

1 RESUMEN DE LA PROPUESTA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Isabel Mateu Andrés

TITULO DEL PROYECTO: Filogeografía comparada de plantas representativas de la flora mediterránea. Datos de interés ecológico y forestal.

RESUMEN:

El proyecto que aquí se propone tiene por objetivo investigar la filogeografía comparada de especies que comparten su distribución circunmediterránea, mediante microsatélites cloroplásticos (cpSSR). Para ello, se han seleccionado 8 especies de interés ecológico y económico por su uso en restauración de ecosistemas, ornamental y maderero, principalmente: *Arbutus unedo* L., *Celtis australis* L., *Myrtus communis* L., *Nerium oleander* L., *Pistacia lentiscus* L., *Quercus coccifera* L., *Rhamnus alaternus* L. y *Rosmarinus officinalis* L.

Se estudiarán 40 poblaciones de cada especie repartidas por toda su área de distribución. Los marcadores elegidos son cpSSR por ser de herencia uniparental, adecuados para conocer la distribución geográfica de la variabilidad genética, al tiempo que presentan niveles elevados de variabilidad. Con el fin de comprobar que los diferentes tamaños de cada uno de los fragmentos corresponden a *indels* concordantes, y que tamaños iguales de un mismo fragmento implican la misma composición nucleotídica, se secuenciarán las muestras de cada fragmento de diferente tamaño. Para saber si existen diferencias entre poblaciones, en aspectos de interés forestal como la capacidad de germinación de semillas y supervivencia de plantas, se realizarán pruebas en condiciones homogéneas, con material procedente de 20 poblaciones entre las estudiadas para cada especie.

Con los resultados obtenidos, intentamos conocer si existen patrones filogeográficos comunes en las especies consideradas y si éstos concuerdan o difieren con los previamente observados para la flora de las zonas boreal y templada europeas, aportar datos que sustenten la identificación de zonas de interés especial para la conservación de la diversidad genética en el Mediterráneo y disponer de herramientas moleculares fiables para la definición de zonas de procedencia y certificación de semillas, así como para sustentar las normas que han de regular el comercio de semillas y plantas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Finalidad del proyecto.

En este proyecto se pretende llevar a cabo el estudio filogeográfico comparado de 8 especies de plantas distribuidas por toda la cuenca mediterránea: *Arbutus unedo* L., *Celtis australis* L., *Myrtus communis* L., *Nerium oleander* L., *Pistacia lentiscus* L., *Quercus coccifera* L., *Rhamnus alaternus* L. y *Rosmarinus officinalis* L. Se trata de especies de reproducción sexual, y algunas presentan multiplicación vegetativa también, mayoritariamente arbustivas aunque una especie es arbórea (*Celtis australis*). Todas ellas tienen importancia ecológica y forestal, además de interés económico por su uso ornamental y maderero, principalmente.

Los marcadores elegidos son microsatélites cloroplásticos por ser de transmisión uniparental al tiempo que presentan niveles de variabilidad relativamente altos.

Son escasos los datos sobre la filogeografía de especies distribuidas alrededor del Mar Mediterráneo, como las que pretendemos abordar aquí, de hecho no existen estudios filogeográficos sobre ninguna de las especies elegidas, salvo de poblaciones occidentales de *Quercus coccifera*.

Aunque el número de especies se puede considerar relativamente bajo, éstas son la práctica totalidad de las especies arbustivas distribuidas preferentemente por la Región Mediterránea. Por otra parte, y dado que especies del mismo género suelen presentar pautas comunes, esperamos que los resultados del proyecto nos permitan obtener patrones filogeográficos generalizables a otras especies del área. La información resultante permitirá identificar rutas migratorias y posibles áreas de refugio pleistocénicas, así como señalar áreas de interés particular para la conservación de la diversidad genética de plantas mediterráneas y servir de base para la definición de regiones de procedencia, la certificación de calidad de semillas y su regulación comercial.

2.2. Antecedentes y estado actual de los conocimientos científico-técnicos

El mar Mediterráneo se extiende en dirección Este-Oeste (E-O) desde el estrecho de Gibraltar hasta Palestina. Ocupa una posición pivote entre África y Eurasia, estando delimitado en su mitad Norte por grandes penínsulas e islas, mientras que en sus límites meridionales destacan sus largos tramos rectilíneos.

Geológicamente deriva del antiguo Tethys tras los movimientos tectónicos que determinaron la actual posición de los dos continentes. El movimiento de África, durante el Mioceno, produjo el cierre del estrecho de Gibraltar en el extremo occidental, las cadenas montañosas que rodean su cuenca, así como la pérdida de conexión con el Océano Índico. En la transición entre el Mioceno y el Plioceno (6-5 ma), el cierre del estrecho de Gibraltar provocó la crisis Messiniense, de catastróficas consecuencias para la biota de dicho mar, y en la que, salvo algunos lagos salinos marginales, el mar se secó casi completamente. El restablecimiento posterior de la conexión con el Atlántico permitió su recolonización biológica.

La cuenca mediterránea presenta mayoritariamente un clima caracterizado por veranos cálidos y secos e inviernos fríos y húmedos, originado a finales del Plioceno, habiendo sido anteriormente de carácter tropical. En promedio, el clima es más frío y húmedo en el O (salvo en el S-E de España) en que el período de déficit hídrico dura dos meses, y más cálido y seco en el E, cuyo período de déficit hídrico puede extenderse entre 5-6 meses. Durante las glaciaciones del Pleistoceno la mayoría de las fanerógamas tropicales desaparecieron, si bien algunas consiguieron persistir principalmente en Macaronesia, siendo reemplazadas por especies esteparias Irano-Turanianas y Saharo-Arábicas, elementos boreales y especies autóctonas (Blondel and Aronson, 1999). Desde el punto de vista biogeográfico, las zonas circunmediterráneas con este tipo de clima, se consideran Región Mediterránea.

Entre otros factores importantes en el modelado de la vegetación mediterránea actual destacan el fuego, producido por causas naturales o antrópicas, y la deforestación histórica de vastas zonas para uso agrícola. Aunque la influencia antrópica en el Mediterráneo ha sido muy importante desde tiempos remotos, en la actualidad se ve agravada por la agricultura intensiva, y el gran desarrollo urbanístico, especialmente en zonas costeras.

La vegetación natural más característica del área mediterránea es el matorral (maquia y garriga), con cuyo nombre se designan las formaciones vegetales de arbustos esclerófilos con un estrato inferior de plantas herbáceas anuales y perennes asociadas, en ocasiones, a especies de los géneros *Pinus* y *Quercus*. Otro tipo de vegetación importante es la que se desarrolla sobre suelos periódica o permanentemente húmedos en ramblas y arroyos (edafófila), una de cuyas especies más emblemáticas es *Nerium oleander*.



Figura 1: Áreas de clima mediterráneo en la cuenca mediterránea (tomado de Folch et al., 1993)

La filogeografía es una parte de la biogeografía que, en palabras de Avise (1998), el creador del término, “aborda el estudio relativo a los principios y procesos que rigen la distribución geográfica de linajes, a nivel intraespecífico”. Los estudios filogeográficos analizan la distribución espacial de alelos dentro y entre poblaciones para deducir sus relaciones filogenéticas, si bien todos aquellos estudios que tratan de la distribución espacial de cualquier rasgo genético (morfológico, comportamiento, etc), pueden considerarse como filogeográficos en sentido amplio (Avise, 1998). La gran mayoría de los trabajos sobre filogeografía se han centrado en especies o grupos de especies relacionadas (ej. Tremblay and Schoen, 1999; Raspe *et al.*, 2000; Hampe *et al.*, 2003; Fineschi *et al.*, 2003; Marcussen, 2003; Gardner *et al.*, 2004; Cieslak *et al.*, 2005).

Contrariamente a la abundante información disponible sobre filogeografía de especies europeas (referencias en Aguinagalde *et al.*, 2005), que han documentado extensamente el papel de refugios de las penínsulas mediterráneas durante las glaciaciones, son escasos los trabajos sobre especies mediterráneas.

La **filogeografía comparada** (Arbogast and Kenagy, 2001) es una extensión de la filogeografía que aborda la comparación entre los patrones que exhiben diferentes *taxa* que comparten área de distribución. Según Bermingham y Moritz (1998), la filogeografía comparada puede contribuir a ampliar los estudios sobre ecología y evolución proporcionando un contexto evolutivo y geográfico a especies que comparten áreas, permitiendo determinar los factores históricos e influencias espaciales que han determinado la riqueza de especies, a comprender las respuestas a cambios en el paisaje e identificar de áreas evolutivamente aisladas proporcionando información importante para el diseño de estrategias de conservación. Taberlet *et al.* (1998) publicaron una síntesis en la que se comparan las rutas migratorias de diversas especies de animales y plantas, en la que se observan tendencias comunes entre ellas, así como que este tipo de datos tiene importantes implicaciones en genética de la conservación ya que es posible establecer áreas en las que se deben concentrar los esfuerzos en este sentido. Según estos autores, las regiones del S de Europa son las que presentan mayor interés por concentrar la mayoría de la variación genética debido a su papel de refugios en épocas glaciales.

