

LA FLORA ENDÉMICA DEL PARQUE NACIONAL DE GARAJONAY BAJO LA PERSPECTIVA MOLECULAR: LAS SECUENCIAS DE ADN COMO HERRAMIENTA EN LA IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Angiospermas

RUTH JAÉN-MOLINA¹, ÁGUEDO MARRERO RODRÍGUEZ²,
JORGE ALFREDO REYES-BETANCORT⁴, JOSÉ NARANJO SUÁREZ³,
ARNOLDO SANTOS-GUERRA⁴ Y JULI CAUJAPE-CASTELLS^{1*}

Briófitos

OLAF WERNER⁵, JAIRO PATIÑO⁶, JUANA MARÍA GONZÁLEZ-MANCEBO⁶,
ISABEL DRAPER⁷ Y ROSA MARÍA ROS⁵

RESUMEN

Utilizamos una muestra amplia de la flora Angiospérmica y Briofítica del P.N. de Garajonay que representa a taxones endémicos de las Islas Canarias para testar la posibilidad de complementar la aproximación clásica a la identificación taxonómica mediante: (i) las dos regiones del ADN cloroplástico (*rbcL* y *matK*), elegidas como “código de barras” de plantas terrestres por el Plant Working Group del Consorcio del Código de Barras de La Vida (CBOL PWG) y (ii) otras regiones del ADN nuclear (ADNn) y cloroplástico (ADNcp), aplicadas sólo en Briófitos (*atpB-rbcL*, *ITS*, *rpl16*, *trnA-trnL-trnE*, *trnG* y *trnT-trnE*). Esta muestra representativa fue estratégicamente seleccionada para poder responder a las siguientes cuestiones: (i) ¿Es suficiente el porcentaje de discriminación taxonómica, proporcionado por las regiones de ADN, para proponer su aplicabilidad general como complemento a la morfología en la identificación específica de la flora endémica de este “hotspot” oceánico de biodiversidad?, (ii) ¿Pueden las secuencias de ADN clarificar alguno de los casos donde los caracteres diagnóstico morfológicos han sido hasta ahora

¹ Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN. Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”, Apartado de correos 14 de Tafira Alta, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias (Spain). ruthjaen@gmail.com

* autor para correspondencia. julicaujape@gmail.com

² Herbario. Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”, Apartado de correos 14 de Tafira Alta, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias (Spain). agmarrero@grancanaria.com

³ Departamento de Especies Amenazadas y Base de datos, Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”, Apartado de correos 14 de Tafira Alta, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias (Spain). jnaranjo55@gmail.com

⁴ Jardín de Aclimatación de La Orotava (ICIA). C/ Retama 2, 38400 Puerto de la Cruz, Tenerife, Islas Canarias (Spain).

⁵ Universidad de Murcia, Facultad de Biología, Departamento de Biología Vegetal, Campus de Espinardo, 30100 Murcia (Spain). werner@um.es rmros@um.es

⁶ Departamento de Biología Vegetal (Botánica), Universidad de La Laguna, C/ Astrofísico Francisco Sánchez s/n, 38071 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias (Spain). jpatino@ull.es glezm@ull.es

⁷ Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid (Spain). isabel.draper@uam.es

elusivos o conflictivos?, y (iii) ¿Sugiere la información molecular la existencia de especies crípticas no detectadas por la morfología? En los dos grupos biológicos examinados, se valoró como más que suficiente la proporción de éxito de la aproximación molecular a la identificación de los casos taxonómicamente claros, a pesar de que en Briófitos se constató la inviabilidad de utilizar las dos regiones del ADNcp consensuadas por el CBOL, y se optó por usar las regiones mencionadas anteriormente (bien solas, bien en combinaciones *ad hoc*). Así mismo, la perspectiva molecular ha permitido contribuir a la clarificación de algunos casos conflictivos en ambos grupos, y a revelar discrepancias con la taxonomía clásica que dan pábulo a varias hipótesis sobre posibles especies crípticas. Otros descubrimientos significativos que apoyan la continuidad de una aproximación morfológico-molecular a la investigación taxonómica de la flora endémica Canaria son: (i) la necesidad imperiosa de utilizar otras regiones del ADN para la posible caracterización taxonómica molecular de los Briófitos, (ii) la idoneidad de utilizar en Angiospermas un criterio de discriminación taxonómica basado exclusivamente en caracteres diagnóstico, y (iii) el mayor éxito de *matK* en la discriminación entre Angiospermas co-específicas taxonómicamente conflictivas, a pesar de las importantes dificultades técnicas encontradas en la amplificación de esta región. Los resultados de esta investigación son un paso importante para la elaboración de un catálogo taxonómico morfológico-molecular de las especies de Angiospermas y Briófitos del P.N. de Garajonay, y para la estimación de la Diversidad Filogenética de la flora canaria con objetivos sistemáticos y conservacionistas.

Palabras clave: Taxonomía, ADN, endemismos Canarios, Briófitos, Angiospermas.

SUMMARY

We tested the feasibility of complementing classical taxonomy with the information contained in: (i) the two chloroplast DNA regions (*rbcl* and *matK*) proposed by the Plant Working Group of the Consortium for the Barcode of Life (CBOL) as "DNA barcodes" for plants, and (ii) other regions of nuclear and chloroplast DNA, only in Bryophytes (*atpB-rbcl*, *ITS*, *rpl16*, *trnA-trnL-trnF*, *trnG* y *trnT-trnE*) using a broad sampling of the Angiospermic and Bryophytic flora at the N.P. of Garajonay (Canary Islands). These samples were strategically chosen to answer the following questions: (i) Is the percentage of taxonomic discrimination success provided by the DNA regions enough to propose its widespread applicability, as a complement to morphology, in the species ID of the endemic flora of this oceanic insular hotspot?, (ii) May the DNA sequences shed light on cases where morphological diagnosis has been elusive or conflictive?, and (iii) Does molecular information suggest the existence of cryptic species overlooked by morphology? In both biological groups assessed, the success of the molecular approach to species identification is beyond sufficiency for taxonomically clear cases; however, in Bryophytes, the two CBOL's cpDNA regions are not applicable for various reasons, and we opted to use the above-mentioned cpDNA regions (either alone, or in *ad hoc* combinations). The molecular approach also made it possible to provide resolution to some conflictive cases in both groups, and to elicit discrepancies with classical taxonomy that support hypotheses of cryptic species. Other important insights for the continuity of the morphological-molecular approach to the taxonomy of the Canarian flora are: (i) the necessity of using other DNA regions for the taxonomic characterization of the Bryophytes, (ii) the suitability of only a character-based discrimination criterion for Angiosperms, and (iii) the much higher success of *matK* in discriminating taxonomically conflictive Angiosperms, despite major technical hurdles encountered in the amplification of this region. We believe that these results pave the way to the construction of a morphological-molecular taxonomic catalogue of the endemic Angiosperms and Bryophytes at Garajonay National Park, and to estimate Phylogenetic Diversity of the Canarian Flora with systematic and conservation outlooks.

Key words: Taxonomy, DNA, Canarian endemics, Briophytes, Angiosperms.

INTRODUCCIÓN

Las islas albergan una cuarta parte de las especies de plantas vasculares conocidas en todo el planeta (SUDA *et al.* 2005; KREFT *et al.* 2008; KIER *et al.* 2009), y 20 de los 34 “hotspots” de biodiversidad definidos por MYERS *et al.* (2000) son islas, o contienen un componente insular relevante. En consecuencia, los ecosistemas insulares representan importantes reservorios de riqueza vegetal endémica (9,5 veces mayor que en regiones continentales según KIER *et al.* 2009). Las islas oceánicas poseen mayor número de especies endémicas por unidad de área que las continentales, pero las dificultades de identificación de estos endemismos son también mayores, por la gran incidencia de fenómenos como la radiación adaptativa y la hibridación (LOSOS & RICKLEFS 2009; MANSION *et al.* 2008; WHITTAKER & FERNÁNDEZ-PALACIOS 2007). Por lo tanto, las islas oceánicas constituyen valiosos laboratorios naturales también para la investigación taxonómica. Además, el prolongado aislamiento evolutivo de los endemismos de islas oceánicas los hace mucho más sensibles a los cambios medioambientales que los de otros entornos (CAUJAPÉ-CASTELLS *et al.* 2010), por lo cual este tipo de investigación tiene siempre un marcado componente conservacionista.

Las Islas Canarias son un archipiélago oceánico conformado en la actualidad por siete islas principales que, según las estimaciones oficiales más recientes, contienen unas 607 especies vegetales endémicas (ACEBES-GINOVÉS *et al.* 2004; SANTOS-GUERRA, datos sin publicar) lo que equivale a aproximadamente un 32% de su flora nativa. El archipiélago Canario representa menos del 0,1% de la totalidad del territorio español, pero alberga a más del 50% de sus especies endémicas de plantas vasculares, lo que le confiere el mayor índice de endemidad para cualquier área continental o insular similar en Europa y el cuarto Norte de África. Gran parte de la flora endémica de Canarias pertenece a linajes caracterizados por espectaculares radiaciones morfológicas cuyo polimorfismo molecular es, en el mejor de los casos, moderado o bajo (JAÉN-MOLINA *et al.* 2009; CAUJAPÉ -CASTELLS 2010).

En Canarias, la isla de La Gomera es la más rica en especies endémicas por unidad de superficie, en términos de densidad relativa, seguida del resto de islas centro-occidentales de Canarias y de la isla de Madeira (MARRERO & FRANCISCO-ORTEGA 2001; MARTÍN *et al.* 2005). El Parque Nacional de Garajonay abarca una parte importante de esta isla y contiene una gran diversidad vegetal y de hábitats, destacando las numerosas especies arbóreas de la laurisilva. En consecuencia, consideramos que el P.N. de Garajonay es un buen modelo para evaluar la viabilidad de la aplicación de varias regiones del ADN a la identificación taxonómica en un enclave insular oceánico.

La presente investigación se inspiró, en parte, por la acuciante problemática taxonómica que sufren algunos Briófitos y Angiospermas endémicos de La Gomera, de Canarias o de Macaronesia que se distribuyen en el P.N. de Garajonay, y en parte, debido a que el Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” (JBCVC) es, desde 2005, una de las instituciones participantes del Consorcio del Código de Barras de La Vida (CBOL). Por ello, en este proyecto se aplican, además de otras, las dos regiones del ADN cloroplástico (ADNcp) elegidas como “código de barras” de plantas terrestres por el Plant Working Group del mencionado Consorcio (CBOL PWG), con la finalidad de lograr una adecuada discriminación taxonómica, que permita realizar un censo completo de la diversidad vegetal del Garajonay y diseñar mejores estrategias científicas de conservación.

OBJETIVOS

Disponer de nuevas herramientas que nos permitan identificar correctamente la biodiversidad es de suma importancia para proporcionar otro tipo de datos esenciales que apoyen los esfuerzos científicos para la conservación de las especies. La finalidad de este trabajo de investigación taxonómica es testar la viabilidad de utilizar “identificadores moleculares” como complemento a las variables morfológicas en la caracterización taxonómica de la flora endémica Canaria. Para ello, usamos una muestra representativa

de elementos endémicos de la flora Angiospérmica y Briofítica distribuidos en el P.N. de Garajonay (algunos de ellos con prioridad de conservación).

Nuestros objetivos concretos son:

1. Testar la utilidad discriminante de las dos regiones cloroplásticas (*rbcl* y *matK*) elegidas por el CBOL PWG (y, en su defecto, de otras regiones del ADNn y ADNcp) en la flora Angiospérmica y Briofítica endémica de Canarias y Macaronesia que se distribuye en el P.N. de Garajonay (La Gomera).
2. Examinar la posible existencia de especies crípticas para la morfología y, en su caso, valorar la necesidad de ampliar el conocimiento taxonómico de los grupos afectados.
3. Contribuir a la gestión del P.N. de Garajonay sugiriendo acciones para la conservación basadas en (i) la elaboración de un censo más completo y preciso de las especies de Angiospermas y Briófitos que alberga, y (ii) la delimitación de áreas prioritarias de conservación según los indicadores de Diversidad Filogenética (PD, *sensu* FAITH 2005) obtenidos.

