

DUPLICACIONES Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *PAROLINIA ORNATA* (BRASSICACEAE: MATTHIOLEAE) ENDEMISMO DE GRAN CANARIA EN RELACIÓN A DOS CONGÉNERES MAS RESTRINGIDOS Y OTROS TAXONES ISLEÑOS Y CONTINENTALES

OLGA FERNÁNDEZ-PALACIOS, JULIA PÉREZ DE PAZ, ROSA FEBLES Y JULI CAUJAPE-CASTELLS

Jardín Botánico Canario "Viera Y Clavijo". Apto de Correos 14 de Tafira Alta. 35017 Las Palmas de Gran Canaria (ofernandez@grancanaria.com; jperezdepaz@grancanaria.com; rfebles@grancanaria.com; julicaujape@grancanaria.com)

Recibido: Septiembre 2006

Palabras clave: isoenzimas, Brassicaceae, *Parolinia*, Canarias, diversidad genética, duplicación

Key words: allozyme, Brassicaceae, *Parolinia*, Canarias, genetic diversity, duplicated

RESUMEN

Se analizan los niveles de diversidad y estructura genética del endemismo de Gran Canaria *Parolinia ornata* (Brassicaceae: Matthioleae) y se comparan con las dos especies grancanarias del género restringidas a una única población, *P. glabriuscula* y *P. platypetala*. Se confrontan, asimismo, los niveles de diversidad intrapoblacionales en las tres especies según el número de individuos o talla poblacional. En las tres poblaciones estudiadas de *P. ornata* se puede observar altos niveles de diversidad genética con unos valores medios ($A_1 = 3.8$, $P = 69.2$, $H_e = 0.301$), así como desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg con exceso de homocigotos. Los bajos niveles de diferenciación poblacional ($G_{ST} = 0.067$) y las altas identidades genéticas (con un promedio de $I = 0.959$) indican una elevada cohesión genética entre estas poblaciones. A nivel cualitativo se observó un alto número de alelos exclusivos, especialmente en la población del barranco de Tirajana (7 alelos), probablemente como consecuencia de la mayor talla poblacional y/o posiblemente más antigüedad de esta población. Los resultados ponen en evidencia que en *Parolinia* la adscripción filogenética tiene más influencia en los niveles de biodiversidad alcanzados por una especie, que su distribución geográfica y tamaño poblacional.

SUMMARY

We assess the levels and structuring of genetic variation in three populations of the widely distributed Gran Canarian endemic species *Parolinia ornata* (Brassicaceae: Matthioleae) and we compare their intra-population diversity with two congeneric monotypic species with similar population sizes: *P. glabriuscula* and *P. platypetala*. Overall, levels of genetic variation in the three populations of *P. ornata* are high (with average values of basic polymorphism indicators of $A_1 = 3.8$, $P = 69.2$, $H_e = 0.301$) and manifest a generalised lack of Hardy-Weinberg equilibrium and homozygote excess. Cogent with the high value of genetic identity estimated ($I = 0.959$), the inter-population component of genetic variation was low ($G_{ST} = 0.067$), indicating a considerable genetic cohesion among these

populations. Qualitatively, we detected a high number of exclusive alleles in the three populations, but especially in Barranco de Tirajana, thereby suggesting a possibly higher antiquity of this population. These results indicate that, in *Parolinia*, lineage ascription is more important to explain the levels of diversity attained by a species than its geographic distribution or its population size.

INTRODUCCIÓN

Parolinia ornata Webb, endemismo de la isla de Gran Canaria (Fig.1a), es la primera de las especies descritas para el género *Parolinia* (WEBB, 1840), que se consideró monotípico hasta que se describió *P. schizogynoides* Svent. en la isla de La Gomera (SVENTENIUS, 1960). Como el resto de sus congéneres, es una especie leñosa y diploide con $2n = 22$ (BRAMWELL *et al.*, 1972).

Se caracteriza morfológicamente por su porte arbustivo y erecto de hasta 2.5 m de alto (Fig.1b) y copa de unos 80 cm de diámetro medio, ramas breves, hojas sésiles, lineales o sublanceolado-lineares de hasta 12.4 cm de longitud y 0.4 cm de ancho. Las flores, brevemente pediceladas, tienen el cáliz tomentoso de unos 0.8 cm (0.5-1.1), pétalos unguilados espato-lanceolados de color blanco-rosados entre 0.6-1.7cm de largo y 0.2 cm de ancho (Fig.1c). La silicua de longitud media 1.8 cm (incluyendo apéndices) puede alcanzar los 4 cm (0.6-4.0), apéndices más o menos iguales a las valvas y profundamente bifidos hacia el ápice; valvas fundamentalmente rectas (en ocasiones curvas) con una media de 15 septos (4-26) y 10 semillas (1-20). Semillas de forma muy variable, mayoritariamente circular o subcirculares pero también cónicas y ovals (WEBB, 1840; FERNÁNDEZ-PALACIOS, PÉREZ DE PAZ & FEBLES, 2005 a, b, c).

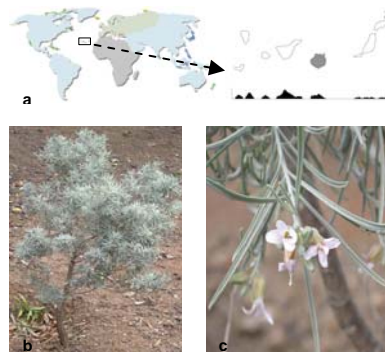


Figura 1.- *Parolinia ornata*: a. Localización geográfica en la isla de Gran Canaria; b. Porte de un individuo del barranco de Tirajana (POS); c. Detalle de la inflorescencia.

Esta especie, citada como abundante y de amplia distribución en los barrancos del SE al SO de la isla (Fig. 2a), ha sido relegada de las listas rojas de especies amenazadas de estudios más profundos dirigidos a la conservación, al contrario que sus congéneres más restringidos, *P. filifolia* Kunkel (EN) considerada en peligro, y *P. glabriuscula* Montelongo & Bramwell y *P. platypetala* Kunkel, en situación crítica (CR), ambas con una única población (WALTER & GUILLETT, 1998; VVAA, 2000; BAÑARES *et al.*, 2003).

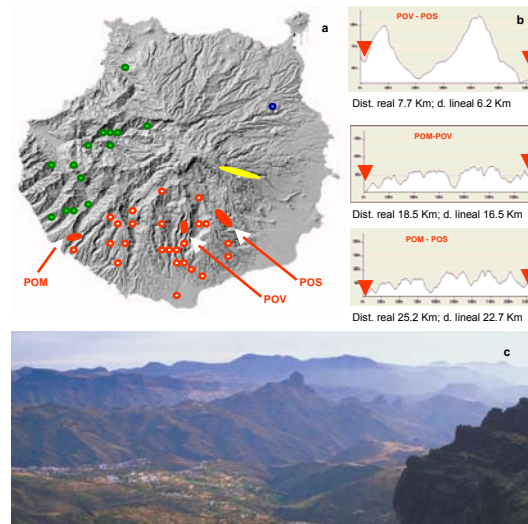


Figura 2.- a. Mapa de distribución de las especies de *Parolinia* en Gran Canaria según base de datos del JBCVC: ○ *P. ornata*, ● poblaciones estudiadas señaladas con flechas; ● *P. platypetala*; ● *P. glabriuscula* y ● *P. filifolia*; b. Perfil topográfico, distancia lineal (DI), orográfica (Do) y desniveles entre las poblaciones estudiadas según GRAFCAN; c. Barrancos de Gran Canaria con fuertes pendientes como barrera geográfica típica.

Tradicionalmente se le ha considerado propia de los barrancos secos y soleados del sur y oeste de Gran Canaria entre 100 y 500 m s.m. (SVENIENIUS, 1948; KUNKEL, 1969; BRAMWELL, 1970) en comunidades xerofíticas (Fig.2a en color rojo) pertenecientes al *Aeonio-Euphorbion canariensis* Sunding (1972). Aunque para el *holotypus* se describe su habitat: “*Hab. locis petrosis aridissimis insulae Canariae inter dumeta Cneori pulverulenti, cui facie simillima*”, no se menciona su *locus classicus* (WEBB, 1840; LA SERNA & LEÓN, 1980).

Aunque ha sido citada también en localidades de Gran Canaria como Agaete (NO) y San Nicolás de Tolentino (O) e incluso en la isla de Tenerife (SVENIENIUS, 1948; KUNKEL, 1969; BRAMWELL & BRAMWELL, 2001), no se han considerado dichas poblaciones en este análisis, toda vez que los recientes estudios micro-morfológicos del género, señalan que no se corresponden con este taxon (FERNÁNDEZ-PALACIOS, PÉREZ DE PAZ & FEBLES, 2005a, b, c). Esto evidencia la necesidad de un nuevo replanteamiento en las adscripciones taxonómicas de las respectivas poblaciones naturales de *Parolinia* y consecuentemente de su taxonomía infragenérica y corología general.

Filogenia, biología reproductiva y diversidad genética

Este estudio está enmarcado en otro mucho más amplio en el que se han analizado de forma multidisciplinar las siete especies que constituyen el género *Parolinia*, su biodiversidad y estructuración tanto genética como micro-morfológico-reproductiva (FERNÁNDEZ-PALACIOS, PÉREZ DE PAZ & FEBLES, 2005a, b, c; FERNÁNDEZ-PALACIOS, *et al.*, en preparación) asumiendo como hipótesis y premisa fundamental, que la “adscripción filogenética” de los grupos

vegetales (referido a la categoría taxonómica) está determinando los niveles de biodiversidad y la historia evolutiva de los sistemas de cruzamiento (WEBB, 1984; KARRON, 1987, 1988; GITZENDANNER & SOLTIS, 2000). Esta es la razón que justifica que para el conocimiento real de la biodiversidad a niveles infragenéricos sean indispensables estudios comparativos de especies congenéricas de distinto rango de distribución, lo que al mismo tiempo se considera fundamento básico para la conservación y estrategias de recuperación, en aquellas especies con problemas de erosión.

Se asume, por tanto, que los caracteres florales y mecanismos reproductivos en general, controlan los apareamientos entre los individuos de la población natural, siendo los responsables decisivos del éxito reproductivo y niveles de biodiversidad (genética y macro y micro-morfológica) en su descendencia y corresponsables junto con otros agentes ambientales de las migraciones del flujo génico, polínico o de semillas (WEBB, 1984; RICHARDS, 1986 y 1997; HAMRICK & GODT, 1996; PROCTOR, YEO & LACK, 1996; BARRETT *et al.*, 1997; BRIGGS & WALTERS, 1997; GIVNISH, 1997 y 1998; BARRETT, 1998; GRANT, 1998; PÉREZ DE PAZ, 2002; PÉREZ DE PAZ *et al.*, en preparación).

En consecuencia y siguiendo estos últimos criterios, la correcta interpretación de los parámetros genéticos de una determinada especie, asume como esencial el conocimiento de los factores cuya incidencia puede ser la causa determinante de su biodiversidad (AVISE & HAMRICK, 1996; GITZEDANNER & SOLTIS, 2000; ANDERSON *et al.*, 2002). Por ejemplo:

1. La adscripción filogenética, principalmente referida a la categoría taxonómica de familias y géneros, condiciona y está íntimamente relacionada con la historia evolutiva de los taxones y de sus sistemas de cruzamiento, a su vez controlados por sus síndromes florales y sistemas sexuales (hermafroditismo, diclinia, dioecia, monoecia) y/o sistemas de auto-incompatibilidad, de manera que el conocimiento y evaluación de la biodiversidad de una especie, requiere la confrontación con taxones del mismo grupo, valorando además:

1a. La biología reproductiva y/o sistemas de cruzamiento por determinar la configuración genética de la descendencia de los taxones en cuestión, mediante los heteromorfismos florales (sexuales y/o de auto-incompatibilidad) y otros mecanismos de auto-incompatibilidad homomórficos no detectables a simple vista, que origina individuos con más o menos variabilidad, consecuencia de los apareamientos (*mating systems*) intra o inter-individuales frente a la presencia de apomixia o reproducción asexual con individuos clónicos.

En Brassicaceae está generalizado el sistema de auto-incompatibilidad esporofítico homomórfico (SSI) cuyo control genético, desde el esporofito diploide, se debe a un *locus* de múltiples alelos. Se considera el más eficaz y exigente de los sistemas, toda vez que el rechazo del polen inadecuado que comparte los mismos alelos S del gineceo, tiene lugar en el estigma interrumpiendo de inmediato el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del gineceo. Al mismo tiempo, se considera el más flexible en poblaciones grandes, donde la posibilidad de un mayor número de alelos S, puede permitir un mayor número de apareamientos viables entre individuos (RICHARDS, 1986 y 1997; GIBBS, 1986 y 1988; BARRETT, 1988; BYERS & MEAGHER, 1992). En el género *Parolinia* se ha detectado dicho sistema en *P. ornata*, *P. platypetala* y *P. glabriuscula* y se ha confirmado, su mayor o menor flexibilidad con diferencias de intensidad según

talla poblacional. En las especies con poblaciones más pequeñas se ha observado un mayor control genético que limita los apareamientos entre individuos que comparten, más frecuentemente, los alelos S de auto-incompatibilidad (FERNÁNDEZ-PALACIOS *et al*, sin publicar).

1b. Los cromosomas, número y nivel de ploidía, principales vehículos genéticos (ADN) directamente relacionados con la filogenia de los taxones, repercuten en la generación de biodiversidad, tanto desde la reproducción asexual como sexual. Siguiendo a RICHARDS (1997) en la reproducción sexual, el número potencial de gametos diferentes generados por un parental diploide (2^n) y consecuentemente el número de cigotos diferentes, $(2^n)^2$, depende directamente del número haploide de cromosomas (n), asumiendo, que solamente hay un sólo *locus* heterocigoto por cromosoma homólogo e ignorando la variabilidad originada por recombinación cromosómica. En consecuencia, las especies de *Parolinia*, todas con $2n=22$ pueden generar como mínimo, 2.048 gametos diferentes y unos 4.194.304 de cigotos e individuos potencialmente distintos (PÉREZ DE PAZ, 2002).

2. Otros factores, como el flujo génico, tamaño poblacional y rango de distribución geográfica, que influyen a niveles de población natural, además de estar supeditados y relacionados a los anteriores (filogenia, reproducción asexual, síndromes florales y sistemas de cruzamiento) inciden y dependen también de otros factores ambientales añadidos, incluidos los problemas de erosión. Es desde esta perspectiva jerárquica y global donde únicamente se deben considerar las confrontaciones de biodiversidad y desde donde tiene sentido que, un mayor número de individuos, según rango geográfico o talla poblacional, genere mayor variabilidad y biodiversidad, independientemente de la naturaleza continental o isleña (WEBB, 1984; KARRON, 1987, 1988; FRANKHAM, 1997; GITZENDANNER & SOLTIS, 2000; FRANCISCO-ORTEGA *et al*, 2000; CRAWFORD *et al.*, 2001, 2006).

Por otro lado, en los estudios comparativos de diversidad genética, además de asumir su íntima relación con la filogenia e historia evolutiva de los taxones y sistemas de cruzamiento, la comparación de los parámetros genéticos se debe llevar a cabo, utilizando idénticos grupos de isoenzimas y *loci*, toda vez que bajo las mismas presiones selectivas ambientales, enzimas diferentes pueden manifestar o exhibir distintos niveles de polimorfismo (HAMRICK *et al*, 1979; KARRON *et al.*, 1988; CRAWFORD *et al.*, 2001; ELGAR & CLODE, 2001).

Con este trabajo destinado a la evaluación genética de *P. ornata* mediante la electroforesis de isoenzimas, se pretende evidenciar y reforzar que también en Canarias la adscripción filogenética y sistemas de cruzamiento tienen más influencia en los niveles de biodiversidad que el rango de distribución geográfica y tamaño poblacional, independientemente de su condición isleña. Para ello, se comparan los niveles de diversidad en:

- (i) *P. ornata* (PO), como especie ampliamente distribuida, frente a *P. glabriuscula* (PG) y *P. platypetala* (PP), estas dos últimas restringidas a una sola población.
- (ii) Cada una de las tres poblaciones estudiadas de *P. ornata* en relación a la única población de *P. glabriuscula* (PGB) y de *P. platypetala* (PPG) según el número de individuos o talla poblacional.
- (iii) El género *Parolinia* en relación a otros géneros de Brassicaceae y en general a taxones de otras familias presentes en Canarias y en otros archipiélagos oceánicos, según sistemas de cruzamiento y rangos de distribución.

MATERIAL Y MÉTODOS

La distribución de las especies de *Parolinia* en Gran Canaria corresponde a los datos corológicos extraídos de la base de datos del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” (JBCVC) con datos adicionales de Saturno Hernández para la Montaña de Amurga (comunicación personal) y se representa en la Fig.2a, mediante cartografía básica, modelo de elevación de GRAFCAN (Gobierno de Canarias). Se señalan en círculos blancos y rojos las poblaciones de *P.ornata* destacando con color rojo las estudiadas. Con este mismo programa, se obtuvo, tanto la distancia lineal (DI) entre pares de poblaciones, como la distancia orográfica (Do) que considera como valores añadidos, los perfiles topográficos y desniveles entre las mismas, debidos generalmente a la presencia de barrancos (Fig. 2b).