En un trabajo muy reciente Aguinagalde et al. (2005) han demostrado la influencia de la filogenia en los patrones de distribución geográfica de la variabilidad genética (en ADN cloroplástico) así como la correlación entre ésta y el tipo de distribución de las especies, mientras que, por el contrario, no existe correlación con rasgos biológicos como el tipo biológico, forma de reproducción, polinización y dispersión de semillas.

En el conjunto de la Comunidad Económica Europea (CEE) hay un interés creciente en la restauración de ecosistemas, para lo cual se considera altamente deseable el uso de especies autóctonas y material procedente de áreas locales dado que, en general, los genotipos locales están mejor adaptados a sus particulares condiciones ambientales. Con esta finalidad, en la CEE se han definido regiones de procedencia de semillas de especies forestales. Dichas regiones de procedencia están definidas por datos fisiográficos y ecológicos y tienen carácter provisional a la espera de datos moleculares que den una base más sólida que permitan establecerlas de manera definitiva.

Mientras que en la Europa templada la distribución de la flora sigue unos patrones filogeográficos latitudinales, abundantemente documentados, la orientación longitudinal de la cuenca mediterránea y su historia paleoclimática, presumiblemente afectada de manera marginal por las glaciaciones, sugieren un modelo longitudinal, que correspondería con procesos de dispersión. Sin embargo, el papel de refugios de las penínsulas mediterráneas y N de África, permiten plantear una hipótesis alternativa, según la cual la distribución de la variabilidad genética seguiría un modelo en mosaico, reflejo de una fragmentación ancestral de las poblaciones.

Basándonos en lo anterior, el **objetivo** de este proyecto es realizar un estudio de **filogeografía comparada** de especies que comparten su **distribución alrededor del Mar Mediterráneo**, con la finalidad de:

- 1, Conocer la distribución geográfica de la variabilidad genética de estas especies para detectar posibles patrones filogeográficos de forma que sea posible predecir la organización de la diversidad genética en otras especies con cloroplastos de herencia materna.
- 2, Contrastar los posibles patrones filogeográficos de la flora mediterránea con los observados por otros autores para la flora de las zonas boreal y templada europeas.
- 3, Obtener datos que, junto a los disponibles en la bibliografía (Fineschi *et al.*, 2005; Lumaret *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2004; González-Martínez *et al.*, 2004; Soranzo *et al.*, 2004), permitan señalar zonas de especial interés para el mantenimiento de la diversidad genética de plantas mediterráneas.
- 4, Disponer de datos moleculares que fundamenten la definición de regiones de procedencia de semillas en especies de interés ecológico y forestal, y que ayuden a regular el comercio de semillas y plantas.

Elección de especies:

Por todo lo anterior, se han elegido 8 especies pertenecientes a otras tantas familias y con diferentes características biológicas, que cumplen los siguientes criterios:

- Presentar carácter autóctono.
- Compartir área de distribución circunmediterránea.
- Tener gran importancia ecológica y económica: Las especies elegidas son de amplio interés forestal y ornamental, siendo utilizadas para la restauración de hábitats y en jardinería, entre otros usos.

Por otra parte, dado que las especies de un mismo género suelen presentar patrones comunes (Aguinagalde *et al.*, 2005), y con el fin de incorporar la mayor diversidad taxonómica y predictividad posible, hemos procedido a seleccionar en los géneros pluriespecíficos una especie por género.

Las especies seleccionadas son: *Arbutus unedo* L., *Celtis australis* L., *Myrtus communis* L., *Nerium oleander* L., *Pistacia lentiscus* L., *Quercus coccifera* L., *Rhamnus alaternus* L. y *Rosmarinus officinalis* L.

Todas ellas son plantas de reproducción sexual, aunque varias de ellas pueden multiplicarse vegetativamente (Tabla 1). Su distribución es esencialmente mediterránea, si bien algunas especies se extienden a otras áreas de forma marginal. *Celtis australis* es el único árbol de hoja caduca, siendo las restantes arbustos perennifolios, aunque pueden alcanzar 4-6m de altura. Salvo *Nerium oleander* que vive en suelos con humedad freática y *Celtis australis* que, en los ambientes más xerofíticos, crece en hábitats fisurícolas con humedad edáfica, mayoritariamente son especies de matorral, con una considerable amplitud ecológica en cuanto a tipo de suelos y rango altitudinal, aunque rehúsan los ambientes continentales.

Tabla 1: Características biológicas más significativas de cada especie y su aprovechamiento.

| Especie | Familia | Tipo | Mult ¹ | Sexo | Poliniz ² | Disp. Frutos ³ | Usos |
|-------------------------------|---------------|---------|-------------------|------|----------------------|---------------------------|------------------------------|
| <i>Arbutus unedo</i> | Ericaceae | Arbusto | R | H | Z | Z | Ornamental, madera, frutos |
| <i>Celtis australis</i> | Cannabaceae | Árbol | - | H | A | Z | Madera y ornamental |
| <i>Myrtus communis</i> * | Myrtaceae | Arbusto | E | H | Z | Z | Ornamental, madera, tenería |
| <i>Nerium oleander</i> | Apocynaceae | Arbusto | E | H | Z | A | Ornamental |
| <i>Pistacia lentiscus</i> | Anacardiaceae | Arbusto | R | D | A | Z | Madera, resina |
| <i>Quercus coccifera</i> | Fagaceae | Arbusto | R | M | A | Z | Cultivo, cochinilla, tenería |
| <i>Rhamnus alaternus</i> | Rhamnaceae | Arbusto | R | M | A, Z | Z | Ornamental, maderero |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | Labiatae | Arbusto | E | H | Z | B | Ornamental, melífero |

* Especie protegida en Baleares. H, Hermafrodita; D, Dioica; M, Monoica. 1 Multiplicación: E, esqueje; R, rebrote. 2, Polinización: Z, zoófila; A, anemófila. 3, Dispersión de frutos: A, anemócora; B, barócora; Z, zoócora.

No se incluyen gimnospermas porque en ellas los cloroplastos se heredan por vía paterna, lo que introduciría un modelo diferente (Burban and Petit, 2003). Especies de los géneros *Erica*, *Retama*, *Genista* y *Tamarix* así como *Ulex parviflorus*, *Phyllirea angustifolia* y *Viburnum tinus* se han excluido por su distribución reducida al occidente de la cuenca. Especies del género *Cistus* por haber sido ya estudiadas (Vargas, 2005). Finalmente, *Phyllirea latifolia* y *P. media* se han excluido por su capacidad de hibridación con otras especies y su controvertida delimitación taxonómica.

Salvo los trabajos de Jiménez *et al.* (2004) y López de Heredia *et al.* (2005), sobre las especies perennifolias de *Quercus* (*Q. suber*, *Q. ilex* y *Q. coccifera*) del O mediterráneo, no se han realizado estudios filogeográficos previos en ninguna de estas especies. Werner *et al.* (2002) han estudiado la diversidad genética de *Pistacia lentiscus* en el S de la Península Ibérica y N de África, mediante RAPDs, encontrando una gran distancia genética entre las poblaciones de ambas zonas. Portis *et al.* (2004) han publicado un trabajo sobre la identificación de variedades de cultivo de *Nerium oleander* mediante AFLPs. Angioni *et al.* (2004) han

relacionado los resultados obtenidos con RAPDs con la composición química del aceite esencial de romero, en Cerdeña, y su actividad antimicrobiana y antifúngica. Hileman *et al.* (2001) han publicado un trabajo sobre filogenia y biogeografía de Arbutioideae en el que se concluye el origen polifilético del género *Arbutus*. Traveset *et al.* (2001) han estudiado aspectos relativos a la dispersión de frutos de *Myrtus communis*. Aronne and Wilcock (1994, 1995) demostraron la participación de hormigas en la polinización y dispersión de frutos *R. alaternus*.

Elección de marcadores

En estudios filogeográficos, se utilizan marcadores cloroplásticos o mitocondriales por tener una baja tasa de mutación respecto del ADN nuclear y por ser de herencia uniparental, lo que hace que estén más estructurados geográficamente debido a la limitada capacidad de dispersión de las semillas comparadas con el polen. El ADN mitocondrial presenta una tasa de mutación muy baja en plantas, por lo que nos centraremos en el estudio de ADN cloroplástico, transmitido por vía materna en angiospermas, salvo contadas excepciones.

Los marcadores elegidos son microsatélites cloroplásticos (cpSSR), los cuales presentan tasas de mutación superiores a otros marcadores cloroplásticos en plantas (Provan *et al.*, 1999), lo que es deseable cuando se trata de estudiar variabilidad genética a nivel intraespecífico.

En los últimos diez años se han descrito diversos cebadores universales (Demesure *et al.*, 1995; Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997; Grivet *et al.*, 2001; Taberlet *et al.*, 1991; Weising & Gardner, 1998), entre los cuales hemos elegido los descritos por Weising & Gardner (1998). En 7 de ellos (ccpm1, ccpm2, ccpm3, ccpm4, ccpm7, ccpm9 y ccpm10) los motivos de repetición son microsatélites perfectos formados por mononucleótidos (A o T) siendo los restantes compuestos (ccpm5) o imperfectos (ccpm6 y ccpm8) y están perfectamente localizados en el ADN cloroplástico (Grivet *et al.*, 2001). La elección de estos cebadores está motivada por sus buenos resultados en cuanto a variabilidad demostrada en numerosos grupos de plantas, así como por el hecho de tener experiencia en su manejo y aplicación a fresnos y otros grupos de plantas cuyo estudio está en curso. En el caso eventual de que los cebadores propuestos no presenten variabilidad suficiente en alguna especie, se emplearán otros cebadores de los varios disponibles en la literatura arriba citada.