Más allá de estos objetivos, los identificadores moleculares basados en secuencias de ADN pueden tener implicaciones de gran calado, no solamente desde el punto de vista de la taxonomía y de la investigación del origen y relaciones entre sus elementos, sino también desde una perspectiva legal y de gestión sostenible de la biodiversidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Elección y muestreo de taxones

Este estudio comprende 93 taxones, en su mayoría correspondientes a especies, pero también a algunas subespecies, que fueron estratégicamente elegidos y que representan 64 taxones de 23 familias de Angiospermas (estudiados por los investigadores del JBCVC y el Jardín de Aclimatación de la Orotava, JAO) y, 29 taxones restantes que pertenecen a 9 familias distintas de Briófitos (en concreto de musgos) y, que fueron

analizados por los grupos de investigación de las dos Universidades copartícipes (Universidad de La Laguna, ULL y Universidad de Murcia, UMU). Estos distintos casos de investigación agrupan (i) situaciones donde la taxonomía clásica ha permitido delimitar las Unidades Taxonómicas Operativas (UTOs) sin ambigüedades, y (ii) casos donde existe un conflicto taxonómico de clara relevancia para la circunscripción y conservación de especies endémicas que se distribuyen en el P.N. de Garajonay. La mayoría de los taxones estudiados se distribuyen en La Gomera pero también, se analizan muestras recolectadas en otras islas del archipiélago Canario, además de Madeira, Azores y Cabo Verde (Angiospermas y Briófitos) e incluso de otros continentes como Europa, África, Asia y América (Briófitos), ya que nuestras observaciones previas nos hacían sospechar que la diversidad genética dentro de las poblaciones sería baja o inexistente.

En el caso de los Briófitos, la endemidad reviste especial importancia, pues en este grupo (en general de amplia distribución mundial), el número de especies endémicas descritas es muy inferior al que presentan los espermatófitos. En el P.N. de Garajonay se ha citado 1 endemismo canario, 11 endemismos macaronésicos y 4 especies que podemos denominar como endemismos ibero-macaronésicos, ya que su distribución en la región Macaronésica se extiende hasta el SW de la Península Ibérica, donde son consideradas como especies muy raras (GONZÁLEZ-MANCEBO *et al.* 2008 a y b). Entre estas especies se seleccionaron representantes de 6 géneros para su análisis molecular.

En Angiospermas, se recolectaron hojas frescas y se geo-referenciaron un total de 183 individuos (mínimo 2-3 individuos por población) en unas 65 poblaciones de las 23 familias seleccionadas (Tabla 1), gracias a las expediciones de muestreo coordinadas (aunque independientes), de los grupos del JBCVC y JAO, tanto en La Gomera (Fig. 1) como en Tenerife, La Palma y Gran Canaria. Una parte del material estudiado perteneciente a dichas islas, así como a Madeira, ya se encontraba depositado en el Banco de ADN de la Flora Canaria del JBCVC. En las expediciones de muestreo que se llevaron a cabo en La Gomera,

TAXON	N	Ntax	p	matK + rbcL	
				Ndiag	Npol
Poaceae	18	4	0.00152	3	1
Lamiaceae	16	6	0.00420	0	4
Lauraceae	13	7	0.00668	0	7
Fabaceae	12	5	0.00357	0	4
Sambucaceae	20	2	0.00544	4	2
Brassicaceae	65	12	0.02064	4	11
Rosaceae	13	2	0.00956	5	5
Euphorbiaceae	10	3	0.00807	4	2
Cyperaceae	6	3	0.01343	6	3
Rutaceae	16	4	0.01045	3	11
Ericaceae	19	3	0.03121	6	24
Aquifoliaceae	6	3	0.03170	7	17
Asparagaceae	6	2	0.00467	3	0
Asteraceae	10	6	0.01677	3	14
Caryophyllaceae	5	5	0.02163	2	24
Cistaceae	6	3	0.00537	5	0
Crassulaceae	6	2	0.00734	5	3
Geraniaceae	3	2	0.00613	2	3
Myrsinaceae	6	2	0.02672	3	27
Myricaceae	6	3	0.01877	4	14
Oleaceae	4	2	0.02511	6	18
Rubiaceae	6	4	0.02117	4	1
Violaceae	3	2	0.00623	3	1
Totales	277	87	0.01332	4	9

Tabla 1. Familias y número total de comparaciones (N) dentro de las diferentes familias de Angiospermas examinadas, junto al resumen de los resultados. Ntax: número total de taxones examinados por familia; p: distancia-*p* promedio entre taxones de una misma familia; Ndiag: número promedio de caracteres diagnóstico detectados (polimórficos y no polimórficos); Npol: número promedio de caracteres polimórficos no-diagnóstico detectados.

Table 1. Families and total number of comparisons (N) within the different Angiosperm families assessed, and summary of results. Ntax: Total number of taxa examined by family; p: average of the *p*-distance between taxa of the same family; Ndiag: average number of detected diagnostic character (polymorphic and non-polymorphic); Npol: average number of polymorphic non-diagnostic characters identified.

contamos con la valiosa ayuda del personal del P.N. de Garajonay, especialmente en lo que se refiere a la obtención de algunas muestras complicadas de recolectar por la abrupta orografía o, por el hecho de que, en algunos taxones, existen individuos reintroducidos imposibles de identificar si no se dispone de la información “histórica” que posee el personal de este Parque Nacional. En la Figura 1, mostramos las áreas de La Gomera donde se recolectó la mayor parte del material vegetal de Angiospermas incluido en este estudio, quedando patente que el muestreo se realizó más exhaustivamente en el P.N. de Garajonay. En cada una de las poblaciones visita-

das se recolectaron pliegos testigos asociados a cada especie muestreada que se depositaron en los herbarios LPA (en el JBCVC) y ORT (en el JAO). En el caso de los Briófitos, la experiencia previa de trabajo en el P. N. nos permitió tener una buena base de datos para hacer una amplia selección de localidades en diferentes situaciones climáticas y microclimáticas para cada uno de los taxones seleccionados. En cada localidad se recolectaron al menos cinco muestras, y de cada una de ellas se hizo un duplicado de tal manera que el material está depositado en los herbarios TFC de la ULL y el herbario MUB de la UMU.

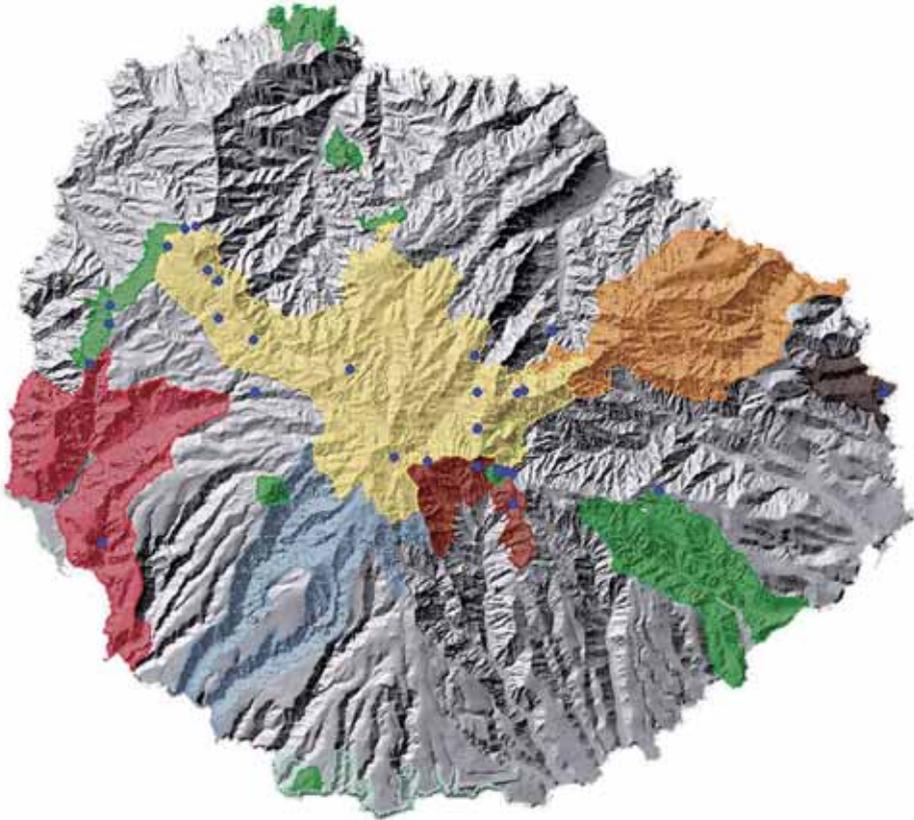


Figura 1. Mapa de distribución de los taxones de Angiospermas recolectados en La Gomera. Las recolecciones fueron más exhaustivas en el P.N. de Garajonay (área marcada en amarillo) y zonas próximas.

Figure 1. Distribution map of the Angiosperm taxa collected in La Gomera. Sampling was more intensive within the N.P. of Garajonay (marked in yellow) and neighboring areas.

Extracción, cuantificación y codificación del ADN

Las extracciones del ADN total, en Angiospermas, se llevaron a cabo por el método CTAB 2X (DOYLE & DOYLE 1987; PALMER *et al.* 1988), y tras las mismas, se comprobó la calidad del ADN extraído tanto, en geles de agarosa (1%), como con el biofómetro (BioPhotometer Eppendorf). Posteriormente, varias alícuotas de los extractos de ADN fueron depositados en el Banco de ADN de la Flora Canaria del JBCVC.

En los Briófitos se utilizó el GenElute Plant Genomic DNA MiniPrep Kit de Sigma para la ex-

tracción del ADN total. La calidad de los extractos de ADN se comprobó como en Angiospermas, y los mismos están depositados en las instalaciones del Departamento de Biología Vegetal de la UMU.

Amplificación y secuenciación del ADN

En Angiospermas, las amplificaciones de las regiones *rbcl* y *matK*, se llevaron a cabo según los protocolos publicados en la web del CBOL (www.barcoding.si.edu) por el PWG, con algunas modificaciones para *matK*, según otros autores y con otros cebadores (FORD *et al.* 2009; FA-

ZEKAS *et al.* 2008; KRESS & ERICKSON 2007; COWAN *et al.* 2006; KIM, sin publicar). A diferencia de la región *rbcl*, para la que el éxito de amplificación y secuenciación fue casi de un 100%, la región *matK* no sólo presentó dificultades en su amplificación sino también para su secuenciación. Por ello, fue necesaria la optimización de los protocolos de amplificación y secuenciación de esta región. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa (1%), y purificados (GenElute PCR Clean-Up, Sigma-Aldrich) antes de ser enviados a la empresa MACROGEN en Corea para su secuenciación bidireccional. El alineamiento y la edición de secuencias se realizaron con el programa Bioedit (HALL 2004) y su aplicación accesoria Clustal W (THOMPSON *et al.* 1994).

En Briófitos, debido a que las indicaciones del CBOL resultaron altamente insatisfactorias, se tomó la decisión de utilizar, en cada caso, las regiones que a nuestro juicio eran más apropiadas según la información previa disponible (especialmente la existencia en GenBank de secuencias relacionadas).

El espaciador entre *atpB-rbcL* fue amplificado con los cebadores *atpB-1* y *rbcl-1* de CHIANG *et al.* (1998). En algunos casos tuvimos problemas con estos cebadores y utilizamos los siguientes: *atpb-2* y *rbcl-2* de VANDERPOORTEN & LONG (2006) rediseñados por el grupo de Briófitos. Para el intrón de *rpl16* se utilizaron los primers F71 y R1661 de JORDAN *et al.* (1996). Para la región

trnL-F utilizamos los cebadores de TABERLET *et al.* (1991), con el cebador A rediseñado según las indicaciones de HERNÁNDEZ-MAQUEDA *et al.* (2007). El intrón de *trnG* se amplificó con los cebadores *trnGF-Leu* de WERNER *et al.* (2009) y *trnGR* de PACAK & SZWEYKOWSKA-KULINSKA (2000). El espaciador *trnT-trnE* se amplificó con los cebadores *trnE* de DOYLE *et al.* (1992) y *trnT(P*)* de DEMESURE *et al.* (1995). Finalmente los espaciadores nucleares *ITS1* e *ITS2* se amplificaron en reacciones separadas porque en algunos casos tuvimos problemas con muestras no recién recogidas. Los cebadores empleados fueron *18F* y *5.8SR* para *ITS1* y *5.8F* y *25R* para *ITS2* de STECH & FRAHM (1999). El control de calidad de los fragmentos amplificados se llevó a cabo como en Angiospermas. La secuenciación de las muestras se hizo en las instalaciones de SECUGEN en Madrid. Para la edición y el alineamiento manual de las secuencias utilizamos también el programa Bioedit (HALL 2004).