De las tres poblaciones elegidas: dos, barranco de Tirajana (POS) y barranco de Mogán (POM), representan los extremos (SE y SO) del área de distribución de la especie y la tercera, barranco de Los Vicentillos, la situación intermedia (Tabla 1 y Fig.2).

| POBLACIONES NATURALES | CODIGO | UTM | ALTITUD | ORIENTACIÓN | Nº INDIVIDUOS MUESTREADOS |
|-----------------------|--------|------------------------|---------|-------------|---------------------------|
| Barranco Tirajana | POS | 28RDR4784 28RDR4982 | ~350 m | SO-NE | 158 |
| Barranco Vicentillos | POV | 28RDR4280 | ~450 m | S-SO | 149 |
| Barranco Mogán | POM | 28RDR2578 | 55 m | SE-SO | 102 |

Tabla 1.- Caracterización de las tres poblaciones naturales estudiadas.

Para hacer comparables los niveles de diversidad genética de *P. ornata* como especie ampliamente distribuida frente a las dos especies restringidas, *P. glabriuscula* y *P. platypetala* (FERNÁNDEZ-PALACIOS *et al.*, 2004) se actualizan los datos según isoenzimas y *loci* isoenzimáticos (Tabla 2) y se consideró cada una de ellas como un solo conjunto poblacional.

| ESPECIES | ENZIMAS | LOCI |
|---|--------------------------------------|--|
| <i>P. glabriuscula</i> * <i>P. platypetala</i> * | ACP, EST IDH, MDH, PGI, PGM, | <i>Acp-1, Acp-2, Est-1, Est-2, Est-3, Idh-1, Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3, Pgi-2, Pgm-1, Pgm-2, Pgm-3</i> |
| <i>P.ornata</i> , <i>P. glabriuscula</i> <i>P.platypetala</i> . | ACP, EST IDH, MDH, ME, PGI, PGM, SKD | <i>Acp-1, Acp-2, Est-1, Est-2, Idh-1, Mdh-1, Mdh-2, Mdh-3, Me-1 Pgi-2, Pgm-2, Pgm-3, Skd-1</i> |

Tabla 2.- Especies, enzimas y *loci* analizados. (*) FERNÁNDEZ-PALACIOS *et al.*, 2004.

Para analizar los niveles de diversidad genética en relación a la talla poblacional, se comparó la población del barranco de Tirajana (POS) con *P. platypetala* (PPG) ambas con unos 40.000 individuos, la población del barranco de Mogán (POM) con *P. glabriuscula* (PGB) ambas con unos 270 individuos y por último, se consideró como control de talla intermedia, la población del barranco Los Vicentillos (POV).

El muestreo se realizó según áreas o núcleos de población, teniendo en cuenta las diferentes orientaciones y laderas de barranco (Tabla 1). Los primordios

foliares (con mayor actividad enzimática) de los individuos muestreados y previamente etiquetados para facilitar eventuales re-muestreos, se guardaron en bolsas etiquetadas y se transportaron en neveras de campo con bloques refrigerantes para evitar la desnaturalización de las enzimas. Una vez en el laboratorio, el material se almacenó en un ultracongelador a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

A. Técnica molecular de electroforesis de isoenzimas

Los extractos proteicos se obtuvieron machacando las hojas en morteros de cristal fríos (4°C) utilizando un tampón de extracción (SHIELDS *et al.*, 1983) adecuado para preservar la actividad enzimática y prevenir la oxidación enzimática. Los extractos se absorbieron en papel Whatman nº3 y se almacenaron en el ultracongelador a -80°C hasta el momento de la electroforesis.

La electroforesis se realizó en geles horizontales de almidón (Aldrich 23.402-8) al 12% (p/v) usando tres sistemas de tampón gel/electrodo: 1) Histidina 7.0 o sistema E de SHIELDS *et al.* (1983); 2) Borato-litio 8.3 o sistema C de SHIELDS *et al.* (1983) y 3) Morfolina-citrato 6.1 (CLAYTON & TRETIAK, 1972) donde se ensayaron los siguientes *loci* enzimáticos: 1) Histidina 7.0: Isocítrico deshidrogenasa (IDH, E.C.1.1.1.42), Malato deshidrogenasa (MDH, E.C.1.1.1.37), Fosfoglucoisomerasa (PGI, E.C.5.3.1.9) y Fosfoglucomutasa (PGM, E.C.5.4.2.2). 2) Borato de Litio 8.3: Acido fosfatasa (ACP, E.C.4.2.1.3), Esterasa (EST, E.C.3.1.1.), Glutamato deshidrogenasa (GDH, E.C.1.4.1.2), Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT, E.C.2.6.1.1) y Leucil- aminopeptidasa (LAP, E.C.3.4.11.1). 3) Morfolina-Citrato 6.1: Enzima málica (ME, E.C.1.1.1.40), Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD, E.C.1.1.1.44), Síkimico deshidrogenasa (SKD, E.C.1.1.1.25). Los protocolos de tinción están basados en ARÚS (1983), WENDEL & WEEDEN (1989) y MURPHY *et al.* (1996) con ligeras modificaciones.

B. Análisis de datos

Cuando una enzima mostró actividad para más de un *locus* genético, los diferentes *loci* se codificaron siguiendo la secuencia numérica desde la región de actividad más cercana al ánodo. Asimismo en cada *locus*, los alelos se denominaron siguiendo el alfabeto, asignando la primera letra a la banda de migración más anodal. En *P. ornata* los alelos no aparecen nominados correlativamente, ya que este estudio forma parte de otro que incluye todas las especies del género *Parolinia* (FERNÁNDEZ-PALACIOS *et al.*, en preparación) donde se realizó la verificación y homologación global de las moviidades alélicas en las distintas especies, a través de comparaciones o geles diferentes de acuerdo a cada una de las bandas o electromorfos.

Las interpretaciones de los patrones electroforéticos y formateo de los datos genotípicos individuales para su implementación en los distintos programas de variabilidad genética usados, se llevó a cabo con el programa TRANSFORMER-2 (CAUJAPÉ-CASTELLS & BACCARANI-ROSAS 2004).

Los parámetros básicos de variabilidad poblacional: número medio de alelos por locus (A_i), porcentaje de *loci* polimórficos P (con frecuencia del alelo más común ≤ 0.95), se calcularon en el programa BIOSYS 1.7 (SWOFFORD & SELANDER, 1989) así como el test Chi-cuadrado para desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg, heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e).

En el mismo programa se realizó el cálculo de los índices de fijación F de WRIGHT (1951), donde los valores cercanos a 0 indican la panmixia o apareamiento al azar; la tasa de alogamia ($t = (1 - F) / (1 + F)$) se calculó a partir de F según WEIR (1990); asimismo, se calcularon los F -estadísticos de WRIGHT (1951) y las distancias e identidades genéticas de NEI (1978). Por último se construyó el dendrograma de acuerdo al método UPGMA utilizando el programa NTSYS (ROHLF 1988) y XLSTAT (ADDINSOFT 1995-2003).

Los estadísticos H_T , H_S , D_{ST} y G_{ST} de NEI (1973) se calcularon mediante el programa GENESTAT-PC 3.31 (LEWIS & WHITKUS, 1993) donde $G_{ST} = H_S / H_T$.

Para detectar si las poblaciones han experimentado cuellos de botella históricamente recientes, se utilizó el programa BOTTLENECK (PIRY, LUIKART & CORNUET, 1998) según datos de frecuencia alélica según el Independent Allele Model (IAM) y Stepwise Mutation Model (SMM) y exceso de heterocigotos (CORNUET & LUIKART, 1996; LUYKART & CORNUET, 1998). El test se fundamenta en que los alelos de frecuencia baja (que apenas contribuyen a la heterocigosidad total) se pierden mucho más rápidamente que los heterocigotos y por tanto poblaciones que han sufrido cuellos de botella, manifestarán un exceso de heterocigotos en un número significativo de *loci*.

El programa POPGENE 3.2 (YEH *et al.* 1997) se usó para estimar el número de alelos efectivos (A_e), el flujo génico inter-poblacional o n° de migrantes N_m , y el test de Neutralidad de Ewens-Watterson. Según CROW & AOKI (1984), el cálculo de N_m , entre dos poblaciones es $N_m = [(1/F_{ST}) - 1] / [4(n/n-1)^2]$. Cuando $N_m > 1$ se asume que hay intercambio de migrantes (polen, semilla) y se presupone una distancia genética baja. (SLATKIN, 1985; SLATKIN & BARTON, 1989). El test de Neutralidad de Ewens-Watterson según algoritmo de MANLY (1985) indica que puede haber "presión selectiva" en cada uno de los *loci* cuando los resultados son significativos. Se considera significativo cuando el valor medio E-W está fuera del intervalo de confianza L95-U95.

La probabilidad de pérdida L (es decir, la probabilidad de que una muestra de tamaño N no contenga un alelo con frecuencia poblacional p) fue estimada usando la expresión: $L = (1-p)^{2N}$ (BENGTSSON *et al.*, 1995) para los alelos que: 1) tenían una frecuencia total menor de 0.5, y 2) estaban presentes solo en el 50% o menos de las poblaciones muestreadas. Se calcularon y representaron las probabilidades de pérdida esperada L_e (calculadas asumiendo que los alelos seleccionados tenían su frecuencia media total en cada una de las poblaciones consideradas) y las probabilidades de pérdida observadas L_o . Estos valores fueron utilizados para dos análisis de regresión lineal, donde la frecuencia de cada alelo se representó en el eje X, y el $-\log(L_o)$ y $-\log(L_e)$ se representaron en el eje Y. Siguiendo a BENGTSSON *et al.* (1995), se obtuvo un valor de representatividad muestral (R) dividiendo la pendiente de la línea de regresión observada (basada en los valores de L_o) por la pendiente de la línea de regresión esperada (basada en los valores de L_e). Este valor se interpreta como la probabilidad de representar todos los alelos raros incluidos en las estimaciones muestreando una sola población al azar. Los valores de R altos (cerca de 1) indican que el muestreo de una sola población representaría la mayor parte de la variabilidad genética del conjunto analizado.

La distribución espacial de la variabilidad genética dentro de las tres poblaciones se evaluó a través del análisis de autocorrelación espacial (SOKAL

1979; GRIFFITH 1987) utilizando el índice de Moran (IM , MORAN, 1948) como coeficiente de autocorrelación espacial con el programa SAAP (WARTENBERG, 1983). Cuando $IM > 0$ para una variable, se dice que ésta exhibe autocorrelación espacial positiva, lo que significa que los puntos que presentan valores similares para esa variable tienden a estar yuxtapuestos en el espacio poblacional. Cuando $IM < 0$, se dice que la variable presenta autocorrelación espacial negativa. En este caso, los puntos con valores similares para la variable tienden a estar separados en el espacio. Con la codificación de genotipos utilizada, IM es idéntica al coeficiente de relación por descendencia ρ de WRIGHT (1922), según COCKERHAM (1969) y BARBUJANI (1987). En los correlogramas (construidos a partir de los cambios de IM según cinco clases de distancias) se calcularon por extrapolación directa las intersecciones de los puntos con el valor "0" del eje X para estimar el tamaño de las áreas genéticamente homogéneas (SOKAL, 1979).

Se realizó el test de Mantel para la matriz de distancias geográficas con las matrices de distancias genéticas y flujos génicos entre pares de poblaciones utilizando los programas NTSYS y XLSTAT.

Para hacer comparables los indicadores básicos de variabilidad genética, de *P. ornata*, frente a *P. glabriuscula* y *P. platypetala* (FÉRNANDEZ-PALACIOS *et al.*, 2004), se han actualizado y considerado los valores para cada especie, según enzimas y *loci* como un solo conjunto poblacional (Tabla 2 y 11).

RESULTADOS

A. Interpretación de las isoenzimas: patrones de múltiples bandas.

En *P. ornata* como en el resto de las especies del género, los geles obtenidos presentan con frecuencia modelos de bandas o electromorfos múltiples que no concuerdan con los modelos establecidos para los taxones diploides (KEPHART, 1990).

De las 12 enzimas ensayadas, cuatro mostraron 7 *loci* con modelos que revelan un comportamiento típico diploide (GOTTLIEB, 1982 y 1984): *Acp-1*, *Acp-2*, *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Me-1* y *Skd-1*, dos no se interpretaron (GDH y LAP) por mala resolución y las 6 restantes mostraron modelos complejos de bandas que podrían ser el resultado de duplicaciones génicas (KEPHART, 1990; ANDERSON & WARWICK, 1999). Aún así, cuatro de las 6, pudieron ser interpretados aunque requieren estudios detallados de progenie que revelen el auténtico modelo de transmisión genética y las dos enzimas restantes GOT y 6-PGD presentaron un patrón tan complicado que no ha podido ser interpretado hasta el momento.

1º. Múltiples bandas, número de alelos, número de *loci* por enzima e intensidad de las bandas.

En la mayoría de los casos se observaron patrones de bandas múltiples que, como en otras Brassicaceae, pueden representar la variación alélica de un sólo *locus*, y/o representar diferentes *loci* de una única enzima (WENDEL & WEEDEN, 1989; KEPHART, 1990; ANDERSON & WARWICK, 1999; FERNANDEZ-PALACIOS *et al.*, 2004). La interpretación se complica cuando se observa además en estos modelos de bandas múltiples, electromorfos de intensidad diferente a la esperada en los modelos de heterocigotos clásicos según enzimas: monómera (1:1), dímera (1:2:1) tetrámera (1:4:6:4:1), etc. Basándonos en los modelos ya

establecidos en otras Brassicaceae y comparando cada uno de los individuos, se pudo diferenciar: a) cuando los múltiples electromorfos se corresponden con alelos de un solo *locus*, o b) cuando se corresponden con alelos de diferentes *loci*:

a) En las enzimas MDH, PGI y PGM muchos individuos manifiestan más electromorfos de los esperados en la región correspondiente a cada *locus*. Por ejemplo en la PGM, enzima monómera con dos *loci* (GOTTLIEB, 1982), el número máximo de bandas esperado en un diploide típico es de cuatro y sin embargo, se pueden observar individuos con más de seis bandas (Fig.3a).

b) Detección de más *loci* de los esperados en las enzimas MDH y PGM: el número mínimo de *loci* isoenzimáticos para una determinada enzima es altamente conservativo para los diferentes táxones en general (GOTTLIEB, 1982 y 1984). Según diversos autores, las enzimas PGM y MDH presentan dos y tres *loci* respectivamente (SOLTIS, SOLTIS, & GOTTLIEB, 1987; WEEDEN & WENDEL, 1989; KEPHART, 1990) sin embargo en *P. ornata* se han detectado tres *loci* de PGM (Fig.3b) en lugar de dos y cuatro *loci* de MDH en lugar de tres.

c) En los *loci* asociados a las enzimas IDH, PGI, MDH y PGM, la presencia de bandas de intensidad diferente (Figs. 3c y 4) que no se corresponden a los modelos de heterocigotos clásicos, se asumen como heterocigotos asimétricos o electromorfos con diferentes dosis alélicas según los individuos (ANDERSON & WARWICK, 1999; WILLIAMSON & WERTH, 1999).

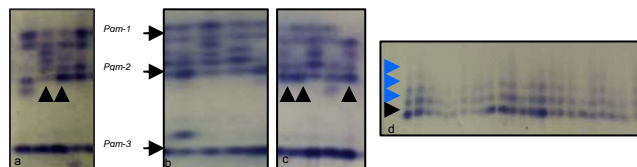


Figura 3.- Evidencias indirectas de duplicaciones. a. Enzima PGM: más electromorfos de los esperados por *locus*; b. Enzima PGM: más *loci* de los esperados; c. Enzima PGM: heterocigotos asimétricos. d. Enzima PGI: ► electromorfos interpretados como homocigotos; ► bandas fantasmas: artefactos o posibles silenciamientos génicos.

d) Asimismo la observación de electromorfos de intensidad más débil que migran muy cerca de las principales bandas, se han interpretado como “bandas fantasmas” (Fig.3d). Mientras algunos autores consideran estas bandas como artefactos de la técnica que se deben ignorar, otros las asumen como silenciamientos genéticos de antiguas duplicaciones (KEPHART, 1990; ANDERSON & WARWICK, 1999; WILLIAMSON & WERTH, 1999; CRAWFORD *et al.*, 2001; etc.).

