

# A holistic approach to the conservation of the coastal Azorean endemic taxa *Lotus azoricus* and *Azorina vidalii*: Reproductive biology, population genetics and ecology.

Tese de Doutoramento

Rúben Miguel Correia Rego

Doutoramento em  
**BIOLOGIA**



# **A holistic approach to the conservation of the coastal Azorean endemic taxa *Lotus azoricus* and *Azorina vidalii*: Reproductive biology, population genetics and ecology**

Tese de Doutoramento

Rúben Miguel Correia Rego

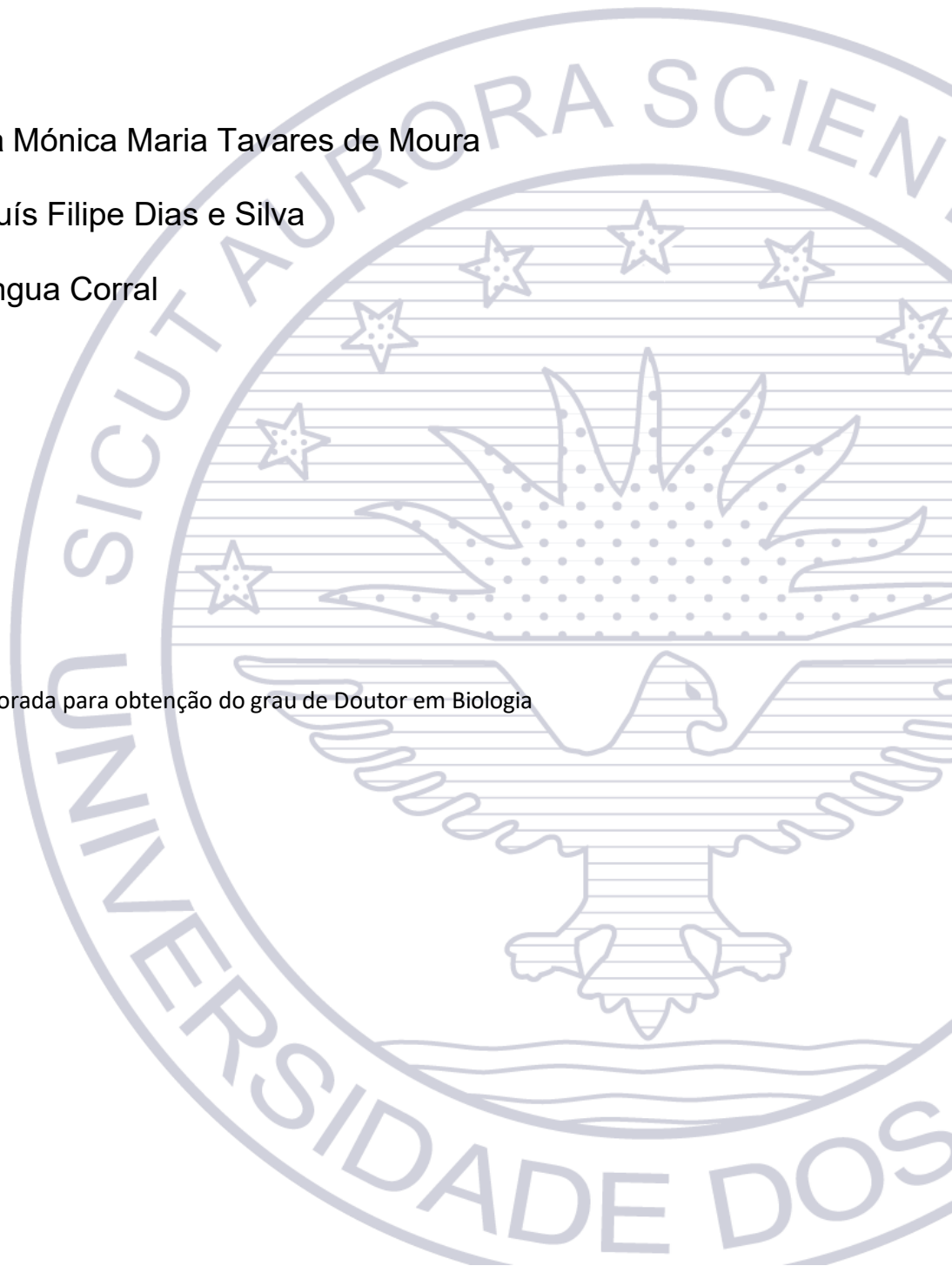
## **Orientadores**

Professora Doutora Mónica Maria Tavares de Moura

Professor Doutor Luís Filipe Dias e Silva

Doutora Maria Olangua Corral

Tese especialmente elaborada para obtenção do grau de Doutor em Biologia



This study was financially supported by a PhD studentship grant (PRO-SCIENTIA/FRCT/2021/M3.1.a/F/014/2021) from Fundo Regional para a Ciência e Tencologia (FRCT), Governo dos Açores.



**UAc**  
UNIVERSIDADE  
DOS AÇORES



**FCT**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DOS AÇORES



**3º CICLO EM BIOLOGIA**



**BIOPOLIS**



**cibio**

*Dedicado com amor, à minha esposa e filho,  
aos meus pais e meu irmão.*

## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	ix
<b>Resumo</b> .....	xii
<b>Abstract</b> .....	xiv
<b>List of Figures</b> .....	1
<b>List of Tables</b> .....	5
<b>List of Appendices</b> .....	7
<b>List of Abbreviations</b> .....	12
<b>List of Publications</b> .....	15
<b>Chapter 1 - General Introduction</b> .....	16
1. <b>Chapter outline</b> .....	16
2. <b>The holistic approach and its importance for the conservation of rare endangered species</b> .....	17
2.1. <b>Reproductive biology</b> .....	18
2.1.1. <b>Phenology</b> .....	19
2.1.2. <b>Breeding systems</b> .....	22
2.1.3. <b>Floral morphology</b> .....	28
2.2. <b>Population genetics</b> .....	29
2.2.1. <b>Population genetics studies with Azorean endemic plants</b> ..	30