Análisis de datos

Para nuestra muestra de la flora Angiospérmica, se analizaron 246 secuencias propias (49 especies y 15 subespecies), y 31 secuencias extraídas del GenBank (17 especies) que equivalen a 102 secuencias de la región *matK* y 175 secuencias de la región *rbcl*. La discriminación entre los taxones se estimó en base a la distancia genética (intra- e interespecífica) detectada entre las secuencias comparadas, y además a la presencia o no de cambios de nucleótidos exclusivos que se han de-

CONCEPTO	DEFINICIÓN
Especie taxonómicamente clara	Especies con-genéricas que son identificadas sin ambigüedades por la Taxonomía clásica
Especie taxonómicamente conflictiva	Aquella cuya diferenciación taxonómica respecto de otros congéneres mediante caracteres morfológicos ha sido elusiva o conflictiva hasta la fecha, por diversos motivos
Especie críptica	Poblaciones co-específicas que, sin formar parte de una especie taxonómicamente conflictiva, presentan un número extremadamente elevado de caracteres moleculares diagnóstico respecto de otras poblaciones teóricamente co-específicas
Distancias-p	Proporción de diferencias nucleotídicas detectadas entre dos secuencias alineadas, excluyendo inserciones y deleciones (indels)
Carácter diagnóstico	Nucleótido o combinación de nucleótidos en una posición de las secuencias alineadas que es exclusiva de todos los individuos disponibles de un taxón determinado, y que contribuye a su discriminación respecto de otros taxones con-genéricos en nuestra muestra

Tabla 2. Definiciones de algunos conceptos básicos empleados en el artículo.

Table 2. Definitions of basic concepts used throughout the paper.

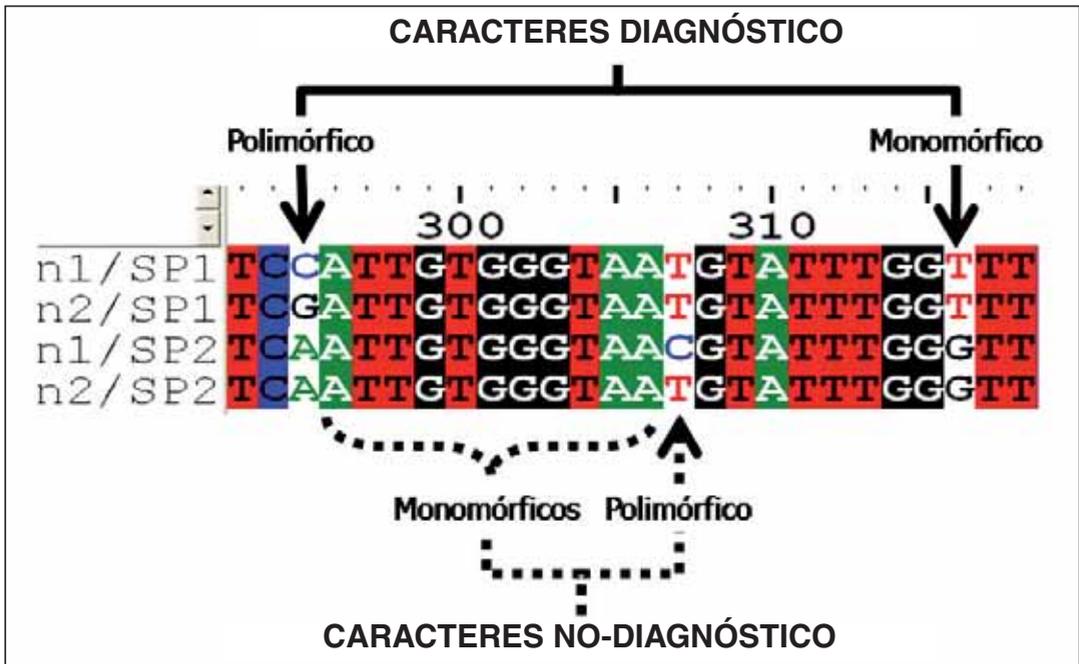


Figura 2. Ejemplos de tipos de caracteres (diagnóstico y no diagnóstico) identificados al comparar secuencias de dos individuos (n1 y n2) de dos especies con-genéricas diferentes (SP1 y SP2). Con trazo continuo se muestran los caracteres diagnósticos (monomórficos o polimórficos) tal como se definen en la Tabla 2. Los caracteres no-diagnóstico están indicados con trazo discontinuo; son monomórficos cuando se corresponden con nucleótidos compartidos entre todas las secuencias disponibles para las dos especies comparadas, y polimórficos cuando los nucleótidos son compartidos entre secuencias de individuos pertenecientes a diferentes especies comparadas.

Figure 2. Examples of types of characters (diagnostic and non-diagnostic) identified by comparing sequences from different individuals (n1 and n2) of two congeneric species (SP1 and SP2). Continuous lines point to the diagnostic characters (monomorphic or polymorphic) as defined in Table 2. Non-diagnostic characters are indicated with dashed lines, being monomorphic when nucleotides are shared among all sequences of the two species compared, and polymorphic when nucleotides are shared between the sequences of each the species compared.

nominado caracteres diagnóstico (ver Tabla 2 y Fig. 2). Para el cálculo de las distancias se utilizó, la aplicación DNADISTv. 3.5c del programa BioEdit.

Hemos testado la utilidad relativa de dos criterios para averiguar (i) si las variables moleculares permiten identificar con éxito todas las especies que no plantean conflicto taxonómico para la morfología, y (ii) si existe una aproximación cuantitativa más resolutiva para la identificación molecular de estas especies. En uno de estos criterios (utilizado por el CBOL PWG, 2009), se considera que la discriminación taxonómica tiene éxito cuando la mayor distancia-*p* intra-específica es menor que la menor distancia-*p* inter-es-

pecífica (Tabla 2). En el otro criterio, el éxito en la discriminación viene determinado por la detección de al menos un carácter diagnóstico inter-específico (ver definiciones en Tabla 2 y Fig. 2).

Así mismo, se testó la capacidad de discriminación de las 2 regiones cloroplásticas, tanto en casos taxonómicamente conflictivos como en casos taxonómicamente claros y, dentro de estos últimos, se examinó la posibilidad de la existencia de especies crípticas (ver definiciones en Tabla 2). Para evaluar la significación de las diferencias detectadas entre las secuencias a los distintos niveles taxonómicos, bióticos y a-bióticos se aplicaron con el programa XLSTAT (Addinsoft, Paris. 2007), los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis (KRUS-

KAL & WALLIS 1952) o de Mann-Whitney (MANN & WHITNEY 1947) dependiendo de si se evaluaban las diferencias entre varias categorías o sólo entre dos categorías, respectivamente.

Al igual que para Angiospermas, en Briófitos se calcularon las distancias intra- e interespecíficas entre las especies con-genéricas y, además, se obtuvieron cladogramas para establecer las relaciones entre las especies de cada género estudiado. La discriminación se evaluó en función de si las muestras que se incluían por taxón (5 ó más) se agrupaban en grupos monofiléticos al hacer un análisis de similitud.

Para los análisis filogenéticos utilizamos los programas PAUP* (SWOFFORD 2002) y MrBayes (HUELSENBECK & RONQUIST 2001).

Nuestra hipótesis general de partida, era que la tasa de identificación molecular aportada por estas regiones de ADN sería más elevada en los casos taxonómicamente claros que en los conflictivos, aunque también se esperaba aportar datos que contribuyeran a aclarar algunos casos taxonómicamente conflictivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de las especies de la flora angiospérmica canaria.

a) *La discriminación taxonómica de Angiospermas con secuencias de ADN: ¿distancias-p, caracteres diagnóstico, o ambos parámetros?*

En Angiospermas, se realizaron un total de 1263 comparaciones (833 para la región *rbcL* y 430 para *matK*), estimándose 1063 distancias inter-específicas y 200 intra-específicas.

Para evaluar el poder de discriminación de las distintas regiones "código de barras", en base al criterio de distancias-*p* (PWG 2009) y al criterio basado en caracteres diagnóstico (JAÉN-MOLINA *et al.* en prep.), se realizaron 277 comparaciones entre taxones con-genéricos, que representaban a 176 casos taxonómicamente claros y a 101 casos taxonómicamente conflictivos.

Se presentan menos secuencias para *matK* porque, al contrario que *rbcL*, nos encontramos con importantes problemas técnicos para la amplificación de esta región en algunos géneros (por otra parte frecuentes también en otras floras), que estamos tratando de resolver mediante el uso de cebadores alternativos (CUÉNOUD *et al.* 2002; FORD *et al.* 2009).

Aunque los valores absolutos entre las distancias-*p* intra-específicas y las inter-específicas fueron muy similares en Angiospermas, el test de Mann-Whitney detectó diferencias significativas entre el promedio de distancias-*p* inter-específicas y el de las distancias-*p* intra-específicas (0,0144 y 0,0140 respectivamente; $P < 0,001$). Sin embargo, *matK* es la única región donde esta relación se mantiene (p inter = 0,008 > p intra = 0,0060; $P < 0,001$); por el contrario, el promedio entre las distancias inter-específicas para *rbcL* fue inferior a la media de las distancias intra-específicas (0,0173 y 0,0184 respectivamente; $P < 0,001$). Además, en cinco familias de nuestra muestra (Cyperaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Lauraceae y Poaceae) el promedio de las distancias intra-específicas fue superior (aunque no significativamente) al de las inter-específicas (Tabla 1).

Por otra parte, en los linajes donde las *p* inter-específicas fueron mayores que las *p* intra-específicas detectamos siempre un gran solapamiento entre ambos tipos de distancias, lo cual tampoco parece garantizar una discriminación uniforme. Un ejemplo paradigmático de estos linajes es la familia Ericaceae (Fig.3).

En conclusión, el criterio utilizado por el CBOL (CBOL 2009) basado en las distancias-*p*, no provee un buen poder discriminatorio para la muestra seleccionada de Angiospermas de la Flora Canaria para esta investigación, porque (i) la condición de discriminación establecida por el PWG del CBOL (2009) solamente se verifica en promedio y para la región *matK*, y (ii) aún en estos casos, la similitud entre las distancias-*p* intra e inter-específicas hace que no haya un "barcoding gap" que pueda permitir la identificación general de todas las especies con-genéricas examinadas (Fig. 3).

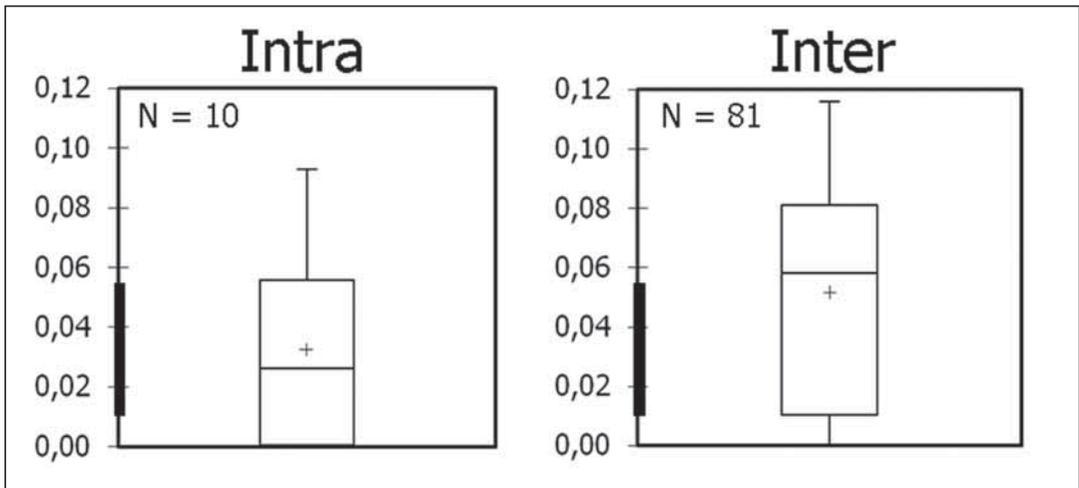


Figura 3. Valores de distancias- p intra e inter-específicas obtenidas para las especies de la familia Ericaceae. La línea gruesa en el eje Y señala el grado de solapamiento entre ambas distancias- p .

Figure 3. Values of intra and inter-specific p -distances obtained for the family Ericaceae. The thick line on the Y-axis indicates the degree of overlap between the two p -distances.

