

Herramientas moleculares para la Conservación

Este artículo inaugura esta nueva sección de *Conservación Vegetal*, que pretendemos sea permanente y de cabida tanto a resultados preliminares de estudios moleculares en marcha, como a la difusión de las conclusiones más relevantes de trabajos ya concluidos. Se invita al envío de contribuciones sobre diversidad genética, filogeografía, sistemática, etc. que tengan aplicaciones en términos conservacionistas.

Escasa diversidad genética en las poblaciones españolas del helecho tropical *Psilotum nudum*

El helecho escoba [*Psilotum nudum* (L.) P. Beauv.] es un pteridófito de la familia Psilotaceae con distribución fundamentalmente pantropical, cuyas poblaciones más septentrionales se encuentran en el sur de la Península Ibérica. Éstas se localizan en las Sierras de Algeciras (provincia de Cádiz) y presentan un notable aislamiento geográfico con respecto al resto de poblaciones de la especie, pues las más cercanas están a más de 3.000 kilómetros de distancia en el archipiélago de Cabo Verde. Recientemente ha aparecido en las Islas Canarias, aunque parece deberse a la acción del hombre (Christenhusz & Raab-Straube, 2013). Su presencia en la Península Ibérica ha sido considerada como una reminiscencia de la flora paleotropical que conformaba los bosques tropicales húmedos que durante el Terciario Inferior (65-25 m.a.) ocupaban gran parte de lo que hoy en día es la Cuenca del Mediterráneo (Díez Garretas & Salvo, 1981). No en vano, las poblaciones españolas del helecho escoba aparecen a menudo asociadas a unas formaciones vegetales muy singulares (canutos) dominadas por especies de hoja lauroide, que se presumen formaciones relictas terciarias. Por ello, esta especie ha sido considerada como una auténtica "joya botánica" y su presencia en España de gran interés científico.

Psilotum nudum no está amenazado a nivel mundial, debido a su vasta área de distribución. Sin embargo, el estado de conservación actual de las poblaciones españolas es preocupante, pues apenas cuenta con tres núcleos poblacionales aislados (separados por más de 50 km entre sí) y un total de cuatro poblaciones de escasa extensión y pocos individuos. Está incluido bajo la máxima categoría de amenaza en los catálogos de especies amenazadas tanto a nivel nacional como autonómico (CMA, 2012; MARM, 2011), así como en la máxima categoría de riesgo según las listas rojas nacionales y autonómicas (Cabezudo *et al.*, 2005; Moreno, 2008). A pesar de que las únicas poblaciones presentes en territorio europeo son las españolas, la especie no ha sido incluida en la Lista Roja Europea de plantas vasculares (Bilz *et al.*, 2011). No obstante, estas poblaciones están protegidas a través de la red nacional y europea de espacios protegidos, ya que se enmarcan dentro del Parque Natural de Los Alcornocales, que es también un ZEC de la red Natura2000 (ES000049). Además, tres de sus poblaciones ibéricas están también protegidas a través de su hábitat, ya que los canutos están recogidos como Hábitat de Interés Comunitario (92B0) en la



Aspecto de uno de los canutos angostos en los que se desarrollan algunas poblaciones de helecho escoba (Foto: S. Martín-Bravo).

Directiva Europea de Hábitats (92/43/EEC). Las principales amenazas que se han citado para su supervivencia, además de su reducida área de distribución y número de individuos, son las recolecciones con fines científicos o coleccionistas, la fragmentación de poblaciones y los incendios (Cabezudo *et al.*, 2004, 2005).

En la mayor parte del área de distribución de la especie (latitudes tropicales), el helecho escoba aparece en ambientes umbríos de sotobosques húmedos, donde suele crecer epífito o directamente sobre el suelo (Díez Garretas & Salvo, 1981). Curiosamente, el hábitat característico de las poblaciones ibéricas de *P. nudum* es totalmente atípico, pues forma parte de comunidades rupícolas en las que crece so-



Detalle de un individuo (*genet*) de helecho escoba en el que se aprecian vástagos (*ramets*) secos y verdes, algunos de los cuales presentan esporangios. Foto: S. Martín-Bravo.

bre estrechas fisuras en paredes verticales de areniscas. Recientemente se ha citado otra población con una ecología fisurícola similar en México (Hernández-Hernández *et al.*, 2014). Aunque algunos de los paredones ibéricos se encuentran inmersos en angostos y sombríos canutos con una elevada humedad ambiental, otros se localizan totalmente expuestos o incluso con orientación S-SE lo que les imprime una marcada xericidad que contrasta fuertemente con el carácter típicamente nemoral de las poblaciones tropicales. Los individuos (*genets*) del helecho escoba presentan un rizoma que va desarrollando vástagos (*ramets*) a lo largo de 25-50 años, que es la vida media que se estima para un individuo (Cabezudo *et al.*, 1999). Este crecimiento rizomatoso, si bien puede facilitar la supervivencia a largo plazo de las poblaciones, incluso en ausencia de reclutamiento mediante esporas, podría por otro lado suponer bajos niveles de diversidad genética. La formación de esporas es abundante y dilatada a lo largo de todo el año, con máximos entre los meses de mayo y agosto; sin embargo, el reclutamiento de nuevos individuos parece ser bastante raro (Cabezudo *et al.*, 1999, 2004).