2.2.2. <b>Data analysis in population genetics</b> .....	32
2.3. <b>Ecology</b> .....	33
3. <b>The Azores archipelago</b> .....	35
3.1. <b>Natural vegetation of the Azores</b> .....	37
3.2. <b>Azorean coastal plant communities</b> .....	37
3.3. <b>Target taxa</b> .....	39
3.3.1. <b>Azorina vidalii</b> .....	39
3.3.2. <b>Lotus azoricus</b> .....	41
4. <b>Thesis scope and outline</b> .....	43
4.1. <b>Research objectives and questions</b> .....	43
4.2. <b>Thesis outline</b> .....	45
<b>References</b> .....	47

<b>Chapter 2 - Anthropogenic disturbance has altered the habitat of two Azorean endemic coastal plants</b> .....	72
<b>Abstract</b> .....	74
<b>1. Introduction</b> .....	75
<b>2. Methods</b> .....	78
<b>2.1. Study site</b> .....	78
<b>2.2. Target species</b> .....	79
<b>2.3. Distribution of sampling stations</b> .....	80
<b>2.4. Plant community sampling</b> .....	81
<b>2.5. Colonisation status</b> .....	82
<b>2.6. Life-forms</b> .....	82
<b>2.7. Habitat ecology</b> .....	83
<b>2.8. Environmental descriptors evaluated in situ</b> .....	83
<b>2.8.1. Substrate</b> .....	83
<b>2.8.2. Soil parameters</b> .....	83
<b>2.8.3. Identified threats</b> .....	84
<b>2.9. Climatic data</b> .....	84
<b>2.10. Statistical treatment</b> .....	85
<b>2.10.1. Plant Diversity</b> .....	85
<b>2.10.2. Quantitative variables</b> .....	85
<b>2.10.3. Categorical variables</b> .....	85
<b>2.10.4. Statistical applications and output</b> .....	85
<b>2.10.5. Species frequency, cover, and importance</b> .....	86
<b>2.10.6. Clustering and ordination</b> .....	86
<b>2.10.7. Indicator species analysis</b> .....	87
<b>2.10.8. Binary logistic regression</b> .....	87
<b>2.11. Populations included in Natura 2000 or Island Natural Parks</b> .....	88
<b>2.12. IUCN Red List Assessment of the target species</b> .....	88
<b>3. Results</b> .....	89
<b>3.1. Plant community sampling</b> .....	89
<b>3.2. Colonisation status</b> .....	89