2º. Interpretación asumida

Los patrones de bandas múltiples detectados pueden ser interpretados como heterocigotos asimétricos o polimorfismos producidos por una duplicación genética que son el resultado de diferentes dosis génicas en individuos con diferentes genotipos (ARÚS & ORTON, 1983; ARÚS & SHIELDS, 1983; BAYER & CRAWFORD, 1986; SOLTIS & RIESEBERG, 1986; MAHY *et al.*, 2000; WILLIAMS & ARNOLD, 2001; TYLER, 2004; AAGAARD *et al.*, 2005), presentando dos alternativas:

a) Asignación de genotipos a las bandas de desigual intensidad: la interpretación se basa en el establecimiento de un modelo subjetivo que asigna genotipos según la intensidad de cada una de las bandas.

b) Dosis de alelos: en esta interpretación se considera las bandas o electromorfos como dosis alélicas diferentes y por tanto se asignan los genotipos en función de dichas dosis. En ausencia de estudios detallados de progenie que proporcionen un conocimiento más profundo sobre la herencia de cada uno de estos *loci* presumiblemente duplicados y ante la imposibilidad de conocer con certeza la composición alélica de los mismos, en este trabajo se asume una interpretación que hemos denominado conservativa para asignar los genotipos individuales.

Según ésta, no se asume presencia de *loci* duplicados con alelos adicionales, de tal manera que en las enzimas monómeras se consideran homocigotos tanto los individuos que poseen una sola banda como aquellos donde una de las bandas presenta mayor intensidad que las otras, y sólo se asignan genotipos heterocigotos a los individuos donde los heterodímeros correspondientes muestran igual intensidad (FERNÁNDEZ-PALACIOS *et al.*, 2004). En el caso de las enzimas dimericas y multiméricas los heterocigotos asimétricos se han interpretado como heterocigotos normales para los dos alelos correspondientes.

Aunque esta interpretación suponga una subestimación de la variabilidad genética, es la que ofrece por el momento, mayores garantías en la comparación de poblaciones y especies hasta que se conozcan mejor los mecanismos de herencia de los *loci* y la historia evolutiva del género. No se descarta evaluar otras interpretaciones posibles en un futuro próximo.

Enzimas estudiadas

- La enzima ACP mostró dos zonas claras de actividad enzimática en la región central de la región anodal del gel, que fueron interpretados como dos *loci* (*Acp-1* y *Acp-2*), con cuatro y tres alelos respectivamente.

- La enzima EST exhibía tres *loci* segregantes (*Est-1*, *Est-2* y *Est-3*) en la parte superior de la región anodal del gel, *Est-1* con nueve alelos y *Est-2* con dos. El *locus Est-3* no fue interpretado debido a su mala resolución.

- En la enzima SKD se observa un *locus* (*Skd-1*) con cuatro alelos en total en la zona media de la región más anodal del gel.

Estas tres enzimas presentan un patrón típico de enzima monómera con heterocigotos formados por dos bandas de igual intensidad.

- La enzima ME mostró una sola región de actividad en la región central de la zona anodal del gel que fue designada como un *locus* putativo (*Me-1*) con cuatro alelos en total. Presentó el patrón típico de una enzima tetramera con los heterocigotos mostrando cinco bandas.

Las enzimas IDH, MDH, PGI y PGM, mostraron heterocigotos asimétricos y bandas fantasmas que no corresponden a los patrones típicos de enzimas monómeras (MDH y PGM) y dimeras (IDH y PGI):

- La enzima MDH mostró tres zonas de actividad enzimática en la zona central de la región anodal del gel que fueron designados como tres *loci* (*Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*) con tres, dos y cuatro alelos respectivamente. Se observó también una región de débil actividad en la zona más baja de la región anodal, *locus Mdh-4*, que no ha sido interpretado por su mala resolución.

Aunque la MDH se considera dímera (VALLEJOS, 1983; WEEDEN & WENDEL, 1989; KEPHART, 1990; MURPHY *et al.*, 1996), los patrones detectados en la mayoría de casos, con numerosas variaciones observadas en el número de bandas por individuo y en su intensidad, no permitían interpretarla de esta manera (Fig.4). Toda vez que en algunos casos la estructura cuaternaria de la MDH ya se ha visto alterada e incierta por el pH (CHEN & SMITH, 2001), a efectos comparativos se ha considerado la presencia/ausencia de bandas de manera que: una sola banda fue asimilada a un homocigoto para ese alelo y dos bandas de igual intensidad fueron asimiladas a un heterocigoto para los dos alelos correspondientes; la presencia de dos bandas de distinta intensidad se interpretó de forma conservativa como homocigoto y no como heterocigoto asimétrico (Fig. 4a).

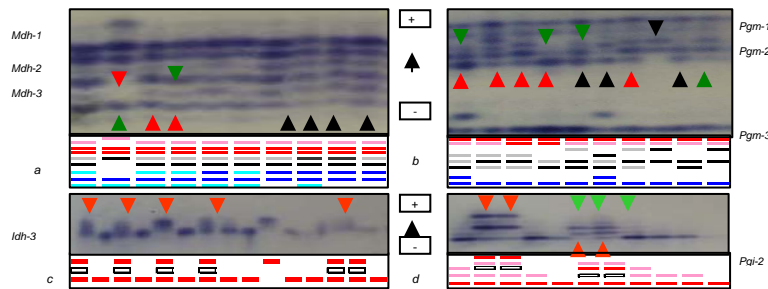


Figura 4.- Patrón representativo de las enzimas: a. MDH en POS con tres *loci*; b. PGM en POS con tres *loci*; c. IDH en POS con un *locus*; d. PGI en POM y sus correspondientes interpretaciones donde los colores rojo, negro y azul en el dibujo señalan los electromorfos interpretados como alelos y los colores rosa, gris y turquesa las bandas fantasmas que no fueron asignadas a ningún alelo; ► heterocigotos asimétricos interpretados como homocigotos según la interpretación conservativa; ▲ heterocigotos normales; ► bandas fantasmas.

- La enzima **PGM** mostró tres regiones de actividad que fueron designadas como tres *loci* putativos (*Pgm-1*, *Pgm-2* y *Pgm-3*). Los alelos detectados en los *loci* *Pgm-1* y *Pgm-2* exhibían una migración similar en la parte anodal del gel, que era en todos los casos superior en localización a la zona de migración de *Pgm-3* (Fig.4b). El *locus* *Pgm-1* no fue interpretado, por no mostrar buena resolución en la mayoría de los geles. *Pgm-2* y *Pgm-3* presentaron cuatro alelos cada una. Esta es la enzima donde se observa más claramente la presencia de heterocigotos asimétricos y bandas fantasmas.

La enzima **IDH** mostró una única zona de actividad enzimática en la zona baja de la región anodal del gel, que fue designada como un locus segregante (*Idh-1*) con dos alelos en total. La mayoría de los heterocigotos no mostraban el patrón de intensidad típico de un enzima dimérico (con la banda intermedia correspondiente al heterodímero más intensa que la de cada uno de los homodímeros) y fueron considerados heterocigotos asimétricos (Fig.4c).

- La enzima **PGI** mostró dos regiones de actividad, de las cuales solo fue interpretable la que estaba en la parte más baja de la región anodal del gel (*Pgi-2*) con cuatro alelos en total. Los genotipos heterocigotos no mostraban un comportamiento dimérico típico, y se consideraron heterocigotos asimétricos. Se observaron además una o varias bandas "fantasmas" (Fig. 4d).

B. Análisis de datos: parámetros de variabilidad intraespecífica

Se contó con resolución suficiente para garantizar la interpretación de 13 *loci* putativos (Tabla 3). Del total de los 49 alelos isoenzimáticos detectados, 7 fueron exclusivos de POS (*Acp-1d*, *Acp-1e*, *Acp-2e*, *Est-1i*, *Idh-1a*, *Mdh-3d*, *Me-1d*), cuatro de POV (*Est-2b*, *Pgi-2j*, *Skd-1a*, *Skd-1b*), y dos de POM (*Pgi-2d*, *Pgm-3b*). Detectamos 7 alelos compartidos exclusivamente entre dos poblaciones: POS - POV (*Pgm-3e*), POS-POM (*Est-1f*, *Est-2b*, *Mdh-3a* y *Me-1c*) y POV-POM (*Acp-2c*, *Est-1a*). Los 29 alelos restantes eran comunes a las tres poblaciones. POV presentó dos *loci* monomórficos (*Est-2a*, *Idh-1b*), POM uno (*Idh-1b*) y POS ninguno (Tabla 3).

| Locus/ Alelo | POS | POV | POM | Locus/ Alelo | POS | POV | POM |
|-----------------|---------|---------|---------|-----------------|---------|---------|---------|
| Acp-1 | 103 | 142 | 91 | Mdh-3 | 103 | 128 | 72 |
| b | 0.010 | 0.011 | 0.011 | a | 0.005** | 0.000 | 0.097** |
| c | 0.937 | 0.989 | 0.989 | b | 0.257 | 0.356 | 0.514 |
| d | 0.049* | 0.000 | 0.000 | c | 0.694 | 0.645 | 0.389 |
| e | 0.005* | 0.000 | 0.000 | d | 0.044* | 0.000 | 0.000 |
| Acp-2 | 117 | 142 | 95 | Me-1 | 47 | 77 | 24 |
| c | 0.000 | 0.011** | 0.174** | a | 0.255 | 0.240 | 0.104 |
| d | 0.992 | 0.989 | 0.826 | b | 0.692 | 0.760 | 0.813 |
| e | 0.009* | 0.000 | 0.000 | c | 0.011** | 0.000 | 0.083** |
| Est-1 | 117 | 138 | 95 | d | 0.043* | 0.000 | 0.000 |
| a | 0.000 | 0.015** | 0.095** | Pgi-2 | 135 | 144 | 99 |
| b | 0.000 | 0.007* | 0.000 | d | 0.000 | 0.000 | 0.010* |
| c | 0.009 | 0.250 | 0.216 | e | 0.041 | 0.004 | 0.010 |
| d | 0.026 | 0.054 | 0.137 | i | 0.959 | 0.983 | 0.980 |
| e | 0.718 | 0.583 | 0.042 | j | 0.000 | 0.014* | 0.000 |
| f | 0.068** | 0.000 | 0.390** | Pgm-2 | 124 | 88 | 85 |
| g | 0.128 | 0.087 | 0.116 | a | 0.057 | 0.097 | 0.135 |
| h | 0.034 | 0.004 | 0.005 | b | 0.157 | 0.171 | 0.324 |
| i | 0.017* | 0.000 | 0.000 | c | 0.686 | 0.511 | 0.459 |
| Est-2 | 120 | 144 | 99 | d | 0.101 | 0.222 | 0.082 |
| a | 0.958 | 1.000 | 0.980 | Pgm-3 | 133 | 144 | 91 |
| b | 0.042** | 0.000 | 0.020** | b | 0.000 | 0.000 | 0.286* |
| Idh-1 | 108 | 80 | 94 | c | 0.053 | 0.007 | 0.082 |
| a | 0.042* | 0.000 | 0.000 | d | 0.940 | 0.927 | 0.632 |
| b | 0.958 | 1.000 | 1.000 | e | 0.008** | 0.066** | 0.000 |
| Mdh-1 | 108 | 125 | 85 | Skd-1 | 44 | 72 | 25 |
| a | 0.023 | 0.016 | 0.077 | a | 0.000 | 0.035* | 0.000 |
| b | 0.472 | 0.600 | 0.547 | b | 0.000 | 0.104* | 0.000 |
| c | 0.505 | 0.384 | 0.377 | c | 0.807 | 0.826 | 0.960 |
| Mdh-2 | 105 | 124 | 83 | d | 0.193 | 0.035 | 0.040 |
| a | 0.238 | 0.202 | 0.247 | | | | |
| b | 0.762 | 0.798 | 0.753 | | | | |

Tabla 3.- Frecuencias alélicas de los 13 *loci* isoenzimáticos interpretados consistentemente para las tres poblaciones muestreadas de *P. ornata*. N: tamaño de muestra por *locus* y por población; * indica los alelos exclusivos y ** indica alelos compartidos por dos poblaciones.

Los indicadores básicos de variabilidad genética se muestran en la Tabla 4. La proporción más baja de *loci* polimórficos fue detectada en las poblaciones POV y POM ($P = 61.5\%$), y la más alta en POS ($P = 69.2\%$), con un valor medio de $P =$

64.1%. El número medio de alelos por locus fue $A_l = 2.9$, con un mínimo de $A_l = 2.8$ en POV y POM y un valor máximo de $A_l = 3.2$ en POS. El valor de la heterocigosidad esperada variaba desde $H_e = 0.262$ en POV hasta $H_e = 0.327$ en POM, con una media poblacional de $H_e = 0.288$, que superó al valor de la heterocigosidad observada, cuya media en las poblaciones fue de $H_o = 0.184$, variando desde $H_o = 0.157$ en POS hasta $H_o = 0.215$ en POM.

| Población | Cód | T | P | Indicadores básicos | | | | F | t | P:O |
|----------------------|-----|----|------|---------------------|--------------|------------------|------------------|-------|-------|--------------|
| | | | | A_l | A_e | H_o | H_e | | | |
| Barranco Tirajana | POS | 41 | 69.2 | 3.2 (0.4) | 1.5 (0.4) | 0.157 (0.052) | 0.274 (0.054) | 0.375 | 0.473 | 5624 (XO) |
| Barranco Vicentillos | POV | 35 | 61.5 | 2.8 (0.4) | 1.5 (1.5) | 0.180 (0.056) | 0.262 (0.067) | 0.311 | 0.525 | 4075 (XO) |
| Barranco Mogán | POM | 37 | 61.5 | 2.8 (0.4) | 1.8 (0.9) | 0.215 (0.075) | 0.327 (0.075) | 0.444 | 0.385 | 6598 (XO) |
| Media | | | 64.1 | 2.9 | 1.6 | 0.184 | 0.288 | 0.371 | 0.461 | |

Tabla 4.- *P. ornata*: indicadores básicos de variabilidad y ratio Polen:Óvulo. T: n° total de alelos observados; P: proporción de loci polimórficos; A_l : n° medio de alelos por locus; A_e : n° de alelos efectivos; H_o y H_e , heterocigosidad observada y esperada; F: índice de fijación; t: tasa de alogamia. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. P:O: ratio Polen:Óvulo de Cruden; XO: xenogamia obligada (FERNÁNDEZ-PALACIOS, PÉREZ de PAZ y FEBLES, sin publicar).

El test de Chi cuadrado no señaló ningún loci en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 5) mostrando exceso de heterocigotos en tres loci de POS (*Pgi-2*, *Acp-2*, *Mdh-1*) y POV (*Pgi-2*, *Mdh-1*, *Pgm-3*) y el resto exceso de homocigotos; POM, que casi alcanza el equilibrio en *Pgi-2*, presenta exceso de heterocigotos en *Mdh-1*.

| POBLACIÓN | Equilibrio Hardy Weinberg | | | | | |
|--------------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | POS | | POV | | POM | |
| LOCUS | X^2 | P | X^2 | P | X^2 | P |
| <i>Acp-1</i> | 205.3 | 0.000 | 0.0 | 0.917 | 0.0 | 0.940 |
| <i>Acp-2</i> | 0.0 | 0.948 | 93.7 | 0.000 | 77.4 | 0.000 |
| <i>Est-1</i> | 205.3 | 0.000 | 177.9 | 0.000 | 281.5 | 0.000 |
| <i>Est-2</i> | 45.3 | 0.000 | --- | --- | 131.3 | 0.000 |
| <i>ldh-1</i> | 4.5 | 0.035 | --- | --- | --- | --- |
| <i>Mdh-1</i> | 34.3 | 0.000 | 46.0 | 0.000 | 57.5 | 0.000 |
| <i>Mdh-2</i> | 50.3 | 0.000 | 1.3 | 0.253 | 3.2 | 0.072 |
| <i>Mdh-3</i> | 51.3 | 0.000 | 5.3 | 0.022 | 43.5 | 0.000 |
| <i>Me-1</i> | 110.7 | 0.000 | 63.0 | 0.000 | 49.3 | 0.000 |
| <i>Pgi-2</i> | 0.2 | 0.639 | 46.8 | 0.000 | 0.0 | 0.999 |
| <i>Pgm-2</i> | 23.6 | 0.001 | 26.4 | 0.000 | 33.0 | 0.000 |
| <i>Pgm-3</i> | 17.4 | 0.001 | 0.8 | 0.839 | 13.2 | 0.004 |
| <i>Skd-1</i> | 39.9 | 0.000 | 136.2 | 0.000 | 49.0 | 0.000 |

Tabla 5-Test de Chi-cuadrado (X^2) para las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) en las tres poblaciones muestreadas. P: probabilidad del test.

Las poblaciones mas cercanas geográficamente POS-POV (7.7 Km) muestran los valores máximos de identidad genética ($I_{NEI} = 0.989$) y flujo génico ($N_m = 14.2$) mientras que solo comparten de forma exclusiva un alelo. De la misma manera las poblaciones mas alejadas POS-POM (25.2 Km) al mismo tiempo que presentan el menor flujo génico e identidad genética ($N_m = 3.2$, $I_{NEI} = 0.935$) comparten de forma

exclusiva cuatro alelos (Tablas 3 y 9). Sin embargo los resultados del test de Mantel, no mostraron correlación entre la matriz de distancia geográfica y las matrices de dichos parámetros (datos no mostrados).