Las diferencias en el tamaño de los fragmentos obtenidos mediante la amplificación con cebadores microsatélite se interpretan como alelos diferentes, sin embargo, es posible que estas diferencias en el tamaño de los fragmentos sean debidas al número de repeticiones de la región microsatélite, lo que correspondería a alelos diferentes en sentido estricto, o bien a diferencias en la región flanqueante. Por otra parte, tamaños iguales pueden presentar composiciones diferentes en nucleótidos.

Para comprobar que las diferencias en tamaño de los productos de PCR son debidas a diferente número de repeticiones del motivo, se secuenciará una muestra de cada producto de diferente tamaño, con cada uno de los cebadores y en todas las especies en estudio.

2.3. Bibliografía más relevante

- Aguinagalde I, A Hampe, A Mohanty, JP Martín, J Duminil, RJ Petit. 2005. Effects of life-history traits and species distribution on genetic structure at maternally inherited markers in European trees and shrubs. *Journal of Biogeography* **32**: 329-339.
- Alia, L Gil, GG Vendramin, A Kremer. 2004. Genetic resources in maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton): molecular and quantitative measures of genetic variation and differentiation among maternal lineages. *Forest Ecology and Management* **197**:103-115.
- Avice JC. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* **7**: 371-379.
- Bermingham E, C Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* **7**: 367-369.
- Blondel J, J Aronson. 1999. *Biology and wildlife of the Mediterranean region*. Oxford University Press. Oxford.
- Burban C, RJ Petit. 2003. Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Molecular Ecology* **12**:1487-1495.
- Carrion J, IY Errikarta, M Walker, AJ Legaz, C Chaín and A. López. 2003. Glacial refugia of temperate, Mediterranean and Ibero-North African flora in south-eastern Spain: new evidence from cave pollen at two Neanderthal man sites. *Global Ecology and Biogeography* **12**:119-129.
- Fineschi S, Cozzolino S, Migliaccio M, Musacchio A, Innocenti M, Vendramin GG. 2005. Sicily represents the Italian reservoir of chloroplast DNA diversity of *Quercus ilex* L. (Fagaceae). *Annals of Forest Science* **62**:79-84.
- Franquette S, J-P Suc, J Guiot, F Diniz, N Feddi, Z Zheng, E Bessais, A Drivaliari. 1999. Climate and biomes in the West Mediterranean are during the Pliocene. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **152**: 15-36.
- Gomez A, GG Vendramin, SC Gonzalez-Martinez, R Alia. 2005. Genetic diversity and differentiation of two Mediterranean pines (*Pinus halepensis* Mill and *Pinus pinaster* Ait) along a latitudinal cline using chloroplast microsatellite markers. *Diversity Distributions* **11**:257-263.
- Gonzalez-Martinez SC, S Mariette, MM Ribeiro, C Burban, A Raffin, MR Chambel, CAM Ribeiro, A Aguiar, C Plomion, R Alia, L Gil, GG Vendramin, A Kremer. 2004. Genetic resources in maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton): molecular and quantitative measures of genetic variation and differentiation among maternal lineages. *Forest Ecology and Management* **197**:103-115.
- Hewitt GM. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87-112.
- Jiménez P, UL de Heredia, C Collada, Z Lorenzo, L Gil. 2004. High variability of chloroplast DNA in three Mediterranean evergreen oaks indicates complex evolutionary history. *Heredity*. **93**:510-515.
- Lumaret R, M Tryphon-Dionnet, H Michaud, A Sanuy, E Ipotesi, C Born, C Mir. 2005. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in cork oak (*Quercus suber*). *Annals of Botany* **96**:853-861.

- Pons O, RJ Petit. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* **144**: 1237-1245.
- Petit RJ, I Aguinagalde, J Beaulieu, C Bittkau, S Brewer, R Cheddadi, R Ennos, S Fineschi, D Grivet, M Lascoux, A Mohanty, G Müller, B Demesure, A Palme, JP Martin, S Rendell, GG Vendramin. 2003. Glacial Refugia: Hotspots But Not Melting Pots of Genetic Diversity. *Science* **300**: 1563-1565.
- Provan J, N Soranzo, NJ Wilson, DB Goldstein, W Powell. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* **153**: 943-947.
- Soranzo N, R Alia, J Provan, W Powell. 2000. Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Molecular Ecology* **9**: 1205-1211.
- Vargas P. 2003. Molecular evidence for multiple diversification patterns of alpine plants in Mediterranean Europe. *Taxon* **52**: 463-476.
- Werner O, P. Sánchez-Gómez, M Carrión-Vilches, J Guerra. 2002. Evaluation of genetic diversity in *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from the southern Iberian Peninsula and North Africa using RAPD assay. Implications for reforestation policy. *Israel Journal of Plant Sciences* **5**: 11-18.

2.4. Grupos nacionales o internacionales que trabajan en la misma materia o en materias afines.

Para una mayor sencillez, se indica el nombre de la persona que encabeza cada grupo.

Españoles:

- R. Alía**, alia@inia.es, INIA, CIFOR, PO 8111, Madrid 28080, España. Desde hace años viene investigando en distintos aspectos de diferenciación y estructura genética de especies del género *Pinus*, así como otros aspectos relacionados con paternidad, flujo polínico y de semillas, respuestas al cloruro sódico (en especies de *Populus*).
- P Goicoechea**, pgoicoetxea@neiker.net. Neiker AB, Granja Modelo Arkaute, Apdo 46, Vitoria 01080, España. Aunque ha trabajado sobre diversas especies de plantas, su investigación más reciente se centra en filogeografía, flujo genético y diferenciación de especies de *Quercus*.
- P Vargas**, vargas@ma-rjb.csic.es. CSIC, Real Jardín Botánico de Madrid, Plaza Murillo 2, E-28014 Madrid, España. Aunque su investigación ha versado sobre filogenia de plantas, recientemente ha publicado un trabajo de síntesis sobre patrones de diversificación de plantas alpinas en la Región Mediterránea de Europa, mediante secuencias de ITS.
- J. Arroyo**, Dpto. de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla, Aptdo. 1095, E-41080-Sevilla, España. Investiga la ecología de poblaciones relictas de plantas y filogeografía como herramienta para el estudio de los procesos evolutivos y sus patrones geográficos.
- O. Werner & R. Ros**, werner@um.cs, Fac Biol, Dept Biol Vegetal, Campus Espinardo, Universidad de Murcia, E-30100 Murcia, han trabajado en filogeografía de algunas especies de musgos mediterráneos.

Grupos extranjeros: Señalamos varios grupos europeos por su proximidad y mejor conocimiento de la flora de nuestro territorio:

- RJ Petit**: petit@pierreton.inra.fr. UMR Biodivers Genes & Ecosyst, 69 Route Arcachon, F-33612 Cestas, Francia. Su extensa producción científica ha versado sobre diversos grupos de animales y plantas, principalmente especies de los géneros *Pinus* y *Quercus*, y ha publicado trabajos de síntesis sobre organización de la diversidad genética y correlación entre rasgos biológicos y distribución de especies en la estructura genética a través de marcadores de herencia materna.
- GG Vendramin**: giovanni.vendramin@iqv.cnr.it. CNR, Istituto di Genetica Vegetale, Via Madonna Piano, I-50019 Florence, Italia. Tiene una amplia producción en trabajos sobre filogeografía de plantas y distribución de la variación genética basada en ADN cloroplástico. Ha trabajado en una gran diversidad de especies: *Fagus sylvatica*, *Zelkova abelicea*, *Fraxinus excelsior*, *Cupressus sempervirens*, diversas especies de *Quercus* y *Pinus*.
- P Taberlet**: Univ Grenoble 1, CNRS, UMR 5553, Lab Ecol Alpine Genom Populat & Biodivers, F-38041 Grenoble 9, Francia. Aunque sus trabajos sobre filogeografía mayoritariamente han tratado sobre diversos grupos de animales (osos, asno, salamandras, bovidos, etc.), también ha trabajado en plantas (*Rhododendron*, *Carex*, *Saxifraga*) y ha publicado trabajos de síntesis sobre las principales rutas migratorias postglaciales en Europa.
- RA Ennos**: rennos@ed.ac.uk. Univ Edinburgh, Sch Biol Sci, Kings Bldg, Mayfield Rd, Edinburgh EH9 3JT, Midlothian, Scotland. Además de trabajos relacionados con aspectos reproductivos y sobre filogeografía de plantas (*Calluna vulgaris*, *Ilex aquifolium*) ha publicado numerosos trabajos sobre conservación de especies amenazadas.

3. OBJETIVOS DEL PROYECTO

◆ 3.1 Hipótesis de partida

Se trata de averiguar si existen patrones filogeográficos comunes en las especies consideradas y si éstos concuerdan o difieren con los previamente observados para la flora de las zonas boreal y templada europeas.