<b>3.3. Life-forms</b> .....	90
<b>3.4. Habitat ecology</b> .....	90
<b>3.5. Plant community clustering</b> .....	91
<b>3.6. Plant diversity</b> .....	91
<b>3.7. Indicator species</b> .....	93
<b>3.8. Environmental variables</b> .....	94
<b>3.8.1. Elevation and exposed soil</b> .....	94
<b>3.8.2. Type of substrate</b> .....	96
<b>3.8.3. Soil parameters</b> .....	97
<b>3.8.4. Climate</b> .....	97
<b>3.9. Binary logistic regression</b> .....	98
<b>3.10. Threats</b> .....	99
<b>3.11. Intersection with protected areas</b> .....	101
<b>3.12. IUCN evaluation</b> .....	101
<b>4. Discussion</b> .....	102
<b>4.1. Sampling constraints</b> .....	102
<b>4.2. Recent changes in the coastal flora</b> .....	105
<b>4.3. Life forms and ecological adaptations</b> .....	106
<b>4.3.1. Azorina vidalii</b> .....	107
<b>4.3.2. Lotus azoricus</b> .....	108
<b>4.4. Environmental descriptors</b> .....	108
<b>4.5. Threats</b> .....	109
<b>4.6. Conservation status and prospects</b> .....	111
<b>5. Conclusions</b> .....	113
<b>Acknowledgements</b> .....	114
<b>References</b> .....	115
<b>Supplementary Materials – Chapter 2</b> .....	127
<b>Chapter 3 - Integrating in situ strategies and molecular genetics for the conservation of the endangered Azorean endemic plant Lotus azoricus</b>	162
<b>Abstract</b> .....	164
<b>1. Introduction</b> .....	165

<b>2. Methods</b> .....	169
<b>2.1. Study area and sampling</b> .....	169
<b>2.2. In situ interventions within Project LIFE VIDALIA</b> .....	171
<b>2.2.1. Seed germination and reinforcement actions</b> .....	171
<b>2.2.2. Control of exotic flora and fauna</b> .....	172
<b>2.3. Genetic analysis</b> .....	173
<b>2.3.1. DNA extraction for PCR amplification</b> .....	173
<b>2.3.2. Preliminary screening and optimization of PCR conditions</b> ...	173
<b>2.3.3. Final-band scoring and matrix construction</b> .....	174
<b>2.3.4. Genetic structure analysis</b> .....	174
<b>2.3.5. Genetic diversity analysis and impact of population augmentation measures</b> .....	176
<b>3. Results</b> .....	176
<b>3.1. Impact of Project LIFE VIDALIA</b> .....	176
<b>3.2. Genetic structure</b> .....	179
<b>3.3. Genetic diversity</b> .....	183
<b>4. Discussion</b> .....	185
<b>4.1. In situ approach</b> .....	185
<b>4.2. Molecular genetics approach</b> .....	187
<b>4.2.1. Transferability of LTR markers</b> .....	187
<b>4.2.2. Colonisation routes and population structure</b> .....	187
<b>4.2.3. Genetic diversity</b> .....	191
<b>4.2.4. Overall conservation aspects</b> .....	193
<b>Acknowledgements</b> .....	195
<b>References</b> .....	195
<b>Supplementary Materials – Chapter 3</b> .....	206
<b>Chapter 4 - Floral Biology, Breeding System and Conservation Implications for the Azorean Endemic <i>Azorina vidalii</i> (Campanulaceae)</b>	213
<b>Abstract</b> .....	215
<b>1. Introduction</b> .....	216
<b>2. Materials and Methods</b> .....	219

