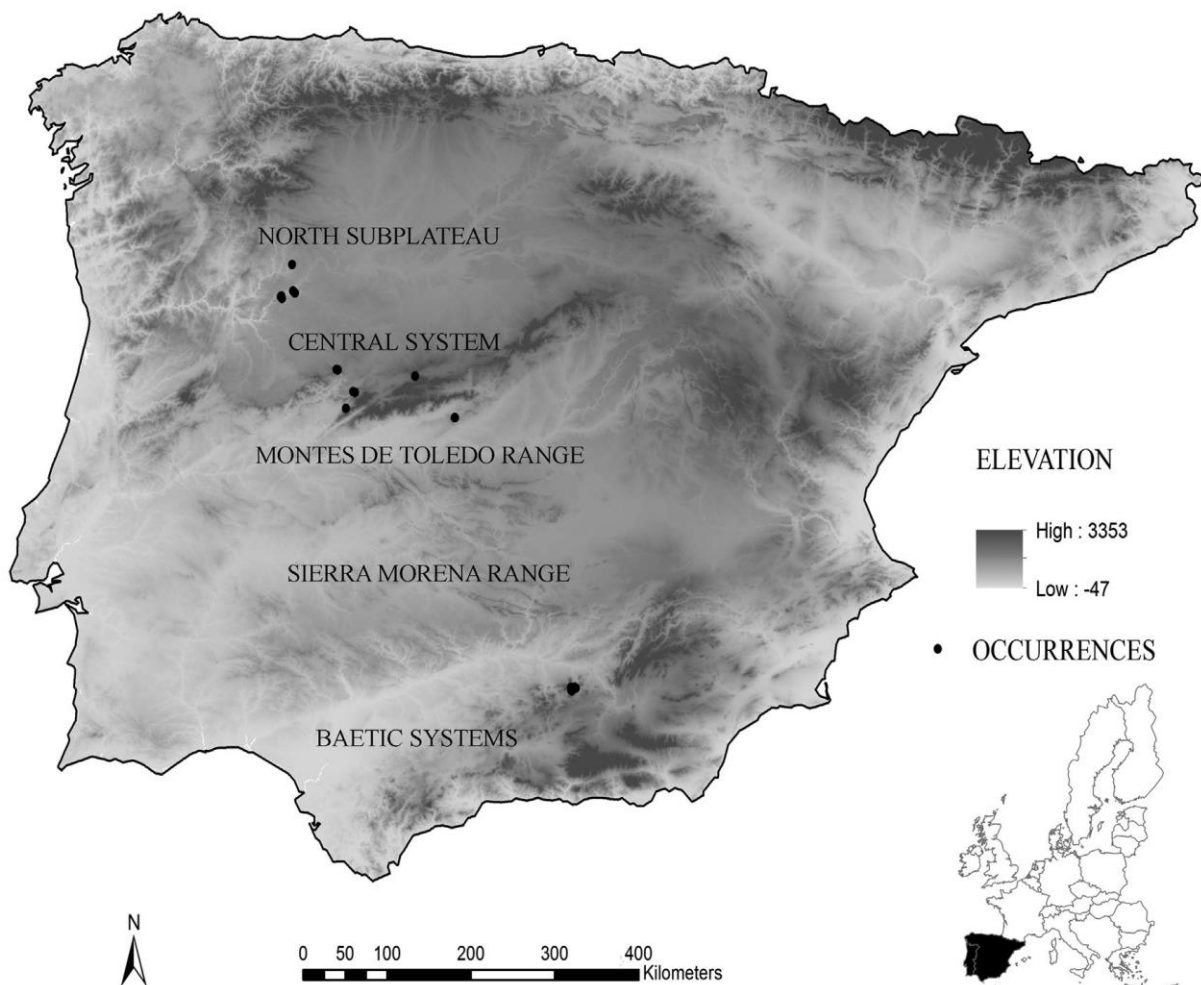
### *Study species*

*Delphinium fissum* Waldst. and Kit subsp. *sordidum* (Cuatrec.) Amich, E. Rico and J. Sánchez (Ranunculaceae) is a rhizomatous hemicryptophyte that develops a rosette of palmatisect leaves at the end of winter and early spring. It grows a flowering stem (June–July) and only forms a dense inflorescence during summer (20-80 zygomorphic blue-violet flowers). Fructification occurs in the summer months (July–August), and seed dispersal starts in late August and this period extends until well into September. At the end of fructification, the aerial part dries out and the rhizome remains in a latent state, dormant until the following spring, coinciding with the rainy season.

It is a restricted endemic of the central-western Iberian Peninsula, with a distant population in the Sierra Mágina (Jaén Province) (Figure 1); it occurs between 400 m (Sanchez-Rodriguez, 1986) and 1800 m of altitude (Cuatrecasas, 1929; Gomez Mercado *et al.*, 1997) and is integrated in different types of plant communities, both in chestnut forests (Amich *et al.*, 1981), oak forests (Rico, 1985), climatophilous holm-oak forest (Sanchez-Rodriguez, 1986) and open areas between shrubs (Gomez Mercado *et al.*, 1997; Amich *et al.*, 1981). The *taxon* is included in the Red List of Spanish Vascular Flora 2008 (Moreno, 2008) and Adenda 2010 (Bañares *et al.*, 2010) under the category EN (B2ab(v)c(iv); C2b), due to its small range, area of occupancy, population size and small number of mature individuals. In the regional catalogues of threatened flora, it is listed in different categories: “In danger of extinction” in the Catalogue of Protected Flora in Castile and Leon (BOCYL, 2007), “Special Interest” in the Regional Catalogue of Threatened Species of Extremadura (Spain) (DOE, 2001) and as “Vulnerable” in the Andalusian Catalogue of Threatened Species (BOJA, 2012).

### Study area

The study area corresponds to the Iberian Peninsula, which is located in the south-west of the European continent (Figure 1). This territory has a great bioclimatic and biogeographic heterogeneity (Rivas-Martinez *et al.*, 2002). The north and north-west areas have a temperate climate. Most of the Iberian Peninsula has a Mediterranean climate, characterized by a dry summer with at least two very hot months with no rainfall or very scarce rainfall. All known localities of the studied *taxon* are found under this type of climate.



**Figure 1.** Study area and occurrence points of *D. fissum subsp. sordidum*.

The main geographic units of the Iberian Peninsula where the *taxon* is found are (Figure 1): (1) the northern sub-plateau, especially the protected area of the Arribes del Duero Natural Park whose lithological, geomorphological and bioclimatic characteristics were described by Amich *et al.* (2004) and the Site of Community Importance (SCI) of the Mines of Santo Adrião (Ramirez-Rodriguez *et al.*, 2017); (2) the Central System, where we focused



on the Sierra de Francia, Sierra de Ávila, Sierra de Béjar and Sierra de San Vicente, is characterized by the presence of holm-oak forest, oak forest and cork oak forest depending on rainfall and aspect (Canto, 2007); and finally, (3) Baetic Systems (Sierra Mágina) with the meso and supramediterranean belts which are dominated by holm-oak and oak forest, respectively, and the oromediterranean belt where grow dense thorny deciduous shrubs, pulviniform shrubs and grassland (Gomez Mercado *et al.*, 1997).

### ***Occurrence data***

We collected point locations for *D. fissum* subsp. *sordidum* from several sources (Amich *et al.*, 1981; Rico, 1985; Sánchez-Rodríguez, 1986; Blanché, 1991; Mateo & Pisco, 1993; Gómez Mercado *et al.*, 1997; Ramírez-Rodríguez & Amich, 2014; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2017) and from the following Iberian herbariums (abbreviations according to Index Herbariorum; Thiers, 2010 (continuously updated)): GDA, MA, SALA and SEV. Localities were visited since 2014, and we can confirm all populations except the Fermoselle population (Zamora Province). The population of Corduente (Guadalajara Province) was not included in this study since studies which are currently being carried out seem to identify that this is in fact a *D. bolosii* population (Medina *et al.*, unpub. data). These data have been supplemented with additional records derived from an intense sampling in other areas. We recorded geographical location in a 1×1 km UTM grid (using Garmin e-map GPS device) matching the pixel resolution of the environmental variables being used as recommended by Guisan & Thuiller (2005). We obtained 49 presence records, although these correspond only to 24 at the defined grid resolution. We assume that this is the distribution of the *taxon*, although we do not rule out the existence elsewhere of populations that have so far not been found, mainly due to the difficulty of detecting the subspecies due to their scarcity (usually seen in small groups of a few individuals) and/or the predation of inflorescences, circumstances that make it inconspicuous.

### ***Environmental variables***

As potential predictors of the distribution of *D. fissum* subsp. *sordidum*, we considered 19 bioclimatic variables and one topographic variable (elevation) from the WorldClim database (Hijmans *et al.*, 2005; available at <https://www.worldclim.org>). From the elevation variable, three topographic variables (aspect, hillshade and slope) were calculated with the ArcGIS 10.3.1 (ESRI, Redlands, California, USA). Analyses were conducted at the native 30''



( $\sim 1 \times 1$  km pixels) spatial resolution of the environmental data-sets using R packages “Dismo” (Hijmans *et al.*, 2016) and “raster” (Hijmans, 2015). The multicollinearity was evaluated using Pearson Correlation Coefficient ( $r$ ) to examine the cross-correlation (Appendix 1, see online Supplemental Data). If two variables had  $|r| \geq 0.7$ , the variable with the best fit to the data was used in the model, in other words, the variable with the best gain was used (Gogol-Prokurat, 2011).

One of the objectives of the study was to understand how each of the chosen environmental variables influenced the presence of the modelled species. The jack-knife method was used to assess variable importance. Maxent’s jack-knife test of variable importance can be used to evaluate the relative strengths of each predictor variable. The training gain was calculated for each variable alone as well as the drop in training gain when the variable is omitted from the full model (Phillips *et al.*, 2006).

### ***Maxent***

Maxent is a general-purpose method for characterizing probability distributions from incomplete information and has been applied in species distributions modelling (Phillips *et al.*, 2006). It focuses on fitting a probability distribution for occurrence of the species in question to the set of pixels across the study region based on the idea that the best explanation to unknown phenomena will maximize the entropy of the probability distribution, subject to the appropriate constraints. Maxent produces a continuous output of habitat suitability values that range from 0 to 1, where 0 is the lowest suitable and 1 is the most suitable. We used Maxent v. 3.3.3 to create the model (<https://www.cs.princeton.edu/~shapire/maxent>). In general, we have used the configuration values recommended for Maxent (for details see Phillips *et al.*, 2006; Elith *et al.*, 2011; Merow *et al.*, 2013): 500 as the maximum number of iterations, the convergence threshold at 0.00001, regularization value at 1, and the choice of the output characteristics “Autofeature”. However, we defined 150,000 as the maximum number of background points due to the extent of the chosen area (Pearson *et al.*, 2007).

### ***Model evaluation***

A simple way to evaluate confidence of model is comparing the predicted presences and absences with real absences and presences; thus the proportion of incorrectly classified cases by the model was measured. We used the jack-knife methodology developed by Pearson



*et al.* (2007), which is the best way for sample sizes of 25 or less. Using this approach, one locality point was removed from the data-set, and the model built using the remaining  $n-1$  localities. Thus, for a species with  $n$  localities,  $n$  individual models were built for testing, finally taking the middle model. To assess model discriminatory power for each prediction, we computed the area under the curve (AUC) of the receiver-operating characteristic (ROC) (Fielding & Bell, 1997). We evaluate how well model predictions discriminate between locations where observations are present and absent, which is one of the most widely used threshold independent evaluators of model discriminatory power (Elith *et al.*, 2006). The AUC value is comprised between 0 and 1 and is determined by comparing the false positives proportion (1-specificity) and true positives proportion (sensitivity). These values should be close to 1 indicating no commission error (100% specificity) and no omission error (100% sensitivity). Although it may not be sufficient, a low omission rate is a necessary condition for a good model (Anderson *et al.*, 2003). AUC values greater than 0.9 indicates that the model has high accuracy (Lobo *et al.*, 2008) and values lower than 0.5 indicate that the model is worse than a random model. The AUC value is sensitive to the size of the study area; hence we calculated this value for the study area, Iberian Peninsula, and also for the Minimum Convex Polygon (MCP) of presence points.

### ***Model outputs and threshold selection***

Firstly, we chose the logistic output, and we used it as an estimation of a relative Habitat Suitability Index (HSI) between zero and one (Phillips & Dudík, 2008). When using the model for conservation plans of existing populations, these values of suitability should be considered as persistence probabilities (Araújo & Williams, 2000). The final maps and output (in ASCII format) was input into ArcGIS as floating-points grids (Peterson *et al.*, 2007).

To survey for new populations, we selected the cumulative output (Yackulic *et al.*, 2013), with values of probabilities between 0 and 100%. We have considered two thresholds, to generate binary maps of presence/absence. Considering that we have few presence points, the identification of the *taxon* is clear and localities have been accurately georeferenced, the first threshold chosen was the “lowest presence threshold” (LPT). The LPT is a conservative method used to identify the predicted minimum area while maintaining an omission error of 0 in the training data-set; it is also appropriate for identifying unknown distribution areas (for details see Pearson *et al.*, 2007). The second more restrictive threshold was 60% of



probability of presence. This is an arbitrary threshold but previous studies have shown that this value determines areas with high potential for the species (e.g. Yang *et al.*, 2013), as well as in studies of the *taxon*.

To propose suitable areas for introductions of the *taxon*, if necessary, we used the logistic output of the model, establishing as threshold the value that maximizes the sensitivity plus the specificity (Liu *et al.*, 2005). However, to calculate this threshold, we did not use the total study area, but the Minimum Convex Polygon (MCP) of the presence points. Based on this threshold, we generated a binary map of presence/absence for the Iberian Peninsula. Finally, we superimposed the final map with the network of protected areas.

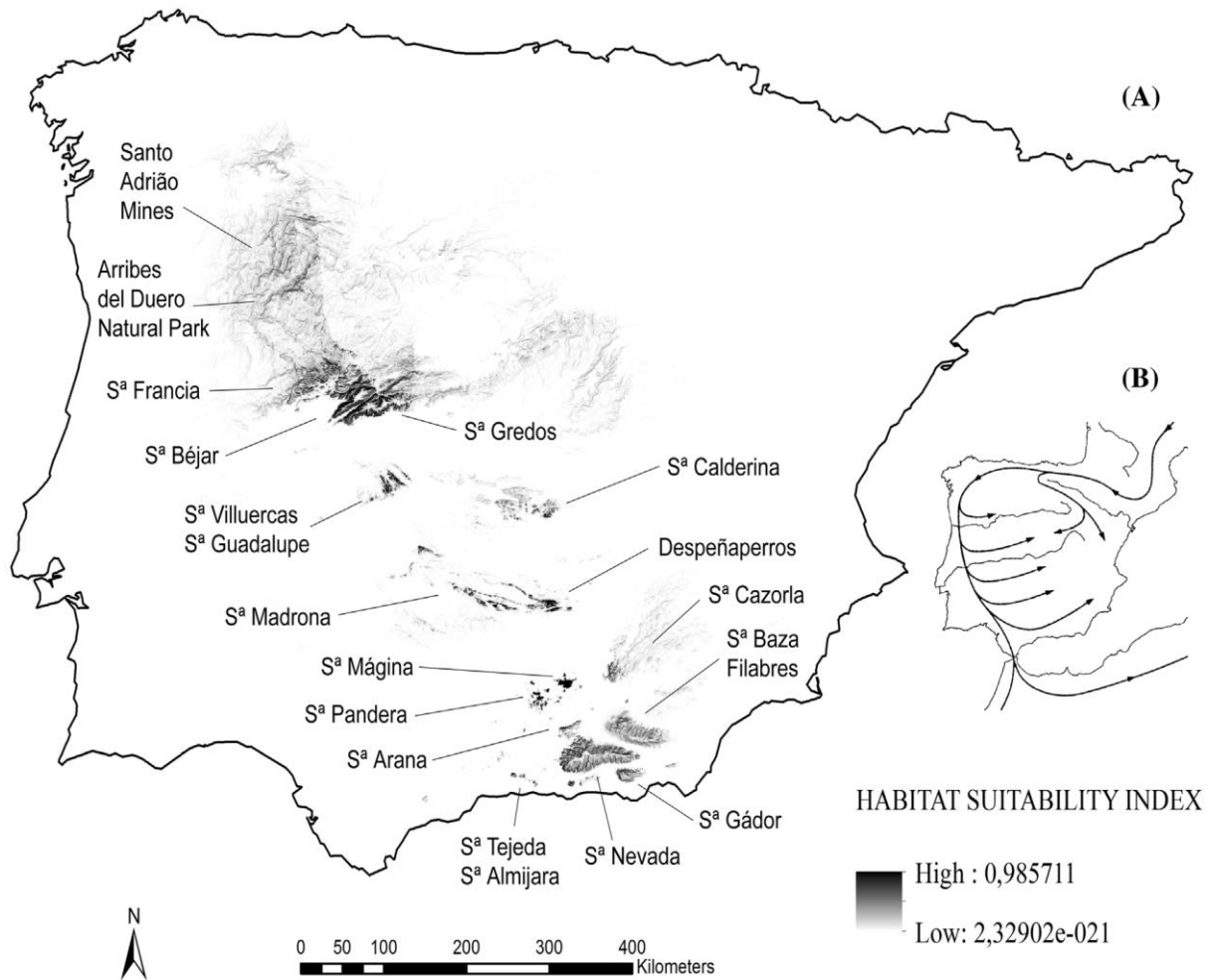
## Results

### *Potential distribution area*

The model identifies the main mountain ranges in the centre and south of the Iberian Peninsula as potential distribution areas of *D. fissum* subsp. *sordidum* (Figure 2). According to the resolution used, the present distribution surface is 15.88 km<sup>2</sup>. However, the potential distribution surface with a medium-high probability of suitable habitat (i.e. 0.6–1) is 920.48 km<sup>2</sup> distributed in the northern sub-plateau (1.32), Central System (501.61), Baetic Systems (212.42), Montes de Toledo Range (60.21) and Sierra Morena Range (144.92). In the first three areas, the potential distribution is much higher than the current distribution while in the last two we do not yet know any population.