Criterio	Porcentaje de éxito según casos taxonómicos		
	Claros	Conflictivos	Todos los casos
Caracteres	75%	26%	51%
Distancias	5%	11%	6.5%

Tabla 3. Porcentaje de éxito en la discriminación con *matK* y *rbcl* en casos taxonómicamente claros respecto a casos taxonómicamente conflictivos, según el criterio utilizado (sólo Angiospermas).

Table 3. Discrimination success rates of *matK* and *rbcl* in taxonomically clear vs. taxonomically conflictive cases, according to the criteria used (only Angiosperms).

Por el contrario, cuando utilizamos el criterio de discriminación basado en la presencia de caracteres diagnóstico (ver definición Tabla 2), el éxito en la discriminación fue siempre muy claramente superior al alcanzado con el criterio basado en distancias, tanto en los casos claros taxonómicamente como en los conflictivos (Tabla 3). No hay ningún caso resuelto por el criterio de distancias- p que no se haya resuelto también por el criterio basado en caracteres, por lo cual nunca puede considerarse que ambos criterios sean complementarios. Por último, los resultados con nuestra muestra de taxones canarios indican que sólo un criterio de discriminación basado en caracteres puede diferenciar las comparaciones entre especies con-genéricas de las que implican niveles infra-específicos (Fig. 4).

Todas estas evidencias convergen en la conclusión de que el único criterio consistente para discriminar a las especies de Angiospermas de la Flora Canaria con las secuencias de *matK* y *rbcl* es el basado en caracteres diagnóstico, aunque en algunos linajes la discriminación molecular es más propicia que en otros. Por lo tanto, de aquí en adelante, nuestras evaluaciones de éxito en la discriminación taxonómica mediante identificadores moleculares se basarán solamente en el criterio de caracteres diagnóstico. Vale decir que la proporción de casos resueltos por las variables moleculares (75%) es equiparable al conseguido en otras floras sin radiación adaptativa (CBOL 2009), lo que sustenta la aplicabilidad de la identificación molecular de la flora Angiospérmica endémica canaria mediante las dos regiones del

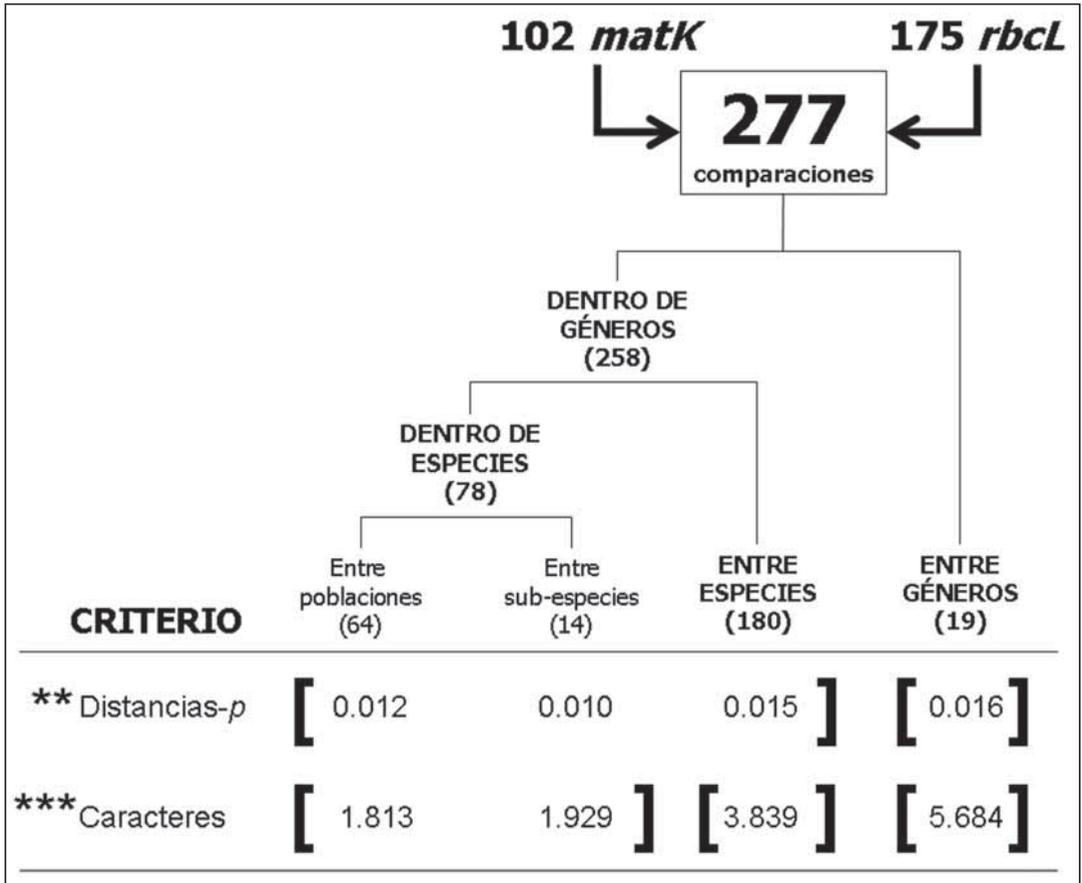


Figura 4. Comparación de los criterios basados en distancias-*p* y caracteres según el nivel de la jerarquía taxonómica analizado. Entre corchetes se agrupan las categorías taxonómicas según la discriminación alcanzada por cada criterio. Queda patente que la singularidad de la discriminación entre comparaciones inter-específicas solamente se detecta en nuestra muestra de Angiospermas con el criterio basado en caracteres.

Figure 4. Comparison of the discrimination criteria based on *p*-distances and on diagnostic characters, depending on the level of taxonomic hierarchy. Brackets group the taxonomic categories according to the resolution power of each respective criterion. Quite clearly, inter-specific comparisons in our Angiosperm sample are singled out from the rest only by a character-based criterion.

ADNcp propuestas por el CBOL (CBOL 2009), y otras que en el futuro puedan incorporarse a éstas. Además, nuestros resultados refuerzan, aún más si cabe, la necesaria complementariedad de las aproximaciones a la investigación taxonómica de la Biodiversidad. En el caso que nos ocupa, tanto las variables moleculares como las morfológicas deben concebirse solamente como dos herramientas encaminadas a un solo fin: la caracterización taxonómica de la flora endémica canaria.

Como era esperable según nuestra hipótesis de partida, detectamos un descenso muy claro del poder de discriminación de ambos criterios en los casos taxonómicamente conflictivos. Aunque se da la paradoja de que las distancias-*p* resuelven más casos taxonómicamente conflictivos que taxonómicamente claros, la proporción de casos conflictivos resueltos por el criterio de caracteres es también netamente superior (más del doble, Tabla 3). No obstante, la “conflictividad” taxonómica representa un obstáculo a la adjudicación

del poder discriminatorio de las secuencias empleadas ya que, por definición, no podemos saber cuáles de las entidades afectadas por “conflictividad” son UTOs y cuáles no. Por consiguiente, la conclusión más importante de esta parte del análisis es que, en algunos casos poco claros para la morfología, las variables moleculares pueden suministrar indicios que den pie a un estudio taxonómico más profundo del grupo en cuestión y, tal vez, a una clarificación taxonómica.

b) *Poder discriminatorio relativo de matK y rbcL en nuestra muestra de Angiospermas de Canarias.*

La región *rbcL* discrimina una mayor proporción de casos taxonómicamente claros, aunque el promedio de caracteres diagnóstico fue significativamente mayor para la región *matK*. En términos de distancias-*p*, no se detectaron diferencias de discriminación entre estas dos regiones del ADNcp.

Para los casos taxonómicamente conflictivos, la región *matK* fue más resolutoria, pero ninguno de los dos criterios de discriminación detectó diferencias entre las dos regiones del ADNcp (datos no mostrados).

c) *¿Hay posibles especies crípticas en nuestra muestra de la flora canaria?*

Entre las poblaciones co-específicas examinadas, se encontraron tres posibles casos de especies crípticas (según definición de la Tabla 2): las poblaciones de *Gallium scabrum* L. de Tenerife y La Gomera; las de *Picconia excelsa* (Aiton) DC. de La Gomera y Madeira; y las poblaciones de *Erica arborea* L. y *E. platycodon* (Webb & Berthel.) Rivas-Mart. et al. de Tenerife, La Gomera y Madeira. Las secuencias *rbcL* obtenidas para las especies de *Erica arborea* y *E. platycodon* mostraron un notable grado de complejidad y polimorfismo, que hace posible hipotetizar la existencia de especies crípticas en varias islas (Fig. 5). Las diferencias más notables se detectaron dentro de *Erica arborea*, en particular entre Canarias y Madeira. En la Figura 5, las muestras de *E. arborea* de Madeira y La Gomera se entremezclan con las de *E. platycodon* de Tenerife y La Gomera, con un valor de apoyo bootstrap máximo (BP=100, Fig. 5). Además, algunas poblaciones de la especie canaria descrita como *E. platycodon* forman un grupo aparte, aunque con apoyo bootstrap menor (BP=51, Fig. 5). Todos estos casos van a examinarse en el futuro con un muestreo más amplio a

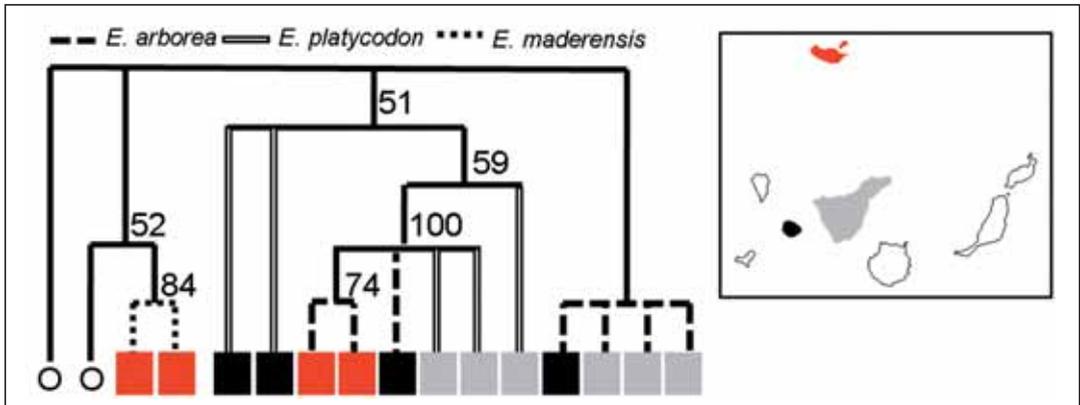


Figura 5. Árbol obtenido con 1000 réplicas de bootstrap para la relación entre las poblaciones de *Erica arborea* (Canarias y Madeira) respecto a las poblaciones de *E. platycodon* de Canarias. En rojo se muestran las poblaciones de Madeira (*E. arborea* y *E. maderensis*), en gris las de Tenerife (*E. arborea* y *E. platycodon*) y, en negro las de La Gomera (*E. arborea* y *E. platycodon*). Las ramas de los distintos clados del árbol resultante, muestran un trazo diferente dependiendo de la especie que agrupen.

Figure 5. Consensus tree obtained with 1000 bootstrap replicates for the relationship between the Canarian and Madeiran populations of *Erica* analyzed. Madeiran populations are shown in red (*E. arborea* and *E. maderensis*), those from Tenerife in gray (*E. arborea* and *E. platycodon*), and those from La Gomera in black (*E. arborea* and *E. platycodon*). As illustrated above the tree, branches are drawn with a different line depending on the species that they refer to.

nivel taxonómico y poblacional, con la inclusión de la región *matK* una vez que resolvamos los problemas técnicos.

d) *Otras implicaciones taxonómicas.*

Nuestros análisis con *rbcL* y *matK* también nos han permitido detectar algunas entidades infra-específicas en las que se podría considerar necesaria una revisión taxonómica, e incluso una elevación de su estatus a nivel de especie. Así, ambos marcadores encuentran caracteres diagnóstico para la diferenciación entre *Myrica faya* Aiton y *M. rivas-martinezii* A. Santos (4 *matK* y 3 *rbcL*), por lo que estas regiones estarían apoyando su separación taxonómica actual, hecho puesto en duda en los últimos años por distintos autores (BAÑARES *et al.* 2001; GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.* 2009). Se encontró también una diferenciación molecular elevadísima entre *Ilex perado* Aiton ssp. *lopezlilloi* (G. Kunkel) e *I. perado* ssp. *platyphylla* (Webb & Berthel.) Tutin (16 caracteres diagnóstico solamente para *rbcL*). Dado lo inesperado de éstos hallazgos, ambos van a ser estudiados más exhaustivamente con el proyecto: “La identificación molecular de los árboles endémicos canarios: un paso hacia la estimación de la señal filogenética de la Flora Canaria” (recientemente concedido al JBCVC por la Agencia Canaria de Universidades e Investigación), para alcanzar resultados más concluyentes.