2.1. Study Area.....	219
2.2. Seasonal Phenology Characterisation in the Field.....	220
2.3. Flower Phenology Analysis in a Garden Experiment .....	221
2.4. Floral Morphometrics.....	222
2.5. Pollen Grains and Stigma Observations .....	223
2.6. Characterisation of the Breeding System and Evaluation of the Reproductive Success.....	224
2.6.1. Pollen/Ovule Ratio Determination .....	224
2.6.2. Controlled Manual-Pollination Experiments in a Natural Population .....	224
2.6.3. Seed Viability and Germination .....	226
2.7. Data Analysis .....	226
3. Results.....	228
3.1. Floral Biology and Pollination Syndromes.....	228
3.1.1. Seasonal Phenology.....	228
3.1.2. Floral Phenology.....	229
3.1.3. Lizard Foraging in the Flowers of <i>Azorina vidalii</i> .....	232
3.2. Flower Morphology Analysis.....	233
3.2.1. Floral Morphometrics and Detection of Geographic Differentiation.....	235
3.3. Breeding System and Reproductive Success Evaluation in <i>Azorina     vidalii</i> .....	237
3.3.1. Determinations of the Ratio Pollen/Ovule.....	237
3.3.2. Controlled Hand-Pollination Experiments .....	238
3.3.3. Seed Germination .....	240
4. Discussion.....	241
4.1. Influence of Environmental Conditions in the Seasonal Phenology of <i>Azorina vidalii</i> .....	241
4.2. Floral Longevity, Dichogamy and Sexual Functions .....	244
4.3. Floral Features and Pollination Syndromes.....	244
4.3.1. Lizards as Pollinators or Floral Predators? .....	246
4.4. Morphological Variation and Geographical Differentiation .....	246

<b>4.5. Breeding Systems and Reproductive Success</b> .....	248
<b>4.5.1. Self-Incompatibility in <i>A. vidalii</i> following Field Experiments</b> .	250
<b>4.6. Conservation Remarks</b> .....	252
<b>5. Conclusions</b> .....	253
<b>Acknowledgments</b> .....	254
<b>References</b> .....	254
<b>Supplementary Materials – Chapter 4</b> .....	268
<b>Chapter 5 - General discussion, conclusions and perspectives for the future</b> .....	278
<b>1. Chapter outline</b> .....	279
<b>2.General discussions and conclusions</b> .....	279
<b>2.1. Constraints of the holistic research</b> .....	279
<b>2.2. The holistic approach in the conservation of <i>Azorina vidalii</i> and <i>Lotus azoricus</i></b> .....	281
<b>2.2.1. Ecology</b> .....	281
<b>2.2.2. Reproductive biology</b> .....	287
<b>2.2.3. Population genetics</b> .....	290
<b>3. General considerations</b> .....	293
<b>4. Future perspectives</b> .....	295
<b>References</b> .....	297
<b>Annex I – CRediT author statement</b> .....	310

## ***Agradecimentos***

Chegado o final desta etapa, sinto uma enorme gratidão para com todos aqueles que, de algum modo, me incentivaram, ajudaram e privaram comigo ao longo desta etapa da minha vida. Tive muita sorte por ter podido desfrutar desta experiência.

Em primeiro lugar, deixo um enorme agradecimento aos meus orientadores, Professora Doutora Mónica Moura, Professor Doutor Luís Silva e Doutora Maria Olangua Corral, por desde logo terem aceitado orientar-me e incentivar-me ao longo do meu doutoramento, a tornar-me um biólogo melhor. Pela simpatia e por terem estado presentes, a ajudarem-me a ultrapassar quaisquer dificuldades que fossem surgindo ao longo das várias etapas da tese.