The ROC analysis indicated that the model had a high predictive accuracy compared to the expected value (0.5) from a random prediction. The value of AUC was  $0.981 \pm 0.033$  for *D. fissum* subsp. *sordidum* in the studied area (Iberian Peninsula). The value of AUC considering only the minimum convex polygon area was also reasonably high,  $0.925 \pm 0.108$ .





**Figure 2.** A: Predicted habitat suitability for *D. fissum* subsp. *sordidum* using Maxent. B: Migratory lines of orophile plants in the Western Mediterranean during the late Miocene, according to Messinian model (proposed by Bocquet *et al.* (1978)).

### ***Environmental analysis***

Jack-knife analysis indicates that Mean Temperature of Wettest Quarter (MTWtQ), Temperature Annual Range (TAR), Precipitation of Warmest Quarter (PWmQ) and Slope (Slo) are the variables that provide the highest gain to the model (Table 1). The environmental variable that decreases the gain most when it is omitted is PWmQ. The additional variables selected for the model after the multicollinearity test were the Precipitation of Coldest Quarter (PCdQ) and Hillshade (Hil).

The model response curves in respect to these variables (Figure 3) indicate that the most suitable areas for the *taxon* are those that have high climatic contrast between the hottest and driest season (summer) and the coldest and wettest season (winter), with the average



temperature for this last season approximately 4 °C. Moreover, they are medium slope and a little hillshade areas in which exist a certain amount of precipitation during the warm quarter.

**Table 1.** Environmental variables used in this study and its percentage contribution to the model.

Code	Environmental variables	Unit	% Contribution
Bio1	Annual mean temperature	°C	
Bio2	Mean diurnal range (mean of monthly max. and min. temp.)	°C	
Bio3	Isothermality ((Bio2/Bio7)×100)	-	
Bio4	Temperature seasonality (standard deviation × 100)	C of V	
Bio5	Maximum temperature of warmest month	°C	
Bio6	Minimum temperature of coldest month	°C	
<b>Bio7</b>	<b>Temperature annual range (Bio5-Bio6)</b>	°C	25.7
<b>Bio8</b>	<b>Mean temperature of wettest quarter</b>	°C	26.2
Bio9	Mean temperature of driest quarter	°C	
Bio10	Mean temperature of warmest quarter	°C	
Bio11	Mean temperature of coldest quarter	°C	
Bio12	Annual precipitation	mm	
Bio13	Precipitation of wettest month	mm	
Bio14	Precipitation of driest month	mm	
Bio15	Precipitation seasonality (CV)	C of V	
Bio16	Precipitation of wettest quarter	mm	
Bio17	Precipitation of driest quarter	mm	
<b>Bio18</b>	<b>Precipitation of warmest quarter</b>	mm	22.1
<b>Bio19</b>	<b>Precipitation of coldest quarter</b>	mm	2.7
Ele	Elevation	m	
<b>Slo</b>	<b>Slope</b>	%	21
Asp	Aspect	Degrees	
<b>Hil</b>	<b>Hillshade</b>	Radians	2.3

Note: The highlighted variables, selected through multicollinearity test, were used in modelling.

### *Areas for populations survey and introductions*

Potential areas to survey for new populations of *D. fissum* subsp. *sordidum*, according to the model are shown in the Figure 4. When we used LPT as threshold, the map indicates very extensive areas of the northern sub-plateau and Central System especially, but also areas of the Montes de Toledo and Sierra Morena Ranges, and Baetic Systems. With the 60% of the probability of presence, the potential survey areas are reduced to some enclaves in the Central



System; high parts of the Montes de Toledo and Sierra Morena Ranges; and Sierra Mágina, Sierra La Pandera and western enclaves of Sierra Nevada in Baetic Systems.

Figure 5 shows suitable areas for introductions and translocations of the *taxon*, if necessary. This map includes the areas mentioned previously in Figure 4, and additional areas: Arribes del Duero Natural Park, Eastern Montes de Toledo Range, and several enclaves of the Baetic Systems. With few exceptions (e.g. Sierra La Pandera), the remaining of the potential areas for introduction are included in protected areas (Figure 5).

## Discussion

One important application of species distribution models refers to their ability to predict the potential areas of occurrence for rare and threatened species (Pearson *et al.*, 2007). However, a thorough assessment of model fit and an understanding of the limitations of these models are necessary to prevent misapplication of model results and prevent errors during habitat prioritization and conservation planning (Gogol-Prokurat, 2011). In our study of *D. fissum* subsp. *sordidum*, the model had high predictive accuracy and AUC values in the 0.981 range, which is sufficiently accurate for conservation planning applications. This AUC value may be overestimated when large studies areas are considered. Nevertheless in our study, when the AUC value was calculated for the artificial minimum convex polygon of presence points, we also had a very high value, above 0.9. Although some studies question the reliability of this method (Lobo *et al.*, 2008), it is a good tool to evaluate models for the same species and within the same geographic extent (Fielding & Bell, 1997).

The potential habitat distribution map for *D. fissum* subsp. *sordidum* shows the range of all theoretical possibilities in which the species could live (Soberón & Peterson, 2005). The SDM indicates that potential distribution of *D. fissum* subsp. *sordidum* has a larger extent than the current one, which is fragmented between the main central and southern mountain ranges of the Iberian Peninsula. These results are congruent with the Messinian model proposed by Bocquet *et al.* (1978) of migration of orophile elements in the western Mediterranean during the late Miocene.

The areas with greatest suitability habitat focus in four zones: Central System (Sierra de Francia, Sierra de Béjar and Sierra de Gredos), western of the Montes de Toledo Range (Sierra de Guadalupe and Sierra Las Villuercas), Sierra Morena Range (surroundings of



Despeñaperros) and some areas of the Baetic Systems as Sierra Mágina, Sierra La Pandera and Sierra Nevada. Of these, the first zone has the greatest extent. It is precisely in this area of the Central System where the most recent populations have been discovered (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2016). The interpretation of the model requires a nuanced approach. There are areas with a medium habitat suitability which might have been underestimated. This is the case in the Arribes del Duero Natural Park, which has several microclimates or mesoclimates (Calonge Cano, 1990).

On the other hand, the populations of *D. fissum* subsp. *sordidum* live at higher elevations when further south. Thus, in Sierra Mágina it is clearly an orophile *taxon*, with all its populations about 1800 m a.s.l. Therefore, areas with medium-high suitability such as the several ranges of the Baetic Systems are isolated by large depressions that could act as important dispersal barriers to species.

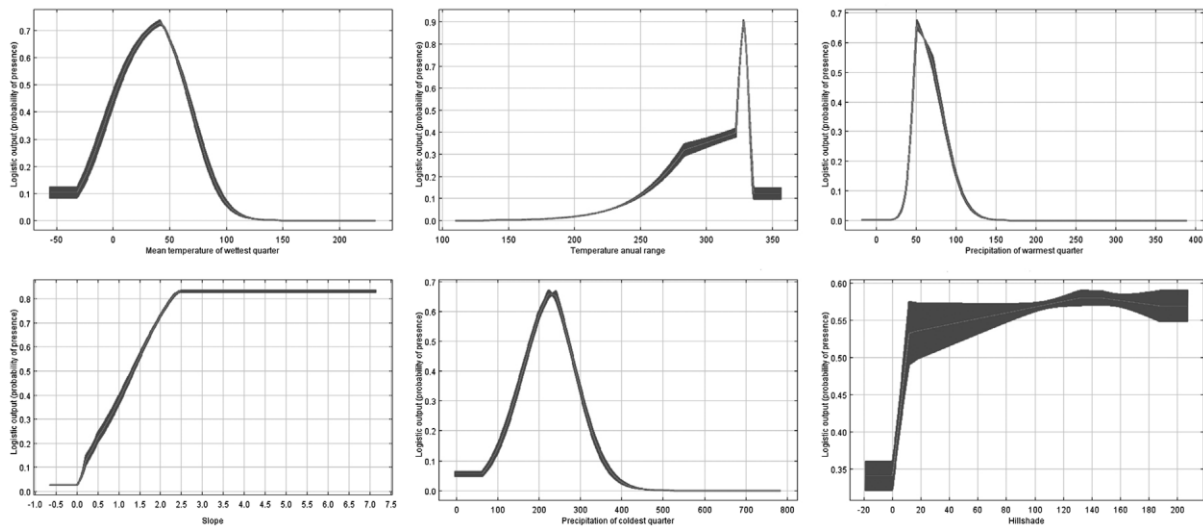
One of the most relevant aspects in the distribution of the species is its dispersal ability and the existence of the geographical barriers. Seed dispersal in *D. fissum* subsp. *sordidum* occurs by boleochory. The seeds have not specific adaptations for dispersal and remain mature within erect follicles, which open by the ventral suture. When the wind or the animals rustle the long scape, the seeds are thrown a few metres from the mother plant. However, the species may have sporadic events of long-distance seed dispersal in which domestic and wild herbivores are involved (Melendo, unpublished data). Even so, the orophile zones of the Baetic Ranges are separated by depressions and valleys with an elevational difference that makes them important barriers for the dispersal of this *taxon*.

The variables that most influence in the potential distribution of *D. fissum* subsp. *sordidum* are: MTWtQ (Mean Temperature of Wettest Quarter), PWmQ (Precipitation of Warmest Quarter), Temperature Annual Range (TAR) and Slo (Slope). In order to interpret and evaluate the model adequately, it is necessary to relate these results with the biology and ecology of the species.

The seeds of *D. fissum* subsp. *sordidum* have some level of morphophysiological dormancy (MPD), because it belongs to the primitive family (Ranunculaceae), hence it requires low temperatures to be able to break from dormancy (MPD) and favour the suitable development of the embryo (Herranz *et al.*, 2010). Germination tests carried out in the laboratory indicate that the optimal conditions to artificially break the seed latency are 4–5 °C



during three months (cold stratification) (Melendo & Rus, unpublished data). This is precisely why the response curve of the model for the MTWtQ variable has its maximum in this value.



**Figure 3.** Response curves for environmental variables used as predictor variables in the ecological niche model for *D. fissum* subsp. *sordidum*.

The *taxon* is especially sensitive to very hot and dry seasons (Blanche, 1991; Bosch, 1997), particularly in the blooming and fruiting stage, which coincides with the warmest quarter (summer). According to our observations over several years, it is very important that during the development of the floral scape there is some rain, usually as a storm, so that the scape finishes its growth and the fruiting is successful. In summers that are too dry, leaves wither, the plant stops growing and does not bloom; in the case that individuals have begun blooming the plants maintain the structure without producing fruits. According to the model, which is congruent with these observations, the PWmQ variable has great significance and indicates that precipitations in this season should be approximately 50 mm.

The importance of the TAR variable is due to the fact that *D. fissum* subsp. *sordidum* is a continental Mediterranean *taxon*. All known populations and potential areas of the model are located in areas of the Iberian Peninsula which have a much contrasted Mediterranean climate, with a high range between the maximum temperature of the warmest month and the minimum of the coldest month higher than 30 °C. In the Iberian Peninsula, this continentality is found at higher elevations when latitude is lower. The most northern populations of *D. fissum* subsp. *sordidum* are found at elevations between 400 and 500 m, while the most southern populations are found at elevations of 1750–1850 m.



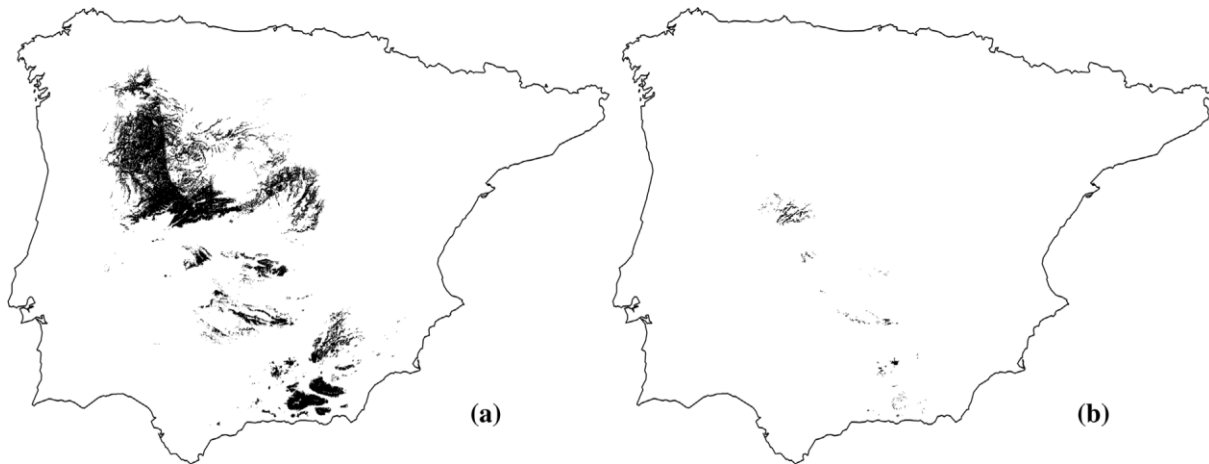
The slope variable is important in the model because it is a mountain *taxon* with preference for spatially heterogeneous areas. In these environments, the species finds refuge on humid and shady slopes, edge of dolines, forest and shrubland that reduce the insolation and maintain the water balance in the dry season.

Some of the limitations of the Species Distribution Model (SDM) are related to the choice of predictor variables. In our case, we have used bioclimatic and topographic variables. We have not worked edaphic, geological and phytocenotic variables for two reasons: the first is the lack of a thematic cartography compatible with the resolution used in this study; but the second and most relevant reason is that *D. fissum* subsp. *sordidum* is not strongly affected by soil or substrate type and can grow on a great diversity of plant communities. The variables that are related to the biotic interactions a priori do not seem to be relevant for the model. For example, the *taxon* is pollinated by generalist, such as medium and small-sized Lepidopterans (especially *Gonepteryx spp.*), Sphingid moths (especially *Macroglossum stellatarum*), several species of the genus *Bombus*, Fam. Bombilidae, Fam. Syrphidae, etc. (Bosch, 1997; Melendo *et al.*, unpublished data).

The results of this study can be applied in the management and conservation of this threatened endemic *D. fissum* subsp. *sordidum*. One possibility is to survey and locate unknown populations. For this purpose, LPT has been used as threshold in several previous works (e.g. Fois *et al.*, 2015). In our case, with a comparatively more large area, it does not seem advisable. The potential areas to survey for new populations of *D. fissum* subsp. *sordidum* according to this threshold are so extensive that the effort would not be viable in the practice. Even with the restricted map of the Figure 4(a) for example removing areas which are well prospected as Sierra Nevada (Lorite, 2016), a complete survey with limited human, economic and temporal resources would not be viable. On the other hand, with a more restrictive threshold that ensures a high probability of presence, in our case 60%, we obtain a selection of enclaves whose survey is feasible (Figure 4(b)). Obviously, there may be populations of the *taxon* in places with a low presence probability which we would not detect with this threshold. However, it could be beneficial to establish survey priorities. Taking into account this threshold and the degree of floristic knowledge of the different zones of the study area (Galicia & Moreno, 2000), new populations surveys should prioritize “Las Villuercas” of the Montes de Toledo Range, region of “Despeñaperros” in Sierra Morena Range and Sierra La Pandera in Baetic Systems, besides continuing with the research of the Sierra de Francia,



Sierra de Béjar and Sierra de Gredos (Central System), where the most recent populations have been discovered (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2016).



**Figure 4.** Potential areas for the survey of new populations of *D. fissum* subsp. *sordidum* according to two thresholds: lowest presence threshold (LPT) (a) and restrictive threshold of 60% of probability of presence (b).