2. Caracterización de las especies de Briófitos de Canarias.

a) El género *Isoetecium* Brid.

Está representado en Europa por 4 especies: *Isoetecium algarvicum* W. E. Nicholson & Dixon, *I. alopecuroides* (Lam. ex Dubois) Isov., *I. holtii* Kindb. e *I. myosuroides* Brid., ésta última con dos variedades (var. *brachythecioides* (Dixon) C.E.O. Jensen y var. *myosuroides*) De todas ellas, solamente *I. holtii* está ausente en las Islas Canarias y en el resto de islas Macaronésicas (GONZÁLEZ-MANCEBO *et al.* 2008 b). Además, recientemente, se ha incluido en este género a *Isoetecium prolixum* (Mitt.) Stech, Sim-Sim, Tangney & D. Quandt. conocido de Madeira, el cual se consideraba anteriormente en el género *Echinodium*

Jur. (STECH *et al.* 2008). De las 5 especies mencionadas, *I. algarvicum* e *I. prolixum* tienen una distribución restringida, la primera es considerada un endemismo íbero-macaronésico y la segunda estrictamente Macaronésico.

Estudios moleculares previos sobre este género, llevados a cabo con especies de Europa (DRAPER *et al.* 2007) y de Norteamérica (RYALL *et al.* 2005), sugieren que el género presenta una historia evolutiva compleja.

En este estudio se han incluido, además de las especies citadas, algunas otras americanas como *I. cardotii* Kindb., *I. cristatum* (Hampe) H. Rob. e *I. subdiversiforme* Broth. Se han secuenciado alrededor de 70 muestras y se han usado 3 marcadores moleculares: las regiones ITS del ADNn y el intrón del gen *trnG* y la región *trnL-F* del ADNcp.

Los cladogramas obtenidos en este trabajo, que muestran las relaciones filogenéticas entre las plantas clasificadas según criterios morfológicos, confirman que se trata de un género muy complejo.

Al analizar los resultados obtenidos con el gen *trnG*, se observa que la media de las distancias-*p* entre dos secuencias es de 5,2 diferencias. La Tabla 4 nos muestra las distancias-*p* intra e inter-específicas. En algunos casos, el valor intra-específico es más alto que el de algunos emparejamiento inter-específicos. La variabilidad genética detectada dentro de *I. alopecuroides* llama la atención por su valor muy elevado. Por otro lado, *I. prolixum* prácticamente no se diferencia a nivel molecular de *I. myosuroides*, a pesar de presentar diferencias morfológicas muy claras. Es de destacar, el hecho de que dentro de varias especies existen muestras con secuencias muy divergentes. Esto queda muy patente en el cladograma (Fig. 6), donde se observa que las muestras de *I. alopecuroides* aparecen separadas en 3 clados diferentes. También, en el caso de *I. holtii* hay un espécimen claramente diferente de los demás. A pesar de llevarse a cabo una revisión morfológica detallada, en colaboración con uno de los mejores especialistas del mundo en musgos pleurocárpicos (Dr. L. Hedenäs, del Museo de Historia Natural de Estocolmo), no se detectaron diferencias signifi-

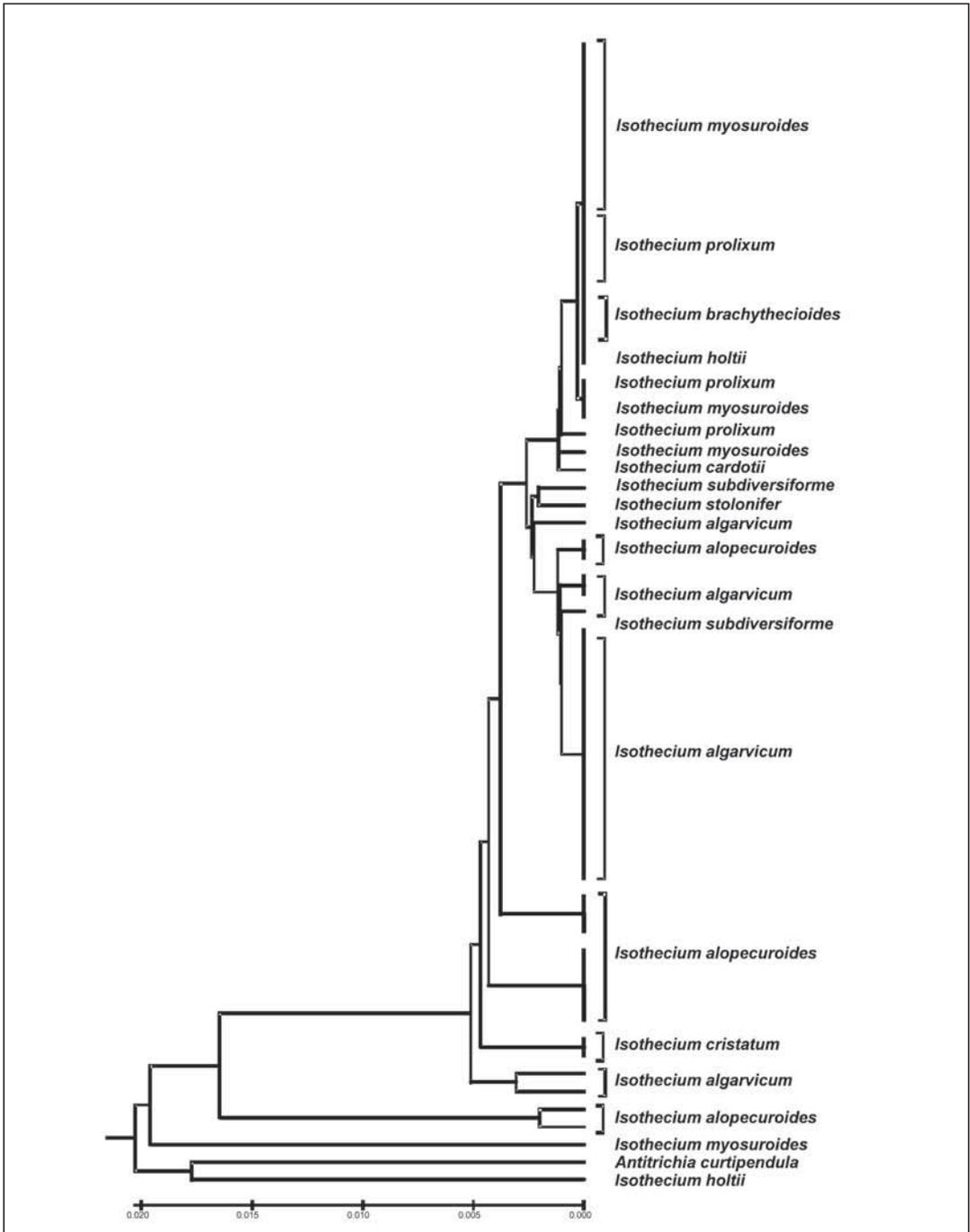


Figura 6. Cladograma del género *Isothecium* basado en secuencias de trnG.

Figure 6. Cladogram of the genus *Isothecium* based on trnG sequences.

Género/región del ADN	Distancia-p	
	intra-específica	inter-específica
<i>Isothecium</i>		
<i>trnG</i> *	0,0089 (±0,0151)	0,0117 (±0,0078)
N	64	64
<i>trnL-F</i>	0,0035 (±0,0044)	0,0119 (±0,0053)
N	63	63
ITS*	0,0189 (±0,0214)	0,0345 (±0,0168)
N	65	65
<i>Leucodon</i>		
<i>trnG</i>	0,0003 (±0,0005)	0,0060 (±0,0017)
N	46	46
<i>trnT-trnE</i>	0,0000 (±0,0000)	0,0126 (±0,0023)
N	46	46
<i>atpB-rbcl</i>	0,0003 (±0,0005)	0,0066 (±0,0023)
N	46	46
ITS	0,0010 (±0,0010)	0,0413 (±0,0051)
N	46	46
<i>Neckera</i>		
<i>trnL-F</i>	0,0000 (±0,0000)	0,0123 (±0,0049)
N	44	44
ITS	0,0000 (±0,0000)	0,0276 (±0,0083)
N	37	38

Tabla 4. Valores medios (± desviación estándar) de las distancias-*p* intra e inter-específicas en las muestras de los géneros de Briófitos *Isothecium*, *Leucodon* y *Neckera*. La presencia de muestras problemáticas en *Isothecium* se hace notar por los valores relativamente elevados de las distancias intra-específicas, con desviaciones estándar también altas. Los asteriscos señalan los casos en que algunos valores intra-específicos fueron más altos que algunos de los inter-específicos. 'N' es el tamaño muestral para cada tipo de distancia y región.

Table 4. Average values (± std) of the intra and inter-specific *p*-distances obtained in the Bryophyte genera *Isothecium*, *Leucodon* and *Neckera*. The relatively high values of intra-specific distances and standard deviations in *Isothecium* are related to the presence of problematic samples (see text). Asterisks denote the cases where some intra-specific values were higher than some inter-specific values. 'N' is the sample size for each distance type and DNA region.

ficativas entre estas muestras tan diferentes a nivel molecular. Por otro lado, hay especies morfológicamente muy alejadas, que hasta hace poco se clasificaban en géneros distintos (como en el caso mencionado de *I. prolixum*), pero cuyas secuencias son, sin embargo, prácticamente indistinguibles de las de *I. myosuroides*. En la Figura 6 se puede observar que este tipo de incongruencia entre las similitudes o diferencias morfológicas y moleculares se da en varios casos.

Utilizando el marcador *trnL-F* (Tabla 4) observamos que la variabilidad genética es más baja que en el caso anterior, con un promedio de *p* entre dos secuencias de 4,1 diferencias. En el cladograma (datos no mostrados) se observa que una parte de las muestras de *I. alopecuroides* no se diferencian de las de *I. algarvicum*, al igual que ocurre entre *I. myosuroides* var. *brachythecoides* e *I. myosuroides* var. *myosuroides*. En esta ocasión, *I.*

prolixum se identifica por una autapomorfía (transversión A->C en la posición 165 de nuestro alineamiento), que la separa del resto.

La región ITS es la más variable de las tres estudiadas, con un promedio de 17,1 diferencias entre dos secuencias, y, tal como muestra la Tabla 4, resulta ser la más caótica. Las distancias-*p* dentro de las especies están entre los valores de 0,0015 en los casos de *I. cristatum* e *I. algarvicum* y llegan hasta 0,0530 en *I. holtii*. Entre especies, los valores ascienden al rango de 0,0043 entre *I. prolixum* e *I. myosuroides* var. *brachythecoides* y 0,0646 entre *I. holtii* e *I. subdiversiforme*. Como en el caso del marcador *trnG*, se observa que en algunos casos, la variabilidad intra-específica es más alta que la inter-específica. En el cladograma obtenido con esta región del ADN (no mostrado), las especies no son monofiléticas (como sucede con *trnG*). También son remarcables las incongruencias

entre los cladogramas basados en secuencias cloroplásticas y nucleares, ya que podrían indicar la presencia de híbridos en el género (DRAPER *et al.* 2007). Como en *trnG*, constatamos la ausencia de autapomorfías que podrían servir para identificar especies, en el caso de los clados detectados mediante el análisis de la región *ITS*.

En resumen, podemos afirmar que el tratamiento del género *Isoethecium* es sumamente complejo. De las regiones estudiadas, no hay ninguna que parezca adecuada para garantizar una identificación a nivel de especie. Esto se debe, por una parte, a la poca distancia entre algunas de las especies, incluso con la región *ITS*, que es normalmente la más variable en Briófitos. Por otro lado, parece que la posible existencia de cierto número de híbridos complica los intentos en este sentido.

b) Los géneros *Cryptoleptodon* (Renauld & Cardot) y *Leptodon* (D. Mohr):

Están representados en las Islas Canarias y en el resto de Macaronesia por una especie cada uno: *Cryptoleptodon longisetus* (Mont.) Enroth. y *Leptodon smithii* (Hedw.) F. Weber & D. Mohr. (HILL *et al.* 2006; GONZÁLEZ-MANCEBO *et al.* 2008 b). La separación a nivel genérico de ambas especies ha sido muy controvertida en el pasado. Los últimos trabajos publicados basados en análisis moleculares sostienen su inclusión en un único género (SOTIAUX *et al.* 2009; OLSSON *et al.* 2010).