Existe una profusa bibliografía sobre filogeografía de plantas, que demuestra el interés y viabilidad de este tipo de trabajos. El proyecto que se propone, pretende abordar el estudio de filogeografía comparada de 8 especies de plantas distribuidas alrededor del mar Mediterráneo: *Arbutus unedo*, *Celtis australis*, *Myrtus communis*, *Nerium oleander*, *Pistacia lentiscus*, *Quercus coccifera*, *Rhamnus alaternus* y *Rosmarinus officinalis*.

Todas ellas son especies de interés ecológico por formar parte importante del paisaje mediterráneo, y económico por sus diversos usos. Las especies elegidas pertenecen a otras tantas familias y presentan diferentes características vitales.

Para el trabajo se utilizarán microsatélites cloroplásticos (cpSSR), ya que son de herencia uniparental por vía materna, lo cual es adecuado para los propósitos de la filogeografía, al tiempo que presentan niveles relativamente altos de variabilidad. La recolección de material se realizará en las mismas estaciones de muestreo para el mayor número de especies posible.

Los resultados del proyecto servirán para predecir la organización de la diversidad genética en otras especies con características semejantes, señalar zonas de especial interés para el mantenimiento de la diversidad genética de plantas mediterráneas y proporcionarán una valiosa herramienta para certificar la procedencia geográfica de semillas y ayudarán a regular el comercio de semillas y plantas.

◆ 3.2. Antecedentes y resultados previos

Aunque con excepción de un trabajo que incluye parcialmente el área de distribución de *Quercus coccifera*, no existen datos filogeográficos sobre las plantas que aquí se proponen y son escasos los trabajos de este tipo sobre otras especies mediterráneas. Sin embargo, el gran número de especies y grupos estudiados con objetivos y metodologías semejantes a las que aquí se proponen, avalan el interés y la viabilidad del proyecto.

Igualmente no existen precedentes de estudios de filogeografía comparada de especies mediterráneas, pero sí sobre la flora de otros territorios siendo destacable, por su proximidad, el trabajo de Taberlet *et al.* (1998) en el que realizan un estudio de filogeografía comparada y rutas de recolonización postglacial en Europa, utilizando especies diversas de animales y plantas. Todo ello, avala la validez de la hipótesis que aquí se plantea así como la posibilidad de obtener resultados con la metodología propuesta.

Además, hay que tener en cuenta que los marcadores (cpSSR) que se utilizarán en este proyecto, son bien conocidos y probados; se han utilizado con éxito en un proyecto europeo (FRAXIGEN) en el que ha participado la investigadora principal de este (IMA). Por otra parte, la composición del equipo, íntegramente formado por personas avezadas en el trabajo con plantas (seis de ellos son profesores del Dpto. de Botánica), así como la experiencia de algunos miembros del equipo en el mismo tema y en el uso de otros marcadores moleculares (JP), son firmes garantías de que este proyecto cumplirá los objetivos que se propone.

3.3. Objetivos concretos

1. **Conocer la distribución geográfica de la variabilidad genética** de 8 especies mediterráneas de forma que sea posible predecir la organización de la diversidad genética en otras especies con cloroplastos de transmisión mediante semillas. Para ello, se utilizarán cpSSR universales, cuyas diferencias en tamaños se considerarán alelos distintos. Para comprobar que tamaños iguales de un mismo fragmento implican la misma composición nucleotídica y que fragmentos de diferentes tamaños corresponden a *indels* concordantes, se secuenciarán muestras de cada fragmento.
2. **Comparar los patrones** de distribución de la variabilidad genética en plantas de interés ecológico y económico, representativas de la flora mediterránea, para saber si existen **patrones de dispersión longitudinal o en mosaico** generalizables a otras especies no incluidas en el trabajo.
3. **Establecer las áreas donde se concentra la mayor variabilidad genética** de plantas alrededor del Mediterráneo, las cuales podrán ser consideradas **zonas de especial interés** para el mantenimiento de la diversidad genética de plantas mediterráneas, para lo cual se recolectará material de diversas especies en las mismas localidades, para el estudio molecular.
4. **Disponer de herramientas moleculares** con las que sea posible certificar la procedencia geográfica de semillas en especies de interés ecológico, forestal y económico así como para la regulación del comercio de semillas y plantas.
5. **Obtener datos de aplicación forestal**, en concreto sobre capacidad de germinación de semillas y supervivencia de plantas, que permitan establecer si existen diferencias en estos parámetros entre poblaciones de una misma especie.

4. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

PERSONAL IMPLICADO EN EL PROYECTO

Las tareas que implica el desarrollo del proyecto, serán realizadas por el personal que se indica a continuación:

Miembros del equipo investigador

Dra. Isabel Mateu Andrés (IMA), Investigadora principal. Profesora Titular de Universidad, adscrita al Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia y miembro del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. Junto con **JP**, se responsabilizará de la puesta a punto de los protocolos de extracción de ADN y amplificación de los diversos cebadores en todas las especies a estudiar, así como de supervisar las reacciones de amplificación de cpSSR y el análisis de los diferentes fragmentos generados. Se responsabilizará del análisis de los datos genéticos y la elaboración del libro divulgativo de los resultados.

Dr. Miguel Guara Requena (MG), profesor Titular de Universidad, adscrito al Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia. Junto con **FB**, **MFP** y **AA** se responsabilizará de la recolección de hojas y extracción de ADN. Con **FB**, **MFP** y **AA** participará en la recolección de semillas en las poblaciones más orientales. Se responsabilizará del programa de divulgación de resultados y coordinación con los EPOs.

Dr. Fernando Boisset López (FB), profesor Titular de Universidad, adscrito al Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia. Junto con **MG**, **MFP** y **AA** se responsabilizará de la recolección de hojas y extracción de ADN. Con **MG**, **MFP** y **AA** colaborará en la recolección de semillas en las poblaciones más orientales.

Dr. Antoni Aguilera Palasí (AA), profesor Titular de Universidad, adscrito al Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia y miembro del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. Junto con **MG**, **FB** y **MFP** se responsabilizará de la recolección de hojas y extracción de ADN. Con **MG**, **FB** y **MFP** participará en la recolección de semillas en las poblaciones más orientales.

Dra. Maria Felisa Puche Pinazo (MFP), Profesora Titular de Universidad, adscrita al Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia. Junto con **MG**, **FB** y **AA** se responsabilizará de la recolección de hojas y extracción de ADN. Con **MG**, **FB** y **AA** participará en la recolección de semillas en las poblaciones más orientales.

Colaborador científico:

Dr. Joan Pedrola Monfort (JP), Investigador Invitado en el Dpto. de Botánica (Fac. de Biología) de la Universidad de Valencia. Se responsabilizará de la secuenciación y, en su caso, clonación de fragmentos obtenidos con cada uno de los cebadores en las distintas especies y participará en la optimización de la extracción de ADN y de la amplificación de fragmentos microsatélites.

Miembros del equipo de investigación pertenecientes a organismos distintos del solicitante.

Dr. Rafael Currás Cayón (RC), es Director del CIEF (Consejería de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda, G.V.) y Profesor Asociado, a tiempo parcial, del Dpto. de Botánica, Universidad de Valencia. Junto con **EL** y **AM** se responsabilizará de la recolección de semillas de las poblaciones situadas en las zonas central y occidental del área, así como de las pruebas de germinación y supervivencia de plántulas.

Dr. Emilio Laguna Lumbreras, es Jefe de Sección de Protección de Recursos Naturales (Consejería de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda, G.V.). Junto con **RC** y **AM** se responsabilizará de la recolección de semillas de las poblaciones situadas en las zonas central y occidental del área, así como de las pruebas de germinación y supervivencia de plántulas.

D. Antoni Marzo Pastor, es Director Técnico del Banco de Semillas Forestales (Consejería de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda,, G.V.). Junto con **RC** y **EL** se responsabilizará de la recolección de semillas de las poblaciones situadas en las zonas central y occidental del área, así como de las pruebas de germinación y supervivencia de plántulas.

Personal solicitado: En la solicitud se incluyen gastos para la contratación temporal (30 horas semanales, durante 24 meses) de un técnico de grado medio (CT) cuya misión consistiría en realizar el trabajo experimental necesario para la amplificación de fragmentos con los diferentes cebadores en cada una de las especies a estudiar (bajo la supervisión de IMA) y participará en la secuenciación de los diferentes fragmentos obtenidos (bajo la supervisión de JP).

Tanto la amplificación como la secuenciación de fragmentos son laboriosas dado el elevado número de muestras a procesar. La secuenciación de dichos fragmentos supone, además, un proceso de puesta a punto y, posiblemente, de técnicas complementarias como la clonación en el caso de fragmentos de pequeño tamaño, por lo que consideramos que su desarrollo requiere de personal ya formado y con amplia y demostrada experiencia en técnicas moleculares, por lo que se considera esencial este personal para la consecución de los objetivos del proyecto en los plazos previstos.

Además, se solicita una beca del Programa de Formación de Investigadores asociada al proyecto. En caso de ser concedida, el becario seleccionado colaboraría en la amplificación de fragmentos (cpSSR) y análisis de resultados (bajo la dirección de IMA).