En 2003 iniciamos un estudio molecular con el objetivo de evaluar la diversidad genética de las poblaciones ibéricas del helecho escoba. Ese año llevamos a cabo un estudio piloto en el que analizamos en tres de sus poblaciones, incluyendo tres individuos (*genets*) pertenecientes a grietas distintas en cada una de las poblaciones (nueve individuos en total). Para el estudio molecular usamos la técnica molecular de huella genética ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Esta técnica se basa en la amplificación de distintos fragmentos del ADN (*loci*) que se encuentran flanqueados por repeticiones en tándem de secuencias cortas (microsatélites, SSR) y que están distribuidos a lo largo de todo el genoma. En cada individuo se identifica la presencia/ausencia de cada fragmento amplificado (*locus*), de modo que a partir de las presencias y ausencias de todos los *loci* el individuo queda identificado por su perfil único de huella genética.

Posteriormente se comparan los perfiles genéticos de todos los individuos con la idea de identificar aquellos *loci* que sean polimórficos, es decir, detectar aquellos fragmentos que están presentes en unos individuos sí y en otros no. La idea que subyace es que cuantos más polimorfismos, mayor diversidad genética; e indirectamente, que a menor similitud en los perfiles de los individuos, mayor distancia genética entre los mismos. En este estudio preliminar amplificamos cuatro regiones de ISSR distintas, lo que arrojó un total de 23 *loci*, todos ellos monomórficos (presentes en todos los individuos). Es decir, los nueve individuos muestreados compartían exactamente el mismo perfil genético, independientemente de la población a la que pertenecían.

Ante este sorprendente resultado, ampliamos el estudio a 44 individuos presuntamente diferentes (*genets*) de las cuatro poblaciones existentes conocidas. Además, decidimos realizar en paralelo un estudio demográfico con ayuda del personal de la Red Andaluza de Jardines Botánicos en Espacios Naturales Protegidos y del Proyecto de Conservación de Pteridófitos, de modo que pudiéramos relacionar los resultados moleculares con los datos demográficos. Los resultados del estudio molecular arrojaron 31 *loci*, siendo de nuevo todos ellos monomórficos independientemente de la grieta y población a la que perteneciesen. Todo ello parece indicar que la diversidad genética de las poblaciones ibéricas de *P. nudum* es extremadamente baja. De confirmarse con técnicas de diversidad genética más finas, la supervivencia a largo plazo de las poblaciones ibéricas estaría seriamente comprometida. Esta baja diversidad genética podría estar detrás del escaso reclutamiento encontrado, a pesar de observarse unos buenos niveles de esporulación.

Población	Año	Grietas	Individuos	Vástagos verdes/secos
Montera del Torero	2005	5	17	236 / 424
	2013	4	10	150 / 285
Cerro del Laurel	2005	19	47	287 / 244
	2013	9	13	609 / 383
Finca del Carrizuelo	2005	8	22	417 / 507
	2013	8	41	301 / 739
Arroyo del Salado	2005	27	119	329 / 411
	2013	-	-	-

Tabla 1. Resultados del seguimiento demográfico en 2005 y 2013 en las poblaciones conocidas del helecho escoba. Para cada una se indican el número de grietas ocupadas, de individuos (*genets*) y de vástagos.

Dicho hallazgo podría tener también relación con el escaso éxito de los ensayos para la propagación de *P. nudum* (germinación *in vitro* de esporas) llevados a cabo dentro del Proyecto de Conservación de Pteridófitos en Andalucía.

Por otro lado, los resultados demográficos parecen indicar una cierta estabilidad en la dinámica de las poblaciones, si

comparamos nuestros resultados (Tabla 1) con los publicados por Cabezudo *et al.* (1999, 2004). De hecho, el seguimiento realizado por el personal de la Red Andaluza de Jardines Botánicos en Espacios Naturales Protegidos y del Proyecto de Conservación de Pteridófitos hasta 2012 confirma esta estabilidad en cuanto al número de individuos (*genets*). No obstante, los datos del último seguimiento demográfico realizado en 2013 parecen indicar cierto declive poblacional, ya que el número de *genets*, e incluso de grietas colonizadas, parece haber descendido en algunas poblaciones (Tabla 1). Sin embargo, es posible que parte del descenso observado se deba a la dificultad de identificar las grietas habitadas en las partes altas de algunos paredones, agravado por la tonalidad pardusca de algunos vástagos que se confunde con el color de las areniscas. Además, el crecimiento rizomatoso del helecho escoba dificulta enormemente la identificación y seguimiento de los individuos (*genets*).