La estructura de la diversidad genética analizada mediante los estadísticos de NEI (1973) y los *F* estadísticos de WRIGHT (1951) así como el test de neutralidad se muestran en la Tabla 6. La diversidad genética total (H_T) presenta un valor medio de 0.306, oscilando entre un máximo de $H_T = 0.732$ en el *locus Est-1* y un mínimo de $H_T = 0.027$ en *Idh-1*. La media de G_{ST} para todos los *loci* polimórficos estudiados fue de 0.067 con un rango de $G_{ST} = 0.002$ (*Mdh-2*) a $G_{ST} = 0.178$ (*Est-1*). Los valores medios de los *F* estadísticos son $F_{IT} = 0.402$, $F_{IS} = 0.360$ y $F_{ST} = 0.065$. En ambos casos se observa que el componente intra-poblacional contribuye más a la diversidad total que el inter-poblacional.

| Locus | Test de neutralidad Ewens-Watterson | | | Nei (1973) | | | | Wright (1951) | | |
|--------------|--|-------|-------|------------|-----------|------------|------------|---------------|------------|------------|
| | Mean | L95 | U95 | <i>Hs</i> | <i>Ht</i> | <i>Dst</i> | <i>Gst</i> | <i>Fis</i> | <i>Fit</i> | <i>Fst</i> |
| <i>Acp-1</i> | 0.668 | 0.349 | 0.976 | 0.054 | 0.055 | 0.001 | 0.021 | 0.077 | 0.096 | 0.021 |
| <i>Acp-2</i> | 0.754 | 0.407 | 0.992 | 0.108 | 0.121 | 0.012 | 0.102 | 0.829 | 0.846 | 0.102 |
| <i>Est-1</i> | 0.413 | 0.204 | 0.777 | 0.602 | 0.732 | 0.130 | 0.178 | 0.579 | 0.654 | 0.178 |
| <i>Est-2</i> | 0.857 | 0.503 | 0.997 | 0.040 | 0.040 | 0.001 | 0.014 | 0.721 | 0.725 | 0.014 |
| <i>Idh-1</i> | 0.856 | 0.503 | 0.997 | 0.027 | 0.027 | 0.001 | 0.028 | 0.188 | 0.211 | 0.028 |
| <i>Mdh-1</i> | 0.750 | 0.395 | 0.991 | 0.522 | 0.529 | 0.007 | 0.013 | -0.377 | -0.359 | 0.013 |
| <i>Mdh-2</i> | 0.858 | 0.505 | 0.997 | 0.352 | 0.353 | 0.001 | 0.002 | 0.332 | 0.334 | 0.002 |
| <i>Mdh-3</i> | 0.650 | 0.342 | 0.974 | 0.495 | 0.526 | 0.032 | 0.060 | 0.365 | 0.403 | 0.060 |
| <i>Me-1</i> | 0.620 | 0.327 | 0.954 | 0.381 | 0.390 | 0.009 | 0.023 | 0.911 | 0.913 | 0.023 |
| <i>Pgi-2</i> | 0.667 | 0.339 | 0.976 | 0.051 | 0.051 | 0.000 | 0.009 | 0.062 | 0.070 | 0.009 |
| <i>Pgm-2</i> | 0.661 | 0.344 | 0.977 | 0.601 | 0.621 | 0.020 | 0.032 | 0.273 | 0.296 | --- |
| <i>Pgm-3</i> | 0.679 | 0.348 | 0.981 | 0.254 | 0.294 | 0.040 | 0.137 | 0.167 | 0.281 | 0.137 |
| <i>Skd-1</i> | 0.624 | 0.334 | 0.958 | 0.231 | 0.244 | 0.013 | 0.052 | 0.827 | 0.836 | 0.052 |
| Media | | | | 0.286 | 0.306 | 0.021 | 0.067 | 0.360 | 0.402 | 0.065 |

Tabla 6.- Test de neutralidad Ewens-Watterson y estadísticos de estructura de población según Nei (1973) y Wright (1951) para los 13 *loci* analizados en *P. ornata*.

El test de neutralidad no resultó significativo para ninguno de los *loci* indicando que no ha habido presión selectiva. Asimismo, los resultados del test del cuello de botella (datos no mostrados).no señalan la existencia de cuellos de botella recientes en ninguna de las tres poblaciones (sin desviaciones en los modelos IAM de alelos independientes ni en el de stepwise mutation, SMM).

Las probabilidades de pérdida observada y esperada (L_o y L_e) para los 11 alelos incluidos en este análisis se muestran en la Tabla 7. El cociente entre las pendientes de las dos líneas de regresión de las frecuencias alélicas medias y las probabilidades de pérdida $[-\log(L_o)$ y $-\log(L_e)$] resultó en un valor de representatividad de $R = 0.334$ (Fig. 5), lo que indica que el muestreo genético en una sola población representaría el 33.4% del total de alelos raros detectados en *P. ornata*.

| Alelo | N | P | L_o | L_e | Área de muestreo preferencial |
|---------------|---|-------|-------|-------|-------------------------------|
| <i>Acp-1d</i> | 1 | 0.049 | 0.905 | 0.742 | POS |
| <i>Acp-1e</i> | 1 | 0.005 | 0.990 | 0.971 | POS |
| <i>Acp-2e</i> | 1 | 0.009 | 0.983 | 0.950 | POS |
| <i>Est-1b</i> | 1 | 0.007 | 0.986 | 0.957 | POV |
| <i>Est-1i</i> | 1 | 0.017 | 0.966 | 0.902 | POS |
| <i>Idh-1a</i> | 1 | 0.042 | 0.918 | 0.775 | POS |
| <i>Mdh-3d</i> | 1 | 0.044 | 0.915 | 0.765 | POS |
| <i>Me-1d</i> | 1 | 0.043 | 0.917 | 0.770 | POS |
| <i>Pgi-2d</i> | 1 | 0.010 | 0.980 | 0.941 | POM |
| <i>Pgi-2j</i> | 1 | 0.014 | 0.972 | 0.920 | POV |
| <i>Skd-1a</i> | 1 | 0.035 | 0.932 | 0.809 | POV |

Tabla 7.- Probabilidades de pérdida por muestreo observada y esperada (L_o y L_e) para los 11 alelos incluidos en el análisis. N: número de poblaciones donde se detectó el alelo correspondiente; P: frecuencia alélica media de las tres poblaciones muestreadas. Área muestreada preferencial que se corresponde con la población donde el alelo correspondiente mantiene la frecuencia más alta.

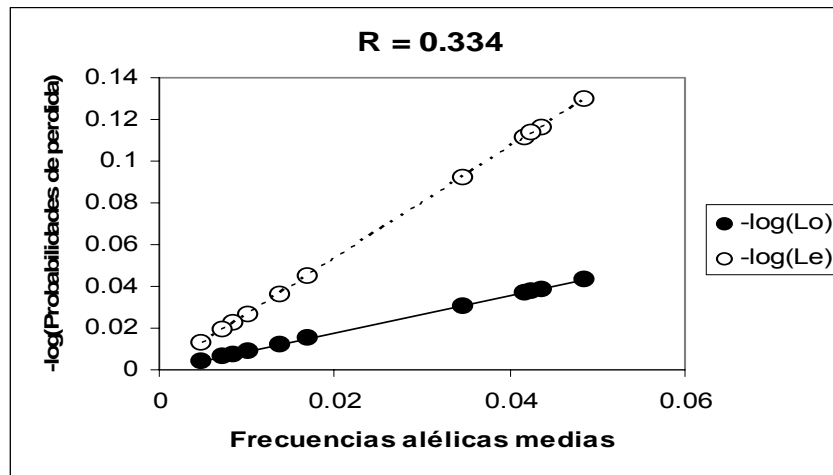


Figura 5.- Líneas de regresión de la frecuencia alélica media (eje X) con $-\log(L_o)$ (círculos negros) y $-\log(L_e)$ (círculos blancos) para los 20 alelos raros analizados. Valor de representatividad $R = 0.334$.

Los resultados del análisis de autocorrelación espacial, se muestran en la Tabla 8 y la Figura 6. Del total de los alelos analizados en las tres poblaciones, resultaron significativos a corta distancia, el 80 % en POV y solo el 5% y 4.2% en POS y POM respectivamente. En la primera clase de distancia, la proporción de alelos que están autocorrelacionados osciló entre el 50% (POS con $IM = 0.065$) y el 100% (POV con $IM = 0.175$), siendo inapreciables los valores de POM.

| Población/alelos | Clase de Distancia | | | | | CP |
|-----------------------------------|--------------------|---------|---------|---------|---------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| POS (20, 182.6) | | | | | | |
| <i>Mdh-2a</i> | 0.10** | 0.020 | -0.14** | -0.020 | 0.010 | 0.000 |
| <i>Pgm-3d</i> | 0.030 | -0.07** | 0.000 | -0.010 | 0.000 | 0.011 |
| Media significativa (<i>IM</i>) | 0.065 | -0.025 | -0.070 | -0.015 | 0.005 | |
| Media total | -0.010 | -0.010 | -0.010 | -0.010 | 0.000 | |
| Distancia límite (m) | 99 | 249 | 422 | 1332 | 1875 | |
| POV (20,59.5) | | | | | | |
| <i>Est-1c</i> | 0.05** | 0.010 | 0.030* | -0.020 | -0.11** | 0.000 |
| <i>Est-1d</i> | 0.04** | -0.05** | 0.03* | -0.05* | 0.000 | 0.018 |
| <i>Est-1e</i> | 0.28** | -0.24** | 0.11** | -0.19** | 0.020 | 0.000 |
| <i>Est-1g</i> | 0.35** | 0.04* | -0.28** | -0.17** | 0.03** | 0.000 |
| <i>Mdh-1b</i> | 0.10** | 0.010 | -0.030 | -0.10** | -0.05** | 0.000 |
| <i>Mdh-2a</i> | 0.19** | -0.09** | -0.09** | 0.010 | -0.09** | 0.000 |
| <i>Mdh-3b</i> | 0.13** | 0.040 | -0.040 | -0.050 | -0.06* | 0.004 |
| <i>Mdh-3c</i> | 0.27** | -0.050 | -0.10** | -0.050 | -0.06* | 0.000 |
| <i>Me-1a</i> | 0.09** | -0.06* | 0.050 | -0.12** | -0.030 | 0.000 |
| <i>Me-1b</i> | 0.18** | 0.030 | -0.09* | -0.10** | -0.18** | 0.000 |
| <i>Pgm-2a</i> | 0.18** | -0.09** | 0.08** | -0.19** | -0.030 | 0.000 |
| <i>Pgm-2b</i> | 0.18** | -0.21** | 0.12** | -0.09** | -0.030 | 0.000 |
| <i>Pgm-2c</i> | 0.25** | -0.010 | -0.20** | 0.000 | -0.07** | 0.000 |
| <i>Pgm-2d</i> | 0.12** | 0.000 | -0.11** | 0.000 | -0.04** | 0.000 |
| <i>Pgm-3d</i> | 0.29** | 0.08** | -0.03 | -0.16** | -0.23** | 0.000 |
| <i>Pgm-3e</i> | 0.10** | -0.16** | 0.04** | 0.000 | -0.010 | 0.000 |
| Media significativa (<i>IM</i>) | 0.175 | -0.047 | -0.032 | -0.080 | -0.058 | |
| Media total | 0.150 | -0.040 | -0.030 | -0.070 | -0.060 | |
| Distancia límite (m) | 35 | 72 | 127 | 213 | 557 | |
| POM (24,-) | | | | | | |
| <i>Me-1b</i> | -0.010 | 0.020 | 0.05* | -0.040 | -0.09** | 0.017 |
| Media significativa (<i>IM</i>) | -0.010 | 0.020 | 0.05* | -0.040 | -0.09** | |
| Media total | -0.030 | -0.010 | -0.010 | -0.010 | -0.010 | |
| Distancia límite (m) | 52 | 107 | 1665 | 1739 | 1860 | |

Tabla 8.- Valores del índice I de Morán para cada una de las cinco clases de distancias en las que los alelos suministraron información no redundante en las tres poblaciones muestreadas de *P. ornata* (POS-POV-POM). CP: probabilidad del correlograma. Solo se muestran los alelos que dieron correlogramas significativos (CP < 0.05). Las cifras entre paréntesis separados por una coma después del código de la población muestran el nº total de alelos sujetos al análisis y el punto de intersección con el eje X (en metros).

Los correlogramas medios multibandas de estas poblaciones mostraron que solamente POV presentó un declive monótonico general de los valores de la I de Moran a través de las cinco clases de distancia, con una disminución entre la primera y la segunda de 0.22 unidades. El rango de intersección del eje X del correlograma para las poblaciones que exhibían valores positivos de *IM* para la primera distancia de clase variaba desde 59.5 metros en POV hasta 182.6 m en POS (Figura 6). El valor medio de intersección del eje X para todas las poblaciones estudiadas fue de 121.04 m.

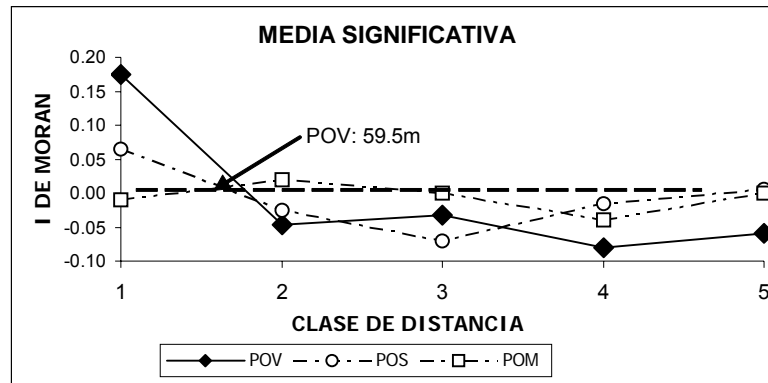


Figura 6.- Correlograma medio de los alelos que resultaron significativos.

DISCUSIÓN

Duplicaciones genéticas

Hasta el momento, se ha considerado que las siete especies que conforman el género *Parolinia* son diploides con número básico $x = 11$ (BORGÉN, 1969; BRAMWELL *et al.*, 1972; FEBLES, 1989; FEBLES sin publicar).

La presencia de duplicaciones génicas en la familia Brassicaceae tanto en taxones diploides como poliploides (BROCHMANN, 1993; BORGÉN, 1997; HURKA & NEUFFER, 1997, ANDERSON & WARWICK, 1999; NEUFFER & HOFFROGGE, 2000; SIMILLION *et al.*, 2002 etc.) sugiere la posibilidad de que los patrones complejos de bandas en *Parolinia*, en el que no se descarta un origen aloploide muy antiguo, se puedan considerar como evidencias indirectas de duplicaciones génicas apoyadas: (i) por la aparición de un mayor número de electromorfos de los esperados (MDH, PGI y PGI), (ii) por la detección de más *loci* de los esperados (MDH y PGM) y (iii) por la presencia de heterocigotos asimétricos (IDH, MDH, PGI y PGM) o heterocigotos con bandas de desigual intensidad (Figuras 3-4). Asimismo se ha considerado evidencia indirecta de duplicaciones, la presencia de bandas fantasmas asociadas a posibles silenciaciones genéticas de antiguas duplicaciones, que además son consideradas de gran importancia filogenética (GOTTLIEB, 1982; CRAWFORD, 1989; WERTH *et al.*, 1993). Esta es la razón que evidencia la necesidad de conocer la diversidad y estructura genética de aquellos géneros más directamente relacionados, *Diceratella* Boiss. y *Morettia* DC, componentes de la disyunción Macaronésica-Sáhara-Síndica y África del Este, fundamentada por compartir con *Parolinia* el número de cromosomas ($2n = 22$) y el tipo polínico en relación al modelo de ornamentación exínica (JONSELL 1978, 1979; PÉREZ DE PAZ, 1980; BRAMWELL, 1986), relación reforzada recientemente para *Diceratella* por la filogenia molecular a partir de *trnH-psbA* e ITS (JAÉN *et al.*, 2005 y 2006).

En otros componentes de la tribu Matthioleae, la presencia de duplicaciones genéticas se ha manifestado también tanto en taxones canarios como mediterráneos del género *Matthiola* R.Br (SANCHEZ *et al.*, 2004 y 2005) y

asimismo en otros representantes de la familia Brassicaceae en Canarias como *Lobularia* Desv ($2n=22$) y *Erysimum* L (*E. albescens* endemismo tetraploide con $2n=28$) de la tribu Alysseae y Hesperideae respectivamente (BORGÉN, 1987 y 1997; VILCHES *et al.*, 2002), incluso también en otros taxones macaronésicos diploides y/o tetraploides de otras familias, como en Fabaceae el género *Lotus* L. (OLIVA *et al.*, 2004) y en Asteraceae el género *Tolpis* Adans (CRAWFORD *et al.*, 2006).