Para la realización de los análisis se han tomado, además de las muestras canarias de ambas especies, las secuencias disponibles en GenBank de especies próximas, de acuerdo con los resultados de OLSSON *et al.* 2010. Los marcadores escogidos para este caso han sido la región *ITS* nuclear y dos regiones del cloroplasto: *trnA-trnL-trnF* y *rpl16*.

La variabilidad genética mostrada por la región *trnA-trnL-trnF* es moderada, con un promedio de diferencias en número de bases entre secuencias de 11,4 diferencias. Dentro de *Cryptoleptodon longisetus*, la distancia-*p* es de 0,0016 y dentro de *Leptodon smithii*, de 0,0027. La distancia media entre muestras de *C. longisetus* y *L. smithii* es de 0,0021. Estos resultados ya indican, que la separación entre las dos especies es problemática si nos ba-

samos en esta región. Tampoco se han encontrado autapomorfías que sirvan para delimitar estas especies.

Lo mismo se puede observar con la región *rpl16*, en la que la distancia genética entre las secuencias es algo menor (7,9 bases). También, las *p* intra-específicas promedio tienen valores menores de 0,0014 dentro de *Leptodon*, de 0,0000 (es decir ninguna diferencia) en *Cryptoleptodon* y 0,0010 entre las dos especies. En ambos casos, el cladograma (no mostrado) revela que *C. longisetus* se encuentra dentro del clado de *L. smithii*.

Por el contrario, la media total de distancias-*p* para la región *ITS* asciende a 18,4. Además, la distancia-*p* media entre las dos especies es mayor (0,0094) que la distancia-*p* media dentro de cada especie (0,0026 para *Cryptoleptodon* y 0,0033 para *Leptodon*). También hay posiciones en el alineamiento que permiten identificar a las dos especies. Parece que en este caso, la región *ITS* podría servir para la identificación, aunque el número reducido de muestras nos exige cierta cautela a la hora de evaluar su utilidad.

c) El género *Leucodon* Schwägr.:

Está representado en Europa por seis especies (HILL *et al.* 2006). *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr. es la más frecuente y está ampliamente distribuida en el Paleártico, incluyendo Macaronesia. *Leucodon canariensis* (Brid.) Schwägr. y *L. treleasei* (Cardot) Paris son especies endémicas de los archipiélagos Macaronésicos, donde son relativamente abundantes, dependiendo de las condiciones climáticas y el grado de conservación de sus bosques de laurisilva (GONZÁLEZ-MANCEBO *et al.* 2009). El hecho de que dos especies del mismo género sean endémicas de la misma área geográfica es poco frecuente en Briófitos. Además, su elevada similitud morfológica había generado confusiones en el pasado, hasta que la revisión taxonómica de HEDENÁS (1992) puso claramente de manifiesto las características morfológicas de cada una de las especies.

Secuenciamos un total de 46 muestras de las tres especies de *Leucodon* presentes en Macaronesia (además de otras 19 pertenecientes a especies eu-

ropeas, americanas y africanas del género, y de las utilizadas como outgroup) para cuatro marcadores moleculares: el intrón *trnG* y los espaciadores *atpB-rbcL* y *trnT-trnE* (ADNcp) y los espaciadores *ITS* (ADNn).

En el caso del intrón *trnG* (Tabla 4) el número medio de diferencias es de 1,9 bases para el conjunto de las muestras. No encontramos variabilidad intra-específica para los dos endemismos y un valor muy bajo de distancia-*p* (0,001) para *L. sciuroides*. Las distancias-*p* entre las especies oscilan entre 0,004 y 0,007.

En el género *Leucodon* probamos como novedad para estudios taxonómicos en Briófitos el espaciador entre *trnT* y *trnE*. Los resultados han sido positivos, puesto que esta región se dejó amplificar sin problemas y resultó casi tan variable como el intrón *trnG*. Encontramos una media de 2,1 diferencias entre el conjunto de las muestras. No se observaron diferencias intra-específicas y la media de distancias-*p* entre las especies ascendió a valores entre 0,010 y 0,014 (Tabla 4).

El espaciador entre *atpB* y *rbcL* se ha utilizado mucho con anterioridad en los trabajos sobre Briófitos. En *Leucodon*, el número medio de diferencias entre dos muestras ascendió a 2,3, que es un valor similar al encontrado en las otras regiones cloroplásticas estudiadas. De nuevo, las distancias-*p* dentro de las especies eran inexistentes en los endemismos y muy bajas (distancia-*p* media 0,001) en *L. sciuroides*. Las distancias medias entre muestras pertenecientes a diferentes especies tenían valores claramente superiores entre 0,004 y 0,008 (Tabla 4). En este caso, llama la atención una duplicación de 15 pares de bases que distingue a *L. treleasei* del resto de las muestras.

En el caso de la región *ITS*, se obtuvieron resultados muy parecidos, pero con distancias genéticas mucho más altas. Así, el número medio de diferencias entre dos secuencias del conjunto de las muestras se eleva a 18,7 y es por lo tanto, más alto que el conjunto de las secuencias cloroplásticas. Se repite otra vez el patrón de poca variabilidad intra-específica y una clara diferenciación entre las tres especies (Tabla 4).

El cladograma (Fig. 7) se ha elaborado con el conjunto de secuencias cloroplásticas y nucleares, puesto que como se ha mencionado anteriormente, las secuencias han apoyado en todos los casos una topología muy similar y, no existen contradicciones importantes entre los datos.

Los datos moleculares permiten, por tanto, una identificación clara de las tres especies. Se puede concluir que el ancestro, de por lo menos una de las dos especies endémicas, llegó a las Islas Canarias desde América y que la especie norteamericana *L. andrewsianus* es idéntica a *L. sciuroides* y probablemente a otras dos especies: la eurasiática *L. immersus* y la afromontana *L. dracaenae*. No obstante, estos datos deben de considerarse todavía provisionales, y es necesario disponer de un número mayor de muestras para obtener conclusiones definitivas (STECH *et al.* in mss).

d) El género *Neckera* Hedw.:

Está representado en Europa por 10 especies (HILL *et al.* 2006), de las cuales 7 están presentes en Canarias y una de ellas, *Neckera intermedia* Brid., se considera un endemismo Íbero-macaronésico (GONZÁLEZ-MANCEBO *et al.* 2008 b).

Datos recientes de OLSSON *et al.* (2010) han puesto de manifiesto que el género *Neckera* es polifilético, y que de las especies europeas, tan sólo *N. menziesii* Drumm. y *N. pennata* Hedw., deben ser tratadas como *Neckera* s.s., mientras que las demás, usualmente, incluidas en el género están más estrechamente relacionadas con especies del género *Forsstroemia* Lindb. Sin embargo, debido a la complejidad del caso, estos investigadores no han llegado a hacer ninguna propuesta taxonómica para estas últimas especies, a la espera de disponer de un mayor número de datos.

En este trabajo se han secuenciado, además de *Neckera intermedia*, las especies que de acuerdo con OLSSON *et al.* (2010) son próximas a ésta: *N. besseri* (Loborzewski) Jur., *N. cephalonica* Jur. & Unger, *N. complanata* (Hedw.) Huebener, *N. crispa* Hedw. y *N. pumila* Hedw. Las regiones utilizadas han sido la región *trnL-F* del cloroplasto y los espaciadores *ITS* del núcleo.

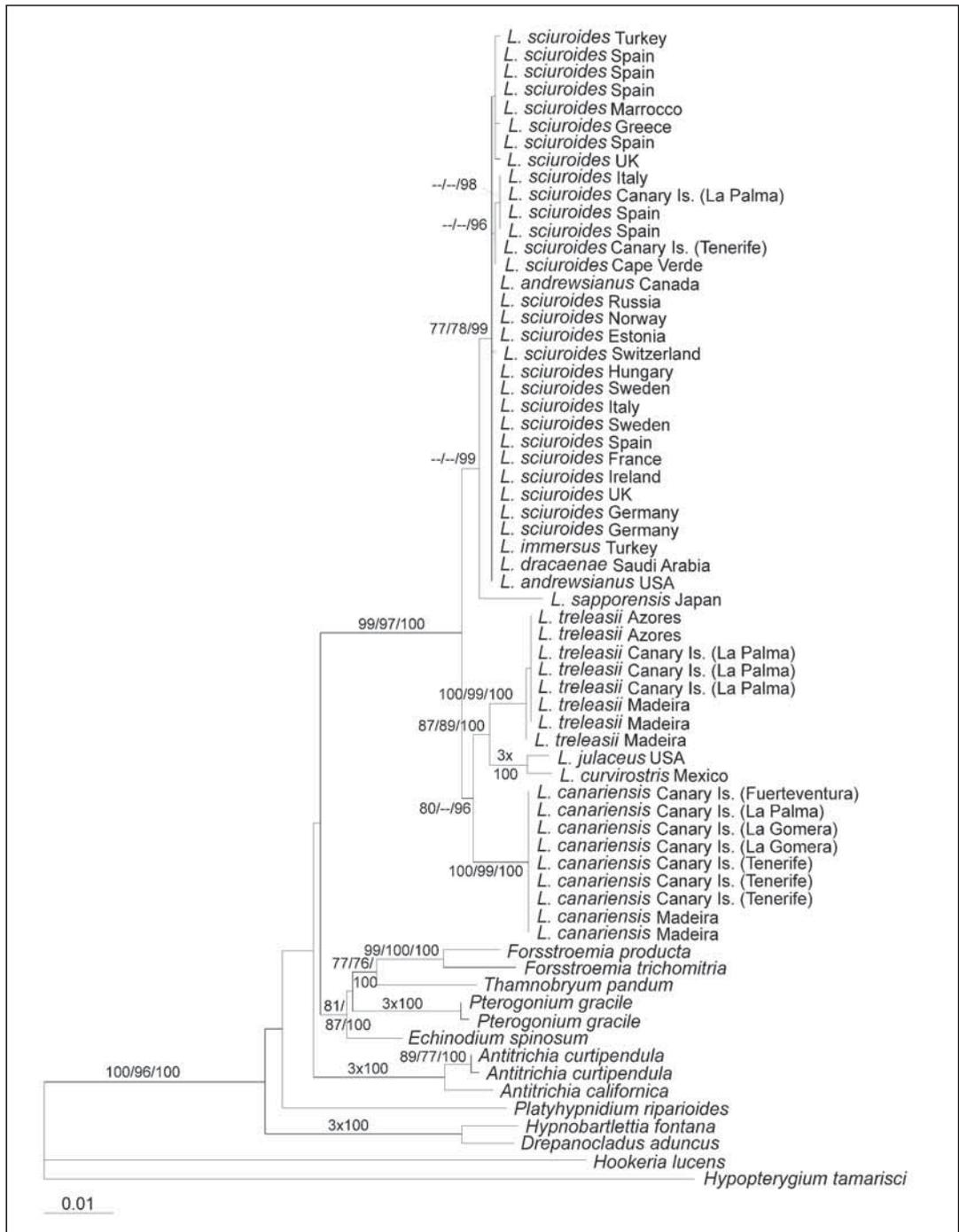


Figura 7. Cladograma con los resultados de las secuencias nucleares y cloroplásticas de *Leucodon* (STECH *et al.*, in mss)

Figure 7. Cladogram with the results of *Leucodon*'s nuclear and chloroplast sequences (STECH *et al.*, in mss).

La región *trnL-F* permite identificar las especies, aunque no detectamos una variabilidad total elevada (el número medio de bases diferentes entre dos muestras fue de 3,492), y solamente en *N. crispa* observamos alguna variabilidad intra-específica (Tabla 4). Hay que destacar que, según nuestros resultados, las muestras de *N. intermedia* procedentes de la Península Ibérica se separan en un clado diferente al que incluye a las Macaronésicas (Fig. 8).

También la región *ITS* resultó ser la más variable (número medio de bases diferentes entre dos muestras 13,449) [Tabla 4]. No obstante, el patrón general observado es muy parecido al del marcador anterior, con poca o nula variabilidad dentro de las especies y una clara diferenciación inter-específica.

En resumen, se puede afirmar que ambos marcadores utilizados permiten la identificación de las especies de *Neckera*.