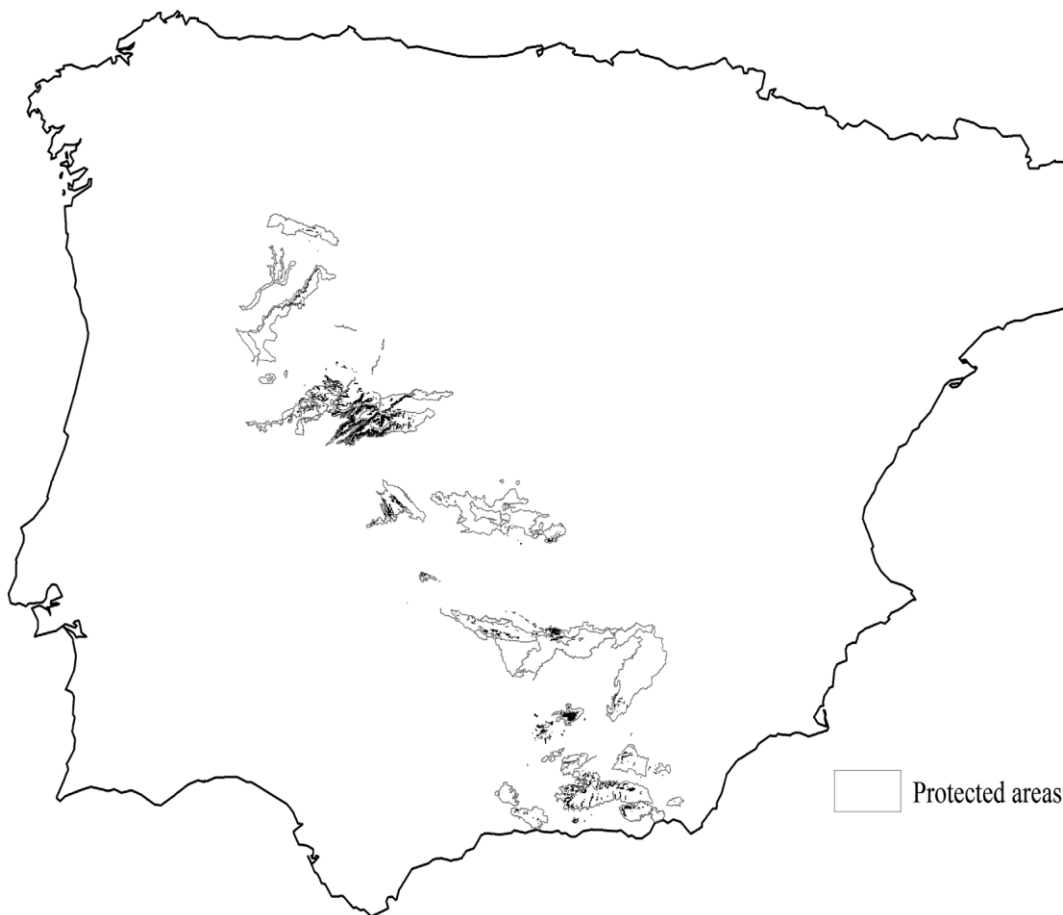
Another application of this study is in management of *D. fissum* subsp. *sordidum*, such as identifying regions for introductions or translocations, if necessary. According to IUCN (2013), species with small populations, in demographic regression or with high extinction probability, have priority when deciding on translocations. In *D. fissum* subsp. *sordidum*, the small population size, habitat fragmentation and the subsequent geographic isolation of populations would induce the biogeographic island effect and reduce genetic diversity (Orellana *et al.*, 2007) and would the trend would lead to extinction if no conservation strategies are implemented.

Suitable translocations or introductions areas for *D. fissum* subsp. *sordidum* coincide in many cases with areas selected for surveying new populations, as previously mentioned. To these areas, we add others such as Arribes del Duero Natural Park, Sierra Madrona and several enclaves of the Baetic Ranges. In general, all these areas are included in some protected area, which is an important influence factor to guarantee the persistence of the population with time (Godefroid *et al.*, 2011). An exception is the Sierra La Pandera in the Baetic Systems which is an area with good prospects for both introductions and for the surveying populations but which does not have sufficient legal protection.

Beyond the suitability and protection of the habitat, there are many other factors that influence the success of the translocation and introduction of a threatened species, especially



the origin and genetic diversity of the material (Gordon, 1994). We must also ensure that threats faced by the species are sufficiently reduced, identifying possible benefits and negative impacts, and taking into account the ecological, social and economic aspects of the territory where the species will be introduced. For instance, in the case of the studied *taxon*, a threat that seriously affects some known populations in Linares de Riofrío (Salamanca Province), Villatoro (Ávila Province) and Sierra Mágina (Jaén Province) is the excess of domestic herbivores which eat the flower scape and do not allow fruiting.



**Figure 5.** Suitable translocations or introductions areas for *D. fissum* subsp. *sordidum* (in black) and related protected areas.

Thus, we believe that there is an urgent need for a Recovery Plan for this species. This Plan should include not only surveys for new populations and the assessment of introductions, but also *in situ* measures, such as restricting herbivores access to populations, and *ex situ* measures such as storing seeds in germplasm banks. Some of these measures have been partially implemented at regional level, but have not been implemented at a global level for the species. It is also necessary to continue and widen genetic, demographic, reproductive and





environmental studies that are under way if we do not want to fail in the recovery plans (Heywood & Iriondo, 2003).

In conclusion, SDM cannot replace fieldwork intended to collect more distributional data, but can be a useful tool for data exploration to help identify potential knowledge gaps in species with disjunct distribution and can direct fieldwork design, establishing potential restoration areas if necessary and identifying possible areas of natural plant expansion. To improve the predictive ability of the model, we should update the presence data with the new populations found in the field. There is a recognized need for such iterative efforts in landscape ecology. This iterative approach will help to get a model closer to reality and predict suitable areas with more accuracy for the rare species. This effort will require collaboration of different environmental agencies and/or volunteer groups to add the new field observations to the database.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Maxim Jaffe for the English revision of the manuscript.

### References

- Adhikari, D., Barik, S.K. & Upadhaya, K.** 2012. Habitat distribution modelling for reintroduction of *Ilex khasiana* Purk, a critically endangered tree species of northeastern India. *Ecological Engineering* 40: 37–43.
- Alfaro-Saiz, E., García-González, M.E., del Río, S., Penas, Á., Rodríguez, A. & Alonso-Redondo, R.** 2014. Incorporating bioclimatic and biogeographic data in the construction of species distribution models in order to prioritize searches for new populations of threatened flora. *Plant Biosystems* 149(5): 827–837.
- Amich, F., Rico, E. & Sánchez, J.** 1981. Sobre *Delphinium sordidum* Cuatrec. y otras aportaciones a la flora del occidente del Sistema Central español. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 38(1): 153–164.
- Amich, F., Bernardos, S., Aguiar, C., Fernández-Díez, F.J. & Crespí, A.L.** 2004. Taxonomic composition and ecological characteristics of the endemic flora of the lower Duero Basin (Iberian Peninsula). *Acta Botanica Gallica* 151: 341–352.



- Anderson, R.P., Lew, D. & Peterson, A.T.** 2003. Evaluating predictive models of species distributions: criteria for selecting optimal models. *Ecological Modelling* 162: 211–232.
- Araújo, M.B. & Williams, P.H.** 2000. Selecting areas for species persistence using occurrence data. *Biological Conservation* 96: 331–345.
- Araújo, M.B. & Pearson, R.G.** 2005. Equilibrium of species' distributions with climate. *Ecography* 28: 693–695.
- Babar, S., Amarnath, G., Reddy, C.S., Jentsch, A. & Sudhakar, S.** 2012. Species distribution models: ecological explanation and prediction of an endemic and endangered plant species (*Pterocarpus santalinus* L. f.). *Current Science* 102(8): 1157–1165.
- Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C. & Ortiz, S. (eds.).** 2010. Atlas y Libro Rojo de la Flora Amenazada de España. Adenda 2010. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino). Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. Madrid.
- Barnosky, A.D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G.O.U., Swartz, B., Quental, T.B., Marshall, C., McGuire, J.L., Lindsey, E.L., Maguire, K.C., Mersey, B. & Ferrer, E.A.** 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471: 51–57.
- Blanché, C.** 1991. *Revisió Biosistemàtica del gènere Delphinium L., a la Península Ibèrica i a les Illes Balears*. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans.
- Bocquet, G., Widler, B. & Kiefer, H.** 1978. The Messinian Model –a new outlook for the floristics and systematics of the Mediterranean area. *Candollea* 33: 269–287.
- BOCYL.** 2007. Decreto 63/2007, de 14 de junio, por el que se crean el Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León y la figura de protección denominada Microrreserva de Flora. *BOCYL (Boletín Oficial de Castilla y León. España)* 119: 13197–13204.
- BOJA.** 2012. Decreto 23/2012, de 14 de febrero, por el que se regula la conservación y el uso sostenible de la flora y la fauna silvestres y sus hábitats. *BOJA (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. España)* 60: 114–163.
- Bosch, M.** 1997. *Biologia de la reproducció de la tribu Delphinieae a la Mediterrània Occidental*. PhD diss., Barcelona: Institut d'Estudis Catalans, Arxius de la Seccions de Ciències, CXX, Secció de Ciències Biològiques.



- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G., Rylands, A.B., Konstant, W.R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G. & Hilton-Taylor, C.** 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology* 16: 909–923.
- Cabeza, M., Araújo, M.B., Wilson, R.J., Thomas, C.D., Cowley, M.J.R. & Moilanen, A.** 2004. Combining probabilities of occurrence with spatial reserve design. *Journal of Applied Ecology* 41: 252–262.
- Calonge Cano, C.G.** 1990. La excepcionalidad climática de los Arribes del Duero. *Eria* 21: 45–59.
- Cantó, P.** 2007. Vegetation series as a tool for Biogeography: a case study of the central Iberian Peninsula. *Phytocoenologia* 37(3): 417–442.
- Cuatrecasas, J.** 1929. Estudios sobre la flora y vegetación del macizo de Mágina. *Trabajos Museo Ciencias Naturales Barcelona* 12: 1–510.
- DOE.** 2001. Decreto 37/2001, de 6 de marzo, por el que se regula el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Extremadura. *DOE (Diario Oficial de Extremadura. España)* 30: 2349–2364.
- Elith, J., Graham, C.H., Anderson, R.P., Dudík, M., Ferrier, S., Guisan, A., Hijmans, R.J., Huettmann, F., Leathwick, J.R., Lehmann, A. Li, J., Lohmann, L.G., Loiselle, B.A., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., Overton, J.McC., Townsend Peterson, A., Phillips, S.J., Richardson, K., Scachetti-Pereira, R., Schapire, R.E., Soberón, J., Williams, S., Wisz, M.S. & Zimmermann, N.E.** 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129–151.
- Elith, J., Phillips, S.J., Hastie, T., Dudík, M., Yung, E.C. & Yates, C.J.** 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions* 17: 43–57.
- Fielding, A.H. & Bell, J.F.** 1997. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environmental Conservation* 24: 38–49.
- Fois, M., Fenu, G., Cuenca, A., Cogoni, D. & Bacchetta, G.** 2015. A practical method to speed up the discovery of unknown populations using Species Distribution Models. *Journal for Nature Conservation* 24: 42–48.



- Galicia, D. & Moreno, J.C.** 2000. Aproximación a la bibliografía florística básica de plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares, II. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 57(2): 341–356.
- Godefroid, S., Piazza, C., Rossi, G., Buord, S., Stevens, A.D., Agurauja, R., Cowell, C., Weekley, C.W., Vogg, G., Iriondo, J.M., Johnson, I., Dixon, B., Gordon, D., Magnaron, S., Valentin, B., Bjureke, K., Koopman, R., Vicens, M., Virevaire, M. & Vanderborght, T.** 2011. How successful are plant species reintroductions? *Biological Conservation* 144: 672–682.
- Gogol-Prokurat, M.** 2011. Predicting habitat suitability for rare plants at local spatial scales using a species distribution model. *Ecological Applications* 21: 33–47.
- Gómez Mercado, F., Moreno Lozano, R. & Giménez Luque, E.** 1997. Estudio de las poblaciones de *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) en Sierra Mágina (Jaén, España). *Monografías de Flora y Vegetación Béticas* 10: 101–113.
- Gordon, D.R.** 1994. Translocation of species into conservation areas: a key for natural resources managers. *Natural Areas Journal* 14: 31–37.
- Guisan, A. & Zimmermann, N.E.** 2000. Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling* 135: 147–186.
- Guisan, A. & Thuiller, W.** 2005. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters* 8: 993–1009.
- Guisan, A., Broennimann, O., Engler, R., Vust, M., Yoccoz, N.G., Lehmann, A. & Zimmermann, N.E.** 2006. Using Niche-based models to improve the sampling of rare species. *Conservation Biology* 20(2): 501–511.
- Hernández, P.A., Graham, C.H., Master, M.M. & Albert, D.** 2006. The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography* 29: 773–785.
- Herranz, J.M., Ferrandis, P. & Martínez-Duro, E.** 2010. Seed germination ecology of the threatened endemic Iberian *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae). *Plant Ecology* 211: 89–106.
- Heywood, V.H. & Iriondo, J.M.** 2003. Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation* 113: 321–335.



- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. & Jarvis, A.** 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- Hijmans R.J.** 2015. *Raster: geographic data analysis and modeling*. R Package Version 2.3-24. <http://CRAN.R-project.org/package=raster>.
- Hijmans, R.J., Phillips, S., Leathwick, J. & Elith, J.** 2016. *Dismo: species distribution modeling*. R package version 1.1-1. <http://CRAN.R-project.org/package=dismo>.
- IUCN.** 2013. *Guidelines for reintroductions and other conservation translocations*. Version 1.0. Gland: IUCN Species Survival Commission, viiii + 57 p.
- IUCN.** 2014. *Guidelines for using the IUCN Red List Categories and criteria: version 11*. <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>.
- Liu, C., Berry, P.M., Dawson, T.P. & Pearson, R.G.** 2005. Selecting thresholds of occurrence in the prediction of species distributions. *Ecography* 28: 385–393.
- Lobo, J.M., Jimenez-Valverde, A. & Real, R.** 2008. AUC: a misleading measure of the performance of predictive distribution models. *Global Ecology and Biogeography* 17: 145–151.
- Lorite, J.** 2016. An updated checklist of the vascular flora of Sierra Nevada (SE Spain). *Phytotaxa* 261(1): 1–57.
- Martínez-Meyer, E., Peterson, A.T, Servín, J.I. & Kiff, L.F.** 2006. Ecological niche modelling and prioritizing areas for species reintroductions. *Oryx* 40: 411–418.
- Mateo, G. & Pisco, J.M.** 1993. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Cuatrec.) Amich, Rico & Sánchez en el Sistema Ibérico. *Acta Botanica Malacitana* 18: 286–287.
- Merow, C., Smith, M.J. & Silander, J.A.Jr.** 2013. A practical guide to MaxEnt for modeling species' distributions: what it does, and why inputs and settings matter. *Ecography* 36: 1058–1069.
- Moreno, J.C. (coord.).** 2008. *Lista Roja 2008 de la Flora Vascular Española*. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas). Madrid.
- Orellana, M.R., López-Pujol, J., Blanché, C. & Bosch, M.** 2007. Genetic diversity in the endangered dysploid larkspur *Delphinium bolosii* and its close diploid relatives in the



- series *Fissa* of the Western Mediterranean area. *Biological Journal of the Linnean Society* 92: 773–784.
- Pearson, R.G., Raxworthy, C.J., Nakamura, M. & Peterson, A.T.** 2007. Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography* 34: 102–117.
- Peterson, A.T., Papes, M. & Eaton, M.** 2007. Transferability and model evaluation in ecological niche modeling: a comparison of GARP and Maxent. *Ecography* 30: 550–560.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P. & Schapire, R.E.** 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- Phillips, S.J. & Dudík, M.** 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31: 161–175.
- Primack, R.B.** 2006. *Essentials of conservation biology*. 6th ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.
- Ramírez-Rodríguez, R. & Amich, F.** 2014. Notes on rare and threatened flora in western-central Iberia. *Lazaroa* 35: 221–226.
- Ramírez-Rodríguez, R., Amich, F., Fuentes Antón, S. & Rodríguez de la Cruz, D.** 2016. Una nueva localidad del endemismo Ibérico amenazado *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae). *Acta Botanica Malacitana* 41: 265–267.
- Ramírez-Rodríguez, R., Medina, L., Menezes de Sequeira, M., Aguiar, C. & Amich, F.** 2017. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) in Portugal: distribution and conservation status. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 74(1): e056.
- Ricketts, T.H., Dinerstein, E., Boucher, T., Brooks, T.M., Butchart, S.H.M., Hoffmann, M., Lamoreux, J.F., Morrison, J., Parr, M., Pilgrim, J.D., Rodrigues, A.S.L., Sechrest, W., Wallace, G.E., Berlin, K., Bielby, J., Burgess, N.D., Church, D.R., Cox, N., Knox, D., Loucks, C., Luck, G.W., Master, L.L., Moore, R., Naidoo, R., Ridgely, R., Schatz, G.E., Shire, G., Strand, H., Wettengel, W. & Wikramanayake, E.** 2005. Pinpointing and preventing imminent extinctions. *PNAS* 102: 18497–18501.
- Rico, E.** 1985. Aportaciones y comentarios sobre la flora del centro-oeste español. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 41(2): 407–423.