Trabajos previos

4.1. Recolección de material biológico. Dado que el estudio se realizará sobre material silvestre, será necesario realizar la recolección del material previamente al desarrollo de cualquier otra parte del trabajo.

En este apartado hemos de distinguir dos aspectos:

- 1, recolección de material para la amplificación de cpSSR y secuenciación.
- 2, recolección de semillas para realizar pruebas de germinación y supervivencia de plántulas.

Para el primero se recolectarán hojas de 8 individuos, separados al menos 50m, en 40 poblaciones naturales de cada una de las especies incluidas en el proyecto repartidas por su área de distribución. El material que se empleará serán hojas sanas sin signos de senescencia, que se desecarán en silicagel para evitar la degradación del ADN. Una vez en el laboratorio, las hojas se conservarán en congelador a -80°C hasta la extracción del ADN. En cada población se recolectará material del mayor número posible de especies con el fin de conseguir una mayor integración de los resultados.

Para la segunda, se recolectarán semillas de 20 poblaciones de cada especie de entre las muestreadas para la primera etapa. Las poblaciones estarán distribuidas por las diferentes áreas y zonas de procedencia de cada especie. Las semillas se conservarán en las instalaciones del CIEF (Consejería de Territorio y Medio Ambiente, Generalitat Valenciana) siguiendo los protocolos habitualmente utilizados por el personal de dicha institución así como las indicaciones del García-Fayos *et al.* (2001).

Con el fin de tener una mayor capacidad de integración de resultados que afecten a las poblaciones muestreadas, se tratará de recolectar el material de las diferentes especies en las mismas poblaciones, hasta donde esto sea posible, dada la diferente ecología de *Nerium oleander* y parcialmente de *Celtis australis*.

La recolección de material se realizará, fundamentalmente, durante el primer año, sin embargo la extensión del área hace necesario continuarlo en un segundo período. Por otra parte, la recolección de semillas, obligará a hacer recolecciones en otoño. En ambos casos, se cuenta con el apoyo logístico que supone la participación de algunos miembros del equipo en la red INTERREG.

Épocas de floración y fructificación: //// época de floración, //// época de fructificación, //// floración+fructificación

| Meses: | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII |
|----------------------------------|---|--|--|--|--|--|--|--|---|---|---|---|
| <i>Arbutus unedo</i> * | //// | | | | | | | | //// | //// | //// | //// |
| <i>Celtis australis</i> | | | | //// | //// | | | | | | //// | //// |
| <i>Myrtus communis</i> | | | | | //// | //// | //// | //// | | | //// | //// |
| <i>Nerium oleander</i> | | | | | | | //// | //// | | | | |
| <i>Pistacia lentiscus</i> | | //// | //// | //// | //// | | | | | | //// | //// |
| <i>Quercus coccifera</i> | | | //// | //// | //// | | | | | | //// | //// |
| <i>Rhamnus alaternus</i> | | //// | //// | //// | //// | | | | | | //// | //// |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> ** | //// | //// | //// | //// | //// | //// | //// | //// | //// | //// | //// | //// |

* En esta especie coincide la época de floración con la maduración de los frutos producidos el año anterior.

** Florece y, por tanto, fructifica a lo largo de todo el año, especialmente tras épocas de lluvias.

4.2. Optimización del método de aislamiento del ADN.

Para la amplificación con los cebadores microsatélite, se requiere disponer de preparaciones de DNA poco degradado y de calidad, sin contaminantes que pudieran inhibir el proceso de amplificación.

Se seguirán los protocolos utilizados generalmente en otras especies de plantas, basados en precipitaciones fraccionadas con bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB). Si es necesario, se modificarán, por adición de resinas, para la absorción de compuestos fenólicos, a fin de obtener ADN del nivel de pureza requerido.

4.3. Optimización del método de amplificación de fragmentos.

Dada la disparidad entre las especies que se estudiarán, será necesario optimizar los protocolos para la amplificación mediante reacciones de PCR, para cada combinación cebador-especie. Dichas pruebas se realizarán sobre 10 individuos de cada especie, y se probará un amplio rango de temperaturas de anillamiento (entre 38-58°C) y concentraciones de cloruro magnésico (1-4mM), hasta obtener fragmentos de los tamaños esperados.

Objetivo 1

4.1.1. Amplificación y análisis de microsatélites cloroplásticos (cpSSRs)

Para desarrollar esta parte del trabajo (Objetivos 1 y 2) se realizarán pruebas con los 10 cebadores universales descritos por Weising & Gardner (1998). Se utilizarán cebadores marcados con diferentes fluorocromos (HEX, NED, FAM Applied Biosystems) para obtener fragmentos que puedan ser analizados con un secuenciador. Si el rango de tamaños de los fragmentos obtenidos con los diferentes cebadores no solapa, se utilizará la técnica multiplex (amplificación simultánea con diferentes cebadores).

Los fragmentos amplificados serán analizados en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Valencia (SCIE), utilizando el secuenciador ABI Prism 3700. Para la determinación de alelos se utilizará el programa GENESCAN 3.1. Se considerarán como alelos diferentes los fragmentos de distinto tamaño, asumiendo que no hay homoplasia, dado que los individuos que se estudian pertenecen a poblaciones de una misma especie.

Para cada especie, se realizarán pruebas iniciales con una muestra de 50 individuos procedentes de diferentes poblaciones para seleccionar los cebadores que den variabilidad, desechando para aquellos que no la presenten. En caso de que los cebadores propuestos no presenten variabilidad en alguna especie, o los niveles de variabilidad sean bajos, se emplearán otros cebadores de los disponibles en la literatura hasta encontrar un mínimo de 10 haplotipos por especie.

4.1.2. Análisis de los datos genéticos

Si la secuenciación de fragmentos (Objetivo 3) confirma que diferencias en un nucleótido son resultado de un evento mutacional que implica a un solo nucleótido, se construirá la red estadísticamente más parsimoniosa de haplotipos, que nos permitirá conocer las relaciones filogenéticas existentes entre ellos, para lo cual se utilizará el programa TCS (Clement *et al.*, 2000).

Para cada especie, se obtendrán los parámetros de diversidad genética del ADN cloroplástico intrapoblacional y total, basados en el modelo de alelos desordenados (h_S y h_T , respectivamente) y ordenados (v_S y v_T , respectivamente). El modelo de alelos desordenados considera las frecuencias alélicas mientras que en el modelo de alelos ordenados además se toman en cuenta las semejanzas entre haplotipos, es decir, la proporción de fragmentos compartidos (Pons & Petit, 1996). Para obtener la diferenciación entre poblaciones se calculará la proporción de variación entre poblaciones siguiendo ambos modelos (G_{ST} y N_{ST} , respectivamente) mediante el programa PERMUTE (pierreton.inra.fr/genetics/labo/Software) el cual, además de los cálculos de diversidad y diferenciación genética, realiza un test para establecer si hay estructura filogeográfica. En ausencia de estructura filogeográfica $G_{ST}=N_{ST}$.

La existencia de estructura filogeográfica se comprobará, además, por comparación de las estimas de N_{ST} con los valores de N_{ST} obtenidos tras 10.000 permutaciones, utilizando el programa SPAGEDI 1.1 (Hardy & Vekemans, 2002). Si $N_{ST}>N_{ST}$ permutado que hay estructura filogeográfica. Esto significa que, en promedio, haplotipos filogenéticamente similares se encuentran en la misma población con mayor frecuencia que otros aleatoriamente elegidos.

La estructura geográfica de la variación genética, se representará mediante un mapa de frecuencias haplotípicas en cada una de las poblaciones estudiadas, mediante el programa MAPINFO 4.1 (MapInfo Corp., NY).

Para comprobar la existencia de aislamiento por distancia se realizará el test de Mantel comparando la

matriz de distancias genéticas entre pares de poblaciones obtenidas mediante $G_{ST}/1-G_{ST}$, con la matriz del logaritmo natural de las distancias geográficas entre ellas.

Mediante el algoritmo SAMOVA (Dupanloup *et al.*, 2002) se definirán grupos geográficos de poblaciones homogéneas y con máxima diferenciación así como la existencia de barreras genéticas entre grupos de poblaciones.

4.1.3. Secuenciación de fragmentos microsatélite y sus zonas flanqueantes.

Las diferencias en el tamaño de los fragmentos obtenidos mediante la amplificación con cebadores microsatélite se interpretan como alelos diferentes, sin embargo, es posible que estas diferencias en el tamaño de los fragmentos sean debidas al número de repeticiones de la región microsatélite, lo que correspondería a alelos diferentes en sentido estricto, o bien a diferencias en la región flanqueante. Por otra parte, tamaños iguales pueden presentar composiciones diferentes en nucleótidos.

Se secuenciará una muestra de cada producto de diferente tamaño (región microsatélite+ zonas flanqueantes), con cada uno de los cebadores en cada especie, con el fin de saber si los fragmentos de distinto tamaño corresponden o no a diferente número de repeticiones del motivo de repetición. Aunque no es posible saber *a priori* el número de muestras a estudiar puesto que no conocemos el de alelos que encontraremos con cada cebador y especie, se puede estimar que variará entre 2-4 alelos por cebador, Así pues, el número de muestras a estudiar variará entre 20-30 por especie, lo que supone un total de 160-300 muestras.