Niveles de diversidad y estructura genética

En relación a la diversidad genética observada en *P. ornata*, el hecho de que el conjunto de las tres poblaciones de esta especie, sólo compartan 29 de los 49 alelos interpretados, sugiere:

a) que su aislamiento geográfico ha sido lo suficientemente intenso como para generar una considerable diferenciación genética cualitativa, hecho que además se vería favorecido por la consideración de los barrancos como barrera geográfica de aislamiento que reduce o impide teóricamente el flujo génico entre poblaciones.

b) la posibilidad de una correlación positiva entre el número de alelos exclusivos y antigüedad del hábitat, como han sugerido algunos autores para otros casos (WESTERBERGH & SAURA, 1994; Elisens & Crawford en BORGÉN, 1997; BORGÉN, 1997). Bajo esta perspectiva se puede señalar a POS como población más antigua por exhibir 7 alelos exclusivos frente a POV y POM, con cuatro y dos alelos exclusivos respectivamente (Tabla 3). No obstante, hay que señalar también que POS posee la mayor talla poblacional distribuida aisladamente a lo largo del cauce del barranco de forma más o menos homogénea, exhibiendo también los valores más altos de indicadores básicos (A_i y P) de variabilidad genética (Tabla 4).

Aunque las tres poblaciones muestreadas solo comparten el 59% de los alelos, los valores medios de identidad genética ($I_{NEI} = 0.96$) y de flujo génico ($N_m = 7.3$) se mantienen elevados y dentro del rango de poblaciones co-específicas (WELLER, SAKAI & STRAUB, 1996; GEMMILL *et al.*, 1998; FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000; CRAWFORD *et al.* 2001, 2006) indicando por tanto una elevada cohesión genética (Tabla 9 y Figura 7) en relación a PPG ($I_{NEI} = 0.91-0.92$) y PGB ($I_{NEI} = 0.73-0.78$) no existiendo flujo génico con PGB ($N_m = (0.6-0.8) < 1$) y muy escaso con PPG ($N_m = 2.3-2.6$).

Estos resultados, que sugieren la existencia de intercambio de migrantes (polen/semillas) entre las poblaciones de *P. ornata*, se pueden explicar por el gran poder de dispersión de las semillas aladas de *Parolinia* (BRAMWELL, 1986) a pesar de los barrancos, cuya orografía en este caso, no ha constituido al parecer un aislamiento insalvable (Figura 2b). Este aspecto permite además pensar que el intercambio genético entre las poblaciones de *P. ornata* ha ocurrido en el pasado de forma más intensa que en el presente, como ha sucedido en otras ocasiones (EHLERS & PEDERSEN, 2000; GRIFFIN & BARRETT, 2004; LEDIG, HODGSKISS & JOHNSON, 2005). De cualquier manera, la estimación indirecta del flujo génico obtenida partir del F_{ST} , se debe tomar con precaución ya que no deja de ser un modelo matemático que puede no contemplar la realidad biológica de las poblaciones naturales (SLATKIN, 1994; WHITLOCK & McCAULEY, 1999).

| Poblaciones | Distancia geográfica | Altitud máxima | N_m | I_{NEI} | D_{NEI} | Alelos compartidos |
|-------------|----------------------|----------------|-------|-----------|-----------|--------------------|
| PGB-PPG | 12.3 | 1043 | 1.0 | 0.815 | 0.204 | 1 (21) |
| PGB-POS | 20.2 | 1320 | 0.6 | 0.729 | 0.316 | 0 (19) |
| PGB-POV | 23.5 | 1475 | 0.6 | 0.752 | 0.285 | 1 (18) |
| PGB-POM | 37.9 | 1900 | 0.8 | 0.782 | 0.246 | 0 (19) |
| PPG-POS | 8.2 | 1206 | 2.4 | 0.916 | 0.088 | 1 (33) |
| PPG-POV | 12 | 1284 | 2.3 | 0.915 | 0.089 | 2 (31) |
| PPG-POM | 29.4 | 1421 | 2.6 | 0.912 | 0.092 | 1 (33) |
| POS-POV | 7.7 | 1037 | 14.2 | 0.989 | 0.011 | 1 (30) |
| POS-POM | 25.2 | 1008 | 3.2 | 0.935 | 0.065 | 4 (33) |
| POV-POM | 18.5 | 961 | 4.3 | 0.954 | 0.046 | 2 (30) |

Tabla 9.- Distancia geográfica en km, altitud máxima entre las poblaciones en metros, flujo génico (N_m), identidad (I_{NEI}), distancia genética (D_{NEI}) y alelos compartidos de forma exclusiva por los pares de poblaciones (los números entre paréntesis son los alelos comunes a las tres especies).

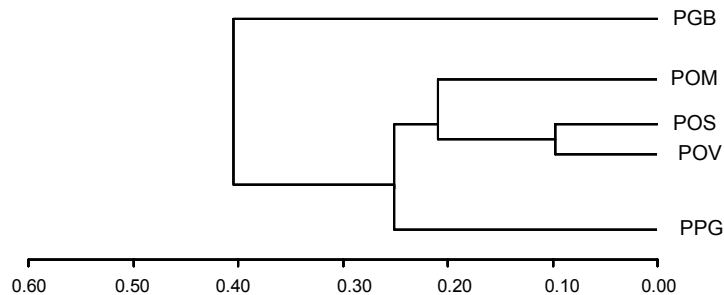


Figura 7.- El Cluster UPGMA de *P. ornata*, *P. platypetala* y *P. glabriuscula*, según distancias genéticas de Nei (1978) muestra una posible correlación con la distancia geográfica y barreras orográficas de aislamiento.

Diversidad genética y sistemas de cruzamiento

Los valores superiores de F_{IS} (36.6%) y H_s (28.6%) frente a F_{ST} (6.5%) y G_{ST} (6.7%) indican que la mayor parte de la diversidad genética detectada reside dentro de las poblaciones, lo cual es característico de poblaciones alógamas. En las poblaciones de *P. ornata* dichos resultados (Tablas 4 y 10) se refuerzan por los niveles de alogamia obtenidos según el ratio Polen:Óvulo (CRUDEN, 1977) que superan tanto el rango para xenogamia obligada (2108 – 195525) como el valor mínimo (3500) de alogamia para 66 taxones de Brassicaceae (PRESTON, 1986).

A pesar de que todo indica que *P. ornata* es fundamentalmente alógama, en las tres poblaciones estudiadas, la ausencia de equilibrio HW en la mayoría de los *loci* estudiados y los valores positivos del índice de fijación F_i , revelan un exceso de homocigotos (Tablas 4 y 5). Esto podría tener justificación en *P. ornata* por el valor de la tasa de alogamia (t) menor a la de sus congéneres, reflejo de la flexibilidad

del sistema de auto-incompatibilidad esporófito homomórfico (SSI) que en esta especie de mayor tamaño poblacional, permite más apareamientos entre individuos allegados debido a un mayor número de alelos S que no comparten (RICHARDS, 1997; GIBBS, 1986 y 1988; BARRETT, 1988; BYERS & MEAGHER, 1992), configurando así una descendencia con una gran variabilidad genética al mismo tiempo que se favorecen los homocigotos.

Aun así, como apuntan algunos autores (NEI, 1987; CESKA, AFFOLTER & HAMRICK, 1997; WILLIAMSON & WERTH, 1999; SILVERTOWN & CHARLESWORTH, 2001) en especies alógamas auto-incompatibles, la aparición de *loci* con exceso de homocigotos puede ocurrir en poblaciones genéticamente estructuradas según núcleos o subpoblaciones con escaso flujo genético (efecto Wahlund) lo que sugiere que las poblaciones de *P. ornata* pueden ser núcleos o fragmentos de lo que alguna vez fue un *pool* genético continuo, revelando para el conjunto muestreado la condición de *población fragmentada*. Esta hipótesis se vería apoyada por la detección de altos valores de identidad (0.94-0.99), de flujo génico (3.2-14.2) y mayor número de alelos compartidos por las poblaciones más distantes, frente al número de alelos exclusivos en cada población (Tablas 3, 9 y Fig.2), donde la fuerte influencia antrópica de esa zona de la isla de Gran Canaria, con intensa reducción de la talla de las poblaciones naturales, justificaría la fragmentación en *P. ornata*.

Asimismo, los resultados obtenidos en los cruzamientos experimentales de auto-polinización en distintas especies de *Parolinia* según la producción de semillas (*P. ornata*: 3-21%, *P. platypetala*: 2-7% y *P. glabriuscula*: 0-4%) señalan a *P. ornata* como ligeramente auto-compatible según las clases de KARRON (1987) y DAFNI (1992), con mayor posibilidad de cruzamientos mixtos que permiten la autogamia y por tanto justificarían el exceso de homocigotos en esta especie. Estos resultados se justifican además, porque también en *Parolinia*, el control de este sistema de auto-incompatibilidad (SSI) con distinto grado de actuación está dependiendo de la talla poblacional, ya que el mayor número de alelos S de las poblaciones grandes pueden aumentar la frecuencia de apareamientos viables entre individuos (RICHARDS, 1986 y 1997; GIBBS, 1986 y 1988; BARRETT, 1988; BYERS & MEAGHER, 1992; FERNÁNDEZ-PALACIOS, PEREZ DE PAZ & FEBLES, en preparación).

Los resultados no significativos del test de Neutralidad indican la ausencia de presiones selectivas y señalan que la fuerza responsable de la mayor parte de la variabilidad genética detectada puede ser la mutación, asociada a un origen antiguo de la especie. Sin embargo, hay que señalar que el mayor ratio Polen: Óvulo en *P. ornata* (5.432) frente a las otras dos especies no se corresponde con los valores mínimos de la tasa de alogamia t (0.43). Esto último reflejaría la menor tasa de mutación de los caracteres implicados en los recursos del androceo y gineceo (número de granos de polen y de óvulos) que permanecerían más conservativos que la evolución de los sistemas de cruzamiento asociados a la tasa de alogamia t (Tablas 4 y 10) en consonancia además, como se ha comentado anteriormente, con la flexibilidad del sistema de auto-incompatibilidad homomórfico (SSI) en relación a la talla de las poblaciones.

| TAXON | Nº pob | Indicadores básicos de variabilidad | | | | | | Sistemas de cruzamiento e índices de alogamia | | |
|-----------------------|--------|-------------------------------------|------|----------------|----------------|------------------|------------------|---|-------|--------------|
| | | T | P | A _i | A _e | H _o | H _e | F | t | P:O |
| <i>P.ornata</i> | 3 | 49 | 69.2 | 3.8 (0.5) | 1.6 (0.7) | 0.182 (0.057) | 0.301 (0.066) | 0.401 | 0.427 | 5432 (XO) |
| <i>P.glabriuscula</i> | 1 | 25 | 53.8 | 2.1 (0.3) | 1.3 (0.4) | 0.183 (0.069) | 0.177 (0.059) | -0.008 | 1.016 | 3697 (XO) |
| <i>P.platypetala</i> | 1 | 40 | 69.2 | 3.2 (0.4) | 1.7 (0.7) | 0.245 (0.068) | 0.321 (0.063) | 0.193 | 0.677 | 3715 (XO) |

Tabla 10.- Comparación de parámetros de variabilidad y sistemas de cruzamiento o índices de alogamia de las tres especies de *Parolinia*. T: nº total de alelos observados; P: proporción de loci polimórficos; A_i: nº medio de alelos por locus; A_e: nº de alelos efectivos; H_o y H_e: heterocigosidad observada y esperada; F índice de fijación y t: tasa de alogamia; P:O: ratio Polen:Óvulo de Cruden; XO: xenogamia obligada.(FERNÁNDEZ-PALACIOS, PÉREZ de PAZ y FEBLES, sin publicar).

Los cálculos de probabilidad de pérdida ($R = 0.334$) estiman que el muestreo aleatorio de una población capturaría menos de la mitad (33.4%) de los alelos raros detectados, lo que subraya que para representar la variabilidad genética de *P. ornata* se debe muestrear las tres poblaciones analizadas, ya que además sólo comparten 29 de los 49 alelos detectados.

Filogenia, sistemas de cruzamiento y diversidad genética

Por último, ante los resultados obtenidos, señalar y reforzar como evidencia también en Canarias que la adscripción filogenética (principalmente referida a familia y género) y sistema de cruzamiento tienen más influencia en los niveles de biodiversidad de las especies que el rango o distribución geográfica y tamaño poblacional (PÉREZ DE PAZ *et al.*, sin publicar):

(i) La evaluación genética de *P. ornata* pone de manifiesto que esta especie, a pesar de estar más ampliamente distribuida en Gran Canaria, los indicadores básicos apenas superan a *P. platypetala* y *P. glabriuscula*, ambas con una única población en la isla (Tabla 10).

(ii) La comparación de las poblaciones de *P. ornata* en relación a la población de *P. glabriuscula* (PGB) y *P. platypetala* (PPG) según el número de individuos (Tablas 4 y 10) indica que:

a) Las poblaciones de mayor talla, POS (*P. ornata*) y PPG (*P. platypetala*) presentan idénticos valores, tanto en el % de loci polimórficos ($P = 69.2$) como en el número medio de alelos por locus ($A_i = 3.2$) superando ligeramente a las poblaciones más pequeñas. b) En las poblaciones más pequeñas (POM y PGB), se observan valores ligeramente más bajos de diversidad genética, no obstante POM supera (H_e) a *P. glabriuscula* (PGB) y es similar a POV con talla poblacional intermedia; a su vez supera a las dos mayores (PPG y POS) no solamente en los heterocigotos esperados (H_e) sino también en A_e o número de alelos efectivos (Tablas 3 y 10).

A pesar de que se observan ligeras diferencias en la diversidad genética de las tres especies de *Parolinia*, no representan ni justifican el diferente rango de distribución ni talla poblacional.

(iii) Evidencias en otros géneros de Brassicaceae y de otras familias dentro y fuera de Canarias:

Los parámetros básicos de variabilidad genética, como el % de loci polimórficos (P), número de alelos por locus (A_i) y la heterocigosidad media esperada (H_e) en

P. ornata, así como de *P. platypetala* y *P. glabriuscula* indican niveles de diversidad genética considerablemente altos, si se comparan con los valores detectados en otras Brassicaceae y según los niveles de diversidad en relación a los sistemas de cruzamiento, número de cromosomas y rangos de distribución geográfica:

a) Dentro de Brassicaceae: en la tribu Matthioleae, los indicadores básicos de las tres especies de *Parolinia*, siendo similares a los de las 8 poblaciones canarias de *Matthiola bolleana* ($2n=12$), superan sin embargo a los cinco taxones mediterráneos de *Matthiola* con mayor rango geográfico (VAN LOOM, 1974; SÁNCHEZ *et al.*, 2004 y 2005; IPCN, 2006) alguno de ellos con mayor número de cromosomas que *M. bolleana*. Aunque sólo se ha confirmado el sistema de cruzamiento para dos taxones del género *Matthiola* (KUNIN & SHMIDA, 1997), los valores de variabilidad genética del taxon canario, podrían indicar que esta especie pudiera encontrarse entre los taxones xenógamos.

Fuera de Matthioleae y en taxones donde se ha verificado la auto-incompatibilidad (SSI), los cinco taxones canarios de *Lobularia canariensis* (Tabla 8) presentan valores ligeramente inferiores (BORGÉN, 1987 y 1997) a *Parolinia*, compartiendo además el mismo número de cromosomas y rango geográfico. Al igual que el anterior, en el género *Brassica* L. que presenta valores similares y ligeramente inferiores a *Parolinia* en consonancia quizás a su menor número de cromosomas, conviene señalar que una sola población del endemismo canario *B. bourgeauii*, puede superar a los taxones mediterráneos del género más ampliamente distribuidos (BORGÉN *et al.*, 1979; CHARLESWORTH & AWADALLA, 1998 LÁZARO & AGUINALDE, 1998; HATAKEYAMA *et al.*, 1998). La variabilidad genética de las 9 poblaciones estudiadas del endemismo grancanario *Erysimum albescens* (VILCHES *et al.*, 2002 y 2004) es considerablemente inferior a *Parolinia* a pesar de su amplia distribución y nivel de ploidía (4x), señalando una posible auto-compatibilidad como ocurre en otras especies del género (BORGÉN, 1969; NIETO FELINER, 1991) y donde la tetraploidía puede haber favorecido la posibilidad de ruptura del sistema de auto-incompatibilidad (RICHARDS, 1997; SANTOS VIEIRA & SHEPHERD, 1998; MILLER & VENABLE, 2002). Fuera de Canarias, solamente taxones auto-incompatibles de los géneros *Raphanus* L., *Leavenworthia* Torr., *Coincya* Rouy. y *Vella* L se acercan a los valores de *Parolinia*:

Los valores más altos de diversidad genética se encuentran en el género *Leavenworthia* (LYONS & ANTONOVICS, 1991; CHARLESWORTH & YANG, 1998; BUSCH, 2005a, b; BECK, AL-SHEHBAZ & SCHAAL, 2006; ANDERSON & BUSCH, 2006) que como *Parolinia* está formado por muy pocos endemismos restringidos, algunos de los cuales comparten el sistema de cruzamiento mixto e incluso el nº de cromosomas. Los máximos valores se observan en un taxon auto-incompatible (*L. stylosa*) con mayor número de cromosomas, mientras que los taxones auto-compatibles del género, apenas presentan variabilidad genética. *Coincya rupestris*, endemismo restringido de la Península Ibérica en estado crítico como *P. glabriuscula* y *P. platypetala* (BAÑARES *et al.*, 2003) supera los valores de diversidad genética (MASELLI, *et al.* 1999) en consonancia quizás con su mayor número de cromosomas. Por último, *Vella pseudocytisus* también endemismo restringido de la Península Ibérica presenta los máximos valores encontrados para la familia, que posiblemente encuentre justificación en el número de cromosomas y nivel de ploidía a pesar de la presencia de propagación

vegetativa por estolones (MASELLI, *et al.* 1999 y BAÑARES *et al.*, 2003). En la especie cosmopolita *Raphanus raphanistrum* los valores de las 6 poblaciones estudiadas (NANSON & ELLSTRAND, 1995; CONNER & STERLING, 1995; KERCHER & CONNER, 1996; GOODELL *et al.*, 1997; MARSHALL, 1998) superan a *Parolinia*, a pesar de su número de cromosomas más bajo.