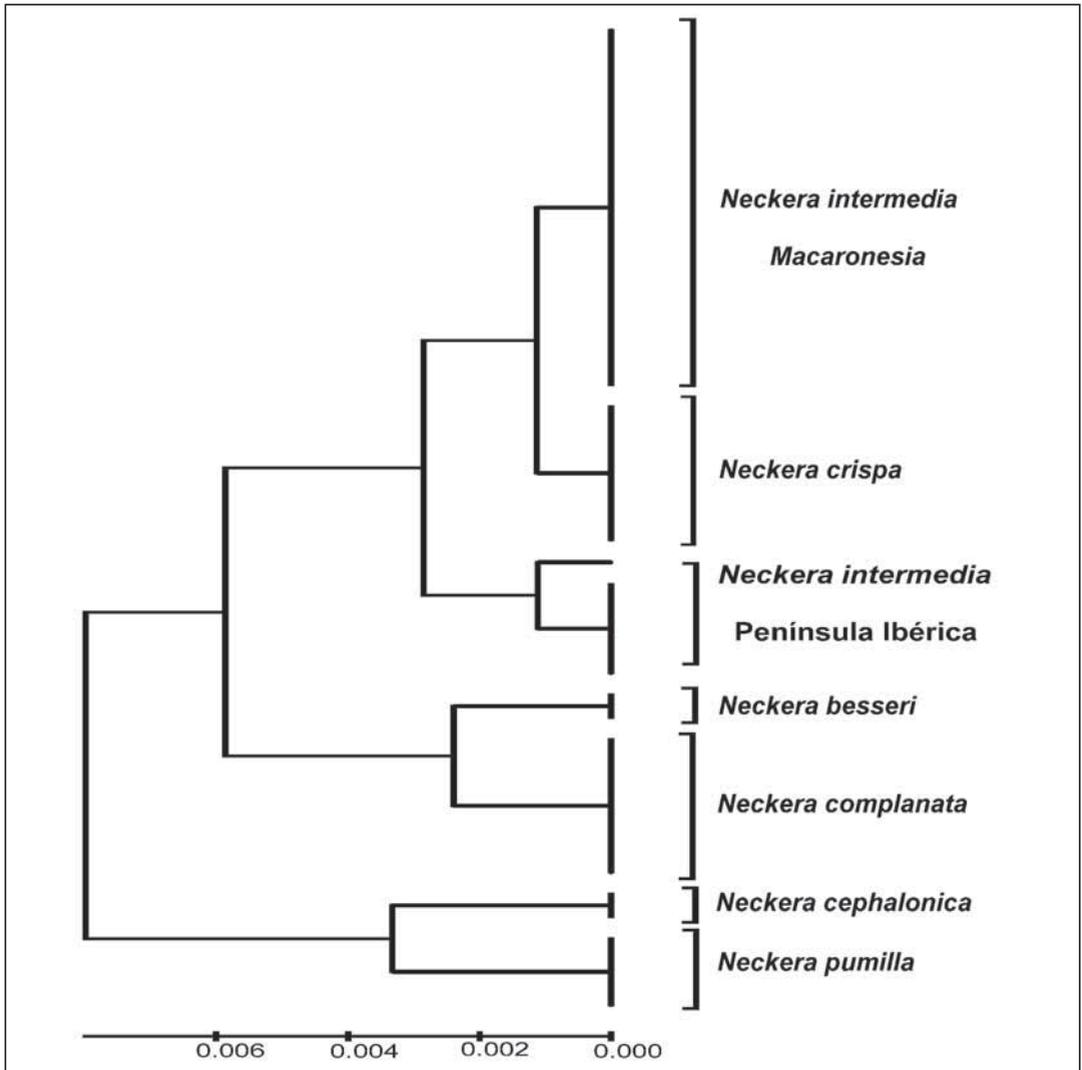


Figura 8. Cladograma con las muestras de *Neckera* basado en el marcador *trnL-F*.
Figure 8. Cladogram based on *trnL-F* for the samples of *Neckera*.

e) El complejo *Fissidens taxifolius* Hedw

El género *Fissidens* Hedw. presenta 34 especies en el continente europeo (HILL *et al.* 2006), de las cuales *Fissidens taxifolius* es una de las más ampliamente distribuidas por el Hemisferio Norte. Es considerada como una especie conflictiva, ya que es muy variable morfológicamente. Se han descrito varios taxones estrechamente relacionados con ella, especialmente en los archipiélagos Macaronésicos, como *Fissidens pallidicaulis* Mitt. y *F. barretoii* Dixon & Luisier.

Estudios moleculares previos, realizados por nosotros, sobre el endemismo Macaronésico *F. luisieri* P. de la Varde, en los que se estudió su identidad taxonómica y relaciones geográficas, han mostrado que no puede diferenciarse de la especie de amplia distribución *F. serrulatus* Brid. Las diferencias genéticas observadas en esta especie responden a un patrón geográfico mucho más acusado que en los otros géneros abordados en este estudio (WERNER *et al.* 2009).

Con el fin de comprobar la identidad taxonómica del complejo de taxones próximos a *Fissidens taxifolius* y de testar si la situación de aislamiento en las Islas Macaronésicas constituye un factor importante en la formación de especies (crípticas) nuevas dentro de este complejo, se han usado unas 40 muestras del género y se ha secuenciado el gen cloroplástico *rbcl* y la región *ITS* del ADNn.

Se ha observado que se trata de una situación bastante más compleja de lo que se observó en *F. luisieri*, ya que algunas de las nuevas secuencias muestran una distancia genética muy grande con las secuenciadas anteriores. Sobre todo la región *ITS1* es tan variable que resulta imposible alinearla sin ambigüedades en muchas de sus partes. La región *ITS2* es algo menos variable, pero todavía las distancias genéticas tienen valores muy elevados (distancia-*p* media entre dos muestras 0,0393). Esto contrasta con las secuencias de *rbcl* con distancias-*p* mucho más bajas (0,0070). Además, se observa una fuerte estructuración según la procedencia de las muestras, lo cual es algo atípico en Briófitos.

Si comparamos estos datos con los obtenidos en los otros géneros tratados en este proyecto, es llamativo que en *Fissidens*, prácticamente, no hay dos muestras con la misma secuencia *ITS*, mientras en géneros como *Leucodon* o *Neckera* la mayoría de las muestras tienen secuencias idénticas. Así mismo, las secuencias del grupo de *F. taxifolius* son muy difíciles de alinear, pero las de *Leucodon* y *Neckera* se dejan alinear fácilmente con las restantes especies del género, e incluso con las de géneros afines. Cabe deducir provisionalmente, que ancestros del grupo *F. taxifolius* colonizaron las Islas Macaronésicas en distintas ocasiones de forma independiente y procedentes de distintos continentes (datos no mostrados). También los datos obtenidos hasta ahora, nos llevan a pensar que existen más especies bajo el concepto de *F. taxifolius* de las que se han considerado hasta ahora en base a la morfología. Puesto que se plantean todavía el problema de cuantas especies hay, no parece adecuado por el momento realizar un análisis con referencia a especies. Por este motivo, se está llevando a cabo un trabajo en profundidad sobre la filogeografía y especiación en este complejo de especies que permita aclarar las incógnitas antes expuestas.

CONCLUSIONES

Angiospermas

1. El criterio basado en caracteres diagnóstico es el único viable para la discriminación taxonómica de la flora endémica Canaria mediante las secuencias de las regiones *matK* y *rbcl*.
2. El porcentaje de éxito en la discriminación taxonómica obtenido con las regiones *matK* y *rbcl* es muy similar al hallado en otros entornos geográficos del planeta, y hace viable la continuidad de una aproximación morfológico-molecular a la identificación de la flora Angiospérmica endémica de Canarias.
3. Cuando no plantea problemas técnicos, la región *matK* es un buen identificador molecular, especialmente para los casos taxonómicamente conflictivos.
4. El éxito de la discriminación es muy dependiente del linaje estudiado.

5. Las dos regiones analizadas han permitido detectar varios casos en los que puede ser necesaria una elevación de taxones actualmente con categoría infra-específica, y otros en los que es posible concebir la existencia de especies crípticas.
6. Es necesaria una región de ADN nuclear que pueda suministrar caracteres moleculares discriminantes para el 25% de casos morfológicamente no conflictivos que no han sido resueltos, y para las especies de origen híbrido.

Briófitos

1. La utilización de las regiones propuestas por el PWG es inviable: la región *matK* presenta muchos problemas técnicos para su amplificación, y *rbcl* no es lo suficientemente discriminante.
2. Aunque la región nuclear *ITS* presenta genes parálogos que dificultan la secuenciación, es también bastante más variable que cualquiera de las regiones cloroplásticas empleadas, y nos permitió la identificación de posibles híbridos. Por ello, la proponemos como candidata a utilizar en aquellos Briófitos en los que *rbcl* no muestra el poder resolutivo deseado.
3. Nuestros análisis basados en diferentes marcadores moleculares han revelado la posible existencia de especies nuevas dentro del complejo *Fissidens taxifolius* y del género *Neckera*, y han permitido zanjar viejas cuestiones taxonómicas como en el caso de los *Leucodon* americanos. Por lo tanto, aún siendo conscientes de las limitaciones de las regiones de ADN en la identificación taxonómica, sí que nos parece que un esfuerzo común de todos los científicos que trabajan en sistemática molecular, y campos afines podría significar un avance muy importante, del que también la sistemática clásica basada en morfología podría beneficiarse.

Sin menoscabo de todo lo anterior, el grupo de Angiospermas está construyendo dos matrices de referencia para albergar las secuencias de los identificadores taxonómicos de la flora canaria.

La información de la que se dispone hoy en día representa aproximadamente al 25% de los taxones endémicos de Canarias.

En Briófitos, los grupos de la UMU y ULL han conseguido una subvención de la Fundación Séneca de la Región de Murcia para un estudio más detallado del problema del complejo *Fissidens taxifolius* y aproximarse a una posible solución. Así mismo, han estrechado vínculos de cooperación investigadora con grupos extranjeros con líneas de investigación afines.

Recomendaciones para la conservación y perspectivas futuras

Los resultados de este estudio sugieren la utilización de, al menos, las regiones *matK* y *rbcl* (en Angiospermas) y otras regiones más polimórficas (en Briófitos) para desarrollar acciones estratégicas con múltiples implicaciones para la gestión y conservación futura de las especies vegetales del P.N. de Garajonay:

- 1) Elaboración de un catálogo con las especies de Angiospermas y Briófitos del P.N. de Garajonay basado en la complementación entre los caracteres morfológicos y los identificadores moleculares.
- 2) Estimación de la Diversidad Filogenética del P.N. de Garajonay (PD) para localizar las zonas de su territorio con mayor complejidad o diversidad evolutiva. Puesto que las estimaciones basadas en secuencias de ADN no tienen por qué coincidir con las basadas en la diversidad taxonómica por unidad de área (REYES-BETANCORT *et al.* 2008), probablemente contribuirían a delimitar posibles zonas de conservación prioritaria o "santuarios" de diversidad vegetal dentro de este Parque Nacional.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido subvencionado por el proyecto de investigación "La flora endémica del Parque Nacional de Garajonay bajo la perspectiva molecular: el código de barras mo-

lecular como herramienta taxonómica” (Ref. 129/2006) del Organismo Autónomo Parques Nacionales (Ministerio de Medio Ambiente). Queremos agradecer a Ángel Fernández, (Director del P.N. de Garajonay), a su equipo de guardas, personal técnico y administrativo, además de a Pedro Romero de la U.I.M.A del Cabildo de La Gomera, su buena disposición para todas las actividades de este proyecto y, su enorme ayuda en la recolección de muestras. Agradecemos también, la ayuda de todos los colaboradores del Banco de ADN del JBCVC que no han participado en este proyecto, por llevar a cabo y/o facilitarnos la recolección de muestras en otras islas del archipiélago Canario y en otros archipiélagos Macaronésicos (Madeira y Cabo Verde), así como, al Departamento de Biología de la ULPGC

