

PATRONES DE VARIACIÓN GENÉTICA POBLACIONAL EN EL ENDEMISMO CANARIO *MATTHIOLA BOLLEANA* WEBB EX CHRIST.

JUAN LUIS SÁNCHEZ¹, JORGE ALFREDO REYES-BETANCORT², STEPHAN SCHOLZ³ Y JULI CAUJAPÉ-CASTELLS¹

¹ Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo". Ap. de correos 14 de Tafira Alta, 35017 Las Palmas de Gran Canaria.

² Departamento Biología Vegetal (Botánica), Universidad de La Laguna, 38071 La Laguna.

³ Casa Sick-Esquinzo, 35626 Jandía, Fuerteventura.

Recibido: Marzo 2004

Palabras clave: *Matthiola bolleana*, Cruciferae, endemismo, Lanzarote, Fuerteventura, isoenzimas, variabilidad genética.

Keywords: *Matthiola bolleana*, Cruciferae, endemic, Lanzarote, Fuerteventura, isozymes, genetic variation.

RESUMEN

Se estudiaron los niveles básicos de polimorfismo, variabilidad genética y estructuración genética del endemismo canario *Matthiola bolleana* (distribuido exclusivamente en las islas de Lanzarote y Fuerteventura) mediante análisis electroforético de isoenzimas en gel de almidón. Para ambas islas, se obtuvieron valores moderado-altos de los indicadores básicos de polimorfismo genético poblacional que son similares a los de otros endemismos canarios, pero mucho más altos que los valores calculados para las especies endémicas en general y que los hallados en investigaciones previas para sus congéneres del sistema insular Siciliano. Los valores obtenidos de flujo génico entre las poblaciones de Lanzarote fueron los más altos y mayores que uno. Los altos valores de *Fst* delatan una clara diferenciación genética entre ambas islas, siendo las poblaciones de Lanzarote más parecidas entre ellas que las de Fuerteventura, que resultaron ser mucho más variables y menos cohesionadas a nivel genético.

SUMMARY

We studied the basic levels of polymorphism, genetic variation and population structuring of the Canarian endemic *Matthiola bolleana* (that occurs exclusively in the islands of Fuerteventura and Lanzarote) through horizontal starch gel isozyme electrophoresis. For both islands, we obtained moderate to high values of the basic indicators of polymorphism that are similar to those reported for other Canarian endemics, but much higher than the values for endemics in general or than those for their congeners in the Sicilian insular system. The values of gene flow obtained between the populations from Lanzarote were the highest detected and always higher than one. The considerably high values of *Fst* suggest a clear genetic differentiation between the two islands, with the populations from Lanzarote exhibiting a higher degree of similarity among them than those from Fuerteventura, that were much more variable and exhibited a lesser genetic cohesion.

INTRODUCCIÓN

Los estudios con géneros endémicos (o casi endémicos) de la flora de Macaronesia han propiciado importantes hipótesis sobre las conexiones florísticas entre este archipiélago, el continente Africano y el área Mediterránea (ver por ejemplo MOORE *et al.* 2002, MORT *et al.* 2002, FUERTES *et al.* 2002, CAUJAPÉ CASTELLS & JANSEN 2003). Sin embargo, estos importantes conocimientos se han obtenido a expensas de ignorar profundamente la investigación de los géneros cuya diversificación está en estado incipiente, y que son los únicos que pueden darnos claves para entender los procesos de endemización que subyacen a esas espectaculares (y, en ocasiones, desconcertantes) conexiones florísticas.

Hasta el momento actual, restringir la mayor parte del esfuerzo investigador a la biota endémica de Macaronesia ha implicado un profundo desconocimiento de la diversificación incipiente y, por lo tanto, de los factores y procesos que en el pasado contribuyeron a la gestación de la riqueza endémica que hoy distingue a este archipiélago oceánico. A todas luces, la obtención de hipótesis fundamentadas sobre la evolución de la endemidad en Macaronesia y sobre las relaciones de intercambio de biodiversidad con el continente solamente puede llevarse a cabo a través del estudio de grupos relativamente modernos, en los cuales las distorsiones atribuibles al tiempo de divergencia, la ignorancia histórica (a causa de la extinción en la biota de las áreas continentales próximas) y la ignorancia florística (debida al muestreo defectuoso del grupo en cuestión) presenten un impacto mucho menor.