Con valores similares de diversidad genética y mayor rango de distribución que *Parolinia*, los géneros *Diploaxis* DC. (RUSTAN, 1996; ESCHMANN-GRUPE *et al.* 2004) y *Streptanthus* Nutt. (PRESTON, 1991; MAYER, SOLTIS & SOLTIS, 1994; MOYLE, OLSON, TIFFIN, 2004; IPCN, 2006) podrían justificar su variabilidad por el sistema de auto-incompatibilidad (SSI) toda vez que la menor diversidad genética se observa en los taxones auto-compatibles independientemente del número de cromosomas observado.

Por el contrario, los valores ostensiblemente inferiores a *Parolinia* de *Arabis serrata* Fr. & Sav. (ROY, 1995; OYAMA, 1998; KÄRKKÄINEN *et al.*, 1999; IPCN, 2006) y *Warea carteri* Small (EVANS *et al.*, 2000; IPCN, 2006) estarían en consonancia con su auto-compatibilidad (SC) a pesar de su mayor rango de distribución geográfico y número de cromosomas.

b) Taxones de otras familias presentes en Canarias:

Superando a *Parolinia*, los dos taxones de *Olea* L. en Oleaceae (VASSILIADIS *et al.*, 2000; LUMARET *et al.*, 2004) y en Fabaceae el complejo *Chamaecytisus proliferus* (L. fil.) Link FRANCISCO-ORTEGA *et al.* 1992) todos ellos con n° de cromosomas elevado, presuntamente auto-incompatibles y rango variable de distribución. Con valores similares de diversidad genética, pero sin superar a *Parolinia*, algunos taxones de Asteraceae de los generos *Sonchus* L. y *Tolpis* (KIM *et al.*, 1999; CRAWFORD *et al.* 2006) en Plumbaginaceae, *Limonium* Mill. (SUAREZ *et al.*, en prep.), en Boraginaceae, *Echium* L. (BATISTA & SOSA, 1998 y MORA *et al.*, en prep.) en Fabaceae, *Lotus* (OLIVA *et al.*, 2004, 2005 y en prensa), todos ellos taxones auto-incompatibles, con menor n° de cromosomas que los anteriores y distribución restringida. Y por último, con valores inferiores a *Parolinia*, se pueden encontrar en Asteraceae, el género *Argyranthemum* Webb ex Sch. Bip. (FRANCISCO-ORTEGA *et al.* 1996) en Cistaceae, *Cistus* L. (BATISTA *et al.*, 2001) en Violaceae, *Viola* L. (BATISTA & SOSA, 2002), en Cneoraceae, *Neochamaelea* (Engl.) Erdtm. (LORENZO *et al.*, 2003) en Colchicaceae, *Androcymbium* Willd., (PEDROLA-MONFORT, & CAUJAPÉ-CASTELLS, 1994, 1996; MEMBRIVES, PEDROLA-MONFORT & CAUJAPÉ-CASTELLS, 2001) en Arecaceae *Phoenix* L. (GONZALEZ-PÉREZ, CAUJAPÉ-CASTELL & SOSA, 2004) y en Myricaceae el género *Myrica* L. (BATISTA & SOSA, 1998) taxones tanto auto-compatibles como auto-incompatibles, con número de cromosomas menor y distribución igualmente restringida.

c) En otras islas oceánicas se encuentran varios taxones xenógamos con valores similares o superiores a *Parolinia* en el género *Schiedea* Cham. & Schltdl. (Caryophyllaceae) en Hawaii que ostentan una fuerte evolución de los sistemas de cruzamiento (según sistemas sexuales de hermafroditismo, ginodioecia y dioecia) y talla poblacional superior a 100 individuos (WELLER, SAKAI & STRAV, 1996), así como dos taxones xenógamos (dioicos) en el género *Robinsonia* DC. (Asteraceae) en las islas de Juan Fernández (CRAWFORD *et al.* 2001) ambos con un número elevado de cromosomas (IPCN, 2006).

La alta variabilidad genética de los endemismos canarios en relación a otras floras oceánicas ya se ha comentado en varias ocasiones (FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000; CRAWFORD *et al.*, 2001, 2006). Además estos autores indican que dicha variabilidad tiene en el archipiélago de Hawaii los valores más cercanos a Canarias, en *Schieda* y *Alsinodendron* (Caryophyllaceae) donde además se encontraron fuertemente correlacionados al sistema de cruzamiento y tamaño poblacional (WELLER, SAKAI & STRAV, 1996). Hasta el momento la falta de datos en Canarias sobre la influencia de los sistemas de cruzamiento y de la talla poblacional en la variabilidad genética no ha sido posible.

La elevada diversidad genética detectada en endemismos vegetales Canarios se ha justificado por la elevada antigüedad de las islas y por su proximidad a las áreas continentales que puede propiciar el flujo génico con el continente (FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000; SILVERTOWN, 2004).

Según CRAWFORD *et al.* (2001) en las islas Juan Fernández, los resultados no concuerden con lo esperado según HAMRICK & GODT (1989), la variabilidad genética y estructuración de la diversidad encontrada no la consideran especialmente relacionadas a los sistemas de cruzamiento aunque debe ser un factor importante al contrario que la talla poblacional en Juan Fernández y no en canarias, admitiendo que en los endemismos insulares, la diversidad puede haber estado influenciados por otros factores históricos de naturaleza ecológico-reproductiva y filogenética. CRAWFORD *et al.* (2006) en el género *Tolpis* en Canarias encuentra una íntima correlación de la diversidad genética y sistemas de cruzamiento como WELLER, SAKAI & STRAV (1996) en Hawaii.

En Canarias, desde hace unos pocos años, al mismo tiempo que han aumentado considerablemente los datos de diversidad genética, aunque la mayoría de las veces no son absolutamente comparables por proceder de distintos grupos de investigación, distintos enzimas y parámetros (HAMRICK *et al.*, 1979; KARRON *et al.*, 1988; CRAWFORD *et al.*, 2001; ELGAR & CLODE, 2001; CULLEY *et al.* 2002), también se dispone de un mayor conocimiento de la biología reproductiva y sistemas de cruzamiento, según las distintas manifestaciones de los heteromorfismos florales que reflejan la actuación de los distintos sistemas sexuales y sistemas de auto-incompatibilidad en sus endemismos, aunque todavía de forma incompleta e insuficiente (PÉREZ DE PAZ, 2002; FERNÁNDEZ-PALACIOS, PÉREZ DE PAZ & FEBLES, 2002; MORA *et al.*, 2002; PÉREZ DE PAZ & FEBLES, 2002 y 2005; SUÁREZ *et al.*, 2002; OLANGUA, FEBLES & PÉREZ DE PAZ, 2004; OLESEN *et al.*, 2005; ANDERSON *et al.*, 2006) pero que indican, que desde una misma adscripción filogenética (referida a familias y géneros y no a la posición en un árbol filogenético), los sistemas de cruzamiento y de reproducción asexual son los principales responsables de la variabilidad observada, aún admitiendo razones históricas de antigüedad de las islas.

Según esta perspectiva, taxones del mismo grupo y con el mismo sistema de cruzamiento y/o de reproducción pueden variar ligeramente de acuerdo a su rango y aislamiento geográfico, talla poblacional, número de cromosomas y variables ambientales y/o de erosión.

Por último y de acuerdo con la mayoría de los autores (WEBB, 1984; KARRON, 1987, 1988; RICHARDS, 1986 y 1997; HAMRICK & GODT, 1996; BARRETT, 1998; GITZENDANNER & SOLTIS, 2000; FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000; CRAWFORD *et al.* 2001; ANDERSON *et al.*, 2002) sería necesario un mayor y

mejor conocimiento unificado y global de los componentes de la biodiversidad vegetal canaria: genético, macro-micro-morfológico, incluyendo los aspectos fisiológicos y funcionales de la biología reproductiva en una muestra suficientemente amplia y representativa de endemismos canarios (familias y géneros), donde el conocimiento de sus respectivos sistemas de reproducción según poblaciones naturales y su rango geográfico (ampliamente distribuidos en las islas vs. distribución restringida), puedan disipar las incógnitas y cuestiones evolutivas de la biodiversidad en general y en particular de las islas Canarias y oceánicas, sin que este tipo de estudios se vieran afectados por razones relacionadas al tipo de muestreo. Esto además redundaría en un mejor conocimiento de la biodiversidad poblacional que sería el fundamento sobre el cual se perfilara el diseño de estrategias de conservación verdaderamente efectivas en las especies amenazadas.

CONCLUSIONES

1. La evaluación genética de *Parolinia* evidencia que la adscripción filogenética y sistema de cruzamiento tienen más influencia en los niveles de biodiversidad observados que la distribución geográfica y tamaño poblacional. A pesar de que se observan ligeras diferencias en la diversidad genética de las tres especies de *Parolinia* en la isla de Gran Canaria, éstas no se pueden justificar por los diferentes rangos de distribución de los taxones en la isla ni por las diferencias de sus respectivas tallas poblacionales.

2. El conocimiento actual de la diversidad genética de la flora canaria así como de los sistemas de cruzamiento putativos, según los sistemas sexuales y sistemas de auto-incompatibilidad implicados, parecen indicar que, desde una misma adscripción filogenética, la biología reproductiva y sistemas de cruzamiento son los principales responsables de la variabilidad observada. Según esta perspectiva, taxones del mismo grupo y con el mismo sistema de cruzamiento y/o de reproducción pueden variar ligeramente de acuerdo a su rango y aislamiento geográfico, talla poblacional, número de cromosomas y variables ambientales y/o de erosión.

Es necesario un mayor y mejor conocimiento unificado y global de los componentes de la biodiversidad vegetal canaria: genético, macro-micro-morfológico, incluyendo los aspectos fisiológicos y funcionales de la biología reproductiva en una muestra suficientemente amplia y representativa de endemismos canarios (familias y géneros), donde el conocimiento de sus respectivos sistemas de reproducción según poblaciones naturales, puedan disipar las incógnitas y cuestiones evolutivas de la biodiversidad canaria y de las islas oceánicas en general, sin que este tipo de estudios se vieran afectados por razones relacionadas al tipo de muestreo. Esto además redundaría en un mejor conocimiento de la biodiversidad poblacional que sería el fundamento sobre el cual se perfilara el diseño de estrategias de conservación verdaderamente efectivas en las especies amenazadas.

3. Las evidencias de duplicaciones en *Parolinia* y su importancia filogenética, ha puesto de manifiesto la necesidad de confirmar su presencia en los géneros considerados más directamente relacionados, *Diceratella* y *Morettia*,

representantes de la disyunción Macaronésica-Saharo-Síndica-Este de África, toda vez que no se descarta la posibilidad de un origen alopoliploide muy antiguo.

4. Aunque *P. ornata* actualmente se considere como especie ampliamente distribuida (Fig.2) con poblaciones de elevado número de individuos, muchas de ellas se encuentran en zonas de interés turístico sometidas a una fuerte presión antrópica y se han visto afectadas por el crecimiento urbanístico, presentando síndromes de erosión en su biodiversidad que sin duda está afectando a la depauperación de su acervo genético, razón suficiente para proponer a *P. ornata* como especie amenazada e incluirla en las listas rojas de especies en peligro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Gobierno de Canarias (Proyecto PI1998/034) y Cabildo de Gran Canaria sus respectivas financiaciones que han hecho posible esta investigación. También expresan sus agradecimientos a los compañeros del Jardín Botánico Canario, especialmente a David Bramwell, Bernardo Navarro, Pepa Navarro, José Naranjo, Magui Olangua, Felicia Oliva, Oscar Saturno, Blas Vilches y Carolina Suárez, porque sin su colaboración no hubiera sido posible elaborar la corología de las especies de *Parolinia* en la isla de Gran Canaria. Asimismo se agradece la inestimable colaboración de los compañeros del Jardín Botánico implicados en el cultivo y cuidado de estas especies, Banco de Semillas, Biblioteca y Herbario.

REFERENCIAS

- AAGAARD, S.M.D., SASTAD, S. M., GREILHUBER, J. & A. MOEN, 2005.- A secondary hybrid zone between diploid *Dactylorhiza incarnata* ssp. *cruenta* and allotetraploid *D. lapponica* (Orchidaceae). *Heredity* 94: 488-96.
- ADDINSOFT 1995-2003.- XLSTAT version 7.0, your data analysis solution.
- ANDERSON, I. A. & J. W. BUSCH. 2006.- Relaxed pollinator-mediated selection weakens floral integration in self-compatible taxa of *Leavenworthia* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 93 (6): 860-867.
- ANDERSON, J. K. & S.I. WARWICK, 1999. - Chromosome number evolution in the tribe Brassiceae (Brassicaceae): evidence from isozyme number. *Plant Syst. Evol.* 215: 255-284.
- ANDERSON, G. J., S. D. JOHNSON, P. R. NEAL & G. BERNARDELLO. 2002. - Reproductive biology and plant systematics: the growth of a symbiotic association. *Taxon* 51: 637-53.
- ANDERSON, G. J., G. BERNARDELLO, M. R. OPEL, A. SANTOS-GUERRA, and M. ANDERSON. 2006. Reproductive biology of the dioecious Canary Islands endemic *Withania aristata* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 93, no. 9: 1295-305.
- ARÚS, P., 1983.- Metodología de electroforesis horizontal en gel de almidón para muestras de hoja de almendro. IRTA, Cabrils.
- ARÚS, P. & T.J. ORTON, 1983.- Inheritance and linkage relationships of isozyme loci in *Brassica oleracea*. *The Journal of Heredity*. 74: 405-12.
- ARÚS, P. & C. R. SHIELDS. 1983.- Cole crops (*Brassica oleraceae* L.) in: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Part B. 1ª ed., S. D Tanksley & T.J Orton (eds.): 339-50. Elsevier. Amsterdam.
- AVISE, J. C. & HAMRICK J. L. (eds), 1996.- *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*: Chapman & Hall. New York.