Para llevar a cabo la secuenciación de fragmentos es necesario disponer de material purificado y los nucleótidos deben estar marcados con un fluorocromo para que sea posible la lectura de la secuencia. La amplificación de fragmentos de ADN se realizará mediante PCR, y constará de dos etapas, en la primera se usaran pares de cebadores y nucleótidos no marcados y los productos de PCR se purificarán mediante kits convencionales (QIAQUICK PCR PURIFICATION de Qiagen). En la segunda etapa, partiendo de los fragmentos obtenidos y purificados en el paso anterior, se realizará una segunda amplificación mediante PCR empleando nucleótidos marcados con fluorocromo (BigDye). Se utilizará el secuenciador ABI Prism 3700 del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Valencia (SCIE). La lectura e interpretación de la secuencia de nucleótidos se realizará mediante el programa SeqEdit. Para la alineación automática de secuencias, y su comprobación manual, se realizará con el algoritmo CLUSTAL X del programa BioEdit.

En caso de que no sea posible la secuenciación de algún fragmento microsatélite debido a su pequeño tamaño, se procederá a la clonación de este fragmento en un vector de tipo TA como el pGEM-T (Promega) y su posterior secuenciación con cebadores propios del vector (T7 promotor y SP6).

Objetivo 2

Conocidos los datos sobre niveles de variabilidad genética y su estructura dentro y entre poblaciones repartidas por toda el área de estudio y, en el caso de especies de distribución más amplia, de la especie en general, de cada especie individual, estaremos en condiciones de realizar comparaciones entre ellas para tratar de establecer patrones filogeográficos comunes a plantas que, con diferentes características biológicas, comparten su carácter autóctono y distribución circunmediterránea.

El desarrollo de este objetivo no requiere trabajo adicional por cuanto resulta del análisis de los resultados obtenidos en el Objetivo 1.

Objetivo 3

Para una mejor integración de los resultados obtenidos en las diferentes especies, que nos permita detectar la posible existencia de áreas en las que se concentra la diversidad genética, así como haplotipos singulares, se recolectará de material del mayor número posible de las especies incluidas en el proyecto, tanto para el estudio molecular (Objetivo 1) como de la capacidad de germinación de semillas y supervivencia de plantas (objetivo 5).

El desarrollo de este objetivo no requiere trabajo adicional por cuanto resulta del análisis de los resultados obtenidos en el Objetivo 1.

Objetivo 4

El análisis de los resultados del Objetivo 1, permitirá establecer si existen diferencias en la distribución de haplotipos en el área de estudio. En el previsible caso de que existan tales diferencias, será posible establecer la procedencia geográfica de semillas que, además, serán aplicables al establecimiento de normas que regulen el comercio de semillas y plantas.

El desarrollo de este objetivo no requiere trabajo adicional por cuanto resulta del análisis de los resultados obtenidos en el Objetivo 1.

Objetivo 5

4.5.1. Pruebas de viabilidad de semillas: Dado que los requerimientos de germinación y la dormición de semillas pueden variar entre poblaciones de una especie (Gibson, 2002), las pruebas de germinación y supervivencia de plantas se realizarán sobre semillas recolectadas en 20 de las poblaciones muestreadas para el estudio molecular en cada especie.

En los ensayos de germinación, se seguirá la metodología propuesta por la Internacional Seed Testing Association (Internacional rules for seed testing, 2006). Cada ensayo se realizará sobre 400 semillas tomadas al azar, distribuidas en cuatro repeticiones de 100 semillas en palca Petri con papel de filtro humedecido. Previamente al ensayo las placas Petri y el papel serán autoclavados.

Los ensayos se realizarán en incubadoras o cámaras de germinación, en las condiciones de luz y temperatura más adecuadas para cada especie. Si fuese necesario, las semillas serán sometidas a tratamiento con ácidos o escarificación mecánica de la cubierta, estratificación o aislamiento de embriones, con el fin de superar la dormición y favorecer una germinación rápida. Las semillas se considerarán germinadas cuando la raíz alcance el tamaño de la semilla. Diariamente se hará el recuento de semillas germinadas hasta que se considere acabada la prueba. Se considerará como resultado de la germinación la media de las cuatro repeticiones. Los ensayos son tolerables siempre que la desviación entre los valores extremos no los límites de tolerancia de ISTA.

Para establecer si existen o no diferencias en la capacidad germinativa de las semillas atribuibles a su distinto origen, así como entre años dentro de cada población, se realizarán sendos análisis de la varianza.

4.5.2. Supervivencia de plántulas. Como continuación natural al estudio sobre la capacidad de germinación de semillas, se estudiará la supervivencia de plántulas.

Para ello, se obtendrán plántulas mediante siembra de semillas en contenedores. Se sembrarán 5 semillas en cada contenedor de las que, se dejará solo una después de germinadas. Las plántulas permanecerán en los contenedores hasta pasado el primer periodo de crecimiento, en cuyo momento 30 de ellas, elegidas al azar, serán trasplantadas al exterior, en parcelas del CIEF, dentro de sus respectivos contenedores, situando las plantas a distancias iguales de 30cm. Durante la experiencia, no se aplicarán fertilizantes y las plantas se regarán de forma homogénea con una cantidad de agua semejante a la media de precipitaciones anuales en poblaciones naturales.

La supervivencia de plántulas se evaluará mediante recuento directo de individuos supervivientes, con periodicidad bisemanal.

El análisis de la varianza aplicado a los resultados obtenidos para cada parámetro permitirá establecer si existen o no diferencias atribuibles al distinto origen de las semillas.

4.1 MODELO DE CRONOGRAMA (ORIENTATIVO)

| Actividades/Tareas | Centro Ejecutor | Persona responsable y otras involucradas | Primer año (*) | Segundo año (*) | Tercer año (*) |
|--|-----------------|--|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Trabajos previos: Recolección de material biológico. | UVEG GV | MG, FB, MFP, AA, RC, EL, AM | x x x x x x x x x x | x x | |
| Optimización del método de aislamiento del DNA. | UVEG | IMA, JP | x x | | |
| Optimización de la amplificación de fragmentos para cada par especie-cebador. | UVEG | IMA, JP | x x x x x | | |
| Objetivo 1. Extracción de ADN | UVEG | MG, MFP, FB, AA | x x x x | x x x x | |
| Amplificación y análisis de fragmentos microsátélites. | UVEG | IMA, CT, becario | x x | x x x x x x x x x x x x x x | x x x |
| Secuenciación de fragmentos y análisis de secuencias. | UVEG | JP, CT | | | |
| Objetivo 5. Pruebas de germinación de semillas | GV | RC, EL, AM | | x x x | x x x |
| Estudio de supervivencia de plantas. | GV | RC, EL, AM | | x x x x x x x x x | x x x x x x x x x x x x x x |
| Elaboración de informes y redacción de trabajos | UVEG, GV | IMA, JP, MG, FB MFP AA, RC, EL, AM | x x x | x x x | x x x |
| Elaboración y mantenimiento de la página Web | UVEG | MG | x x x | x x | x x |
| Redacción libro divulgativo | UVEG, GV | IMA, JP, MG, FB MFP AA, RC, EL, AM | | | x x x |
| El desarrollo de los objetivos 2, 3 y 4 no figuran en el cronograma porque, como se explica en el apartado de Metodología, no requieren trabajo adicional. | | | | | |

(*) Colocar una X en el número de casillas (meses) que corresponda

5. BENEFICIOS DEL PROYECTO, DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN EN SU CASO DE LOS RESULTADOS

Contribuciones científico técnicas:

Del desarrollo del presente proyecto, se espera obtener abundantes datos sobre los objetivos antes descritos que serán presentados en aquellos congresos y reuniones científicas que se desarrollen sobre temas afines, y se materializarán en publicaciones en revistas internacionales de prestigio de las áreas de genética, botánica, cultivos forestales, etc., que, previsiblemente, abordarán los siguientes aspectos concretos:

- 1 – Estudio de la variabilidad genética del ADN cloroplástico y estructura filogeográfica, de cada una de las especies estudiadas.
- 2 – Estudio comparado de las diferentes especies para tratar de establecer patrones comunes así como la existencia de áreas de especial interés para la conservación de flora mediterránea.
- 3- Capacidad germinativa de semillas de distintas procedencias geográficas y supervivencia de plántulas de las diferentes especies.

Se espera que los resultados obtenidos del desarrollo de este proyecto contribuyan a la definición de zonas y áreas de procedencia de semillas de uso forestal, semejantes a las establecidas para especies arbóreas, lo cual constituye una tarea de primordial importancia pero aún pendiente en plantas de matorral.

Igualmente se espera que los resultados del proyecto serán de aplicación directa para los entes públicos y privados interesados, por diversos motivos, en la certificación de procedencia de plantas tanto para su uso ornamental como para la restauración de ecosistemas. Los estudios sobre filogeografía, capacidad de germinación de semillas y supervivencia y crecimiento de plantas de especies importantes del matorral mediterráneo proporcionarán datos importantes para la producción y comercialización de estas plantas, así como para su adecuado uso en restauración. Prueba de dicho interés es el apoyo recibido por diferentes EPOs.