A pesar de su interés, las investigaciones sobre los estadios más tempranos de la endemización de plantas vasculares en Macaronesia son prácticamente inexistentes en la actualidad. Al nivel molecular poblacional, los únicos antecedentes que guardan alguna similitud con el estudio que se propone son las investigaciones llevadas a cabo con *Avena canariensis* Baum, Rajhathy & Sampson (Gramineae) [BAUM *et al.* 1973; MORIKAWA & LEGGETT 1990] y las especies *Androcymbium psammophilum* Svent. y *A. hierrense* Santos (Colchicaceae) (PEDROLA-MONFORT & CAUJAPÉ-CASTELLS 1996).

Por su distribución y características biológicas, el género *Matthiola* R. Br. *in* Aiton (Cruciferae) parece un modelo adecuado para investigar la diversificación incipiente de plantas vasculares en Macaronesia. Su contingente endémico en este archipiélago oceánico es minoritario (actualmente solo las especies *M. bolleana* Webb *ex* Christ y *M. maderensis* Lowe) y sus especies no endémicas están ampliamente distribuidas en Macaronesia y en áreas continentales e insulares del norte de África, en estos enclaves geográficos.

Matthiola bolleana es un endemismo exclusivo de Fuerteventura y Lanzarote. Se caracteriza por ser una planta anual, ramificada desde la base, con indumento mas o menos denso de pelos cortos ramificados; Tallo de 5-20 (35) cm; hojas de enteras a sinuado-dentadas, rara vez pinnatífidas, de ápice redondeado; pedicelos de 1 mm en la fructificación; sépalos de 8,5-9,5 mm, normalmente teñidos de púrpura; pétalos de limbo de 8-10 x 3,5-5 mm, oblanceolado, obtuso, emarginado, patente, rosado purpúreo en los 2/3 superiores y blanco hacia la base; fruto de 20-50 x 1,2-1,5 mm, algo torulosos, con nervios paralelos, erecto patentes, patentes y con frecuencia recurvados, con indumento denso de pelos ramificados;

estigmas con cuernos laterales de tamaño variable aunque en general cortos (0,7 – 1 mm) dando un aspecto triangular al estigma; semillas ovado-redondeadas de 0,9 x 0,8 mm, cortamente aladas (en ocasiones sin alas). Su nivel de ploidía es $2n = 12$ (ARDÉVOL GONZÁLES *et al.* 1993).

En este trabajo, iniciamos la investigación del origen y las pautas de diversificación del género *Matthiola* en Macaronesia analizando la variabilidad molecular poblacional del endemismo canario *Matthiola bolleana* en 11 *loci* isoenzimáticos para describir sus niveles básicos de diversidad genética. Puesto que se trata de una especie endémica, los datos genéticos obtenidos servirán para aconsejar posibles estrategias de conservación (SÁNCHEZ *et al.*, *in prep.*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Muestreamos hojas de un total de 117 individuos de *Matthiola bolleana* correspondientes a ocho poblaciones (tres de Lanzarote y cinco de Fuerteventura) que representan todas las áreas de distribución de esta especie endémica canaria. Las hojas de cada individuo muestreado fueron guardadas en sobres individuales con un código numérico único que se conservaron en una nevera de campo hasta que fueron almacenados a -80°C en los laboratorios de Biodiversidad Molecular del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo". Las hojas fueron recolectadas a intervalos regulares a lo largo de transectos dentro de cada población para representar todas las áreas de distribución de las plantas.

Análisis electroforéticos

Los extractos proteicos fueron obtenidos utilizando un mortero de vidrio donde se machacaron las hojas almacenadas en el ultracongelador a -80°C con una solución de extracción (según SHIELDS *et al.* 1983) que previno la oxidación de los enzimas y garantizó su óptima conservación. La disolución resultante se adsorbió en patillas de papel de filtro Whatman nº 3 que fueron mantenidas a -80°C hasta el análisis electroforético en geles horizontales de almidón (Aldrich 23, 402-8) al 11% p/v.

Resolvimos siete sistemas enzimáticos [isocitrato deshidrogenasa (IDH, E.C.1.1.1.42), malato deshidrogenasa (MDH, E.C.1.1.1.37), fosfoglucosa isomerasa (PGI, E.C.5.3.1.9), fosfoglucosa mutasa (PGM, E.C.5.4.2.2), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH, E.C.1.1.1.44) y glutamato oxalacetato transaminasa (GOT, E.C.2.6.1.1)] utilizando tres sistemas de gel/electrodo: morfolina-citrato 6.1 (CLAYTON Y TRETIAK, 1972) para 6-PGDH, IDH y MDH, histidina 7.0 (SHIELDS *et al.*, 1983) para PGM y PGI y borato de Litio (SHIELDS *et al.*, 1983) para GOT.