Estos resultados plantean numerosos interrogantes sobre el origen y evolución de estas poblaciones ibéricas, cuyo esclarecimiento es clave de cara a plantear estrategias de conservación efectivas. La distancia geográfica que separa las poblaciones ibéricas entre sí es de más de 50 km; excepto entre las poblaciones de Montera del Torero y Cerro del Laurel, que apenas distan 1,5 km. Estas grandes distancias sin poblaciones intermedias, junto con el tipo de hábitat fisurícola y las características biológicas de la especie, harían esperar cierto aislamiento geográfico debido a un limitado flujo génico entre poblaciones. Teniendo en cuenta estas premisas, si la presencia de *P. nudum* en la Península datara de la época Terciaria, sus poblaciones se habrían tenido que refugiar en los canutos durante los acontecimientos climáticos de finales del Terciario y Cuaternario. Por ello, lo esperado sería haber encontrado grandes diferencias genéticas entre las poblaciones ibéricas al haber quedado separadas, y presuntamente aisladas, desde entonces. En cambio, si el origen de las poblaciones ibéricas fuese más reciente y mediado por dispersión, la ausencia de diversidad genética detectada entre poblaciones sería más fácilmente explicable dado que el escaso tiempo transcurri-

do habría limitado la diferenciación de las poblaciones. Con los estudios que hemos realizado y los resultados obtenidos, no podemos descartar que el origen del helecho escoba en la Península date de tiempos Terciarios, pero que sus poblaciones actuales sean el fruto de una expansión reciente; escenario que haría factible los resultados de diversidad genética encontrados. Sin embargo, los datos demográficos con los que contamos parecen indicar que estamos ante poblaciones bien establecidas, a menudo con numerosos individuos maduros bien desarrollados (>200 vástagos vivos). Incluso en muchos de los *genets* con pocos vástagos vivos, estos son de gran tamaño y además se desarrollan sobre un gran rizoma, lo que hace pensar que estos son también individuos maduros.

En el futuro sería deseable evaluar los resultados de diversidad genética que hemos encontrado para las poblaciones ibéricas mediante el uso de una técnica molecular más fina (p.e. AFLPs, microsátélites). Asimismo, sería interesante estudiar la diferenciación genética de las poblaciones ibéricas con respecto a las poblaciones tropicales. Esto nos proporcionaría un marco temporal tanto para la aparición de *P. nudum* en la Península como para esclarecer el origen geográfico de sus poblaciones ibéricas actuales. Todo ello sería de gran utilidad de cara a comprender los niveles de diversidad genética encontrados y proponer medidas de actuación dirigidas y efectivas.

Agradecimientos: C. Rodríguez-Hiraldo, Servicio de Geodiversidad y Biodiversidad de la Junta de Andalucía, B. Garrido Díaz y personal de la Red Andaluza de Jardines Botánicos en Espacios Naturales Protegidos y del Proyecto de Conservación de Pteridófitos, M. A. Ramírez Aguilera, J. A. Ortiz, A. J. Molinillo, propietario y personal de la Finca del Carrizuelo.

Bibliografía

- Bilz, M., S.P. Kell, N. Maxted & R.V. Lansdown (2011). *European Red List of Vascular Plants*. Publications Office of the European Union, Luxemburgo.
- Cabezudo, B., D. Navas, F. Sánchez & A.E. Salvo (1999). *Psilotum nudum*. In: B. Valdés, C. Rodríguez, A. López & O. Merino (coords.), *Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía*, vol. I: 224-227. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Cabezudo, B., Y. Gil, D. Navas, P. Navas & A.V. Pérez Latorre (2004). *Psilotum nudum* (L.) P. Beauv. In: A. Bañares, G. Blanca, J. Güemes, J.C. Moreno & S. Ortiz (eds.), *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculosa Amenazada de España*: 452-453. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Cabezudo, B., S. Talavera, G. Blanca, C. Salazar, M. Cueto, B. Valdés, J.E. Hernández Bermejo, C.M. Herrera, C. Rodríguez Hiraldo & D. Navas (2005). *Lista Roja de la Flora Vasculosa de Andalucía*. Consejería Medio Ambiente, Sevilla.
- Christenhusz, M. & E. von Raab-Straube (2013). Polypodiopsida. In: *Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity*.
- CMA, Consejería de Medio Ambiente (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 60 de 27/03/2012.
- Diez-Garretas, B. & A.E. Salvo (1981). Ensayo biogeográfico de los Pteridófitos de las sierras de Algeciras. *Anales del Real Jardín Botánico de Madrid* 37: 455-462.
- Hernández-Hernández, V., M.G. Segovia-Ramírez & S. Argüelles-Marmolejo (2014). Un nuevo registro para Guanajuato: *Psilotum nudum* (Psilotaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 610-612.
- MARM, Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino (2011). *Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas*. BOE 46: 20912-20951.
- 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.

SANTIAGO MARTÍN BRAVO¹, ANTONIO J. DELGADO² Y VIRGINIA VALCÁRCEL³

1. Área de Botánica, Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de Olavide. Ctra. de Utrera km 1, 41013 Sevilla. E-mail: smarbra@upo.es.

2. Rue Albert 1er 9, 1390 Grez-Doiceau (Bélgica).

3. Área de Botánica, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid. C/ Darwin 2, 28049 Madrid.