Adecuación del proyecto a las prioridades de la convocatoria y, en su caso, del Programa Nacional correspondiente:

El proyecto se adecua a las prioridades de la presente convocatoria, por cuanto la **Filogeografía** es parte de la **Biogeografía** y, por tanto, se ajusta perfectamente al apartado 1.1 del Programa Nacional de Biodiversidad, Ciencias de la Tierra y Cambio Global.

Plan de difusión de los resultados:

Los resultados serán difundidos a la comunidad **científica** mediante **publicaciones**, y a los **EPOs** mediante **reuniones**. Se prevé realizar tres reuniones con los EPOs, de un día de duración. La primera se celebrará dentro del primer semestre del proyecto y en ella se expondrán nuestros planteamientos y metodología, al tiempo que se atenderán los comentarios, sugerencias y demandas que, partiendo de personas y grupos con larga experiencia práctica en el manejo de semillas y cultivo de plantas de las especies incluidas en este trabajo, nos aportará información esencial para el buen desarrollo del trabajo. La segunda se celebrará a mediados del segundo año y tendrá por finalidad exponer los resultados que se vayan obteniendo así como los problemas con los que nos vayamos encontrando a fin de recabar opiniones que nos ayuden a resolverlos. La tercera reunión se prevé para el inicio del último semestre de duración del proyecto y en ella se expondrán los resultados globales del proyecto.

Además, se elaborará una página **Web**, que se actualizará semestralmente, y en la que cualquier interesado podrá consultar los planteamientos, metodología del proyecto y resultados que se vayan obteniendo.

Como culminación del proyecto se elaborará un pequeño **libro** en el que, en tono **divulgativo**, se expliquen los objetivos, metodología seguida y resultados obtenidos en el proyecto, haciendo especial hincapié en aquellos aspectos de más directa aplicación por parte de usuarios finales.

6. HISTORIAL DEL EQUIPO SOLICITANTE EN EL TEMA PROPUESTO

Como se ha indicado en el apartado 4, el equipo de investigación está compuesto por:

Dra. Isabel Mateu Andrés (IMA), Investigadora principal. Profesora Titular de Universidad, adscrita al Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia y miembro del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva.

Dr. Miguel Guara Requena (MG), profesor Titular de Universidad, adscrito al Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia.

Dr. Fernando Boisset López (FB), profesor Titular de Universidad, adscrito al Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia.

Dr. Antoni Aguilera Palasí (AA), profesor Titular de Universidad, adscrito al Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia y miembro del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva.

Dra. Maria Felisa Puche Pinazo (MFP), Profesora Titular de Universidad, adscrita al Dpto. de Botánica de la Universidad de Valencia.

Dr. Joan Pedrola Monfort (JP), Colaborador Científico de la Universidad de Valencia, desarrolla su investigación en el laboratorio de IMA.

Dr. Rafael Currás Cayón (RC), es Director del Centro para la Investigación y Experimentación Forestal de la Comunidad Valenciana (CIEF) de la Consejería de Medio Ambiente, Agua, Territorio y Vivienda (G.V.).

Dr. Emilio Laguna Lumbreras (EL), es Jefe de Sección de Protección de Recursos Naturales (Consejería de Medio Ambiente, Agua, Territorio y Vivienda, G.V.).

D. Antoni Marzo Pastor, es Director Técnico del Banco de Semillas Consejería de Medio Ambiente, Agua, Territorio y Vivienda, G.V.).

Estos investigadores forman un equipo multidisciplinar en el que a dos personas de Consejería de Medio Ambiente, Agua, Territorio y Vivienda (RC y EL), se unen cinco pertenecientes al mismo Departamento (IMA, MG, AA, FB y MFP) además de RC también profesor del mismo, lo cual facilita su coordinación de forma importante. La participación de JP, quien mantiene una actividad profesional privada totalmente compatible con una colaboración intensiva con la investigación que desarrolla IMA, fortalece el equipo de investigación especialmente en lo relativo al trabajo molecular, además de tener una amplia experiencia en el trabajo de campo.

El equipo de investigación integra personal científico con los conocimientos técnicos necesarios para cubrir los diferentes objetivos del proyecto que se propone y cuya experiencia garantiza la obtención de resultados. En el equipo se reúne personal con experiencia en la utilización de diversos marcadores moleculares aplicados a los objetivos de conservación de plantas amenazadas y de caracterización de especies (IMA) y filogenia (JP) y en temas forestales (MG) amplio conocimiento en el reconocimiento de la flora y vegetación ibéricas (AA, FB, MFP, MG). Consideramos que la incorporación de especialistas en flora no vascular, no resta eficacia al conjunto por cuanto las tareas que de que se responsabilizarán (recolección de material y extracción de ADN) no presentan dificultades. Por el contrario, consideramos que este proyecto es una ocasión para que un amplio grupo de investigadores se introduzcan en el trabajo molecular ampliando la posibilidad de investigaciones futuras de índole filogeográfica en otros grupos de plantas.

Por otra parte, los miembros del equipo han colaborado hace tiempo en diferentes proyectos y trabajos de investigación (*ver CVs adjuntos*). Por lo que, aunque se constituyen en este proyecto como equipo de investigación, vienen compartiendo su actividad profesional desde hace años, lo que garantiza la estabilidad del equipo.

IMA tiene una dilatada experiencia en la utilización de diversos marcadores moleculares aplicados a conservación de plantas amenazadas y sistemática. Participa en el proyecto BFI2002-00664 teniendo bajo su responsabilidad la

aplicación de microsatélites a la caracterización de variedades de arroz. Es investigadora principal de un proyecto europeo coordinado en el que se aplican microsatélites nucleares al estudio de la diversidad genética y su estructura de especies europeas de fresno (*Fraxinus ornus*, *F. excelsior* y *F. angustifolia*), así como a de microsatélites cloroplásticos para establecer la filogeografía de dichas especies. Fruto de este proyecto, recientemente acabado (30 Junio 2005), es el libro *Ash species in Europe* de la que es coautora y en el que ha participado en la redacción de los apartados anteriormente explicados en *F. ornus* y *F. angustifolia*.

MG, ha participado en más de una decena de proyectos de investigación (convenios y contratos) financiados con fondos públicos (Generalitat Valenciana y Ministerio de Educación y Ciencia: CICYT) referidos a los efectos de los incendios forestales y tratamientos selvícolas la taxonomía y ecología de algunas especies vasculares, así como en tratamiento taxonómico y corológico de diversas plantas y tiene amplia experiencia en el tratamiento estadístico y multivariante de datos.

AA, es director del Jardín Botánico de la Universidad de Valencia y especialista en flora y vegetación ibéricas. Ha participado en diversos proyectos financiados por diversas entidades y organismos públicos, sobre evaluación de flora y recursos filogenéticos y actualmente participa en un proyecto europeo de acrónimo ENSCONET, para la conservación de semillas nativas de Europa.

FB, es especialista en flora marina mediterránea y ha participado en diversos proyectos financiados con fondos públicos (Generalitat Valenciana y CICYT), entre los que cabe destacar el proyecto Flora Phycologica Ibérica, cuyo objetivo final pretende actualizar progresivamente la información sobre la biodiversidad algal de las costas ibéricas. Aunque su actividad investigadora se desarrolla en el ámbito de la flora marina, su labor docente en el Dpto. de Botánica le proporciona un buen conocimiento de la flora vascular sobre la que, por otra parte, versó su Tesis de Licenciatura.

MFP, es especialista en flora briofítica ibérica. Ha participado en diversos proyectos de investigación financiados por diversos organismos públicos, entre los que cabe destacar el proyecto Flora Briofítica Ibérica, que viene desarrollándose desde hace nueve años.

JP ha sido director del Jardín Botánico Marimurtra (Blanes, Gerona) y tiene un extenso currículum en la aplicación de diversos marcadores moleculares (aloenzimas, RAPDs, microsatélites) en estudios de biología evolutiva y filogenia de plantas. Entre las técnicas que maneja están las de secuenciación y tiene experiencia en la aplicación de métodos de inferencia Bayesiana a la filogenia y filogeografía de plantas.

RC es Director del CIEF y profesor asociado en el Departamento de Botánica de la Facultad de Biología. Ha sido Jefe del Servicio Territorial del ICONA en la Comunidad Valenciana y Jefe de la Sección Forestal de Valencia. Cuenta con una amplia experiencia en la planificación, redacción y ejecución de proyectos y obras de restauración hidrológico-forestal, de repoblación forestal, tratamientos selvícolas, lucha contra incendios, restauración de áreas degradadas e incendiadas y de actuaciones de Sanidad Forestal.

EL es Jefe de Sección de Protección de Recursos Naturales de la Generalitat Valenciana, siendo encargado de relaciones externas en proyectos internacionales y redes multiregionales o plurinacionales de los programas de conservación de flora o habitats. Posee el Premio Europeo de Conservación de Flora 'Silver Leaf Award Planta Europa' y es miembro experto del Comité de Supervivencia de Especies de la UICN.