Todas las recetas de tinción estuvieron basadas en WENDEL & WEEDEN (1989) aunque, para ciertas enzimas, la concentración de sustrato y el pH final de las soluciones fueron modificados para incrementar la resolución de las bandas.

Los patrones enzimáticos resultantes fueron interpretados y dibujados en la matriz creada a tal efecto en el programa informático Transformer-1 (CAUJAPÉ-CASTELLS 2001). Para cada enzima, los *loci* genéticos e isoenzimas fueron

designados según la secuencia numérica y, en cada *locus*, los alelos se asociaron a una letra (en orden alfabético), empezando por el más rápido hacia el ánodo (ver Figuras 1 a 4).

El número e intensidad de todas las bandas interpretadas concuerda con la hipótesis de la codominancia de Mendel (ver apartado de resultados para una mejor explicación). La verificación de las movilidades enzimáticas entre poblaciones y entre especies se realizó por comparación directa de las variantes alélicas detectadas en un mismo gel destinado a tal efecto.

Análisis de datos

El número de alelos por *locus* (A_i), el porcentaje de *loci* polimórficos (P), la heterocigosidad esperada y observada (H_e y H_o) y las distancias genéticas (NEI, 1978) fueron calculados usando BIOSYS-1 versión 1.7 (SWOFFORD Y SELANDER, 1988). Los estadísticos de estructura poblacional de NEI (1973) y WRIGHT (1922) fueron calculados usando el programa informático GENESTAT-PC versión 3.31 (LEWIS, 1993) y POPGENE (1997) respectivamente. Construimos un árbol con las distancias genéticas de NEI (1978) utilizando el algoritmo UPGMA en el programa NTSYS-PC versión 1.80 (ROHLF, 1993).

Usamos las distancias de NEI (1978) porque las simulaciones en NEI *et al.* (1983) mostraron que este estimador da resultados más consistentes que otros métodos de cálculo de la distancia genética. Los diferentes formatos de archivos que se necesitaron para correr los programas de genética de poblaciones y obtener los valores de los parámetros de variación genética intra e interpoblacional fueron generados por el programa informático TRANSFORMER 1 (CAUJAPÉ-CASTELLS, 2001) a partir de la matriz de genotipos individuales por *locus* por población.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Interpretación de los patrones moleculares

La enzima IDH (Fig. 1) mostró una única zona de actividad enzimática en la zona inferior de la región anodal del gel, que fue designada como un *locus* segregante (*Idh-1*) donde se detectaron un total de cinco alelos. Este *locus* mostró el patrón de intensidades esperado en un enzima dimerico con herencia mendeliana codominante. Esto significa que los individuos heterocigotos exhibieron tres bandas, de las cuales la intermedia (correspondiente al heterodímero) fué más intensa que la de cada una de los extremos (correspondientes a los homodímeros) y equidistante respecto a ellas.

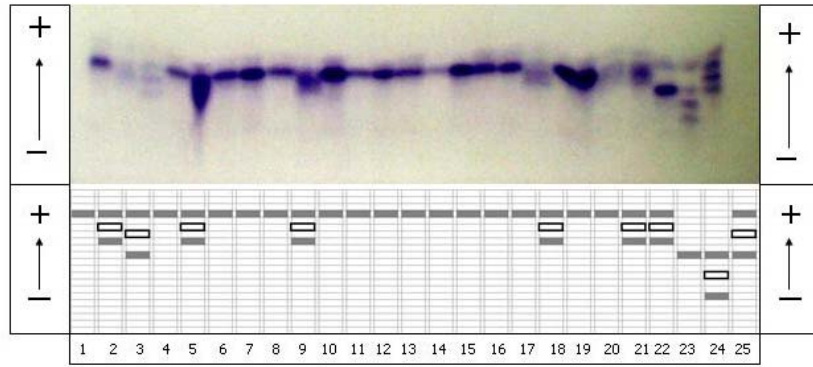


Figura 1. La interpretación de este gel correspondiente a la enzima IDH muestra un cambio alélico que refleja las diferencias genéticas entre Fuerteventura y Lanzarote. Los 22 primeros individuos pertenecen a poblaciones de Fuerteventura de las especie *M. bolleana* y *M. gr. longipetala*, mientras que los tres últimos individuos pertenecen a las poblaciones de *M. bolleana* en Lanzarote. Las bandas blancas simbolizan los heterodímeros.