- Rivas-Martínez, S., Díaz, T.E., Fernández-González, F., Izco, J., Loidi, J., Lousa, M. & Penas, Á.** 2002. Vascular plant communities of Spain and Portugal. *Itinera Geobotanica* 15: 5–922.
- Rocha, J., Crespi, A., Almeida, R. & Amich, F.** 2012. Status and conservation of *Silene* section *Cordifolia* in the Iberian Peninsula: a menaced group under global environmental change. *Plant Ecology & Diversity* 5(1): 45–56.
- Sánchez-Rodríguez, J.A.** 1986. Aportaciones a la Flora Zamorana I. *Collectanea Botanica* 16(2): 371–376.
- Soberón, J. & Peterson, A.T.** 2005. Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodiversity Informatics* 2: 1–10.
- Soulé, M.E.** 1991. Conservation: tactics for a constant crisis. *Science* 253: 744–750.
- Thiers, B.** 2010 [continuously updated]. *Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff*. New York (NY): Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>.
- Thuiller, W., Richardson, D.M., Pysek, P., Midgley, G.F., Hughes, G.O. & Rouget, M.** 2005. Niche-based modelling as a tool for predicting the risk of alien plant invasions at a global scale. *Global Change Biology* 11: 2234–2250.
- Williams, J.N., Seo, C., Thorne, J., Nelson, J.K., Erwin, S., O'Brien, J.M. & Schwartz, M.W.** 2009. Using species distribution models to predict new occurrences for rare plants. *Diversity and Distributions* 15: 565–576.
- Wisz, M.S., Hijmans, R.J., Li, J., Peterson, A.T., Graham, C.H. & Guisan, A.** 2008. Effects of sample size on the performance of species distribution models. *Diversity and Distributions* 14: 763–773.
- Yackulic, C.B., Chandler, R., Zipkin, E., Royle, J.A., Nichols, J.D., Campbell Grant, E.H. & Veran, S.** 2013. Presence-only modelling using MAXENT: when can we trust the inferences? *Methods in Ecology and Evolution* 4: 236–243.
- Yang, X.Q., Kushwaha, S.P.S., Saran, S., Xu, J. & Roy, P.S.** 2013. Maxent modeling for predicting the potential distribution of medicinal plant, *Justicia adhatoda* L. in Lesser Himalayan foothills. *Ecological Engineering* 51: 83–87.



Zaniewski, A.E., Lehmann, A. & Overton, J.McC. 2002. Predicting species spatial distributions using presence-only data: a case study of native New Zealand ferns. *Ecological Modelling* 157: 261–280.

**Supplemental Material**

**Appendix 1.** Multicollinearity test by using cross-correlations (Pearson correlation coefficients, r) among environmental variables.

Variables	Bio1	Bio2	Bio3	Bio4	Bio5	Bio6	Bio7	Bio8	Bio9	Bio10	Bio11	Bio12	Bio13	Bio14	Bio15	Bio16	Bio17	Bio18	Bio19	Ele	Asp	Slo	Hil
Bio1	1,00																						
Bio2	0,11	1,00																					
Bio3	0,21	0,04	1,00																				
Bio4	-0,04	0,83	-0,51	1,00																			
Bio5	0,75	0,70	-0,02	0,60	1,00																		
Bio6	0,88	-0,33	0,34	-0,48	0,37	1,00																	
Bio7	0,04	0,94	-0,29	0,96	0,68	-0,42	1,00																
Bio8	0,47	-0,03	-0,10	0,06	0,28	0,34	0,00	1,00															
Bio9	0,62	0,38	0,28	0,13	0,66	0,48	0,27	-0,04	1,00														
Bio10	0,92	0,42	0,00	0,35	0,93	0,64	0,40	0,45	0,64	1,00													
Bio11	0,94	-0,17	0,36	-0,37	0,50	0,98	-0,29	0,41	0,54	0,74	1,00												
Bio12	-0,33	-0,63	0,15	-0,64	-0,63	0,05	-0,65	-0,51	-0,23	-0,55	-0,09	1,00											
Bio13	-0,13	-0,63	0,23	-0,68	-0,51	0,23	-0,68	-0,43	-0,12	-0,39	0,10	0,96	1,00										
Bio14	-0,78	-0,48	-0,18	-0,30	-0,85	-0,54	-0,40	-0,25	-0,67	-0,85	-0,63	0,54	0,34	1,00									
Bio15	0,76	0,05	0,32	-0,16	0,55	0,75	-0,06	0,00	0,58	0,66	0,77	0,02	0,24	-0,76	1,00								
Bio16	-0,10	-0,60	0,27	-0,68	-0,47	0,26	-0,67	-0,46	-0,07	-0,36	0,14	0,95	0,99	0,28	0,29	1,00							
Bio17	-0,76	-0,51	-0,17	-0,33	-0,85	-0,50	-0,44	-0,27	-0,63	-0,85	-0,60	0,60	0,40	0,99	-0,74	0,35	1,00						
Bio18	-0,71	-0,56	-0,21	-0,35	-0,85	-0,45	-0,48	-0,16	-0,70	-0,81	-0,55	0,57	0,39	0,97	-0,73	0,33	0,98	1,00					
Bio19	-0,02	-0,50	0,32	-0,63	-0,34	0,32	-0,58	-0,53	0,08	-0,25	0,20	0,91	0,95	0,15	0,40	0,98	0,22	0,18	1,00				
Ele	-0,87	0,22	-0,32	0,37	-0,42	-0,92	0,31	-0,45	-0,42	-0,67	-0,92	0,08	-0,08	0,50	-0,58	-0,10	0,47	0,41	-0,15	1,00			
Asp	0,01	0,01	0,02	0,00	0,02	0,02	0,00	-0,04	0,03	0,01	0,01	0,03	0,03	-0,03	0,04	0,03	-0,02	-0,03	0,05	-0,01	1,00		
Slo	-0,05	0,01	0,00	0,01	-0,02	-0,05	0,01	-0,03	-0,03	-0,04	-0,05	0,02	0,01	0,03	-0,04	0,00	0,04	0,03	0,00	0,05	0,05	1,00	
Hil	0,01	0,02	0,02	0,00	0,02	0,02	0,01	-0,03	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02	-0,03	0,04	0,03	-0,03	-0,03	0,04	-0,01	0,60	-0,04	1,00

Note: Bio1 a Bio19 = bioclimatic variables obtained from WorldClim. Ele = Elevation, Asp = Aspect, Slo = Slope, Hil = Hillshade. If two variables had >=0.7, only one of them was selected in the model.



## TERCER CAPÍTVLO

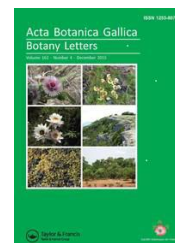
“Effects of local abundance on pollination and reproduction  
in *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae)”





## Efectos de la abundancia local sobre la polinización y reproducción en *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*

Rubén Ramírez-Rodríguez & Francisco Amich



*Botany Letters* (2017) 164 (4): 371–383. doi: 10.1080/23818107.2017.1383307

Factor de Impacto (2017): 1.342



### Resumen

*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) es un hemicriptófito amenazado, xenógamo, auto-compatible y endémico del centro-oeste de la Península Ibérica, con distribución disyunta en Sierra Mágina (España: Jaén). Nosotros estudiamos los efectos de la abundancia local, en términos del tamaño del plot (número de individuos) y de la pureza del plot (abundancia relativa), evaluando la actividad de los polinizadores (frecuencia de las visitas y comportamiento de los visitantes), cantidad y calidad de los servicios de los polinizadores y el conjunto de semillas en las dos poblaciones estudiadas. Las flores de *D. fissum* subsp. *sordidum* fueron visitadas por Hymenoptera (88.8%), Lepidoptera (10.3%) y Diptera (0.9%). El polinizador más frecuente fue *Bombus terrestris* (72.6% del total de visitas). Se observaron diferencias entre las poblaciones en las frecuencias relativas de las visitas a las plantas. Los plots con un mayor número de individuos atrajeron más polinizadores. El mismo patrón fue observado para las cargas polínicas y para el conjunto de semillas; 99.46% de los granos de polen depositados sobre los estigmas fueron conespecíficos, y el principal competidor fue *Ferula communis*. Los efectos de la pureza fueron evaluados comparando los plots puros con un plot mixto que incluyó especies que coinciden con la etapa de floración de *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* y ejercen un efecto de competición interespecífica. Estos resultados pueden ser útiles para desarrollar medidas de conservación, especialmente en la pequeña población de Aldeadávila.





## Effects of local abundance on pollination and reproduction in *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae)

Rubén Ramírez-Rodríguez and Francisco Amich

Evolution, Taxonomy and Conservation Group (ECOMED), Department of Botany and Plant Physiology, University of Salamanca, Salamanca, Spain

### Abstract

*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) is an endangered, xenogamous, self-compatible hemicryptophyte endemic of the central-western Iberian Peninsula, with a disjunct distribution in the Sierra Mágina (Spain: Jaén Province). We studied the effects of local abundance, in terms of plot size (number of individuals) and plot purity (relative abundance), assessing the activity of pollinators (frequency of visits and behaviour of visitors), quantity and quality of pollinator services and seed set in two populations. Flowers of *D. fissum* subsp. *sordidum* were visited by Hymenoptera (88.8%), Lepidoptera (10.3%) and Diptera (0.9%). The most frequent pollinator was *Bombus terrestris* (72.6% of total visits). Differences in relative frequency of visits to plants were observed between populations. Plots with high numbers of individuals attracted more pollinators. The same pattern was observed for stigmatic pollen loads and seed set; 99.46% of pollen grains deposited on the stigmas were conspecific, and the main competitor was *Ferula communis*. The effects of purity were assessed by comparing pure plots with a mixed plot that included plants that coincide with the flowering stage of *D. fissum* subsp. *sordidum* and exert an effect of interspecific competition. These results may be useful for developing conservation measures, especially in the small population of Aldeadávila.

**Keywords:** Delphinieae; *Bombus*; pollination visitation rates; stigmatic pollen loads; seed set; conservation

### Introduction

Outcrossing rates may vary from population to population as a result of differences in the degree of protandry (Schoen *et al.*, 1997), sex ratio (Brunet & Charlesworth, 1995), population density (Bosch & Waser, 1999), plant size and structure (Ishii & Harder, 2006),



number of individuals in the population (Bosch *et al.*, 2002) and isolation (Groom, 1998). Local abundance is a complex concept related to population size (number of individuals), population density (spatial distance between neighbouring conspecifics) and population purity (the relative abundance of the species) (Kunin, 1997). Population size and density are often correlated, which makes it sometimes difficult to interpret the results (Ågren, 1996). Changes in any of these parameters are expected to have a significant effect on ecological interactions such as pollination and population dynamics. In this sense, narrow endemic species, which usually occur in small populations and in specialized habitats, are especially sensitive to variations in abundance (Kirchner *et al.*, 2005).

Entomophily is an important kind of plant pollination in which pollen is distributed by insects. The success of the plant–animal system is measured in terms of the frequency of the interaction (quantity component) and the fitness impact of each occurrence (quality component) (Herrera, 1989). The quality component is assessed by the variation in frequency of pollen deposition on stigmas, number of pollen grains delivered when deposition occurs and suitability of the pollen from the viewpoint of the mother plant (Herrera, 1987). The quantity component is assessed by the variation in pollinator abundance and flower visitation rates (Herrera, 1989).

The tribe Delphinieae Warming (Ranunculaceae L.) consists of six genera: *Aconitum* L., *Delphinium* L., *Consolida* (DC.) S.F. Gray, *Aconitella* Spach, *Staphisagria* J. Hill (Jabbour & Renner, 2011) and *Gymnaconitum* (Stapf) Wei Wang & J.D. Chen (Wang *et al.*, 2013). This tribe comprises 650 to 700 species (Tamura, 1995). They are herbaceous perennials or annuals, mainly distributed in temperate zones of the northern hemisphere (Jalas & Suominen, 1989). The Delphinieae tribe has evolved towards a zygomorphic floral morphology adapted to insect pollination, mainly bumblebees (Bosch *et al.*, 1997; Müller, 1883). They have many stamens and have hidden nectaries that force insects to make certain movements over the sexual organs. These flowers are also protandrous with a marked herkogamy, which prevents self-pollination (Bosch *et al.*, 2001). These morphological traits are characteristic of the bumblebee pollination syndrome (melittophily) as described by Faegri & Van der Pijl (1979): zygomorphy, showy coloration, nectar guides indicating the position of the nectaries, mechanical resistance and structures suitable for insect landing.



In this study, we analysed how differences in plot size and plot purity affected both components of pollination and reproductive success in *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Cuatrec.) Amich, E. Rico & J. Sánchez. This subspecies is a good study case because it is a rare and threatened species, which is included in the Red List of Spanish Vascular Flora 2008 (Bañares *et al.*, 2008) and Adenda 2010 (Bañares *et al.*, 2010) under the category EN [B2ab(v)c(iv); C2b] due to its small range, area of occupancy, population size and small number of mature individuals. In the regional catalogues of threatened flora, it is listed in different categories: “In danger of extinction” in the Catalogue of Protected Flora in Castile & Leon (BOCYL, 2007) and in the Regional Catalogue of threatened species of Castile-La Mancha (DOCM, 2001), “Special Interest” in the Regional Catalogue of threatened species of Extremadura (DOE, 2001) and as “Vulnerable” in the Andalusian Catalogue of threatened species (BOJA, 2012). The main threats that this subspecies faces are: low recruitment rate, inter-annual variability in population size and structure, with the minimum population size corresponding to the driest years and areas where tourism and recreational activities are particularly intense (Ramírez-Rodríguez *et al.*, unpubl.). Plant collecting of remarkable or/and rare species is a potential threat. Herbivory is a potentially serious threat for the populations of the Sierra Mágina (Jaén Province), Villatoro (Ávila Province), the Sierra de San Vicente (Toledo Province) and Linares de Riofrío (Salamanca Province).

The aims of this study were to: (1) identify the diversity of pollinators, (2) evaluate whether abundance and/ or purity of the plots affect the number of possible pollinator visits, (3) estimate the quality of the pollinator services based on the pollen deposited on the stigmas and (4) determine whether abundance and/or purity of plots affected reproductive success.

## Materials and methods

### *The plant*

*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* is a perennial and rhizomatous hemicryptophyte that develops a rosette of palmatisect leaves at the end of winter and early spring. During the blooming period (June–July), it grows a flowering stem and forms a single dense inflorescence with 20–80 zygomorphic blue-violet flowers. The plant is self-compatible, xenogamous, its flowers are protandrous and pollination is entomophilous. The total number of flowers produced per plant in the studied populations was  $42.3 \pm 29.6$  (mean  $\pm$  SE, N = 53; range: 8–198). Fructification occurs in the summer months (June–August). Fruits are glabrous



follicles arranged in triplets, which have many black and non-winged seeds, with 7–8 bands of imbricated membranous scales. Its chromosome number is  $2n = 16$  (Rico Hernández *et al.*, 1981). Once fructification ends, the aerial part dries out and the rhizome remains in a dormant state until the following spring, coinciding with the rainy season. Vegetative multiplication by rhizome fragmentation can occur.

*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* is a restricted endemic taxon, whose core distribution is located in the central-western Iberian Peninsula (Cáceres, Salamanca, Zamora, Toledo and Ávila Provinces) in Spain and the Trás-os-Montes region in Portugal, with a disjunct population in the Sierra Mágina (Jaén Province). The taxon is mainly found in chestnut and oak forests (for more details see Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2017; Rus *et al.*, 2017).

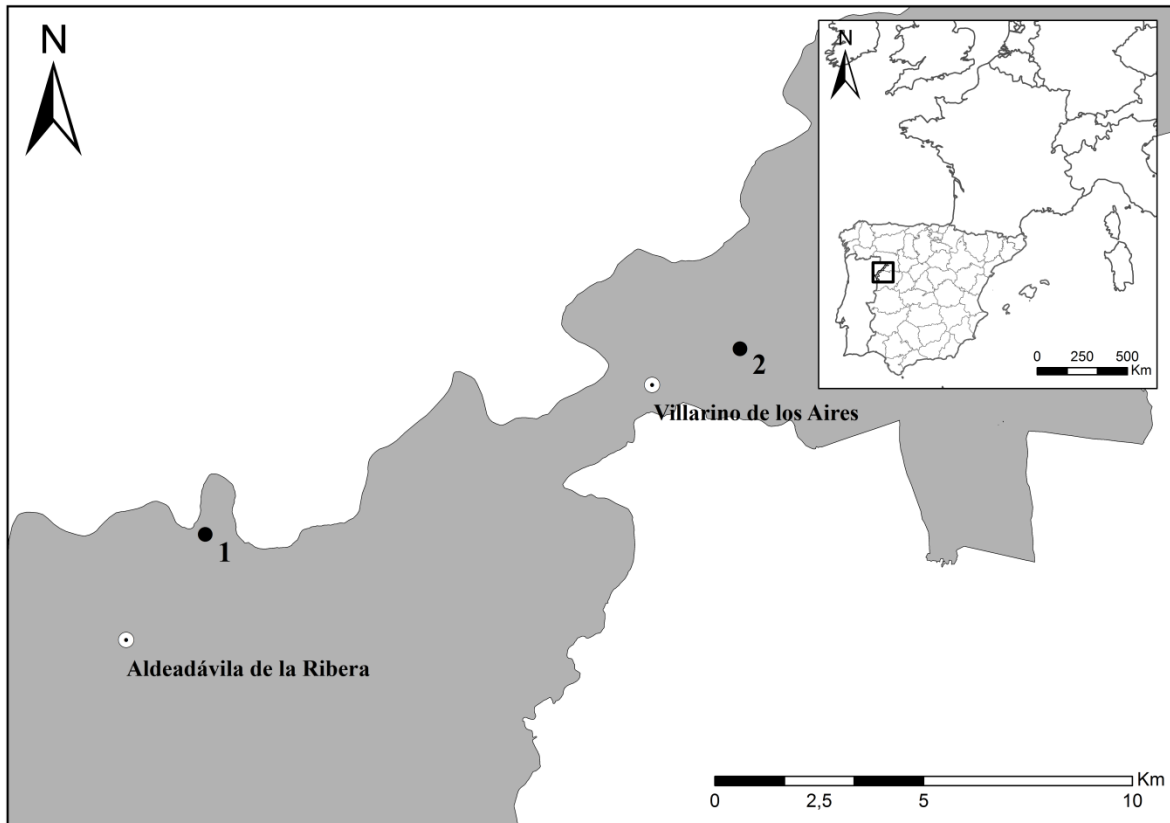
### **Study area**

The study was carried out in two populations located in the Salamanca Province, within the Arribes del Duero Natural Park and approximately 13.5 km apart (Figure 1). The population of Aldeadávila de la Ribera (henceforth AR) is found at 480 m.a.s.l. in mixed forest of *Quercus faginea* Lam., *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. and *Acer monspessulanum* L. including hemicryptophytic humicolous communities of *Gallio-Alliarion petiolatae* Oberdorfer & Lohmeyer in Oberdorfer, Görs, Korneck, Lohmeyer, Müller, Philippi & Seibert 1967 (Ramírez-Rodríguez & Amich, 2014). This population has 58 individuals, of which 17 are reproductive individuals. Demographic studies estimate that approximately only 25%–30% of the total of number of individuals flower each year (Ramírez-Rodríguez *et al.*, unpubl.), reducing considerably the quantity of reproductive plants per population. On the other hand, the population of Villarino de los Aires (henceforth VA) has 249 reproductive individuals and is found at 660 m.a.s.l. in clearings within *Quercion pyrenaicae* Rivas Goday ex Rivas-Martínez 1964 forests.