- BAÑARES, A., BLANCA, A., GÜEMES, J., MORENO, J.C. & ORTIZ, S., eds. 2003. *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid, 1072 pp.
- BARBUJANI, G. 1987.- Autocorrelation of gene frequencies under isolation by distance. *Genetics* 117: 777-782.
- BARRETT, S. C. H. 1988. - The evolution, maintenance and loss of self-incompatibility systems. in *Reproductive Strategies of Plants: Patterns & Strategies*, J. Lovett Doust & L. Lovett Doust (eds): 98-124. Oxford University Press. New York.
- , 1998.- The reproductive biology and genetics of islands Plants. In: *Evolution on Islands*. P. R. Grant (ed): 18-34. Oxford University Press. Oxford.
- . HARDER, L.D. & A. C. WORLEY, 1997.- The Comparative Biology of Pollination and Mating in flowering plants. In *"Plant Life Histories: Ecology, Phylogeny and Evolution"*. Silvertown, J. Franco M. & J. L. Harper (eds.): 57-76. Cambridge University Press. U.K.
- BASE de DATOS del JARDÍN BOTÁNICO CANARIO "VIERA Y CLAVIJO".- Servicio de Medio Ambiente y Aguas del Cabildo de Gran Canaria. Jardincanario.org.
- BATISTA, F., A. BAÑARES BAUDET, J. CAUJAPÉ-CASTELLS, E. CARQUÉ ÁLAMO, M. MARRERO GÓMEZ & P. A. SOSA. 2001.- Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* (Cistaceae) from the Canary Islands: intraspecific and interspecific comparisons and implications for genetic conservation. *Amer. J. Bot.* 88 (9): 1582-92.
- BATISTA, F. & P. A. SOSA. 2002.- Allozyme diversity in natural populations of *Viola palmensis* Webb & Berth. (Violaceae) from La Palma (Canary Islands): implications for conservation genetics. *Annals of Botany* 90: 725-33.
- BAYER, R.J., & D. J. CRAWFORD. 1986.- Allozyme divergence among five diploid species of *Antennaria* (Asteraceae: Inuleae) and their allopolyploid derivatives. *American Journal of Botany* 73 (2): 287-96.
- BECK, J. B., I. A. AL-SHEHBAZ & B. A. SCHAAL. 2006.- *Leavenworthia* (Brassicaceae) Revisited: Testing Classic Systematic and Mating System Hypotheses. *Systematic Botany* 31 (1): 151-59.
- BENGTSSON, B. O., P. WEIBULL & L. GHATNEKAR. 1995.- The loss of alleles by sampling: a study of the common outbreeding grass *Festuca ovina* over three geographic scales. *Hereditas* 122: 221-38.
- BORGEN, L. 1969.- Chromosome numbers of vascular plants from the Canary Islands, with special reference to the occurrence of polyploidy. *Nytt. Mag. Bot.* 16: 81-121.
- , 1987.- *Lobularia* (Cruciferae). A biosystematic study with special reference to the Macaronesian region. *Opera Botanica*: 1-96
- . Ø. H. RUSTAN & R. ELVEN. 1979.- *Brassica bourgeoui* (Cruciferae) in the Canary Islands. *Norw. J. Bot.* 26 (4): 255-64.
- . 1997.- Genetic differentiation in endemic *Lobularia* (Brassicaceae) in the Canary Islands. *Nord. J. Bot.* 16: 487-503.
- BRAMWELL, D. 1970.- A revision of the genus *Parolinia* Webb (Cruciferae) in the Canary Islands. *Bot. Notiser* 123: 394-400.
- . 1986.- Contribución a la biogeografía de las islas Canarias. *Botánica Macaronésica* 14: 3-34.
- , HUMPHRIES, C.J., MURRAY, B.G. & S.J. OWENS, 1972.- Chromosome Studies in the Flora of Macaronesia. *Bot. Notiser* 125: 139-152
- & Z. BRAMWELL, 2001. *Flores Silvestres de las Islas Canarias*. Editorial Rueda. Madrid
- BRIGGS, D. & S.M. WALTERS, 1997.- Conservation: confronting extinction species (15). In: *Plant Variation and Evolution*. 3ª ed. D. Briggs & S. M. Walters (eds.). Cambridge University Press. Cambridge: 399-433.
- BROCHMANN, C. 1993.- Reproductive strategies of diploid and polyploid populations of arctic *Draba* (Brassicaceae). *Plant Systematics and Evolution* 185: 55-83.
- BUSCH, J. W. 2005a.- The evolution of self-compatibility in geographically peripheral populations of

- Leavenworthia alabamica* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 92 (9): 1503-12.
- . 2005b. Inbreeding depression in self-incompatible and self-compatible populations of *Leavenworthia alabamica*. *Heredity* 94: 159-65.
- BYERS, D. L. & T. R. MEAGHER. 1992.- Mater availability in small populations of plant species with homomorphic sporophytic self-incompatibility. *Heredity* 68: 353-59.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J. & M. BACCARANI-ROSAS, 2006.- *Transformer-3*: a program for the analysis of molecular population genetic data. Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" and Instituto Tecnológico de Canarias. Las Palmas de Gran Canaria. Spain.
- CHARLESWORTH, D. & Z. YANG. 1998.- Allozyme diversity in *Leavenworthia* populations with different inbreeding levels. *Heredity* 81: 453-61.
- & P. AWADALLA. 1998.- Flowering plant self-incompatibility: the molecular population genetics of *Brassica* S-loci. *Heredity* 81: 1-9.
- CESKA, J. F., J. M. AFFOLTER & J. L. HAMRICK. 1997.- Developing a sampling strategy for *Baptisia archnifera* based on allozyme diversity. *Conservation Biology* 11 (5): 1133-39.
- CHEN, J. & D. L. SMITH, 2001.- Amide hydrogen exchange shows that malate dehydrogenase is a folded monomer at pH 5. *Protein Science* 10:1079–1083.
- CLAYTON, J.W. & D.N. TRETIAK, 1972.- Amine citrate buffer for pH control in starch gel electrophoreses. *J. Fish. Res. Board Canada* 29: 1169-1172.
- COCKERHAM, C. C., 1969.- Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-84.
- CONNER, J. K. & A. STERLING. 1995.- Testing hypothesis of functional relationships: A comparative survey of correlation patterns among floral traits in five insect-pollinated plants. *American Journal of Botany* 82 (11): 1399-406.
- CORNUET J.M & G. LUIKART, 1996.- Description and evaluation of two tests for detecting recent bottlenecks. *Genetics* 144: 2001-2014.
- CRAWFORD, D.J. 1989.- Enzyme Electrophoresis and Plant Systematics in *Isozymes in Plant Biology*. 1ª ed., D. E. Soltis & Soltis P. S (eds): 146-64. Dioscorides Press. Hong Kong.
- E. RUIZ, T.F. STUESSY, E. TEPE, P. AQEVEQUE, F. GONZALES, R.J. JENSEN, G.J. ANDERSON, G. BERNARDELLO, C.M. BAEZA, U. SWENSON & O.M. SILVA, 2001.- Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation. *American Journal of Botany* 88 (12): 2195-203.
- CRAWFORD, D. J., J. K. ARCHIBALD, A. SANTOS- GUERRA & M. E. MORT. 2006.- Allozyme diversity within and divergence among species of *Tolpis* (Asteraceae-Lactuceae) in the Canary Islands: systematic, evolutionary and biogeographical implications. *American Journal of Botany* 93 (4): 656-64.
- CROW, J.F. & K. AOKI, 1984.- Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S A* 81: 6073-6077.
- CRUDEN, R. W. 1977.- Pollen-Ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31 (1): 32-46.
- DAFNI, A. 1992.- *Pollination Ecology. A practical approach*. IRL PRESS. OXFORD UNIVERSITY PRESS. New York.
- EHLERS, B. K. & PEDERSEN, H. Æ. 2000.- Genetic variation in three species of *Epipactis* (Orchidaceae): geographic scale and evolutionary inferences. *Biological Journal of the Linnean Society* 69: 411-430.
- ELGAR, M.A. & D. CLODE, 2001.- Inbreeding and extinction in island populations: a cautionary note. *Conservation Biology* 15 (1): 284-86.
- ESCHMANN-GRUPE, G., B. NEUFFER & H. HURKA. 2004.- Extent and structure of genetic variation in two colonising *Diplotaxis* species (Brassicaceae) with contrasting breeding systems. *Plant Systematics and Evolution* 244: 31-43.

- EVANS, M. E. K., R. W. DOLAN, E. S. MENGES & D. R. GORDON. 2000.- Genetic diversity and reproductive biology in *Warea carteri* (Brassicaceae), a narrowly endemic Florida scrub annual. *American Journal of Botany* 87 (3): 372-81.
- FEBLES, R. 1989.- Estudios en la flora macaronésica: algunos números de cromosomas. VI. *Botánica Macaronésica* 17: 57-76.
- & J. PÉREZ DE PAZ. 2005.- Sistemas de reproducción y biodiversidad Macaronésica. II. Síndromes florales, dicogamia y otros componentes filogenéticos de diversidad. *VIII Simposio de la Asociación Iberomacaronésica de Jardines Botánicos*. Las Palmas.
- FERNANDEZ-PALAZIOS, O., J. PÉREZ DE PAZ & R. FEBLES, 2002a.- Biología reproductiva del género endémico canario *Parolinia* Webb (Brassicaceae). 1^{er} Congreso de Biología de la Conservación. Libro de Resúmenes: 67. Valencia.
- , J. PÉREZ DE PAZ, R. FEBLES, & J. CAUJAPÉ- CASTELLS, 2004.- Diversidad genética en *Parolinia*: *P. glabriuscula* y *P. platypetala* (Brassicaceae:Matthioleae). *Bot.Macaronésica* 25: 147-64.
- , J. PÉREZ DE PAZ & R. FEBLES, 2005a.- Micromarcadores de biodiversidad morfológico-reproductiva en el género canario *Parolinia* Webb (Brassicaceae). *VIII Simposio de la Asociación Iberomacaronésica de Jardines Botánicos*. Las Palmas.
- , J. PÉREZ DE PAZ & R. FEBLES, 2005b.- Morphological-reproductive biodiversity micromarkers in the Canarian endemic genus *Parolinia* Webb (Brassicaceae). *XVII International Botanical Congress (Libro de Resúmenes)*: 458. Viena.
- , J. PÉREZ DE PAZ & R. FEBLES, 2005c. Micro-marcadores de biodiversidad morfológico-reproductiva y sistemas de cruzamiento en el género canario *Parolinia* Webb (Brassicaceae). 2^o Congreso de Biología de La Conservación de Plantas (Libro de Resúmenes). Gijón.
- FRANCISCO-ORTEGA, J.; JACKSON, M. T.; CATTY, J.P. & FORD-LLOYD, B.V,1992.- Genetic diversity in the *Chamaecytisus proliferus* complex (Fabaceae: Genisteae) in the Canary Islands in relation to *in situ* conservation. *Genetic Resources and Crop. Evolution* 39:149-158.
- , D.J. CRAWFORD, A. SANTOS-GUERRA & J. A. CARVALHO. 1996.- Isozyme differentiation in the endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae: Anthemideae) in the Macaronesian Islands. *Plant Systematics and Evolution* 202: 137-52.
- , A. SANTOS- GUERRA, K. SEUNG-CHUL & D. J. CRAWFORD. 2000.- Plant Genetic Diversity in the Canary Islands: a Conservation Perspective. *Amer. J. Bot.*: 909-19.
- FRANKHAM, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* 78: 311-27.
- GEMMILL, C.E.C., E.A. RANKER & D. RAGONE. 1998.- Conservation genetic of the endangered endemic Hawaiian genus *Brighamia* (Campanulaceae). *American Journal of Botany* 85 (4): 528-39.
- GIBBS, P. E. 1986.- Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism? *Plant Systematics and Evolution* 154: 285-323.
- . 1988.- Self-Incompatibility mechanisms in flowering plants: some complications and clarifications. *Lagascalia* 15: 17-28. Extra.
- GITZENDANNER, M. A. & SOLTIS. P.S. 2000.- Patterns of genetic variation in rare, and widespread plant congeners. *Amer. J. Bot.* 87 (6): 783-792.
- GIVNISH, T.J., 1997.- Adaptive radiation and molecular systematics: issues and approaches. in *Molecular Evolution and Adaptive Radiation*. 1^a ed. T.J. Givnish & K.J. Sytsma (eds): 1-54. Cambridge University Press. USA.
- , 1998. - Adaptive Plant Evolution on Islands: classical patterns, molecular data, new insights in *Evolution on Islands*, P.R., Grant (ed): 281-304. Oxford University Press. Oxford.
- GODT, M. J. W. & J. L. HAMRICK. 1999.- Genetic divergence among infraspecific taxa of *Sarracenia purpurea*. *Systematic Botany* 23 (4): 427-38.
- GOODELL, K., D.R. ELAM, J.D. NASON & N.C. ELLSTRAND. 1997.- Gene Flow among small populations of a self-incompatible plant: an interaction between demography and genetics. *American Journal of Botany* 84 (10): 1362-71.

- GONZÁLEZ PÉREZ, M.A., J. CAUJAPÉ- CASTELLS & P.A. SOSA. 2004.- Allozyme variation and structure of the Canarian endemic palm tree *Phoenix canariensis* (Arecaceae): implications for conservation. *Heredity* 93 (3): 307-15.
- GOTTLIEB, L.D. 1982.- Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216:373-380.
- , L.D. 1984.- Isozyme evidence and problem solving in plant systematics in *Plant Biosystematics*. First ed., W. F. Grant. (ed): 343-57. Academic Press. Canada.
- GRAFCAN.- Cartografía básica. Gobierno Autónomo de Canarias.
- GRANT, P. R. 1998.- Evolution on Islands: Epilogue and Questions in *Evolution on Islands*, P.R. Grant (ed): 305-19. Oxford University Press. Oxford.
- GRIFFIN, S.R., & S.C.H. BARRETT. 2004.- Genetic variation in *Trillium erectum* (Melanthiaceae), a widespread forest herb in eastern North America. *Can. J. Bot.* 82: 316-21.
- GRIFFITH, D.A., 1987.- Spatial autocorrelation: a primer. Washington. DC. Association of American Geographers.
- HAMRICK, J. L. & M. J. W. GODT, 1996.- Conservation Genetic of Endemic Plant Species in *Conservation Genetic: Case Histories from Nature*. Avise J.C. & J.L. Hamrick (eds): 281-304. Chapman & Hall. Madrid, London, Paris, New York.
- , Y. B. LINHART, and J. B. MITTON. 1979.- Relationships between Life History characteristics and electrophoretically detectable Genetic Variation in Plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10: 173-200.
- HATAKEYAMA, K., M. WATANABE, T. TAKASAKI, K. OJIMA & K. HINATA. 1998.- Dominance relationships between S-alleles in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Heredity* 80: 241-47.
- HEYWOOD, J.S., 1991.- Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 335-355.
- HURKA, H. & B. NEUFFER. 1997.- Evolutionary processes in the genus *Capsella* (Brassicaceae). *Plant Systematics and Evolution* 206: 295-316.
- IPCN, 2006.- Index to Plant Chromosome Numbers Data Base. *Missouri Botanical Garden*.
- JAÉN MOLINA, R., J. CAUJAPÉ- CASTELLS, O. FERNÁNDEZ-PALACIOS, J. PÉREZ DE PAZ, R. FEBLES, D. BRAMWELL, A. REYES, H. AKHANI & K. A. KHALIK. 2005.- Filogenia molecular de las Matthioleae Macaronésicas según la información de las regiones ITS y *trnH-psbA*. 2º Congreso de Biología de la Conservación de Plantas (*Libro De Resúmenes*). Gijón.
- . J. CAUJAPÉ- CASTELLS, O. FERNÁNDEZ-PALACIOS, J. PÉREZ DE PAZ, R. FEBLES, D. BRAMWELL, A. REYES, H. AKHANI & K. A. KHALIK. 2006. _Toward a molecular phylogeny of the Canarian Matthioleae (Brassicaceae): first insights based on sequence data for ITS1 and ITS2. ASPT Meeting. . *Libro de Resúmenes*. Chico (California)
- JONSELL, B., 1978.- New taxa of *Diceratella* and *Farsetia* (Cruciferae) from E Tropical Africa. *Bot. Notiser* 131: 251-257.
- , 1979.- New taxa of Cruciferae from East Tropical Africa and Madagascar. *Bot. Notiser* 132: 521-535.
- KÄRKKÄINEN, K., H. KUITTINEN, R. V. TREUREN, S. OIKARINEN & O. SAVOLAINEN. 1999.- Genetic basis of inbreeding depression in *Arabis petraea*. *Evolution* 53 (5): 1354-65.
- KARRON, J. D. 1987.- A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* 1: 47-58.
- KARRON, J.D. 1989.- Breeding systems and levels of inbreeding depression in geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). *Amer. J. Bot.* 76 (3): 331-40.
- , LINHART, Y.B., CHAULK, C.A. & C.A. ROBERTSON, 1988.- Genetic structure of populations of geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 75 (8): 1114-1119.
- KEPHART, SUSAN R., 1990.- Starch Gel Electrophoresis of Plant Isozymes: A comparative analysis of techniques. *Amer.J.Bot.*, 77 (5): 693-712.