La enzima MDH (Fig. 2) mostró dos regiones de actividad en la zona anodal media de los geles, que fueron designadas como dos *loci* putativos (*Mdh-1* y *Mdh-2*) con tres y cinco alelos, respectivamente. Ambos *loci* se correspondieron con el de un enzima dimérico.

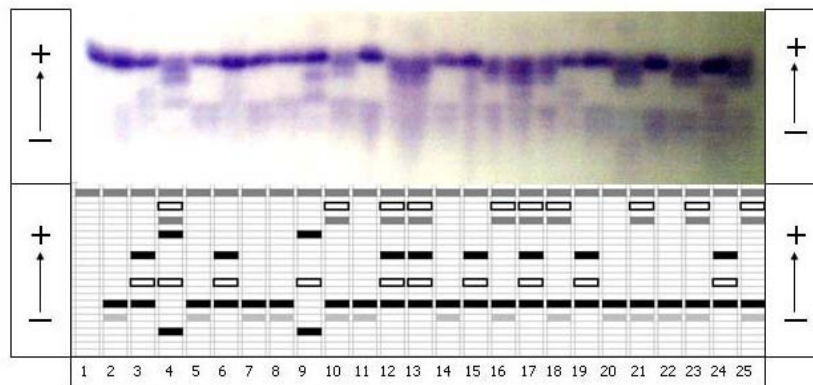


Figura 2. Una foto de gel teñido para Mdh por encima de su dibujo realizado en el programa Transformer 1. Las bandas blancas simbolizan los heterodímeros.

La enzima 6PGD mostró dos regiones de actividad que fueron designadas como dos *loci* putativos (*6Pgd-1* y *6Pgd-2*) con uno y tres alelos respectivamente que se adaptaban al patrón de expresión de un enzima de estructura dimérica (ver explicación en *IDH*), aunque el *loci 6pgd-1* fue monomórfico en todas las poblaciones. Estos dos *loci* se resolvieron en la zona baja de la región catodal del gel.

La enzima PGI (Fig. 3) 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 (*locus Pgi-1*). Los patrones de PGI correspondieron a lo esperado para un enzima dimérico (ver explicación en IDH) y fueron interpretados como polimorfismos segregantes correspondientes a dos alelos.

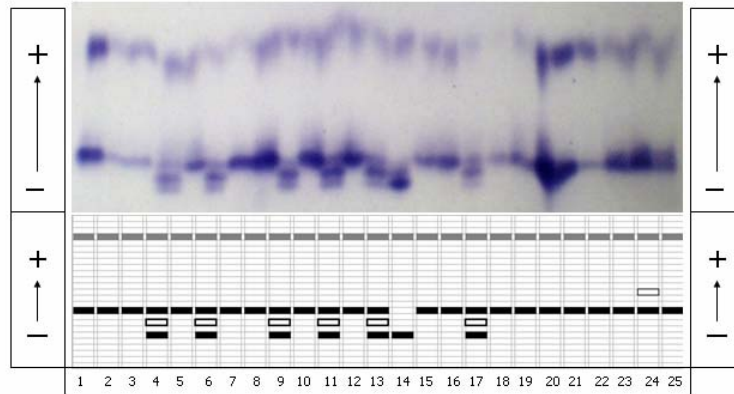


Figura 3. La enzima PGI mostró dos zonas de actividad aunque sólo pudo ser interpretado el sistema inferior (dibujado en negro). Las bandas blancas simbolizan los heterodímeros.

La enzima PGM (Fig. 4) mostró tres regiones de actividad que fueron designadas como tres *loci* putativos (*Pgm-1*, *Pgm-2* y *Pgm-3*) con cinco, cuatro y cuatro alelos, respectivamente. En algunos casos, se detectaron bandas débiles cerca de las correspondientes a la expresión de los alelos del locus *Pgm-2*. El origen de estas bandas es incierto, por lo cual no han sido interpretadas.