We set up two plots in each population, each plot covering  $4 \times 3 \text{ m}^2$ . This plot size was chosen due to the low density and random growth that this rare and threatened plant exhibited. Each plot had a different number of individuals which allowed us to analyse the natural variation in abundance. Thus, large plots in VA and AR consisted of 15 and 6 reproductive individuals and small plots of 6 and 2 reproductive individuals, respectively. In VA, we set up an additional mixed plot ( $4 \times 3 \text{ m}^2$ ) with 6 reproductive individuals in an area predominantly



covered by species that compete for pollinators with *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* due to overlap in blooming periods. Plots were placed as far as possible from each other, and with the same orientation (NW).



**Figure 1.** Map of the Iberian Peninsula located in southern Europe. The box represents the study area of *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* showing the enlarged area of Arribes del Duero Natural Park in grey. The southwestern studied population is 1, Aldeadávila de la Ribera (AR) and the northeastern studied population is 2, Villarino de los Aires (VA).

### *Pollinator visitation*

We carried out pollinator censuses in the five study plots during a series of 15-min periods during the blooming season between 7 and 30 June 2014. Observations were carried out from 10 am to 8 pm. In total, 45 h were recorded (9 h/plot) during 11 days: 27 in VA and 18 in AR. During each census, we recorded the following details for each pollinator: identity; behaviour whether it acted as a legitimate or illegitimate pollinator (primary or secondary nectar robbers); the type of forage reward (nectar or pollen); the number of visits per plot; the number of plants and flowers visited per plot; the time measured in seconds spent in each



flower. Insects that could not be identified in the field with certainty were taken to the laboratory for subsequent identification.

### ***Deposition of pollen load***

To estimate the pollinator service quality, we analysed the pollen load deposition on stigmas of already pollinated flowers. We collected stigmas of 20 senescent flowers from different plants in each plot. Three bilobate stigmas per flower were set in basic fuchsin gel on a microscope slide (Kearns & Inouye, 1993), and quantities of conspecific and heterospecific pollen were counted using an optical microscope at 100–400×. Heterospecific pollen was identified by comparison to a pollen reference collection of nearby flowering plants, which are also potential competitors of *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*. We have also used the Pollen Atlas of Western Andalusia (Valdés *et al.*, 1987) to identify heterospecific pollen.

### ***Reproductive success***

Reproductive success was calculated by counting the seeds and undeveloped ovules from 20 randomly selected fruits from each plot.

### ***Data analysis***

Statistical analyses of the data were run using the software R-project 3.3.1. When necessary, logarithmic transformation was applied to the data to obtain a normal distribution. We used two-way ANOVA to analyse the differences between populations and plot sizes in terms of number of visits, number of plants and flowers visited per plot, pollen loads (conspecific, heterospecific and total pollen load) and seed set (number of seeds, number of aborted seeds and total ovules). We used one-way ANOVA to check the differences in the number of flowers visited per plant among different insect species (insect species with a single visit in a flower were excluded from the analysis), as well as to evaluate the effect of plot purity on pollinator visits, pollen load and seed set, comparing the mixed and large pure plot in VA. Group differences were set at the 95% confidence level.

## **Results**

### ***Pollinator visitation***

*Delphinium fissum* subsp. *sordidum* attracted a broad spectrum of pollinators, with great differences in plot visitation frequency between the studied populations. A total of 234



insects were recorded visiting observed plants. The mean number of insects that visited study plots was  $1.3 \pm 1.1$  per 15-min census (mean  $\pm$  SE; N = 234). Flower visitors of *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* are listed in Table 1. The most frequent pollinators belonged to the order Hymenoptera (88.8%), the most frequent species being *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) (72.6%). Other insects that visited the flowers were the genus *Halictus* sp. (Latreille, 1804) (12.4%) and the hawkmoth *Macroglossum stellatarum* (Linnaeus, 1758) (5.1%). Most pollinators collected nectar, except Vespidae, Halictidae (*Halictus* sp.) and Syrphidae (*Helophilus* sp. (Meigen, 1822)) that collected pollen. We did not observe illegitimate pollinators making holes at the base of the corolla tube of the flowers in order to obtain the nectar (primary nectar robber) nor using these holes to reach the nectar (secondary nectar robber).

In the AR population, a total of 59 insects were recorded. The majority of visits (71.2%) were from genus *Bombus* (Latreille, 1802) (family Apidae; order Hymenoptera): *Bombus terrestris* (69.5%) and *Bombus pascuorum* (Scopoli, 1763) (1.7%). The remaining visits (28.8%) were from genus *Halictus* sp. (family Halictidae; order Hymenoptera). In the VA population, a total of 175 insects were recorded, 73.7% of which were from *Bombus terrestris*, 6.9% from genus *Halictus*, 6.9% from *Macroglossum stellatarum* and 4.0% from genus *Antophora* (Latreille, 1803). The remaining groups were from five families of the order Lepidoptera (Hesperiidae, Nymphalidae, Papilionidae, Pieridae and Satyridae) and one from the order Diptera (Syrphidae) (Table 1). We have observed that *Bombus terrestris* exhibited a marked preference, visiting consecutively a single species (in this case *D. fissum* subsp. *sordidum*); therefore, the floral constancy of *Bombus terrestris* was high (pers. obs.).

The number of flowers visited per plant were different among the distinct pollinators ( $F_{8,349} = 4.724$ ,  $P = 1.62e-05$ ). *Bombus terrestris* visited more flowers per plant than the remaining pollinators (Table 1), and the time spent per flower was  $2.6 \pm 0.9$  s. *Macroglossum stellatarum* was the second pollinator that visited more flowers per plant, but the time spent per flower was shorter ( $1.5 \pm 0.3$  s). Other frequent pollinators such as *Halictus* sp. spent more time per flower ( $8.1 \pm 12.1$  s) due to the time devoted to pollen foraging, and *Antophora* sp. spent an average of  $2.7 \pm 0.8$  s, close to the time spent by *Bombus terrestris*.

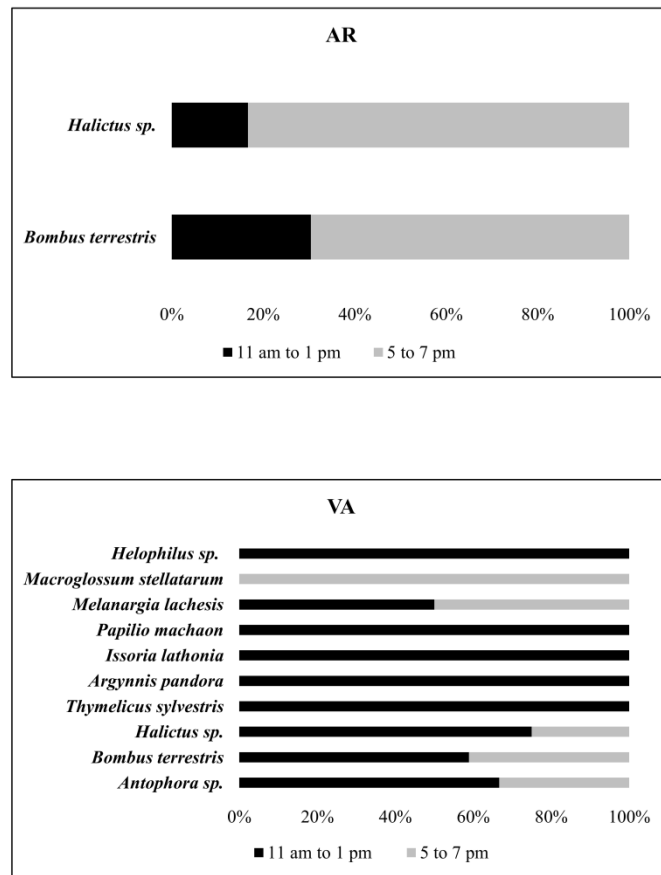
We recorded pollinator activity in two periods: 11 am to 1 pm (morning) and 5 to 7 pm (afternoon) for each one of the studied populations (Figure 2). In the AR population, the main period activity of the two pollinators, *B. terrestris* and *Halictus* sp., occurred in the



afternoon. In the case of VA, where insect diversity was higher, most of the groups were predominantly active in the morning period, with exception of *M. stellatarum* that was only observed in the afternoon period.

**Table 1.** Pollinators observed on *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*: “B-R”, Behaviour and Reward (N, Nectar; P, Pollen; L, Legal pollinator); “Visits”, visits per plot; “% total visits”, percentage of total visits; “Flowers visited/plant”, mean number ( $\pm$  SE) of flowers visited per plant; “Time/flower”, mean time measured in seconds spent in each flower; “% Visits” frequency of visits in the two studied populations (VA, Villarino de los Aires; AR, Aldeadávila de la Ribera).

Insect	B-R	Visits	% total visits	Flowers visited/plant (number of plants)	Time/flower	% Visits	
						VA	AR
<b>HYMENOPTERA</b>							
Anthophoridae							
<i>Antophora</i> sp.	L (N + P)	7	3.0	6 $\pm$ 7.0 (8)	2.7 $\pm$ 0.8	4.0	
Apidae							
<i>Bombus terrestris</i>	L (N + P)	170	72.6	9.2 $\pm$ 7.2 (280)	2.6 $\pm$ 0.9	73.7	69.5
<i>Bombus pascuorum</i>	L (N + P)	1	0.4	6.0 $\pm$ 0.0 (1)	3.5 $\pm$ 0.0		1.7
Halictidae							
<i>Halictus</i> sp.	L (P)	29	12.4	2.5 $\pm$ 2.7 (28)	8.1 $\pm$ 12.1	6.9	28.8
Vespidae	L (P)	1	0.4	4.0 $\pm$ 0.0 (1)	0.7 $\pm$ 0.0	0.6	
<b>LEPIDOPTERA</b>							
Hesperiidae							
<i>Thymelicus sylvestris</i>	L (N)	1	0.4	1.0 $\pm$ 0.0 (1)	2.0 $\pm$ 0.0	0.6	
Nymphalidae							
<i>Argynnis pandora</i>	L (N)	3	1.3	2.0 $\pm$ 1.0 (3)	9.2 $\pm$ 7.8	1.7	
<i>Issoria lathonia</i>	L (N)	2	0.9	1.0 $\pm$ 0.0 (2)	3.0 $\pm$ 0.0	1.1	
Papilionidae							
<i>Papilio machaon</i>	L (N)	3	1.3	4.0 $\pm$ 2.6 (3)	4.4 $\pm$ 2.5	1.7	
Pieridae							
<i>Pieris rapae</i>	L (N)	1	0.4	1.0 $\pm$ 0.0 (1)	6.0 $\pm$ 0.0	0.6	
Satyridae							
<i>Melanargia lachesis</i>	L (N)	2	0.9	1.0 $\pm$ 0.0 (2)	6.0 $\pm$ 0.0	1.1	
Sphingidae							
<i>Macroglossum stellatarum</i>	L (N)	12	5.1	6.5 $\pm$ 7.0 (28)	1.5 $\pm$ 0.3	6.9	
<b>DIPTERA</b>							
Syrphidae							
<i>Helophilus</i> sp.	L (P)	2	0.9	2.5 $\pm$ 0.7 (2)	1.5 $\pm$ 0.7	1.1	
		234	100%	Total number of plants visited = 360		100%	100%



**Figure 2.** Insect activity observed in the two studied populations of *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* during two different periods of day.

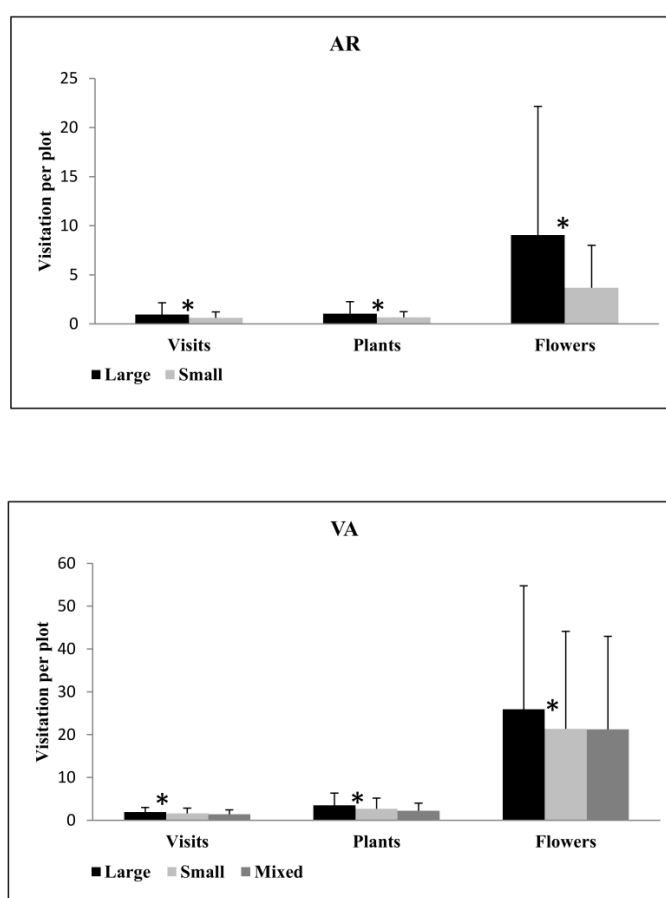
**Table 2.** ANOVAs of effects of population and size on pollinator visits per plot, number of plants visited per plot and number of flowers visited per plot, all per 15-min observation period of *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*.

Parameter	Source	d.f	SS	F	P
Visits/plot	Population	1	2.604	12.411	<b>0.00059***</b>
	Size	2	2.482	5.913	<b>0.00348**</b>
	Population*Size	1	0.000	0.001	0.97950
	Error	130	27.279		
N° plants visited/plot	Population	1	12.88	33.544	<b>4.97e-08***</b>
	Size	2	3.88	5.056	<b>0.00768**</b>
	Population*Size	1	0.01	0.035	0.85091
	Error	130	49.93		
N° flowers visited/plot	Population	1	17.60	11.779	<b>0.000804***</b>
	Size	2	9.20	3.077	<b>0.049453*</b>
	Population*Size	1	0.01	0.006	0.936173
	Error	130	194.27		

“df”, degrees of freedom; “SS”, Sum of Squares; “F”, F-value; “P”, P-value. Significant effect ( $P < 0.05$ ) are shown in bold. Statistical significance: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .



Significant differences were found when comparing populations and plot sizes in terms of visits per plot, number of plants and flowers visited per plot (Table 2). Large plots had more visits than small plots in both populations (Figure 3), and greater number of flowers were visited in the VA population. The presence of different species in the mixed plot of VA population had negative effects on the variable visits per plot, which was lower than what was observed in the large plot ( $F_{1,59} = 5.17$ ,  $P = 0.0266$ ); we did not find significant differences in the variables plants ( $F_{1,59} = 3.371$ ,  $P = 0.0714$ ) and flowers visited/plot ( $F_{1,59} = 0.522$ ,  $P = 0.473$ ).



**Figure 3.** Pollinator visitation per 15-min census in the large, the small and the mixed plots of the two studied populations of *D. fissum* subsp. *sordidum*. “Visits”, visits per plot; “Plants” number of plants visited per plot; “Flowers” number of flowers visited per plot. Each bar represents mean  $\pm$  SE. \*Significant differences ( $P < 0.005$ ) using Anova.