por habernos facilitado alícuotas de ADN de *Myrica faya* (G) y *Sambucus palmensisii* (P y T); sin estas múltiples aportaciones colaterales, no hubiésemos podido disponer de algunos de los taxones que se han utilizado para las comparaciones con los taxones del P.N. de La Gomera. Finalmente, a nuestras respectivas instituciones madre (Cabildo de Gran Canaria, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Universidad de La Laguna y Universidad de Murcia), su constante apoyo a todas nuestras líneas de investigación. Asimismo, al Dr. Michael Stech de la Universidad de Leiden por su colaboración en el estudio del género *Leucodon* de Briófitos, y a Rosalina de Almeida Gabriel, de la Universidad de Terceira (Azores), por su colaboración con la recolección de muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEBES-GINOVÉS, J.R., DEL ARCO-AGUILAR, M., GARCÍA-GALLO, A., LEÓN-ARENCEBIA, M.C., PÉREZ DE PAZ, P.L. *et al.* 2004. *Pteridophyta, Spermatophyta*. En: I. Izquierdo, J. L. Martín, N. Zurita & M. Arechavaleta (eds.) Lista de especies silvestres de Canarias (hongos, plantas y animales terrestres), pp. 96-143: Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente de Canarias. Santa Cruz de Tenerife.
- BAÑARES, Á., MARRERO, M., CARQUÉ, E. & SOSA, P. 2001. Biología de la conservación de la flora amenazada en los Parques Nacionales canarios. En: C. Gómez -Campo (coord.) Conservación de especies vegetales amenazadas en la Región Mediterránea Occidental, pp. 35-62. Centro de Estudios Ramón Areces S.A., Madrid.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J. 2010. Jesters, red queens, boomerangs and surfers: a molecular outlook on the diversity of the Canarian endemic flora. En: D. Bramwell & J. Caujape-Castells (eds.) *The Biology of island floras*. Cambridge University Press, London (en prensa).
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J., TYE, A., CRAWFORD, D., SANTOS-GUERRA, A., SAKAI, A., BEAVER, K., LOBIN, W., FLORENS, V., MOURA, M., JARDIM, R., GÓMES, I. & KUEFFER, K. 2010. Conservation of oceanic island floras: present and future global challenges. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12: 107-129.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 12794-12797.
- CHIANG, T.Y., SCHAAL, B.A. & PENG, C. I. 1998. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39: 245-250.
- COWAN, R.S., CHASE, M.W., KRESS, W.J. & SAVOLAINEN, V. 2006. 300,000 species to identify: problems, progress and prospects in DNA barcoding of land plants. *Taxon* 55:611-616.
- CUÉNOUD, P., SAVOLAINEN, V., CHATROU, L.W., POWELL, M., GRAYER, R.J. & CHASE, M. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences *American Journal of Botany* 89: 132-144.

- DEMASURE, B., SODZI, N. & PETIT, R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129-131.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- DOYLE, J.J., DAVIS, J.L., SORENG, R.J., GARVIN, D. & ANDERSON, M.J. 1992. Chloroplast DNA Inversions and the origin of the grass family (Poaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89: 7722-7726.
- DRAPER, I., HEDENÄS, L. & GRIMM, G. 2007. Molecular and morphological incongruence in European species of *Isoetecium* (Bryophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 700-716.
- FAITH, D.P. & WILLIAMS, K.J. 2005. How Large-scale DNA Barcoding Programs Can Boost Biodiversity Conservation Planning: Linking Phylogenetic Diversity (PD) Analyses to the Barcode of Life Database (BoLD). En: Australian Entomological Society's 36th AGM and Scientific Conference/7th Invertebrate Biodiversity and Conservation Conference. pp. 83-84. Australian Systematics Society. Canberra, Australia.
- FAZEKAS, A.J., BURGESS, K.S., KESANAKURTI, P.R., GRAHAM, S.W., NEWMASER, B.C., HUSBAND, B.C., PERCY, D.M., HAJIBABAEI, M. & BARRETT, S.C. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3:e2802.
- FORD, C.S., AYRES, K.L., TOOMEY, N., HAIDER, N., AIDER, J.V.A., STAHL, L. KELLY, J., WIKSTROM, N., HOLLINGSWORTH, P.M., DUFF, J., HOOT, S.B., COWAN, R.S., CHASE, M.W & WILKINSON, M.J. 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159:1-11
- GONZÁLEZ-MANCEBO, J.M., LOSADA-LIMA, A., PATIÑO LLORENTE, J. & LEAL PÉREZ, J. 2008a. Briófitos. En: E. Beltrán Tejera (ed.): Hongos, líquenes y Briófitos del Parque Nacional de Garajonay. pp. 565-786. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Serie Técnica. Madrid.
- GONZÁLEZ-MANCEBO, J.M, ROMAGUERA, F, ROS, R.M., PATIÑO, J. & WERNER, O. 2008b. Bryophyte flora of the Canary Islands: an updated compilation of the species list with an analysis of distribution patterns in the context of the Macaronesian Region. *Cryptogamie, Bryologie* 29: 315-357.
- GONZÁLEZ-MANCEBO, J.M., PATIÑO, J., WERNER, O., GABRIEL, R.M. & ROS, R.M. 2009. Distribution patterns of *Leucodon* species in Macaronesia, with special reference to the Canary Islands. *Cryptogamie, Bryologie* 30: 185-197.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A., SOSA, P., RIVERO, E., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E.A. & NARANJO, A. 2009. Molecular markers reveal no genetic differentiation between *Myrica rivas-martinezii* and *M. faya* (Myricaceae). *Annals of Botany*. 103: 79-86.
- HALL, T. 2004. Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- HEDENÄS, L. 1992. Flora of Madeiran Pleurocarpous mosses (Isobryales, Hypnobryales, Hookeriales). *Bryophytorum Bibliotheca* 44: 1-165.
- HERNÁNDEZ-MAQUEDA, R., QUANDT, D., WERNER, O. & MUÑOZ, J. 2007. Chloroplast data reveals two conflicting hipótesis for the position of *Campylostelium* and *Grimmia pitardii* (Bryophyta). *Taxon* 56: 89-94.
- HILL, M.O., BELL, N., BRUGGEMAN-NANNENGA, M.A., BRUGUÉS, M., CANO, M.J., ENROTH, J., FLATBERG, K.I., FRAHM, J.-P., GALLEGO, M.T., GARILLETI, R., GUERRA, J., HEDENÄS, L., HOLYOAK, D.T., HYVÖNEN, J., IGNATOV, M.S., LARA, F., MAZIMPAKA, V., MUÑOZ, J. & SÖDERSTRÖM, L. 2006. An annotated checklist of the mosses of Europe and Macaronesia. *Journal of Bryology* 28: 198-267.
- HUELSENBECK, J.P. & RONQUIST, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.

- JAÉN-MOLINA, R., CAUJAPÉ-CASTELLS, J., REYES-BETANCORT, J.A., AKHANI, H., FERNÁNDEZ-PALACIOS, O., PÉREZ DE PAZ, J., FEBLES-HERNÁNDEZ, R. & MARRERO-RODRÍGUEZ, A. 2009. Molecular phylogeny of *Matthiola* R. Br. (Brassicaceae) inferred from ITS sequences, with special emphasis on the Macaronesian endemics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 972-981.
- JORDAN, E.C., COURTNEY, M.W. & NEIGEL, J.T. 1996. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American duckweeds (Lemnaceae). *American Journal of Botany* 83: 430-439.
- KIER, G., KREFT, H., LEE, T.M., JETZ, W., IBISCH, P.L., NOWICKI, C., MUTKE, J. & BARTHLOTT, W. 2009. A global assessment of endemism and species richness across island and mainland regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 106: 9322-9327.
- KREFT, H., JETZ, W., MUTKE, J., KIER, G. & BARTHLOTT, W. 2008. Global diversity of island floras from a macroecological perspective. *Ecology Letters*. 11: 116-127.
- KRESS, W.J. & ERICKSON, D.L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2:e508.
- KRUSKAL, W. & WALLIS, W.A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47 (260): 583-62.
- LOSOS, J.B. & RICKLEFS, R.E. 2009. Adaptation and diversification on islands. *Nature* 457: 830-836 (doi:10.1038/nature07893)
- MANN, H.B. & WHITNEY, D.R. 1947. «On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other». *Annals of Mathematical Statistics* 18: 50-60.
- MANSION, G., ROSENBAUM, G., SCHOENENBERGER, N., BACCHETTA, G., ROSSELLO', J.A. & CONTI, E. 2008. Phylogenetic analysis informed by geological history supports multiple, sequential invasions of the Mediterranean Basin by the angiosperm family Araceae. *Systematic Biology* 57: 269-285.
- MARRERO, Á. & FRANCISCO-ORTEGA, F. J. 2001. Evolución en Islas: la metáfora espacio-tiempo-forma. En: J. M^a Fernández-Palacios & J. L. Martín Esquivel (eds.) *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y Conservación*. pp. 133-140. Publicaciones Turquesa. Santa Cruz de Tenerife
- MARTÍN J.L., MARRERO, N., ZURITA, N., ARECHAVALETA, M. & IZQUIERDO, I. 2005. Biodiversidad en gráficas. *Especies Silvestre de las Islas Canarias. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias*. pp 56.
- MYERS, N., MITTERMEIER R.A., MITTERMEIER, C.G., DA FONSECA, G.A.B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- OLSSON, S., BUCHBENDER, V., ENROTH, J., HEDENÄS, L., HUTTUNEN, S. & QUANDT, D. 2010. *Neckera* and *Thamnobryum* (Neckeraceae, Bryopsida) - paraphyletic assemblages. *Taxon* (en prensa).
- PACAK, A. & SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z. 2000. Molecular data concerning allopolyploid character and the origin of chloroplast and mitochondrial genomes in the liverwort *Pellia borealis*. *Journal of Plant Biotechnology* 2: 101-108.
- PALMER, J.D., JANSEN, R.K., MICHAELS, H.J., CHASE, M.W. & MANHART, J.R. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 75: 1180-1206.
- REYES-BETANCORT, J.A., SANTOS GUERRA, A., GUMA, I.R., HUMPHRIES, C.J. & CARINE, M.A. 2008. Diversity, rarity and the evolution and conservation of the Canary Islands endemic flora. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 65: 25-45
- RYALL, K., WHITTON, J., SCHOFIELD, W., ELLIS, S. & SHAW, A.J. 2005. Molecular Phylogenetic Study of interspecific Variation in the Moss *Isoetes* (Brachytheciaceae). *Systematic Botany* 30: 242-247.
- SOTIAUX, A., ENROTH, J., OLSSON, S., QUANDT, D. & VANDERPOORTEN, A. 2009. When morphology and molecules tell us different stories: A case-in-point with *Leptodon corsicus*, a new and unique endemic moss species from Corsica. *Journal of Bryology* 31: 186-196.

- STECH, M. & FRAHM, J.P. 1999. The status of *Platyhypnidium mutatum* Ochyra & Vanderpoorten and the systematic value of the Donrichardsiaceae based on molecular data. *Journal of Bryology* 21: 191-195.
- STECH, M., SIM-SIM, M., EQUIVEL, M.G., FONTINHA, S., TANGNEY, R., LOBO, C., GABRIEL, R. & QUANDT, D. 2008. Explaining the 'anomalous' distribution of *Echinodium* (Bryopsida: Echinodiaceae): Independent evolution in Macaronesia and Australasia. *Organisms Diversity and Evolution* 8: 282-292.
- STECH, M., WERNER, O., GONZÁLEZ-MANCEBO, J.M., PATIÑO, J., SIM-SIM, M., FONTINHA, S., HILDEBRANDT, I. & ROS, R.M. (in mss). Systematic and biogeographic relationships in *Leucodon* Schwägr. (Leucodontaceae, Bryophyta) with a focus on the Macaronesian species. *American Journal of Botany*.
- SUDA, J., KYNCL, T. & JAROLÍMOVÁ, V. 2005. Genome size variation in Macaronesian angiosperms: forty percent of the Canarian endemic flora completed. *Plant Systematics and Evolution* 252: 215-238.
- SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sunderland, MA, USA.
- TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G. & BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- VANDERPOORTEN, A. & LONG, D.G. 2006. Budding speciation and neotropical origin of the Azorean endemic liverwort, *Leptoscyphus azoricus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 73-83.
- WERNER, O., PATIÑO, J., GONZÁLEZ-MANCEBO, J.M., GABRIEL, R.M.A. & ROS, R.M. 2009. The taxonomic status and the geographical relationships of the Macaronesian endemic moss *Fissidens luisieri* based on DNA sequence data. *The Bryologist* 112(2): 315-324
- WHITTAKER, R.J. & FERNÁNDEZ-PALACIOS, J.M. 2007. *Island Biogeography. Ecology, Evolution, and Conservation*. 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford, UK.