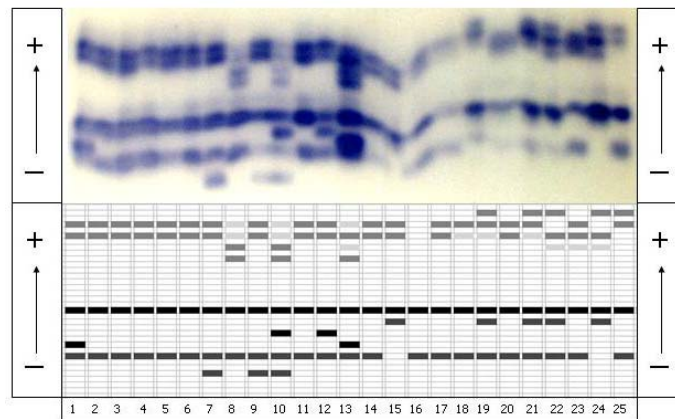


Figura 4. La enzima PGM mostró tres zonas de actividad correspondientes a tres *loci*, cada una con un esquema alélico de tipo monomérico. En la interpretación de Transformer-1, *Pgm-1* corresponde a las bandas grises claras, *Pgm-2* a las bandas negras y *Pgm-3* a las bandas gris oscuro.

Niveles de variación genética

La Tabla 1 ilustra que los mayores niveles de polimorfismo fueron detectados en las poblaciones de Fuerteventura, donde destacan por su elevada magnitud los valores obtenidos en las muestras de Montaña Talahijas (TALA, $T = 28$, $A_I = 2,5$, $P = 81,8$, $H_o = 0,207$, $H_e = 0,270$, $F = 0,236$ y $t = 0,618$). Asimismo, la media de todos los índices fué superior en esta isla con valores promedio de $T = 25,2$, $A_I = 2,3$, $P = 76,3$, $H_o = 0,236$, $H_e = 0,284$, $F = 0,156$ y $t = 0,733$. Los valores más bajos de variabilidad genética fueron observados en Lanzarote, con niveles de polimorfismo muy parecidos entre sus poblaciones, destacando la playa de Famara (FAMA) con resultados: $T = 17$, $A_I = 1,5$, $P = 45,5$, $H_o = 0,158$, $H_e = 0,128$, $F = -0,157$ y $t = 1,372$. Los niveles medios para esta isla fueron siempre inferiores a los de Fuerteventura: $T = 17,7$, $A_I = 1,6$, $P = 45,5$, $H_o = 0,150$, $H_e = 0,161$, $F = 0,016$ y $t = 1,002$. La media total de los valores de polimorfismo obtenidos para *Matthiola bolleana sensu lato* fue de $T = 22,3$, $A_I = 2,02$, $P = 64,8$, $H_o = 0,204$, $H_e = 0,238$, $F = 0,103$ y $t = 0,834$.

Los valores de F_{st} por locus hallados para *M. bolleana* son en general moderadamente altos (media $F_{st} = 0,367$, datos no mostrados). Considerando todos los pares de poblaciones, el valor máximo de este parámetro (que cuantifica la proporción de variación atribuible a la diferenciación entre poblaciones) fue $F_{st} = 0,516$ (FAMA – FAJA) y el mínimo de $F_{st} = 0,043$ (PSBR – TALA) (Tabla 2). El valor promedio hallado en Fuerteventura fue $F_{st} = 0,207$ y en Lanzarote fue solamente la mitad $F_{st} = 0,105$. Por lo tanto, a partir de estos datos, puede inferirse que existe una mayor variabilidad genética en la isla de Fuerteventura que podría ser atribuible a una mayor antigüedad de estas poblaciones.

En consonancia con esta mayor heterogeneidad genética, las poblaciones de esta isla están más diferenciadas que sus congéneres de Lanzarote, que destacan por su menor polimorfismo y su elevada cohesión genética. Las poblaciones de Lanzarote tienen una mayor continuidad ecológica tanto de tipo de sustrato (jables) como de exposición (todas prácticamente están fuertemente influenciadas por la maresía), de forma que podríamos hablar de una única población. Por el contrario, la mayor diversidad de las poblaciones de Fuerteventura quizás tenga que ver además con una mayor probabilidad de flujo genético entre *M. gr. longipetala* y *M. bolleana* en esta isla. De hecho, la variabilidad morfológica observada en las poblaciones de *Matthiola* de Jandía parece indicar algo así. No obstante, esperamos que los análisis moleculares con las poblaciones de *M. longipetala* (SÁNCHEZ *et al. in prep.*) permitan dar una respuesta más concreta a estas hipótesis. Por estos valores de diversidad genética tan diferenciados, si hubieramos de conservar la variación genética de este endemismo canario, probablemente tendríamos que considerar separadamente las poblaciones de cada una de estas islas.