### *Pollen deposition*

The mean number of pollen grains per flower of all species deposited on the stigmas of *D. fissum* subsp. *sordidum* was  $380 \pm 319.4$  (range: 14–1705, mean  $\pm$  SE,  $N = 86$ ). From



the total pollen, 99.46% were conspecific pollen. The most common species providing heterospecific pollen were: *Ferula communis* L. (0.24%), *Hypericum perforatum* L. (0.079%) and *Sedum forsterianum* Sm. (0.064%). We did not detect significant differences in heterospecific pollen loads. We found significant differences between populations and the interaction of both factors for conspecific and total pollen loads (Figure 4; Table 3). When we compared the mixed plot with the large plot of VA population, we found significant differences in the total pollen loads ( $F_{1,38} = 6.368$ ,  $P = 0.0159$ ), in the conspecific pollen loads ( $F_{1,38} = 6.611$ ,  $P = 0.0142$ ), but we did not find significant differences in the heterospecific pollen loads ( $F_{1,38} = 1.761$ ,  $P = 0.192$ ).

**Table 3.** ANOVAs of effects of population and size on conspecific pollen loads (“Consp.”), heterospecific pollen loads (“Heterosp.”) and total pollen loads (“Total”) on stigmas of *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*.

Parameter	Source	df	SS	F	P
Consp.	Population	1	17.86	27.265	<b>1.34e-06***</b>
	Size	2	1.30	0.994	0.3747
	Population*Size	1	10.86	16.575	<b>0.000108***</b>
	Error	81	53.05		
Heterosp.	Population	1	72.6	2.207	0.141
	Size	2	150.5	2.288	0.108
	Population*Size	1	0.7	0.021	0.885
	Error	81	2664		
Total	Population	1	17.89	27.495	<b>1.23e-06***</b>
	Size	2	1.23	0.943	0.394
	Population*Size	1	10.74	16.505	<b>0.000112***</b>
	Error	81	52.70		

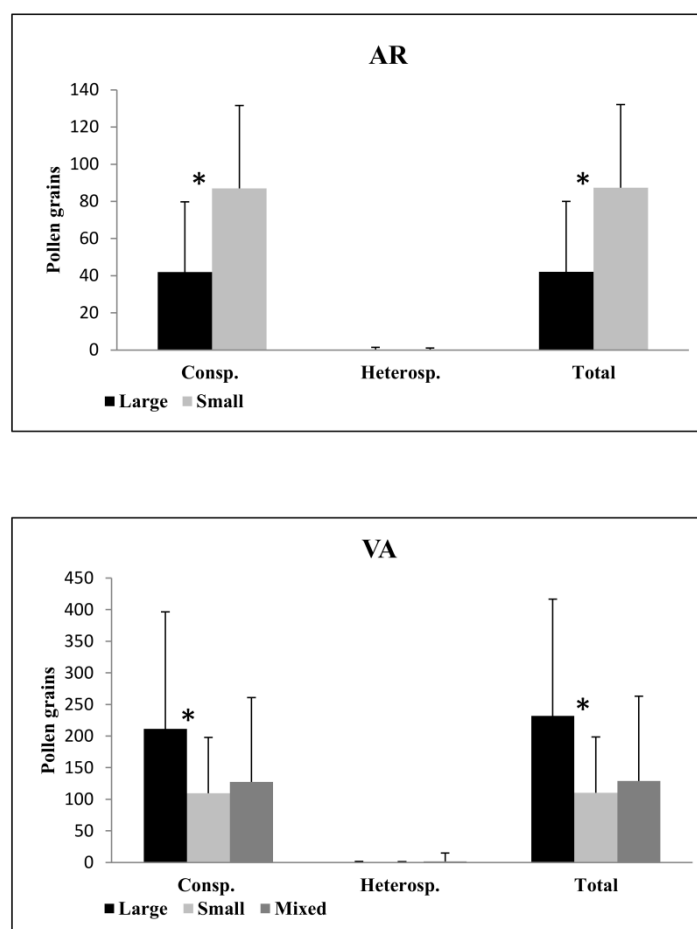
“df”, degrees of freedom; “SS”, Sum of Squares; “F”, F-value; “P”, P-value. Significant effect ( $P < 0.05$ ) are shown in bold. Statistical significance: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### Seed set

The mean number of seeds produced per fruit was  $7.38 \pm 3.41$  (range 1–17, mean  $\pm$  SE,  $N = 100$ ); thus, each flower produced on average 22.14 seeds. The mean number of aborted seeds produced per fruit was  $3.2 \pm 1.92$  (range 0–9, mean  $\pm$  SE,  $N = 100$ ); thus, each flower produced on average 9.6 aborted seeds. Mature seeds make up 69.75% of the total number of ovules. In general, in the VA population, individuals produced a greater number of ovules per flower and had a slightly lower rate of aborted seeds than the AR population. There are significant differences in the number of seeds for the population size (size factor). The number of aborted seeds and the total ovules are significantly different for the size factor



and the interaction of both factors (Figure 5; Table 4). In the VA population, the mixed plot was significantly different in terms of the number of seeds ( $F_{1,38} = 36.31$ ,  $P = 5.24e-07$ ), aborted seeds ( $F_{1,38} = 6.057$ ,  $P = 0.0186$ ) and total ovules ( $F_{1,38} = 27.36$ ,  $P = 6.44e-06$ ).



**Figure 4.** Stigmatic pollen deposition in the large, the small and the mixed plots of the two studied populations of *D. fissum* subsp. *sordidum*. “Consp.,” conspecific pollen loads; “Heterosp.,” heterospecific pollen loads; “Total”, total pollen loads. Each bar represents mean  $\pm$  SE. \*Significant differences ( $P < 0.005$ ) using Anova.

## Discussion

Field observations show that the pollinator spectrum for *D. fissum* subsp. *sordidum* in VA and AR localities in Spain is broad, comprising the insect orders Hymenoptera, Lepidoptera and Diptera. This wide spectrum has certain parallelism with some American species of *Delphinium* (Waser, 1982). The differences between populations in terms of pollinator diversity and number of visits may be due to flower supply (e.g. flower density), plant characteristics (e.g. plant size, nectar secretion rates), microclimatic aspects (insolation, ambient humidity or a combination of these factors (Herrera, 1988)). The main pollinator in





both populations is *Bombus terrestris*, representing 72.6% of all individuals. Bumblebees have a vertical movement pattern from the bottom to the top of the inflorescence, following the patterns of nectar abundance of the flowers in the inflorescence (Pyke, 1978).

**Table 4.** ANOVAs of effects of population and size on number of seeds, number of aborted seeds and total ovules.

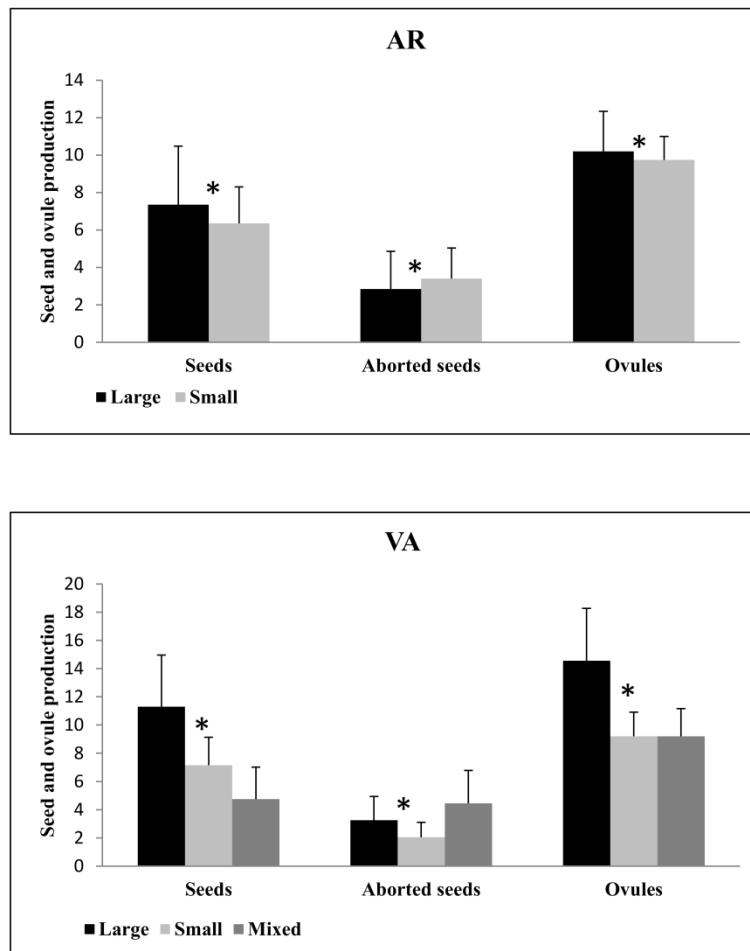
Parameter	Source	d.f	SS	F	P
Number of seeds	Population	1	0.116	0.582	0.4475
	Size	2	8.311	20.775	<b>3.28e-08***</b>
	Population*Size	1	0.588	2.941	0.0896
	Error	95	19.002		
Number of aborted seeds	Population	1	0.38	0.117	0.73328
	Size	2	45.31	7.057	<b>0.00139**</b>
	Population*Size	1	15.31	4.769	<b>0.03143*</b>
	Error	95	305		
Total ovules	Population	1	0.088	1.821	0.18
	Size	2	1.778	18.291	<b>1.91e-07***</b>
	Population*Size	1	0.821	16.900	<b>8.37e-05***</b>
	Error	95	4.61		

“df”, degrees of freedom; “SS”, Sum of Squares; “F”, F-value; “P”, P-value. Significant effect ( $P < 0.05$ ) are shown in bold. Statistical significance: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

In self-compatible species the selfing rate would increase when number of flowers per plant would be higher (Snow *et al.*, 1996), but in this case the maturation of flowers occurs in ascending order in simple racemes that contain simultaneously female flowers (lower positions) and male flowers (higher positions), preventing bumblebees from promoting self-pollination by geitonogamy (Bosch *et al.*, 2001). *Halictus* sp. is the second most important pollinator in both populations. They were frequently observed moving between the stamens of flowers carrying high amounts of pollen attached to their body. This behaviour could have promoted autogamy, as it occurs in other species of *Delphinium* (Orellana *et al.*, 2008). *Macroglossum stellatarum* is the main pollinator of the order Lepidoptera, which only forages nectar, and their pollination effectiveness is much lower than *Bombus terrestris*. In this sense, it is necessary to understand the nuance between the terms pollination efficiency and pollination effectiveness. Firstly, pollination efficiency can be defined as the ratio between the number of pollen grains deposited on a receptive stigma in a single visit by a pollinator and the number of pollen grains carried by the vector. Given the large and hairy bodies of bumblebees, they can transport a larger amount of pollen and are more likely to touch the anthers and stigmas, thus being more efficient than *M. stellatarum*. Secondly, pollination



effectiveness is the ratio of the number of pollen grains from a flower deposited on receptive stigmas and the total number of pollen grains produced by the flower. *M. stellatarum* carries a smaller number of pollen grains than bumblebees (lower pollination effectiveness), but this is compensated for by short visiting times which increases cross-pollination and thus pollination effectiveness (Herrera, 1987). Our results are similar to those reported by Waser & Price (1990), who studied American species of bumblebees and hummingbirds (that have a foraging behaviour similar to hawkmoths). *Delphinium bolosii* C. Blanché & Molero is a species closely related to *D. fissum* subsp. *sordidum*, and it has a similar pollinator spectrum with the predominant pollinators belonging to the Apidae (genus *Bombus*), Halictidae (genus *Lasioglossum* (Curtis, 1833)) and Sphingidae (*Macroglossum stellatarum*) families (see Orellana *et al.*, 2008).



**Figure 5.** Seed and ovule production in the large, the small and the mixed plots of the two studied populations of *Delphinium fissum* subsp. *sordidum*. “Seeds”, number of seeds; “Aborted seeds”, number of aborted seeds; “Ovules”, total ovules. Each bar represents mean ± SE. \*Significant differences ( $P < 0.005$ ) using Anova.



In our study, we recorded the presence of *Mylabris quadripunctata* (Linnaeus, 1767) (order Coleoptera, family Meloidae) acting as a fruit predator in the VA population (it was also recorded in *Delphinium bolosii*, see Bosch, 1999), but we have not observed damaged flowers with a small hole in the calyx nor insects behaving as primary or secondary robbers. However, the incidence of nectar robbery can fluctuate significantly from year to year, depending on seasonal climatic conditions and on the availability of suitable fauna (Bosch *et al.*, 1997).

We observed a decrease in pollinator activities in cloudy and rainy days (pers. obs.), which is apparently the general rule for other plants and indicates the importance of weather in the insects' activity, flower opening, pollen germination and fertilization (Corbet, 1990; Tuell & Isaacs, 2010). The greatest pollinator activity and diversity was recorded in the VA population during the morning (10 am to 1 pm). The most frequent pollinator was *Bombus terrestris*, due to the species' ability to thermoregulate and remain active under relatively low temperatures (Heinrich, 1975). The pollinator activity of *Macroglossum stellatarum* occurred only in the afternoon, corresponding to the time interval of maximum activity (Herrera, 1992), since *M. stellatarum* has a physiological adaptation to tolerate high ambient temperatures, similar to nocturnal hawkmoths (Heinrich, 1970).

Our results suggest that the population and the number of individuals of *D. fissum* subsp. *sordidum* in the studied plots influenced the number of visits per plot and the number of plants and flowers visited per plot. In this way, the VA population had a higher visitation rate than the AR population, and the large plots a higher visitation rate than small plots. Due to the benefits of mutual attraction, plots with more conspecific plants are more attractive and have higher visitation rates to plants and flowers. Interspecific competition has a negative effect on *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* pollination. The number of visits per plot was reduced in the mixed plot. In this case, instead of a facilitation effect occurring due to the increase in the total number of flowers available for pollination, and hence increased visitation rates, the opposite effect occurred owing to the apparent increase in competition between species for resources or/and pollinator services (interspecific competition) (Sih & Baltus, 1987).

Conspecific pollen deposited on stigmas was high and sufficient to fertilize all ovules. The amount of heterospecific pollen was relatively low, the greatest competitor plant being



*Ferula communis*, followed by *Hypericum perforatum* and *Sedum forsterianum*, plants which bloom in synchrony with *D. fissum* subsp. *sordidum*. Statistically, the number of plants per plot did not have any effect on stigmatic pollen load, because we did not find any significant effect caused by plot size. However, when we compared the studied populations and the pure plot with the mixed plot in the VA population, we found significant differences in the conspecific and total pollen loads. These differences can be attributed to a decreased availability of pollinators (pollinator limitation: Bosch & Waser, 2001) or to a decreased quantity and/or quality of the pollen deposited on stigmas (pollen limitation: Kunin, 1997) with decreasing local conspecific density. Nonetheless, in self-compatible species reproductive success depended more on resource availability than on pollinator service (Mustajärvi *et al.*, 2001). Low pollen quality can result from a high fraction of heterospecific pollen in the pollen loads brought by insects to stigmas. Most of *D. fissum* subsp. *sordidum*'s floral visitors have been described as generalists in the closely related species *D. bolosii* (Bosch *et al.*, 1998), and low densities and small populations such as the AR population are more prone to suffer from a decrease in conspecific pollen transfer (Aizen & Feinsinger, 1994).

The number of pollen grains deposited on the stigma must exceed a minimum threshold, which is the number of ovules in the ovary, for fructification to occur (McDade & Davidar, 1984). In our study, the number of seeds, aborted seeds and total ovules responded strongly to the effect of local size (see Bosch & Waser, 1999; Roll *et al.*, 1997). Although the total number of ovules in the small and large plots in AR population was similar, approximately 70% of the ovules matured as seeds in small plots of both populations. Regarding the purity effect, we can observe that the difference between the large and mixed plots of the VA population is greater than double in the number of seeds (Figure 5). Approximately half of ovules matured to seeds in the mixed plot.

At present, we have no actual evidence to say whether this decrease in the number of seeds is due to pollen limitation or limited resources. In any case, we can affirm that the AR population has a small number of individuals, lower seed production than the VA population and will likely suffer stochastic demographic processes, inbreeding depression and low genetic diversity (Ramírez-Rodríguez *et al.*, unpubl.). These observations have implications in terms of conservation and management measures.



### *Implications for its conservation*

Arribes del Duero Natural Park is a territory that fulfils all the conditions (geographical situation, broad elevation range, biogeographical significance and ecological characteristics) to be a priority area for insect diversity conservation (González *et al.*, 2009). It is a heterogeneous landscape that has been affected by modern agro-forestry practices, abandonment of crops, orchards and traditional land uses, landscape fragmentation and habitat degradation. These changes affect insect diversity (Klein *et al.*, 2004) and alter pollinator services entailing negative ecological consequences (Ashman *et al.*, 2004).

The management of endangered species with disjunct distributions is a challenge (Tepedino *et al.*, 2007), especially in the Mediterranean region where landscape fragmentation is the most common threat (Thompson, 2005). Decision-making to deal with this issue of disjunct populations is particularly complex when the necessary information is insufficient or not available at all (Sosa *et al.*, 2002). This is the case of *D. fissum* subsp. *sordidum*, a rare and endemic subspecies in the Iberian Peninsula, which depends on pollinators to produce fruits. Although in this study the number of populations under study and number of replicates was low (only two study populations), our findings suggest that population size and purity influence population fitness. Thus, the lack of pollinator visits can reduce its seed production. Outcrossing promotes gene flow which increases and/or maintains genetic diversity, but without the intervention of pollen vectors in the pollination process, reproductive success decreases. In this sense, conservation programmes for this taxon should include the protection of bumblebee populations. These insects have been observed foraging at maximum distances of 800–1750 m from their nest in mark–recapture experiments (Osborne *et al.*, 2008) and were calculated to fly 2300–2800 m based on models of nest densities (Chapman *et al.*, 2003). According to Ellstrand (1992), most threatened xenogamous species that are more than 10 km apart are not linked genetically through pollen flow. Thus, our populations, which are separated by 13.5 km, remain isolated from each other. Selfing restricts heterozygosity through reduced gene flow but ensures reproduction in critical situations like pollinator scarcity or mate limitation after habitat fragmentation (Kearns & Inouye, 1993); however, *D. fissum* subsp. *sordidum* did not produce seeds by spontaneous self-pollination under greenhouse conditions (Bosch *et al.*, 2001), indicating that insects are key for its pollination.