- KERCHER, S. & J. K. CONNER. 1996.- Patterns of genetic variability within and among populations of wild radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 83 (11): 1416-21.
- KIM, S-C., D.J. CRAWFORD, J. FRANCISCO-ORTEGA & A. SANTOS-GUERRA. 1999.- Adaptive radiation and genetic differentiation in the woody *Sonchus* alliance (Asteraceae: Sonchinae) in the Canary Islands. *Plant Systematics and Evolution* 215: 101-18.
- KUNIN, W. E. & A. SHMIDA. 1997.- Plant reproductive traits as a function of local, regional, and global abundance. *Conservation Biology* 11 (1): 183-92.
- KUNKEL, G. 1969.- Sobre la distribución de *Parolinia ornata* (Cruciferae) en Gran Canaria. *Cuaderno Botanica Canaria* VII: 1-4.
- LA-SERNA RAMOS. I. & M. C. LEÓN ARENCIBIA. 1980.- Contribución a la tipificación de endemismos canarios descritos por Webb y Berthelot. *Vieraea* 10: 109-28.
- LAZARO, A & AGUINAGALDE, I. 1998.- Genetic diversity in *Brassica oleracea* L. (Cruciferae) and wild relatives (2n=18) using isozymes. *Annals of Botany* 82:821-828.
- LEDIG, F. T., P. D. HODGSKISS & D. R. JOHNSON. 2005.- Genic diversity, genetic structure, and mating system of Brewer spruce (Pinaceae), a relict of the Arcto-Tertiary forest. *American Journal of Botany* 92 (12): 1987-94.
- LEWIS P.O. & R. WHITKUS, 1993.- Genestat-PC 3.3. North Carolina State University. Raleigh. North Carolina.
- LORENZO, H., J. CAUJAPÉ- CASTELLS, R. FEBLES & J. PÉREZ DE PAZ. 2003.- Isozyme variation in the Canarian endemic *Neochamaelea pulverulenta* (Cneoraceae): implications for population differentiation in the Canaries and first molecular insights on the floristic link with the Mediterranean. *Bocconea* 16 (2): 953-59.
- LUIKART G. & J.M. CORNUET, 1998.- Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12, 228-237.
- LUMARET, R., N. OUZZANI, H. MICHAUD, G. VIVIER, M.-F. DEGUILLOUX & F. DI GUISTO. 2004.- Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. *Heredity* 92(4): 343-51.
- LYONS, E.E. & J. ANTONOVICS. 1991.- Breeding system evolution in *Leavenworthia*: breeding system variation and reproductive success in natural populations of *Leavenworthia crassa* (Cruciferae). *American Journal of Botany* 78 (2): 270-287.
- MAHY, G., L. P. BRUEDERLE, B. CONNOR, M. VAN HOFWEGEN & N. VORSA, 2000.- Allozyme evidence for genetic autopolyploidy and high genetic diversity in tetraploid cranberry, *Vaccinium oxycoccos* (Ericaceae). *Amer. J. Bot.* 87 (12): 1882-89.
- MARSHALL, D.L. 1998.- Pollen donor performance can be consistent across maternal plants in wild radish (*Raphanus sativus*, Brassicaceae): a necessary condition for the action of sexual selection. *American Journal of Botany* 85 (10): 1389-97.
- MASELLI, S., PÉREZ-GARCÍA, F. & I. AGUINAGALDE, 1999.- Evaluation of seed storage conditions and genetic diversity of four Crucifers endemic to Spain. *Annals of Botany* 84: 207-212.
- MAYER, M.; SOLTIS, P. S. & SOLTIS, D. E. 1994.- The evolution of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae): genetic divergence and gene flow in serpentine endemics. *American Journal of Botany*. 81(10):1288-1299.
- MEMBRIVES-FERNÁNDEZ, N., PEDROLA-MONFORT. J. & CAUJAPÉ-CASTELLS. J. 2001.- Relative influence of biological versus historical factors on isozyme variation of the genus *Androcymbium* (Colchicaceae) in Africa. *Plant Systematics and Evolution* 229: 237-60.
- MILLER, J. S., & D.L. VENABLE. 2002.- The transition to gender dimorphism on an evolutionary background of self-incompatibility: an example from *Lycium* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 89 (12): 1907-15.
- MORA, S., R. JAÉN MOLINA, J. PÉREZ DE PAZ & R. FEBLES. 2002.- Sexos, formas y colores en el género *Echium* L. (Boraginaceae) ¿Tiene esto que ver con la sistemática? 1º Congreso de Biología de la Conservación de Plantas (Libro de Resúmenes): 63. Valencia.

- MORAN, P.A.P., 1948.- The interpretation of statistical maps. *Journal of the Royal Statistical Society B* 37: 243-251.
- MOYLE, L.C., M. S. OLSON & P. TIFFIN. 2004.- Patterns of reproductive isolation in three angiosperm genera. *Evolution* 58 (6): 1195-208.
- MURPHY, R.W., J.W. SITES, D. G. BUTH & C. H. HAUFLE, 1996.- Proteins: isozyme electrophoresis. In: *Molecular Systematics*. Hillis, D.M., Moritz C. & B.K. Mable (eds.). Sinauer Associates, Inc. Sunderland. USA.: 51-120
- NASON, J. D. & N. C. ELLSTRAND. 1995.- Lifetime estimates of biparental inbreeding depression in the self-incompatible annual plant *Raphanus sativus*. *Evolution* 49, no. 2: 307-16.
- NEI M., 1973.- Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 70: 3321 – 3323.
- , 1978.- Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583 - 590.
- NEI, M. 1987.- *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- NEUFFER, B., & R. HOFFROGGE. 2000.- Ecotypic and allozyme variation of *Capsella bursa-pastoris* and *C.rubella* (Brassicaceae) along latitude and altitude gradients on the Iberian Peninsula. *Anales Jardín Botánico De Madrid*. 57 (2): 299-315.
- NIETO-FELINER, G. 1991.- Breeding systems and related floral traits in several *Erysimum* (Cruciferae). *Can. J. Bot.* 69: 2515-21.
- ODEN, N.L., 1984.- Assessing the significance of a spatial correlogram. *Geographical Analysis* 16: 1-16.
- OLANGUA-CORRAL, M., R. FEBLES & J. PÉREZ DE PAZ. 2004.- Fenología estacional y del capítulo de la Sección *Monoptera* (Sch. Bip.) Humph. de *Argyranthemum* Webb ex Sch. Bip. (Asteraceae:Anthemidae) endémica de Gran Canaria. *Botánica Macaronésica* 25: 127-41.
- OLESEN, J. M., Y. L. DUPONT, B. K. EHLERS, A. VALIDO & D. M. HANSEN. 2005.- Heterostyly in the Canarian endemic *Jasminum odoratissimum* (Oleaceae). *Nordic Journal of Botany* 23: 537-39.
- OLIVA TEJERA, F., J. CAUJAPÉ-CASTELLS, J. NARANJO SUÁREZ, J. NAVARRO DÉNIZ, J.R. ACEBES GINOVÉS & D. BRAMWELL. 2004. Variación genética de los *Lotus* I. (Fabaceae: Loteae) de pinar en Gran Canaria. *Botánica Macaronésica* 25: 31-52.
- , N. CABRERA GARCÍA, M. BACCARANI ROSAS, J. NAVARRO DÉNIZ & J. CAUJAPÉ-CASTELLS. 2005.- Memoria Final: Estudio genético molecular del estatus taxonómico o poblacional de diversos táxones de plantas vasculares del archipiélago canario para el proyecto BIOTA-genes.
- OYAMA, K.1998.- Genetic differentiation among populations of *Arabis serrata* (Brassicaceae) along its geographic distribution. *Plant Systematics and Evolution*. 213: 91-102.
- PEDROLA-MONFORT, J., & J. CAUJAPÉ-CASTELLS.1994.- Allozymic and morphological relationships among *Androcymbium gramineum*, *A. europaeum* and *A. psammophilum* (Colchicaceae). *Plant Systematics and Evolution* 191: 111-26.
- . 1996.- Genetic and morphological divergence in the *Androcymbium gramineum* complex (Colchicaceae). *Plant Systematics and Evolution* 201: 149-62.
- PÉREZ DE PAZ, J., 1980.- Contribución al atlas palinológico de endemismos canario-macaronésicos 3. *Bot.Macaronésica* 7: 77-112.
- . 2002.- La Biología reproductiva. Importancia y tipos de estudios. in *Biología de la conservación de plantas amenazadas*, A. Bañares-Baudet (ed), 71-132. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Madrid.
- PÉREZ DE PAZ, J. & R. FEBLES. 2002.- Principales síndromes reproductivos de la flora canaria. 1º *Congreso de Biología de la Conservación de Plantas (Libro de Resúmenes)*: 61. Valencia.
- & R. FEBLES. 2002a.- Principales síndromes reproductivos de la flora canaria. 1º *Congreso de Biología de la Conservación de Plantas (Libro de Resúmenes)*: 61. Valencia.

- & FEBLES, 2002b.-Sistemas sexuales en la Flora Canaria. Importancia de la dioecia, subdioecia y diclinia. *1^{er} Congreso de Biología de la Conservación (Libro de Resúmenes)*: 61. Valencia.
- . & R. FEBLES. 2005a.- Banco de micro-marcadores morfológico-reproductivos (Red de Bancos de Biodiversidad en la Flora Macaronésica: BIOMABANC: INTERREG IIIB: espacio Azores-Madeira-Canarias). VIII Simposio de la Asociación Iberomacaronésica de Jardines Botánicos. Las Palmas de Gran Canaria.
- . & R. FEBLES 2005b.- Sistemas de cruzamiento, biodiversidad y filogenia en la Flora Macaronésica. I. Evolución de los síndromes florales: heteromorfismos y sistemas sexuales. VIII Simposio De La Asociación Iberomacaronésica De Jardines Botánicos. Las Palmas de Gran Canaria.
- PIRY, S., LUIKART, G. & J.M. CORNUET, 1998.- Bottleneck, a program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data. INRA, URLB, Laboratoire de Modélisation et Biologie Evolutive. Montpellier, France.
- PRESTON, R.E., 1986.- Pollen-Ovule ratios in the Cruciferae. *Amer.J.Bot.* 73(12): 1732-1740.
- PROCTOR, M., P. YEO & A. LACK. 1996.- *The Natural History of Pollination*. London: Harper Collins Publishers.
- RICHARDS, A. J. 1986.- *Plant Breeding Systems*. London: Chapman & Hall.
- . 1997.- *Plant Breeding Systems*. London: Chapman & Hall.
- ROHLF, F.J. 1998.- NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis version 2.02j. Applied Biostatistics Inc.
- ROY, B.A., 1995.- The breeding systems of six species of *Arabis* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 82 (7): 869-877
- RUSTAN, Ø. H. 1996.- Revision of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) in the Cape Verde Islands, W Africa. *Nordic Journal of Botany* 16: 19-50.
- SÁNCHEZ, J.L., J. A. REYES-BETANCORT, S. SCHOLZ & J. CAUJAPÉ- CASTELLS. 2004.- Patrones de variación genética poblacional en el endemismo canario *Matthiola bolleana* Webb ex Christ. *Bot.Macaronésica* 25: 1-11.
- . G. DOMINA & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, 2005.- Genetic differentiation of three species of *Matthiola* (Brassicaceae) in the Sicilian insular system. *Plant Systematics and Evolution* 253: 81-93.
- SANTOS VIEIRA, A. O. & G. J. SHEPHERD. 1998.- Breeding systems in *Ludwigia* (Onagraceae) in Southeast Brazil. in *Reproductive Biology in Systematics, Conservation and Economic Botany*. S. J. Owens & P. J. Rudall (eds): 395-406. Kew. Kent. UK.: Whitstable Lito Printers Ltd.
- SHIELDS, C. R., T. J. ORTON & C.W., STUBER, 1983.- An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: *Isozymes in Plant Genetics Breeding, Part A* Tanksley, S.D. & T.J. Orton (eds.): 443-468. Elsevier Science Publishing Company Inc. New York.
- SILVERTOWN, J. 2004.- The ghost of competition past in the phylogeny of island endemic plants. *Journal of Ecology* 92 , no. (1): 168-73.
- & D. CHARLESWORTH. 2001. *Introduction to Plant Population Biology*.: Blackwell Science. 4^a ed. U.K.
- SIMILLION, C., VANDEPOELE, K., VAN MONTAGU, M.C.E., ZABEAU, M. & Y. VAN DE PEER, 2002.- The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99 (21): 13627-13632.
- SLATKIN, M. 1985.- Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- , 1994.- Gene flow and population structure. In: *Ecological genetics*.L.A. Real (ed.), Princeton University Press, New Jersey, USA: 3-17.
- & N.H. BARTON, 1989.- A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.

- SOKAL, R.R., 1979.- Testing statistical significance of geographical variation patterns. *Systematic Zoology* 8, 227-232.
- SOLTIS, D. E. & L. H. RIESEBERG, 1986.- Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): genetic insights from enzyme electrophoresis. *American Journal of Botany* 73 (2): 310-318.
- SOLTIS, P.S., SOLTIS, D.E. & GOTTLIEB, 1987.- Phosphoglucosyltransferase gene duplications in *Clarkia* (Onagraceae) and their phylogenetic implications. *Evolution* 41(3): 667-671.
- SUÁREZ, C., J. PÉREZ DE PAZ, J. CAUJAPÉ- CASTELLS & R. FEBLES. 2002.- Sistemas de cruzamiento y diversidad genética de *Limonium dendroides* Svent. (Plumbaginaceae), un endemismo canario en peligro de extinción. 1º Congreso de Biología de la Conservación de Plantas (Libro de Resúmenes): 87. Valencia.
- SVENTENIUS, E.R.S., 1948.- Plantas nuevas o poco conocidas de Tenerife 1. *Bol. Inst. Nac. Invest. Agron.* (18): 1-19.
- , 1960.- *Additamentum ad floram canariense*. Madrid: Inst. Nac. Invest. Agron. Ministerio de Agricultura. Madrid.
- SWOFFORD, D.L. & R.B. SELANDER, 1989.- BIOSYS-1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *Journal of Heredity* 72: 281-283.
- TYLER, T. 2004.- Studies in *Melica ciliata*- complex: 1. Distribution of allozyme variation within and among individuals, populations and geographic regions. *Plant Systematics and Evolution* 248: 1-30.
- VALLEJOS, C.E., 1983.- Enzyme activity staining. In: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*. Tanksley, S.D. & T.J. Orton (eds.). Elsevier Science Publishing Company Inc. New York, U.S.A.: 469-516.
- VAN LOON, J. CRH. 1974.- A cytological investigation of flowering plants from the Canary Islands. *Acta Bot. Neerl.* 23(2): 113-24.
- VASSILIADIS, C, J. LEPART, P. SAUMITOU-LAPRADE & P. VERNET. 2000.- Self-incompatibility and male fertilization success in *Phillyrea angustifolia* (Oleaceae). *Int. J. Plant Sci.* 161, no. 3: 393-402.
- VILCHES NAVARRETE, B., A. ROCA SALINAS, J. NARANJO SUÁREZ, B. NAVARRO, D. BRAMWELL & J. CAUJAPÉ-CASTELLS. 2002.- La variación genética de *Erysimum* L. en Gran Canaria. I Congreso de Biología de la Conservación de Plantas. Valencia.
- , A. ROCA SALINAS, J. NARANJO, B. NAVARRO, D. BRAMWELL & J. CAUJAPÉ-CASTELLS. 2004.- Estructura espacial de la variación genética de *Erysimum albescens* (Cruciferae) en Gran Canaria: implicaciones para la conservación *ex situ* en bancos de germoplasma. *Botánica Macaronésica* 25: 15-30.
- VV.AA. 2000.- Lista Roja de Flora Vascular Española (valoración según categorías de la UICN). *Conservación Vegetal* 6 (extra): 11-38.
- WALTER, K.S. & GUILLETT, H.J. (eds) 1998.- *1997 IUCN Red List of Threatened Plants*. Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. IUCN- The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Lxiv + 862pp.
- WARTENBERG, D., 1989.- Saap vs. 4.3. Spatial autocorrelation Analysis Program. Distributed by the author.
- WEBB, P.B., 1840.- Notice sur le *Parolinia*, nouveau genre Cruciferae. *Annls. Sci. Nat.* sér. 2, 13: 133-134.
- WEBB, C.J. 1984.- Constraints on the Evolution of Plant Breeding Systems and their Relevance to Systematics in W. F. Grant (ed), *Plant Biosystematics*: 249-70.
- WEIR, B.S., 1990.- Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. Sinauer, Sunderland, MA.
- WELLER, S. G., SAKAI, A. K. & STRAUB, C. 1996.- Allozyme diversity and genetic identity in *Schieda* and *Alsiniidendron* (Caryophyllaceae: Alsinoideae) in the Hawaiian islands. *Evolution*. 50(1):23-34.
- WENDEL, J. F & N.F. WEEDEN, 1989.- Visualization and interpretation of plant isozymes. In: *Isozymes in Plant Biology*. First ed. Soltis, D.E. & P.S. Soltis (eds): 5-45. Dioscorides Press. Oregon.

- WERTH, C.R., HILU, W.K, LANGNER, C.A. & BAIRD, W.V., 1993.- Duplicate gene expression for isocitrate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in diploid species of *Eleusine* (Gramineae). *American Journal of Botany*. 80(6):705-710.
- WESTERBERGH, A. & SAURA A. 1994.- Genetic differentiation in endemic *Silene* (Caryophyllaceae) on the Hawaiian Islands. *American Journal of Botany* 81, no. 11: 1487-93.
- WHITLOCK, M. C. & D. E. MCCAULEY. 1999.- Indirect measures of flow and migration: $F_{ST} \approx 1 / (4 N_m + 1)$. *Heredity* 82: 117-25.
- WILLIAMS, J. H. & M. L. ARNOLD. 2001.- Sources of genetic structure in the woody perennial *Betula occidentalis*. *Int. J. Plant Sci.* 162 (5): 1097-109.
- WILLIAMSON, P. S. & C. R. WERTH. 1999.- Levels and patterns of genetic variation in the endangered species *Abronia macrocarpa* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* 86 (2): 293-301.
- WRIGHT, S. 1922.- Coefficients of inbreeding and relationship. *American Naturalist* 56: 330-338
- , 1951.- The genetical structure of populations. *Ann.Eugen.* 15: 323-354
- YEH, F. C., YANG, R.-C., BOYLE, T.B.J., YE, Z.-H. & MAO, J.X. 1997.- Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.