La estimación del flujo génico a través de los valores de N_m (WRIGHT, 1931) entre pares de poblaciones dio un valor máximo de $N_m = 5,582$ entre PSBR – TALA y un mínimo de $N_m = 0,234$ entre FAMA – FAJA. No obstante los valores más altos se observaron entre las poblaciones de Lanzarote, todas con $N_m > 1$ y una media de $N_m = 2,127$, mientras que en Fuerteventura la media fue $N_m = 0,956$. Los valores de N_m entre poblaciones de Fuerteventura y Lanzarote fueron en general, los más bajos con una media de $N_m = 0,577$. En general, los bajos valores de flujo génico entre islas delatan las considerables diferencias de composición

genética entre las poblaciones de Fuerteventura y Lanzarote (detectamos 15 alelos exclusivos en la primera isla y solamente 3 en la segunda). Sin embargo el valor máximo de N_m entre poblaciones de las dos islas es superior a 1 ($N_m = 1,497$, entre FAJA y CAB2).

Población	Código	T	A_i	P	H_o	H_e	F	t
FUERTEVENTURA								
1. Faro de Jandía	FAJA	22	2,0 (0,3)	63,6	0,217 (0,085)	0,249 (0,071)	0,104	0,812
2. Puertito de la Cruz	CRUZ	25	2,3 (0,3)	81,8	0,226 (0,069)	0,287 (0,067)	0,163	0,719
3. Bco. de Agua Oveja	OVEJ	26	2,4 (0,3)	81,8	0,250 (0,086)	0,294 (0,064)	0,183	0,691
4. Montaña de Talahijas	TALA	28	2,5 (0,2)	81,8	0,207 (0,055)	0,270 (0,052)	0,236	0,618
5. Punta Pesebre	PSBR	25	2,3 (0,2)	72,7	0,282 (0,091)	0,322 (0,072)	0,095	0,826
Promedio Fuerteventura		25,2	2,3	76,3	0,236	0,284	0,156	0,733
LANZAROTE								
6. Caleta Caballo 1	CAB1	18	1,6 (0,2)	45,5	0,156 (0,069)	0,187 (0,072)	0,06	0,887
7. Caleta Caballo 2	CAB2	18	1,6 (0,4)	45,5	0,136 (0,070)	0,168 (0,073)	0,144	0,748
8. Playa de Famara	FAMA	17	1,5 (0,2)	45,5	0,158 (0,083)	0,128 (0,052)	- 0,157	1,372
Promedio Lanzarote		17,7	1,6	45,5	0,150	0,161	0,016	1,002
Promedio <i>Matthiola bolleana</i>		22,3	2,02	64,8	0,204	0,238	0,103	0,834

Tabla 1. Indicadores básicos de variabilidad isoenzimática para las ocho poblaciones estudiadas de *Matthiola bolleana*. T: Número total de alelos recontados; A_i : número medio de alelos por locus; P : proporción de loci polimórficos (un locus es considerado como polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no supera el 0,95); H_o y H_e : heterocigotos observados y esperados; F : índice de fijación; t : tasa de reproducción cruzada [$t=(1-F)/(1+F)$]. Los valores entre paréntesis representan la desviación típica.

Estos datos son consistentes con los altos valores de identidad genética de NEI (1978) entre las poblaciones de una misma isla y los valores más bajos entre poblaciones de diferentes islas. En general, las poblaciones de Lanzarote presentaron los valores de identidad genética de NEI (1978) mayores y más próximos a 1. El cluster de la Figura 5 ilustra gráficamente estos resultados al agrupar claramente las poblaciones por islas.

Los resultados promedio de los indicadores básicos de polimorfismo en *Matthiola bolleana* ($A_i = 2,02$, $P = 64,8$ y $H_e = 0,238$) son, en comparación, mucho mayores a los valores medios dados para plantas endémicas en general ($A = 1,39$, $P = 0,26$ y $H_e = 0,063$) según HAMRICK & GODT (1989). Estos valores son asimismo mayores que los obtenidos para poblaciones de otras especies de *Matthiola* en el sistema insular siciliano (SÁNCHEZ *et al.* 2003, 2004 *in mss.*) en el Mediterráneo (con valores máximos de $P = 41,7$ y $H_e = 0,201$), y parecidos a los valores observados en otras plantas endémicas de Canarias como *Avena canariensis* ($A = 1,76$ y $H_e = 0,247$, MORIKAWA & LEGGETT, 1990), *Phoenix canariensis* Chabaud ($A = 1,59$, $P = 41,8$ y $H_e = 0,158$, GONZÁLEZ-PÉREZ, 2001), *Cistus symphytifolius* Lam. var. *leucophyllus* (Spach) Dans. ($A = 1,69$, $P = 53,8$ y $H_e = 0,187$, BATISTA *et al.* 2001) y *Androcymbium psammophilum* ($A_p = 2,0$, $P = 15$ y $H_e = 0,053$, PEDROLA-MONFORT & CAUJAPÉ-CASTELLS, 1996).