Gostaria de agradecer o importante papel dos meus pais, Virgílio e Maria Helena, na minha vida. Por tudo o que me ensinaram ao longo da minha vida e pelo grande esforço que fizeram, para me poderem dar a melhor infância e educação que pudessem. Para que eu possa ter uma vida melhor. Ao meu mano, Érico, por me teres aturado ao longo da tua infância (algo que não deve ter sido nada fácil!). Agradeço o teu companheirismo, a motivação e a tua prontidão e disponibilidade para ajudar-me, sempre que precisasse. Não há palavras para agradecer todo o vosso amor e dedicação.

À minha maravilhosa esposa, companheira e melhor amiga, Nubélia Branco, por ter estado sempre presente para mim. Foste o meu pilar. Por me teres dado o melhor presente de sempre, o nosso filhote, Mateus. Estes últimos quatro anos foram também um período de aprendizagem a dois, sendo que crescemos imenso a nível pessoal e profissional. Fico imensamente grato pelo teu amor e dedicação, pela motivação que sempre me deste para acabar o doutoramento. Por me teres escutado quando andava triste e nesses momentos,

teres estado lá para me suportar e me fazeres rir. Pela paciência que sempre tiveste comigo, nos meus momentos mais difíceis e de maior impaciência. Tudo farei para ser sempre o melhor pai e marido que possa para vocês. Amo-vos.

Agradeço o importante papel do meu amigo e colega Guilherme Roxo no meu doutoramento. Partilhamos infinitas horas juntos a trabalhar no campo e no laboratório, e esta partilha de experiências tornou-me e motivou-me a ser um melhor biólogo. Fico-te grato pela aprendizagem e por todas as discussões de trabalho que impactaram positivamente o resultado da minha dissertação. A ti, desejo-te também a melhor das sortes para o que te resta da tua tese de doutoramento, e para que consigas atingir todos os teus objetivos.

Não menos importante, agradeço imenso a todos os meus amigos, ao Paulo Amaral, ao Hélder, à Alejandra Herrezuelo (com quem também passei imenso tempo no campo e no laboratório, foi uma parceira de muitas gargalhadas), à Isabel Ferreira, ao Tiago Paiva e ao meu primo Óscar e à Maria João, estou grato pelos momentos de descontração, pelo apoio e amizade e ajuda que me deram ao longo da minha vida. Às vezes basta uma palavra para fazer alguém sorrir e melhorar o seu dia.

Ao meu amigo e colega Roberto Resendes, pelo seu apoio nas inúmeras saídas de campo que fizemos, e também no laboratório. Pelas conversas e partilha de ideias e aprendizagens que também enriqueceram esta experiência. Agradeço também às alunas Charlotte Höffman, Maria Ferreira, Beatriz Sousa e Rita Pereira pela sua ajuda no trabalho laboratorial.

Gostaria ainda de deixar uma palavra de apreço aos meus sogros, Nubélia Fátima e Mário Jorge, assim como aos meus cunhados, Leonardo e Sofia Branco pela amizade, e por toda a ajuda que me prestaram durante esta fase.

Quero agradecer às várias pessoas e entidades com quem colaborei ao longo desta dissertação: Eng. Pedro Casimiro, Dra. Mafalda Sousa, e Dr. João Bettencourt do projeto LIFE VIDALIA; Às Dras. Cátia Freitas e Rosana Fraga, do Jardim Botânico do Faial; Às Dras. Rosa Febles, Olga Fernández-Palacios, Julia Pérez de Paz, e ao Dr. Juli Caujapé-Castells, do Jardim Botânico Canário “Viera y Clavijo”; À Dra. Diana Pereira, do Projeto Live IP Invasoras; À Professora Ana Delaunay Caperta pela sua amizade, e pela revisão exaustiva e comentários importantíssimos que fez a um dos manuscritos, que contribuíram para a sua melhoria e efetiva publicação do mesmo. Aos Diretores dos Parques de Ilha e aos vigilantes da natureza das várias ilhas que se disponibilizaram para nos ajudar nos trabalhos de campo.