AM es Director técnico del Banco de Semillas Forestales (CIEF) de la Generalitat Valenciana, es responsable del procesado de frutos, ensayos de viabilidad de semillas y cultivo de plántulas en condiciones controladas. Es coordinador el proyecto europeo P.I.C. IIB Medoc y mantiene estrecho contacto con otros centros del mediterráneo dedicados a la conservación de recursos genéticos de flora (red INTERREG, Red de centros de conservación de material genético de la flora mediterránea).

6.1 FINANCIACIÓN PÚBLICA Y PRIVADA (PROYECTOS Y CONTRATOS DE I+D) DE LOS MIEMBROS DEL EQUIPO INVESTIGADOR

Debe indicarse únicamente lo financiado en los últimos cinco años (2000-2004), ya sea de ámbito autonómico, nacional o internacional.

Deben incluirse las solicitudes pendientes de resolución.

| Título del proyecto o contrato | Relación con la solicitud que ahora se presenta (1) | Investigador Principal | Subvención concedida o solicitada | Entidad financiadora y referencia del proyecto | Periodo de vigencia o fecha de la solicitud (2) |
|---|---|--|-----------------------------------|--|---|
| | | | EURO | | |
| Marcadores fisiológicos y moleculares de tolerancia a factores abióticos generados por déficit hídrico en líneas celulares y plantas de arroz. | 2 | Dra. M.J. Cornejo | 8.950.000pts | Ministerio de Ciencia y Tecnología PB 98-1428 | 01/ 2000-12/2002 C |
| <i>FRAXIGEN. Ash for the future.</i> | 1 | Dra. Janet Stewart/ Dra. I. Mateu (proy. coordinado) | 135.960 | Comunidad Económica Europea EVK2-CT-2001-00108 | 11/2001-06/2005 C |
| Respuestas al stress salino y osmótico en el arroz (<i>Oryza sativa</i> L.): marcadores de tolerancia cruzada y específica. | 3 | Dra. M.J. Cornejo | 116.150 | Ministerio de Ciencia y Tecnología BF I 2002-00664 | 01/2003-12/2005 C |
| Estudio de la biodiversidad de las poblaciones de <i>Rosmarinus</i> en la Comunidad Valenciana. | 1 | Dra. P. Soriano | 15.025 | Consejería de Cultura, Educación y ciencia, GV GV00-060-3 | 1-1-2001 / 31-12-2002 C |
| Caracterización molecular de especies y cultivares de interés económico del género <i>Lavandula</i> L. | 1 | Dra. I. Mateu | 12.000 | Universitat de València | 1-1-2006/ 31-12-2006 S |
| Control de la procesionaria del pino: estudio del complejo parasitario en la Comarca de Los Serranos (Valencia). | 3 | Dr. J. Selfa | 10.818 | Consejería de Cultura, Educación y Ciencia GV99-129-1-3 | 1-1-2000/ 30-12-2001 C |
| Estudio del complejo parasitario asociado a la "oruga de zurrón" <i>Euproctis chrysorrhoea</i> (Lepidoptera, Lymantriidae) en frondosas autóctonas. | 3 | Dr. J. Selfa | 42.435 | Ministerio de Ciencia y Tecnología BOS2002-03820 | 1-11-2000/ 30-10-2005 C |

| | | | | | |
|---|---|-----------------------------|-------------------------------------|---|---|
| Determinación de macrófitos vegetales en el estudio de la implantación de una red de vigilancia de la calidad de las aguas mediante índices bióticos en el ámbito de la Confederación Hidrográfica del Júcar. | 2 | Dr. A. Aguilera | 9.616 | UTE Unima Control | 2000-2001 C |
| Catálogo de las algas marinas macroscópicas de la Comunidad Valenciana. | 3 | Dr. F. Boisset | 12.500 | Consejería de Medio Ambiente, GV 20020348 | 31-5-2002/ 31-12-2002 C |
| Flora Phycologica Ibérica. Bonnemaissoniales, Gracilariales, Palmariales y Rhodymeniales. | 3 | Dra. C. Rodríguez | 13.216,35 | Ministerio de Ciencia y Tecnología REN2001-1473-C03-02 | 28-12-2001/ 28-12-2004 C |
| "Flora Briofítica Ibérica" (2ª fase) | 1 | Rosa Mª Cros Matas | 10.357 | Ministerio de Ciencia y Tecnología BOS2000-0296-C03-03 | 2001-2003 C |
| "Flora Briofítica Ibérica" | 1 | Rosa Mª Cros Matas | 40.000 | Ministerio de Ciencia y Tecnología REN 2003-03131 | 2004-2006 C |
| "Flora Briofítica del Macizo del Caroche y su entorno". | 1 | Felisa Puche | 16.279,66 | Conselleria de Medi Ambient G.V. 99/03/070 | Septiembre 1999 a Septiembre 2001 C |
| "Informatització i actualització de la Col.lecció de Briòfits de l'Herbari VAL". | 2 | Felisa Puche | 11.900 | Conselleria de Territori i Habitatge (G.V.) 40/BD/05 | Marzo 2005- Octubre 2005 C |
| "Flora briofítica Ibérica: Funariales (pro parte), Tatrachidales, Buxbaumiales, Diphysciales, Splachnales, Ditrichales". | 1 | Montserrat Brugués Doménech | 75.000 | Ministerio de Educación y Ciencia | Enero 2006 S |
| Tipificación, cartografía y evaluación de los pastos españoles. | 2 | Dr. Alfonso Sanmiguel Ayanz | 43.519,60 (Comunidad Valenciana) | INIA y todas las CCAA excepto Catalunya OT00-037-C17 | Enero 2001/ Diciembre 2003 C |

| | | | | | |
|--|---|-----------------|-----------|---|------------------------------|
| Biología Evolutiva de las especies de <i>Androcymbium</i> de Sud África Occidental (aloenzimas y RFLPs). | 2 | Joan Pedrola | 60.000 | Fundación Karl Faust | 1-1-1998/ 31-12-2001 C |
| Filogenia y genética de poblaciones de las especies de Sud África Oriental del género <i>Androcymbium</i> (RAPDs y Secuenciación cpDNA, mDNA y nDNA). | 2 | Joan Pedrola | 80.000 | Fundación Karl Faust | 1-1-2001/ 31-12-2003 C |
| Filogenia y Filogeografía de los géneros <i>Lithodora</i> y <i>Merendera</i> en el Mediterraneo (cpSTR y Secuenciación). | 1 | Joan Pedrola | 50.000 | Fundación Karl Faust | 1-1-2002/ 31-12-2005 C |
| Diagnóstico Fitoecológico y Faunístico de las riberas del río Júcar en el tramo comprendido entre Carcaixent y la autopista A-7, y entre la Gola de l'Estany y Cullera. | 2 | A. Aguilera | 41.891,11 | CEOP - Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX) | 2002 C |
| Desarrollo de actividades del banco de germoplasma de flora silvestre del Jardín Botánico. | 1 | A. Aguilera | 21.500 | Conselleria de Medi Ambient de la Generalitat Valenciana. | 2002 C |
| Recolección y procesado de semillas del banco de germoplasma de flora amenazada de la Comunidad Valenciana (Proyecto LIFE Conservación de Hábitats prioritarios). | 1 | Antoni Aguilera | 10.360,34 | - Conselleria de Medi Ambient de la Generalitat Valenciana | 2003 C |
| Elaboración y asesoramiento científico de la exposición del proyecto LIFE conservación de hábitats prioritarios de la Comunidad Valenciana. | 2 | Antoni Aguilera | 10.344 | Conselleria de Medi Ambient de la Generalitat Valenciana | 2003 C |
| Evaluación del estado ecológico de los ríos de la cuenca hidrográfica del Júcar mediante el uso del índice QBR. | 2 | Antoni Aguilera | 48.000 | EPTISA, SERVICIOS DE INGENIERIA, S. A. | 2004 C |
| Divulgación y conservación de la biodiversidad: ajardinamiento temático y restauración paisajística de las áreas de la autopista entre l'Hospitalet de Llobregat y Alicante.: Anteproyecto y solicitud de fondos LIFE. | 1 | Antoni Aguilera | 15.600 | AUMAR Autopista del Mare Nostrum | 2004-05 C |

| | | | | | |
|---|---|--------------|---------|------------------------------------|----------------|
| CREATION D'UN RESEAU DE CENTRES DE CONSERVATION DU MATERIEL GENETIQUE DE LA FLORE DES REGIONS MEDITERRANEENNES DE L'ESPACE MEDOCC.(GENMEDOC). P.I.C. INTERREG III B - MÉDITERRANÉE OCCIDENTALE | 1 | Antoni Marzo | 65.785 | CEEU - Comunidad Económica Europea | 2004-06 C |
| ENSCONET - The European Native Seed Conservation Network VI PROGRAMMA MARCO, SUPORT FOR RESEARCH INFRASTRUCTURES, INTEGRATING ACTIVITIES, CO-ORDINATION ACTION, EU, IIA-CA-506109/03 19 Entidades participantes (COORD. ROYAL BOTANIC GARDENS KEW, MSBP). | 1 | Roger Smith | 364.607 | CEEU - Comunidad Económica Europea | 2004-2009 C |

(1)

- 0 = Es el mismo proyecto
- 1 = está muy relacionado
- 2 = está algo relacionado
- 3 = sin relación

(2) C=concesión, S=solicitud.