	FAJA	CRUZ	OVEJ	TALA	PSBR	CAB1	CAB2	FAMA
FAJA		1,891	0,793	1,344	1,289	0,386	1,497	0,234
CRUZ	0,117		1,076	1,815	2,079	0,651	0,479	0,428
OVEJ	0,240	0,189		1,963	1,946	0,760	0,663	0,677
TALA	0,157	0,121	0,113		5,582	0,592	0,465	0,452
PSBR	0,163	0,107	0,114	0,043		0,567	0,416	0,399
CAB1	0,393	0,277	0,247	0,297	0,306		3,712	3,392
CAB2	0,143	0,343	0,274	0,350	0,375	0,063		1,824
FAMA	0,516	0,369	0,270	0,356	0,385	0,069	0,121	

Tabla 2. Valores de los estimadores de flujo génico entre poblaciones (Nm , diagonal superior) y de la subdivisión poblacional (F_{st} , diagonal inferior). Los códigos corresponden a la Tabla 1.

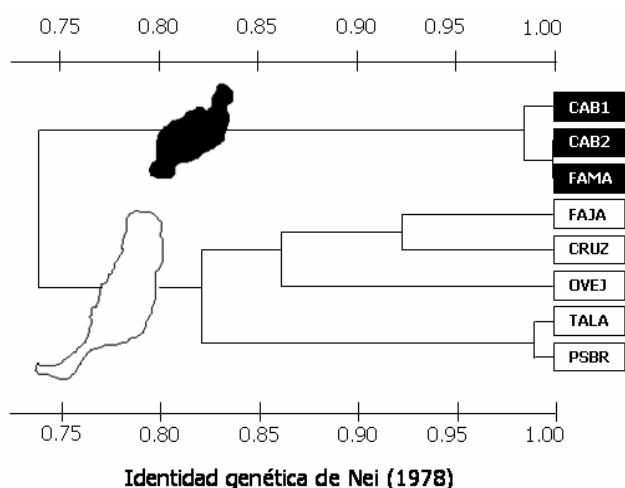


Figura 5. Cluster UPGMA donde se representa la proximidad genética entre las poblaciones de *Matthiola bolleana* según los valores de la identidad de NEI (1978). Los códigos poblacionales corresponden a la Tabla 1.

Con respecto a los datos sobre la distribución de la variabilidad genética entre las poblaciones, la media de $F_{st} = 0,367$ obtenida en *Matthiola bolleana* supera las medias obtenidas para algunos endemismos de Canarias ($F_{st} = 0,280$, FRANCISCO-ORTEGA *et al.* 2000), para *M. fruticulosa* (L.) Maire y *M. tricuspudata* (L.) R. Br. in W. T. Aiton en el sistema insular de Sicilia (0,115 y 0,250 respectivamente, SÁNCHEZ *et al.* 2004), y duplica la medida obtenida para especies alógamas de Canarias ($F_{st} = 0,179$, FRANCISCO-ORTEGA *et al.* 2000).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada en parte con el proyecto Pi 2003-032 del Gobierno de Canarias, por una beca Tomás de Zárata del Cabildo de Gran

Canaria a Juan Luis Sánchez y por un proyecto Ramón y Cajal co-financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y el Cabildo Insular de Gran Canaria a Juli Caujapé-Castells. Agradecemos a estas instituciones su apoyo para llevar a cabo esta investigación.