Por último, agradeço ao Fundo Regional para a Ciência e Tecnologia, pela bolsa de estudos de doutoramento que me foi concedida (CONCURSO PRO-SCIENTIA/FRCT/2021/M3.1.a/001, M3.1.a/F/014/2021), que me permitiu dedicar por completo ao desenvolvimento desta tese e completar este importante marco da minha carreira científica, que, de outro modo, não teria sido possível. Agradeço também à Dra. Marisa Silva e Dr. João Lima, da FRCT, pela simpatia e disponibilidade.

Quero também agradecer a verba atribuída pela Direção Regional da Ciência e Transição Digital, através da Medida 1.1.c – Apoio ao desenvolvimento de projetos exploratórios de investigação – 2022, ref.: M1.1.C/PROJ. EXPLORATÓRIOS/011/2022.

Não há palavras para exprimir a minha gratidão pelos vossos contributos. Obrigado!

## Resumo

A expansão antropogénica nas zonas costeiras, aliada às alterações climáticas e à ocorrência pontual de fenómenos naturais destrutivos, representa uma ameaça significativa para várias espécies endémicas insulares, que possuem áreas de distribuição muito reduzidas e limitada capacidade de evasão. *Azorina vidalii* (H.C. Watson) Feer (Campanulaceae) e *Lotus azoricus* P.W. Ball (Fabaceae) são duas espécies costeiras endémicas dos Açores atualmente ameaçadas, recentemente incluídas em projetos de conservação, como o LIFE VIDALIA, que contemplaram ações de reforço populacional. No entanto, subsistem lacunas consideráveis no conhecimento sobre estas espécies, com estudos existentes focados apenas em aspetos isolados da sua biologia. Este trabalho propõe uma abordagem holística que integra ecologia, genética populacional e biologia reprodutiva, com o objetivo de apoiar a conservação das espécies e avaliar os impactos genéticos dos reforços populacionais recentemente realizados. *Azorina vidalii* ocorre em todas as ilhas do arquipélago, enquanto *L. azoricus* tem uma distribuição mais restrita, ocorrendo apenas nas ilhas de Santa Maria, Pico e São Jorge. Foram amostradas populações de ambas as espécies nas nove ilhas, com recolha de dados morfológicos e moleculares, inventário florístico, e levantamento de variáveis ambientais, climáticas e de ameaças locais. Foram utilizados métodos diretos e indiretos para avaliar as estratégias reprodutivas de *A. vidalii*, incluindo o tipo de sistema de autoincompatibilidade e o sucesso reprodutivo. Para a análise genética de *L. azoricus*, empregaram-se técnicas clássicas de extração e amplificação de DNA, utilizando retrotransposões, um tipo de marcador molecular dominante. Os resultados indicam que a vegetação costeira onde ocorrem estas espécies é limitada pelo mar e por atividades humanas, como infraestruturas costeiras, agricultura, pastoreio, turismo, presença de espécies invasoras,

herbivoria, erosão costeira e submersão marítima. *A. vidalii* apresenta um nicho ecológico mais amplo, enquanto *L. azoricus* prefere habitats elevados, com clima quente e seco — condições que ocorrem quase exclusivamente em Santa Maria, justificando a sua maior raridade. Foi detetada alguma mistura genética em *L. azoricus*, incluindo um efeito fundador artificial numa população reforçada pelo projeto LIFE VIDALIA. A diferenciação genética entre populações foi baixa, com exceção da população de São Lourenço (Santa Maria), onde foi mais acentuada. O fluxo genético foi elevado entre populações do grupo central, possivelmente devido a mecanismos naturais ou assistidos de dispersão. Verificou-se um aumento da diversidade genética nas populações reforçadas; no entanto, no caso da população da Calheta de Nesquim, onde se observou regeneração natural após remoção de invasoras, o reforço populacional revelou-se desnecessário. Foram identificadas populações com elevada riqueza alélica, que devem ser priorizadas em futuras ações de conservação. *Azorina vidalii* revelou variação morfológica floral associada à geografia insular, e a ocorrência das diferentes fases fenológicas mostrou-se dependente do clima. As flores apresentaram plasticidade na duração das fases sexuais, resultando numa dicogamia incompleta. Polinizações experimentais realizadas na população natural dos Mosteiros (ilha de São Miguel) revelaram uma estratégia reprodutiva mista, com ausência de autopolinização espontânea, fecundação dependente de polinizadores, autoincompatibilidade parcial e ocorrência de endogamia. Ambas as espécies foram classificadas como “ameaçadas” segundo os critérios da *União Internacional para a Conservação da Natureza* (IUCN). Conclui-se que a abordagem holística adotada constitui uma ferramenta metodológica valiosa, permitindo a formulação de recomendações concretas para uma conservação mais eficaz e informada destas duas espécies endémicas costeiras dos Açores.