Populations with small size or low density (e.g. the AR population) may be subject to threats linked to deterministic processes, such as the Allee effect (Stephens *et al.*, 1999), and, as a consequence, reproductive success may also be reduced due to genetic factors, such as increased seed abortion due to inbreeding depression (Young *et al.*, 1996). Thus, the AR population produced a lower number of seeds and ovules than the VA population on average. Although seed germination rate for this subspecies is high, under 5 °C and in dark conditions (Herranz *et al.*, 2010), this does not imply that the population growth rate of the VA population is higher since seedlings and saplings are sensitive to dry and hot periods and have a low survival rate. Due to low recruitment and other environmental factors (see comments below), *D. fissum* subsp. *sordidum* has developed evolutionary mechanisms to increase its ability to persist such as: (1) rhizomes that remain in a latent state when conditions are unfavourable, (2) individuals with long lifespan (some can live up to 10 years), (3) plants develop a strong pubescence on petioles, inflorescences and flowers to prevent water loss by evapotranspiration and (4) the maintenance of a high percentage of individuals in vegetative stage, having thus a possible effect on genetic diversity. Consequently, data on post-seedling survival and environment conditions are required to determine the population growth rate (Buckley *et al.*, 2010). Moreover, *D. fissum* subsp. *sordidum* has reduced genetic diversity (Orellana *et al.*, 2007). For this reason, complementary genetic studies using DNA based techniques should be carried out to observe the subspecies genetic variability. These genetic studies will enable adequate conservation measures to be designed (Ramírez- Rodríguez *et al.*, unpubl.).

Only after identifying and understanding the causes (i.e. weather, herbivory, fires and so on) of spatial and temporal variation in the population growth rate of *D. fissum* subsp. *sordidum* will we be able to predict the subspecies population dynamics. Rus *et al.* (2017) reported the following environmental variables to be the most biologically relevant for the subspecies: (1) mean temperature of wettest quarter, (2) precipitation of warmest quarter, (3) temperature annual range and (4) slope. Furthermore, predictive maps using climate change scenarios point out an important decrease in habitat suitability for the Arribes del Duero Natural Park where the studied populations are located (Ramírez Rodríguez *et al.*, unpubl.).

We have mentioned in the introduction section that some populations can be seriously threatened by herbivory. Nonetheless, we did not detect this threat in the study populations. Fire occurs most frequently in areas with high sun exposure and in grassland and clearing



forests facing southwest, such as the population of the Mines of Santo Adrião, Portugal (see Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2017). Likewise, we point out that the population of Villarino de los Aires (VA) was affected by the fire during the summer of 2006 (Ramírez Rodríguez *et al.*, unpubl.).

In conclusion, pollen limitation may vary from year to year due to environmental variability (Dudash & Fenster, 1997), and consequently seed production may vary concomitantly (Elliott, 2008). For this reason, the variation in pollinator activity should be monitored over several years, at different times during the flowering season and at several sites in order to evaluate the long-term impact on reproduction (Herrera, 1989; Utelli & Roy, 2000) such as the potential links between pollination and seed production, seed germination and recruitment, survival and reproduction of the subsequent plant generation. These factors should be measured beforehand in order to inform the design of appropriate conservation management strategies for this threatened taxon (Tsaliki & Diekmann, 2011).

### Acknowledgments

We are indebted to Félix Torres for helping us in the identification of bees, to David Rodríguez de la Cruz for helping us in the pollen identification and to Javier García and Jose Luis Marcos for their collaboration in field observations. We are grateful to the Editor, Florian Jabbour and one anonymous reviewer for their valuable comments. The authors would also like to thank Maxim Jaffe for reviewing the English of the manuscript.

### References

- Ågren, J. 1996. Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria*. *Ecology* 77: 1779–1790.
- Aizen, M.A. & Feinsinger, P. 1994. Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral honeybees in argentine Chaco Serrano. *Ecological Applications* 4: 378–392.
- Ashman, T., Knight, T.M., Steets, J., Amaresekare, P., Burd, M., Campbell, D. R., Dudash, M.R., Johnston, M.O., Mazer, S.J., Mitchell, R.J., Morgan, M.T. & Wilson, W.G. 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* 85: 2408–2421.



- Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C. & Ortiz, S, eds.** 2008. *Lista Roja 2008 de la flora vascular española*. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). Madrid: SEBICOP.
- Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C. & Ortiz, S. (eds.)**. 2010. Atlas y Libro Rojo de la Flora Amenazada de España. Adenda 2010. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino). Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas. Madrid.
- BOCYL**. 2007. Decreto 63/2007, de 14 de junio, por el que se crean el Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León y la figura de protección denominada Microrreserva de Flora. *BOCYL (Boletín Oficial de Castilla y León. España)* 119: 13197–13204.
- BOJA**. 2012. Decreto 23/2012, de 14 de Febrero, por el que se regula la conservación y el uso sostenible de la flora y la fauna silvestres y sus hábitats. *BOJA (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía de España)* 60: 114–163.
- Bosch, M., Simon, J., Blanché, C. & Molero, J.** 1997. Pollination ecology in tribe Delphinieae (Ranunculaceae) in W Mediterranean Area: floral visitors and pollinator behavior. *Lagascalia* 19: 545–562.
- Bosch, M., Simon, J., Molero, J. & Blanché, C.** 1998. Reproductive biology, genetic variation and conservation of the rare endemic dysploid *Delphinium bolosii* (Ranunculaceae). *Biological Conservation* 86: 57–66.
- Bosch, M.** 1999. *Biologia de la reproducció de la tribu Delphinieae a la Mediterrània occidental*. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans, Arxius de la Secció de Ciències 120.
- Bosch, M. & Wasser, N.M.** 1999. Effects of local density on pollination and reproduction in *Delphinium nuttallianum* and *Aconitum columbianum* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 86: 871–879.
- Bosch, M., Simon, J., Molero, J. & Blanché, C.** 2001. Breeding systems in tribe Delphinieae (Ranunculaceae) in the western Mediterranean area. *Flora* 196: 101–113.
- Bosch, M. & Waser, N.M.** 2001. Experimental manipulation of plant density and its effect on pollination and reproduction of two confamilial montane herbs. *Oecologia* 126: 76–83.





- Bosch, M., Simon, J., Rovira, A.M., Molero, J. & Blanché, C.** 2002. Pollination ecology of the Pre-Pyrenean endemic *Petrocoptis montsiciana* (Caryophyllaceae): effects of population size. *Biological Journal of the Linnean Society* 76: 79–90.
- Brunet, J. & Charlesworth, D.** 1995. Floral sex allocation in sequentially blooming plants. *Evolution* 49: 70–79.
- Buckley, Y.M., Ramula, S., Blomberg, S.P., Burns, J.H., Crone, E.E., Ehrlén, J., Knight, T.M., Pichancourt, J.B., Queded, H. & Wardle, G.M.** 2010. Causes and consequences of variation in plant population growth rate: a synthesis of matrix population models in a phylogenetic context. *Ecology Letters* 13: 1182–1197.
- Chapman, R.E., Wang, J. & Bourke, A.F.G.** 2003. Genetic analysis of spatial foraging patterns and resource sharing in bumble bee pollinators. *Molecular Ecology* 12: 2801–2808.
- Corbet, S.A.** 1990. Pollination and the Weather. *Israel Journal of Botany* 39: 13–30.
- DOCM.** 2001. Decreto 200/2001, de 6 de Noviembre de 2001, por el que se modifica el Catálogo Regional de especies amenazadas de Castilla la Mancha. *DOCM (Documento Oficial de Castilla la Mancha)* 119: 12825–12827.
- DOE.** 2001. Decreto 37/2001, de 6 de Marzo, por el que se regula el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Extremadura. *Diario Oficial de Extremadura (DOE)* 30: 2349–2364.
- Dudash, M.R. & Fenster, C.B.** 1997. Multiyear study of pollen limitation and cost of reproduction in the iteroparous *Silene virginica*. *Ecology* 78: 484–493.
- Elliott, S.** 2008. *Reciprocal benefits in a plant-pollinator mutualism*. PhD diss., Dartmouth College, Hanover, New Hampshire, USA.
- Ellstrand, N.C.** 1992. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos* 63: 77–86.
- Faegri, K. & Van der Pijl, L.** 1979. *The Principles of Pollination Ecology*. 3rd ed. Oxford: Pergamon Press.
- González, J.A., Gayubo, S.F., Asís, J.D. & Tormos, J.** 2009. Diversity and biogeographical significance of solitary wasps (Chrysididae, Eumeninae, and Spheciformes) at the Arribes



- del Duero Natural Park, Spain: their importance for insect diversity conservation in the Mediterranean region. *Environmental Entomology* 38 (3): 608–626.
- Groom, M.J.** 1998. Allee effects limit population viability of an annual plant. *American Naturalist* 151: 487–496.
- Heinrich, B.** 1970. Thoracic temperature stabilization by blood circulation in a free-flying moth. *Science* 168: 580–581.
- Heinrich, B.** 1975. Thermoregulation in bumblebees. II. Energetics of warm-up and free flight. *Journal of Comparative Physiology* 96: 155–166.
- Herranz, J.M., Ferrandis, P. & Martínez-Duro, E.** 2010. Seed germination ecology of the threatened endemic iberian *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae). *Plant Ecology* 211: 89–106.
- Herrera, C.M.** 1987. Components of pollinator “quality”: comparative analysis of a diverse insect assemblage. *Oikos* 50: 79–90.
- Herrera, C.M.** 1988. Variation in mutualisms: the spatio-temporal mosaic of a pollinator assemblage. *Biological Journal of the Linnean Society* 35: 95–125.
- Herrera, C.M.** 1989. Pollinator abundance, morphology, and flower visitation rate: analysis of the “quantity” component in a plant-pollinator system. *Oecologia* 80: 241–248.
- Herrera, C.M.** 1992. Activity pattern and thermal biology of a day-flying hawkmoth (*Macroglossum stellatarum*) under Mediterranean summer conditions. *Ecological Entomology* 17: 52–56.
- Ishii, H.S. & Harder, L.D.** 2006. The size of individual *Delphinium* flowers and the opportunity for geitonogamous pollination. *Functional Ecology* 20: 1115–1123.
- Jabbour, F. & Renner, S.S.** 2011. Resurrection of the genus *Staphisagria* J. Hill, sister to all the other *Delphinieae* (Ranunculaceae). *Phytokeys* 7: 21–26.
- Jalas, J. & Suominen, J.** 1989. *Atlas Florae Europaeae*. Helsinki: Distribution of vascular plants in Europe.
- Kearns, C.A. & Inouye, D.W.** 1993. *Techniques for Pollination Biologists*. Niwot, Colorado: University Press of Colorado.



- Kirchner, F., Luitjen, S.H., Imbert, E., Riba, M., Mayol, M., González-Martínez, S.C., Mignot, A. & Colas, B.** 2005. Effects of local density on insect visitation and fertilization success in the narrow-endemic *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). *Oikos* 111: 130–142.
- Klein, A.M., Steffan-Dewenter, I. & Tschardt, T.** 2004. Foraging trip duration and density of megachilid bees, eumenid wasps and pompilid wasps in tropical agroforestry systems. *Journal of Animal Ecology* 73: 517–525.
- Kunin, W.E.** 1997. *Population biology and rarity: on the complexity of density dependence in insect-plant interaction*. Pp. 150–173 in: Kunin, W.E. & Gaston, K.J. (eds.), *The Biology of Rarity: Causes and Consequences of Rare-Common Differences*. New York: Chapman and Hall, London.
- McDade, L.A. & Davidar, P.** 1984. Determinants of fruit and seed set in *Pavonia dasypetala* (Malvaceae). *Oecologia* 64: 61–67.
- Müller, H.** 1883. *The Fertilisation of Flowers*. London: McMillan & Company.
- Mustajärvi, K., Siikamäki, P., Rytönen, S. & Lammi, A.** 2001. Consequences of plant population size and density for plant-pollinator interactions and plant performance. *Journal of Ecology* 89: 80–87.
- Orellana, M.R., López-Pujol, J., Blanché, C. & Bosch, M.** 2007. Genetic diversity in the endangered dysploid larkspur *Delphinium bolosii* and its close diploid relatives in the Series *Fissa* of the western Mediterranean area. *Biological Journal of the Linnean Society* 92: 773–784.
- Orellana, M.R., Rovira, A., Blanché, C. & Bosch, M.** 2008. Effects of local abundance on pollination and reproduction in the narrow endemic endangered species *Delphinium bolosii* (Ranunculaceae). *Orsis* 23: 27–46.
- Osborne, J.L., Martin, A.P., Carreck, N.L., Swain, J.L., Knight, M.E., Goulson, D., Hale, R.J. & Sanderson, R.A.** 2008. Bumble bee flight distances in relation to the forage landscape. *Journal of Animal Ecology* 77: 406–415.
- Pyke, G.H.** 1978. Optimal foraging in bumblebees and coevolution with their plants. *Oecologia* 36: 281–293.
- Ramírez-Rodríguez, R. & Amich, F.** 2014. Notes on rare and threatened flora in western central Iberia. *Lazaroa* 35: 221–226.



- Ramírez-Rodríguez, R., Medina, L., Menezes de Sequeira, M., Aguiar, C. & Amich, F.** 2017. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) in Portugal: distribution and conservation status. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 74(1): e056.
- Rico Hernández, E., Sánchez Sánchez, J. & Amich, F.** 1981. Números cromosómicos de plantas occidentales 100-107. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 38(1): 265–268.
- Roll, J., Mitchell, R.J., Cabin, R.J. & Marshall, D.L.** 1997. Reproductive success increases with local density of conspecifics in a desert mustard (*Lesquerella fendleri*). *Conservation Biology* 11: 738–746.
- Rus, J.D., Ramírez-Rodríguez, R., Amich, F. & Melendo-Luque, M.** 2017. Habitat distribution modelling, under the present climatic scenario, of the threatened endemic Iberian *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* (Ranunculaceae) and implications for its conservation. *Plant Biosystems*. doi: 10.1080/11263504.2017.1359214.
- Schoen, D.J., Johnston, M.O., L'Heureux, A.M. & Marsolais, J.V.** 1997. Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution* 51: 1090–1099.
- Sih, A. & Baltus, M.S.** 1987. Patch size, pollinator behavior, and pollination limitation in catnip. *Ecology* 68: 1679–1690.
- Snow, A.A., Spira, T.P., Simpson, R. & Klips, R.A.** 1996. *The ecology of geitonogamous pollination*. Pp. 191–216 in: Lloyd, D.G. & Barret, S.C.H. (eds.), *Floral Biology. Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Plants: 410*. Berlin: Springer.
- Sosa, P., Batista, F.J., González, M.A. & Bouza, N.** 2002. La conservación genética de las especies vegetales amenazadas. Pp. 133–160 in: Bañares, Á (ed.), *Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas*. Madrid: Organismo Autónomo de Parques Nacionales.
- Stephens, P.A., Sutherland, W.J. & Freckleton, R.P.** 1999. What is the allee effect? *Oikos* 87: 185–190.
- Tamura, M.** 1995. *Systematic Part*. Pp. 223–496 in: Hiepko, P. (ed.) *Die Natürliche Pflanzenfamilien. Band 17 a IV: (Angiospermae: Ordnung Ranunculales, Fam. Ranunculaceae)*. Berlín: Dunker & Humblot.



- Tepedino, V.J., Toler, T.R., Bradley, B.A., Hawk, J.L. & Griswold, T.L.** 2007. Pollination biology of a disjunct population of the endangered sandhills endemic *Penstemon haydenii* S. Wats. (Scrophulariaceae) in Wyoming, USA. *Plant Ecology* 193: 59–69.
- Thompson, J.D.** 2005. *Plant Evolution in the Mediterranean*. New York: Oxford Univ. Press.
- Tsaliki, M. & Diekmann, M.** 2011. Population size, pollination and reproductive success in two endangered *Genista* species. *Flora* 206: 246–250.
- Tuell, J.K. & Isaacs, R.** 2010. Weather during bloom affects pollination and yield of highbush blueberry. *Journal of Economic Entomology* 103 (3): 557–562.
- Utelli, A.B. & Roy, B.A.** 2000. Pollinator abundance and behavior on *Aconitum lycoctonum* (Ranunculaceae): an analysis of the quantity and quality components of pollination. *Oikos* 89: 461–470.
- Valdés, B., Díez, M.J. & Fernández, J.** 1987. *Atlas polínico de Andalucía Occidental: 450*. Sevilla: Instituto de Desarrollo Regional de la Universidad de Sevilla y Excelentísima Diputación de Cádiz.
- Wang, W., Liu, Y., Yu, S.X., Gao, T.G. & Chen, Z.D.** 2013. *Gymnaconitum*, a new genus of Ranunculaceae endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau. *Taxon* 62: 713–722.
- Waser, N.M.** 1982. A comparison of distances flown by different visitors to flowers of the same species. *Oecologia* 55: 251–257.
- Waser, N.M. & Price, M.V.** 1990. Pollination efficiency and effectiveness of bumblebees and hummingbirds visiting *Delphinium nelsonii*. *Collectanea Botanica (Barcelona)* 19: 9–20.
- Young, A., Boyle, T. & Brown, T.** 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 413–418.



**CONCLUSIONES**







1. La estimación del tiempo de divergencia entre *D. fissum* subsp. *sordidum* y *D. bolosii* tuvo lugar hace aproximadamente 3.04 Ma a finales del Plioceno. En el Pleistoceno inferior, durante la edad Calabriense (1.806-0.781 Ma), ocurrió la diferenciación de haplotipos, y ya en el Pleistoceno medio, durante la edad Ioniense (0.781-0.126 Ma), se diversificaron las poblaciones de ambas taxa. Las especies de la serie *Fissa* no presentan grandes diferencias ecológicas, morfológicas, citológicas ni especialmente genéticas entre ellas, siendo capaces de producir híbridos interespecíficos. Estas características sugieren que, a pesar de que su origen (a finales del Plioceno) y posterior diversificación (a principios-mediados del Pleistoceno) ocurrió hace una gran cantidad de tiempo, el proceso de especiación ha sido relativamente lento y reciente sin suficiente tiempo para diferenciarse. Así, su identificación taxonómica no es fácil de realizar y lleva frecuentemente a cometer errores de identificación que tienen diversas consecuencias para la correcta conservación de los taxa implicados.

2. Los resultados obtenidos a partir del análisis AMOVA (94.32% del total de la varianza) y el análisis SAMOVA ( $F_{CT} = 0.943192$ ), apoyan la hipótesis de dos linajes bien definidos de la serie *Fissa* en la Península Ibérica, tal y como muestra el análisis filogenético de clados anidados: uno de distribución mayoritariamente occidental con una población disyunta en Sierra Mágina (clado 3-2 correspondiente a *D. fissum* subsp. *sordidum*) y otro de distribución oriental (clado 3-1 correspondiente a *D. bolosii*). Por otra parte, la única población conocida de *D. mansanetianum* (Mosqueruela, Teruel), la población de Corduente (Guadalajara) identificada como *D. fissum* subsp. *sordidum*, y otras poblaciones, aún no publicadas, localizadas en el Sistema Ibérico, están filogenéticamente relacionadas con la población de Ulldemolins, y por lo tanto, deberían incluirse en *D. bolosii*. En consecuencia, creemos que es necesario reevaluar el estado de conservación de *D. fissum* subsp. *sordidum* y, especialmente, de *Delphinium bolosii* en un futuro cercano.

3. Los modelos señalan dos áreas de distribución claramente diferenciadas y no superpuestas, delimitadas por el Sistema Ibérico, que actúa como barrera geográfica. Por ello, la distribución potencial de *D. fissum* subsp. *sordidum* presenta una mayor extensión que la actual, y se encuentra fragmentada entre los principales sistemas montañosos del centro y sur de la Península Ibérica. Las áreas con mayor idoneidad del hábitat (0.6-1) son cuatro: Sistema Central (Sierra de Francia, Sierra de Béjar y Sierra



de Gredos), la región occidental de los Montes de Toledo (Sierra de Guadalupe y Sierra Las Villuercas), Sierra Morena (alrededores de Despeñaperros), y algunas áreas de los Sistemas Béticos como Sierra Mágina, Sierra La Pandera y Sierra Nevada). Por otro lado, las áreas con mayor idoneidad del hábitat para *Delphinium bolosii* son: el Prepirineo Catalán, Sistema Mediterráneo Catalán (Cordilleras Costero-Catalanas) y el sureste del Sistema Ibérico.

4. Ambos taxa presentan comportamientos ecológicos similares y responden de forma parecida a las variables ambientales seleccionadas, aunque con algunas pequeñas diferencias entre ellos. Las etapas críticas, en su ciclo vital, son la germinación, floración y fructificación.

- ❖ La temperatura media del trimestre más lluvioso (Bio8) (aproximadamente 4-5°C) seleccionada por el modelo para *D. fissum* subsp. *sordidum* y la temperatura media del trimestre más seco (Bio9) (aproximadamente 0°C) para *Delphinium bolosii* corresponden a la temperatura media del invierno, siendo las temperaturas bajas indicadas esenciales para romper la latencia de la semilla y garantizar el adecuado desarrollo del embrión. En este sentido, la precipitación del trimestre más frío (Bio19) es importante para el desarrollo de las plántulas y la finalización del periodo de latencia del rizoma a finales del invierno.
- ❖ El rango anual de temperatura (Bio7) para *D. fissum* subsp. *sordidum* y la estacionalidad en la temperatura (Bio4) e Isotermalidad (Bio3) en *D. bolosii* revelan que son especies mediterráneas continentales que se encuentran en áreas con un fuerte contraste entre la temperatura máxima del mes más cálido y la temperatura mínima del mes más frío.
- ❖ La precipitación del trimestre más cálido (Bio18) para *D. fissum* subsp. *sordidum* y la estacionalidad en la precipitación (Bio15) para *D. bolosii* juegan un papel importante en el desarrollo de las etapas de floración y fructificación. Así, *D. fissum* subsp. *sordidum* requiere aproximadamente 50 mm y *D. bolosii* entre 130-160 mm de precipitación durante los meses de verano.
- ❖ La pendiente (Slo) muestra que ambos taxa tienen un comportamiento diferente. El modelo para *D. fissum* subsp. *sordidum* selecciona áreas con alta pendiente, lo que indica que es un taxon montañoso y que además se desarrolla en laderas



sombreadas orientadas hacia el norte, como señala la variable sombreado (Hil). Por el contrario, el modelo para *D. bolosii* selecciona áreas con baja pendiente aunque este hecho puede ser debido a que la resolución del modelo no capture toda la variabilidad espacial que ofrece la complejidad del terreno.

5. Las áreas potenciales futuras de los taxa de la serie *Fissa* en la Península Ibérica no se superponen, tal y como muestran los modelos obtenidos usando dos escenarios de cambio climático diferentes (RCP 4.5 y RCP 8.5). En el caso de *D. fissum* subsp. *sordidum*, su área de distribución potencial futura aumentó, para todos los escenarios de cambio climático, hacia el noreste del Sistema Central, sureste de los Sistemas Béticos y la región occidental del Sistema Ibérico, siendo las poblaciones localizadas en la submeseta norte las que experimentan una mayor reducción de idoneidad de hábitat. La distribución mismach unimodal y los valores  $D$  negativos del test de Tajima (Tajima's  $D = -0.108$ ,  $P > 0.1$ ) apoyan una expansión de rango de las poblaciones de *D. fissum* subsp. *sordidum* desde las oscilaciones climáticas del Pleistoceno hasta el presente. Por el contrario, la extensión del área potencial futura para *D. bolosii* disminuyó pero la idoneidad del hábitat aumentó. Las poblaciones de *D. fissum* subsp. *sordidum* que se encuentran en los Sistemas Béticos y en el Sistema Central así como las poblaciones de *Delphinium bolosii* en el Prepirineo pueden desplazarse a áreas de mayor altitud si las condiciones ambientales empeoran. Finalmente, *D. fissum* subsp. *sordidum* se considera un taxon más resistente a la sequía y a las altas temperaturas que *D. bolosii*, por eso este último se encuentra en desfiladeros estrechos, valles cerrados y/o áreas cercanas a cursos de agua, los cuales son hábitats que pueden ser considerados como áreas refugio.

6. Los Modelos de distribución de especies (MDE) no pueden sustituir a los trabajos de campo. Sin embargo, son una herramienta útil que refuerzan a estos últimos y que nos ayudan en su diseño y en la identificación de posibles áreas potenciales idóneas de expansión o restauración, priorizando así su búsqueda en ellas, con el fin de optimizar nuestros limitados recursos económicos y humanos. Teniendo en cuenta un umbral del 60% de probabilidad de presencia y el grado de conocimiento florístico de las diferentes zonas de la Península Ibérica, nuestros esfuerzos de búsqueda de nuevas poblaciones de *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* deberían focalizarse en Las Villuercas (Montes de Toledo), la región de Despeñaperros (Sierra Morena) y Sierra La Pandera (Sistemas Béticos) así como continuar con la investigación en Sierra de Francia, Sierra de Béjar y



Sierra de Gredos (Sistema Central). Asimismo, estas áreas previamente mencionadas junto con el Parque Natural de las Arribes del Duero, Sierra Madrona y algunos enclaves de los Sistemas Béticos son zonas idóneas para realizar, si fuera necesario, introducciones o translocaciones, ya que están incluidas en algún área protegida, a excepción de Sierra La Pandera.

7. Los trabajos de campo son esenciales para garantizar un actual seguimiento de las poblaciones conocidas de un taxon, así como realizar búsquedas activas de las mismas, entre otras tareas. Esta memoria doctoral refuerza esta premisa, ya que 4 nuevas poblaciones han sido descubiertas para *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* durante los 5 años de tesis. Una de ellas representa la primera cita para Portugal y ocupa la posición más occidental de su área de distribución actual. Su estado de conservación, aplicando los criterios y categorías regionales de la UICN, es “**En Peligro Crítico**” CR B1ab(v)c(iv) + 2ab(v)c(iv);C2a(i,ii)b;D2.

8. Se confirma que el núcleo principal de distribución de *D. fissum* subsp. *sordidum* se encuentra en el centro-oeste de la Península Ibérica, especialmente en la provincia de Salamanca (Castilla y León), en la cual se encuentran 6 poblaciones conocidas actualmente. Ocupa áreas heterogéneas y se diferencian dos principales comportamientos fitosociológicos: (1) el hábitat principal está constituido por bosques de *Quercus pyrenaica* y/o *Castanea sativa*, más o menos aclarados, pertenecientes a la alianza *Quercion pyrenaicae* o a las primeras etapas de sustitución de esta asociación (*Pruno spinosae-Rubion ulmifolii*); y (2) en las poblaciones de las Arribes del Duero y en la población de las minas de Santo Adrião, la subespecie se desarrolla en el seno de bosques acidófilos marcescentes del *Quercion broteroi*.

9. El número de individuos reproductores experimenta una importante variabilidad interanual, influida en parte, por la cantidad de precipitaciones que tiene lugar durante los meses de invierno-principios de primavera. En cambio, las poblaciones se mantienen estables, destacando la predominancia de la fase vegetativa (70-75% del total de individuos) en la estructura poblacional. Este hecho revela que la estrategia reproductiva de *D. fissum* subsp. *sordidum* ha evolucionado favoreciendo la reproducción vegetativa por multiplicación o fragmentación del rizoma.



10. *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* es un taxon entomófilo generalista y principalmente alógamo. El espectro polinizador, para las dos poblaciones salmantinas estudiadas (Aldeadávila de la Ribera y Villarino de los Aires), es amplio, con un total de 234 insectos anotados y consta de los siguientes órdenes de insectos: Hymenoptera (88.8%), Lepidoptera (10.3%) y Diptera (0.9%). El polinizador principal en ambas poblaciones estudiadas fue *Bombus terrestris* (72.6%), seguido de *Halictus* sp. (12.4%) y finalmente de *Macroglossum stellatarum* (5.1%).

11. La abundancia local (número de individuos/plot), la pureza (abundancia relativa/plot) y el tamaño poblacional (número de individuos en la población) son variables que influyen en el número de visitas de los potenciales polinizadores, en el número de plantas y flores visitadas por plot, en los granos de polen depositados sobre los estigmas de las flores y en la producción de semillas de *D. fissum* subsp. *sordidum*. En general, la población de Villarino de los Aires, con un mayor tamaño poblacional, y los plots de mayor área seleccionada tuvieron más visitas, más carga polínica y menor tasa de semillas abortadas que la población con un menor tamaño poblacional (Aldeadávila de la Ribera) y los plots de menor área seleccionada. La presencia de diferentes especies que coinciden con la floración de *D. fissum* subsp. *sordidum*, estudiada a través de un plot mixto, tuvo efectos negativos (competencia interespecífica) e influyó en el número de visitas/plot, en la carga polínica total y conespecífica y en la producción de óvulos, óvulos abortados y semillas. En definitiva, y aunque se recomienda ampliar el estudio espacial y temporalmente, la abundancia local, el tamaño y la pureza poblacional son variables que influyen en el bienestar de las poblaciones.

12. Un total de 16 haplotipos fueron identificados de 15 poblaciones estudiadas, siendo H4 el haplotipo más frecuente para *D. fissum* subsp. *sordidum*, el cual se distribuye por el Sistema Central y en la submeseta norte, y H14 para *D. bolosii* el cual se localiza en el Sistema Ibérico. Las poblaciones de Sierra Mágina y Villatoro fueron las que más se diferencian del resto de las poblaciones de *D. fissum* subsp. *sordidum*, estando relacionadas filogenéticamente con la población de Ulldemolins de *D. bolosii*. Un total de 8 poblaciones (4 de *D. fissum* subsp. *sordidum* y 4 de *D. bolosii*) contienen un solo haplotipo, lo que significa una gran afinidad geográfica, una importante estructura filogeográfica y una marcada diferenciación haplotípica. El flujo genético entre las poblaciones es reducido, como indican los valores de  $F_{ST} = 0.989$ ,  $h_S = 0.311$  y  $G_{ST} =$



0.675, así como la fragmentación alopátrica detectada para todo el cladograma, y el aislamiento por distancia revelado para los clados 3-2 (*D. fissum* subsp. *sordidum*) y 3-1 (*D. bolosii*). La capacidad y el modo de dispersión de los taxa estudiados y la conectividad del hábitat, ya que existen importantes barreras geográficas, influyen de forma negativa en el flujo genético entre poblaciones. Estos resultados señalan hacia un riesgo significativo de extinción por deriva genética y/o endogamia, por lo que es necesaria la protección y conservación de las especies de la serie *Fissa* en la Península Ibérica.

13. El rango de distribución de *D. fissum* subsp. *sordidum* se encuentra severamente fragmentado, con una extensión de presencia de 3896.37 km<sup>2</sup> y un área de ocupación de aproximadamente 20 km<sup>2</sup>. El número de poblaciones es limitado (12), distribuyéndose, en gran parte, en Castilla y León (8) y aparentemente se encuentran aisladas unas de otras, experimentando fluctuaciones extremas en el número de individuos reproductores de un año a otro. Las principales amenazas a las que se enfrenta la subespecie son el pastoreo, el turismo, las actividades recreativas y la baja tasa de reclutamiento. Como amenazas potenciales se deben tener en cuenta la colecta de individuos y el fuego. El criterio E fue aplicado para la población de Villarino de los Aires (Salamanca) y se asignó la categoría CR ya que la probabilidad de cuasi-extinción aumentó más del 50% en 10 años. Así, el estado actual de conservación asignado en Castilla y León para *D. fissum* subsp. *sordidum* es “**En Peligro**” –EN B1ab(iii)c(iv) + 2ab(iii)c(iv); C2a(i)b;D1– de acuerdo con los criterios B, C, D y E de la UICN.

14. Se propone la creación de una microrreserva de flora en el enclave “**Cascada del Pinero**”, ubicado en la localidad salmantina de Masueco de la Ribera. La propuesta se apoya en las características geológicas y ecológicas excepcionales de la zona, así como en la presencia de especies raras en la provincia de Salamanca (*Adiantum capillus-veneris*), endémicas (*Clematis campaniflora*) y endémicas y amenazadas (*Antirrhinum lopesianum*).

15. Nuestros resultados, obtenidos a través de técnicas multidisciplinares, sugieren redactar sendos planes de recuperación para *D. bolosii*, y especialmente, para *D. fissum* subsp. *sordidum*. Estos planes de recuperación deben de incluir medidas de conservación in situ tales como desarrollar programas de monitorización



individualizados a medio y largo plazo, no solo para las taxa de *Delphinium*, sino también para las poblaciones de polinizadores (por ejemplo, *Bombus terrestris*), identificar y reducir los factores de amenaza (como por ejemplo limitar el acceso a las poblaciones de herbívoros), búsqueda intensiva de nuevas poblaciones, priorizar estas medidas de conservación en aquellas poblaciones con un tamaño poblacional pequeño, sujetas a amenazas y/o que poseen haplotipos endémicos tales como las poblaciones de las Minas de Santo Adrião, Villarino de los Aires, Aldeadávila de la Ribera, Hervás, Villatoro y Sierra Mágina para *Delphinium fissum* subsp. *sordidum* y Corduente, Mosqueruela, Uldemolins y Rubió de Baix para *D. bolosii* y evaluar las introducciones y translocaciones, en caso de haberlas. En cuanto a las medidas de conservación ex situ, cabría señalar el almacenaje de semillas de las poblaciones anteriormente mencionadas en bancos de germoplasma (p.e. en la Universidad de Salamanca o en la Universidad de Barcelona), con el fin de preservar su diversidad genética y su potencial evolutivo y diseñar protocolos de germinación para llevar a cabo, si fuera necesario, introducciones o translocaciones.