## Abstract

Anthropogenic expansion in coastal areas, combined with climate change and the occasional occurrence of destructive natural phenomena, poses a significant threat to several endemic island species, which have very small distribution areas and limited evasion capacity. *Azorina vidalii* (H.C. Watson) Feer (Campanulaceae) and *Lotus azoricus* P.W. Ball (Fabaceae) are two endangered coastal species, endemic to the Azores. They have recently been included in conservation projects, such as LIFE VIDALIA, which have performed population reinforcement actions. However, considerable gaps remain in knowledge about these species, with existing studies focusing only on isolated aspects of their biology. This work proposes a holistic approach that integrates ecology, population genetics, and reproductive biology, with the aim of supporting species conservation and assessing the genetic impacts of recent population reinforcements. *Azorina vidalii* occurs on all islands of the archipelago, while *L. azoricus* has a more restricted distribution, occurring only on the islands of Santa Maria, Pico, and São Jorge. Populations of both species were sampled on the nine islands, with the collection of morphological and molecular data, a floristic inventory, and a survey of environmental, climatic, and local threat variables. Direct and indirect methods were used to assess the reproductive strategies of *A. vidalii*, including the type of self-incompatibility system and reproductive success. For the genetic analysis of *L. azoricus*, classical DNA extraction and amplification techniques were employed, using retrotransposons, a dominant molecular marker. The results indicate that the coastal vegetation where these species occur is limited by the sea and human activities, such as coastal infrastructure, agriculture, grazing, tourism, the presence of invasive species, herbivory, coastal erosion, and sea submersion. *A. vidalii* has a broader ecological niche, while *L. azoricus* prefers highland

habitats with a hot, dry climate—conditions that occur almost exclusively in Santa Maria, explaining its greater rarity. Some genetic admixture was detected in *L. azoricus*, including an artificial founder effect in a population reinforced by the LIFE VIDALIA project. Genetic differentiation between populations was low, with the exception of the São Lourenço (Santa Maria) population, where it was more pronounced. Gene flow was high between populations in the central subarchipelago, possibly due to natural or assisted dispersal mechanisms. Increased genetic diversity was observed in the reinforced populations; however, in the Calheta de Nesquim population, where natural regeneration was observed after invasive species removal, population reinforcement proved unnecessary. Populations with high allelic richness were identified and should be prioritized in future conservation efforts. *Azorina vidalii* revealed floral morphological variation associated with island geography, and the occurrence of different phenological phases was shown to be climate-dependent. The flowers exhibited plasticity in the duration of the sexual phases, resulting in incomplete dichogamy. Experimental pollinations conducted in the natural population of Mosteiros (São Miguel Island) revealed a mixed reproductive strategy, with no spontaneous self-pollination, pollinator-dependent fertilization, partial self-incompatibility, and the occurrence of inbreeding. Both species were classified as "threatened" according to the criteria of the *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). In conclusion, the holistic approach used here constitutes a valuable methodological tool, enabling the formulation of concrete recommendations for more effective and informed conservation of these two coastal endemic species of the Azores.