REFERENCIAS

- ARDÉVOL-GONZÁLES, J. S., BORGÉN L. & PÉREZ DE PAZ P. L., 1993.- Checklist of chromosome numbers counted in Canarian vascular plants. *Sommerfeltia* 18: 1-59.
- BATISTA, F., BAÑARES A., CAUJAPÉ-CASTELLS J., CARQUÉ E., MARRERO-GÓMEZ M., & SOSA P. A., 2001.- Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* (Cistaceae) from the Canary Islands: intraspecific and interespecific comparisons and implications for genetic conservation. *Amer. J. Bot.* 88(9): 1582-1592.
- BAUM, B. R., RAJHATHY, T., & SAMPSON, D. R. 1973.- An important new diploid *Avena* species discovered on the Canary Islands. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 51:759-762.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J., 2001.- *Transformer 1.0: un programa de formateado de datos genotípicos individuales para implementación en programas de análisis molecular en genética de poblaciones*. Distributed by the autor
- & JANSEN R.K., 2003.- The influence of the Miocene Mediterranean dessication on the geographical expansion and genetic variation of *Androcymbium gramineum* (Cav.) McBride (Colchicaceae). *Molec. Ecol.* 12: 1515-1525.
- CLAYTON, J.W., & TRETIAK D.N., 1972.- Amine citrate buffer for pH control in starch gel electrophoresis. *J. Fish Res. Board Canada* 29: 1169-1172.
- FRANCISCO-ORTEGA, J., SANTOS-GUERRA A., S-C . KIM, & CRAWFORD D.J., 2000.- Plant Genetic Diversity In Canary Islands: a conservation perspective. *Amer. J. Bot.* 87(7): 909-919.
- FUERTES AGUILAR, J., FRANCISCO-ORTEGA, J., SANTOS-GUERRA, A., RAY, M. F., & JANSEN, R. K. 2002.- Chloroplast and nuclear molecular evidence for multiple colonizations of *Lavatera* (Malvaceae) in the Canary Islands. *Systematic Botany* 27: 74-83.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.A., 2001.- *Caracterización molecular de la palmera canaria (Phoenix canariensis) como base para su conservación*. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
- HARRICK, J.L., & GODT M. J.W., 1989.- Allozyme diversity in plant species. In A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Wier [eds.], *Plant Population Genetics*, 43-63. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- LEWIS, P.O., 1993.- GeneStat-PC 3.31. North Carolina State University. Raleigh. North Carolina
- NEI, M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3321-3323.
- NEI, M. 1978.- Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- TAJIMA M., F., & TATENO Y., 1983.- Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Molec. Evol.* 19: 153-170.
- MOORE, M. J., FRANCISCO-ORTEGA, J., SANTOS-GUERRA, A., & JANSEN, R. K., 2002.- Chloroplast DNA evidence for the roles of island colonization and extinction in *Tolpis* (Asteraceae: Lactuceae). *American Journal of Botany* 89: 518-526
- MORIKAWA T. & LEGGETT J.M., 1990.- Isozyme polymorphism in natural populations of *Avena canariensis* from the Canary Islands. *Heredity* 64: 403-411. 1990.
- MORT, M. E., SOLTIS, D. E., SOLTIS, P. S., FRANCISCO-ORTEGA, J., SANTOS-GUERRA, A. 2002.- Phylogenetics and evolution of the Macaronesian clade of Crassulaceae inferred from nuclear and chloroplast sequence data. *Systematic Botany* 27: 271-288.

- PEDROLA-MONFORT, J. & CAUJAPÉ-CASTELLS, J., 1996.- Genetic and morphological divergence in the *Androcymbium gramineum* complex (Colchicaceae). *Pl. Syst. Evol.* 201: 149-162.
- POPGENE VERSION 1.32., 1997.- Ag/For Molecular Biology and Biotechnology Centre (University of Alberta) and Center for International Forestry Research. Alberta, Canada.
- ROHLF, F.J., 1993.- *NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis version 1.80*. Applied Biostatistics Inc.
- SÁNCHEZ, J.L., DOMINA, G. & CAUJAPE-CASTELLS J., 2003.- The Sicilian circumscription of genus *Matthiola*: population genetic insights from isozymes. *VI Conference on Plant Taxonomy – Book of Abstracts – pag. 73*, Alghero, Sardinia, Italy.
- 2004.- Genetic differentiation of *Matthiola* (Cruciferae) in the Sicilian insular system. *Heredity* in m.s.s.
- SHIELDS, C.R., T.J. ORTON, & STUBER C.W., 1983.- An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In Tansley, S. D., and T. J. Orton (eds.) *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Amsterdam: Elsevier. A: 443-468.
- SWOFFORD, D.L., & SELANDER, R.B., 1988.- *BIOSYS-1: a computer program for the analysis of allelic variation in genetics*. University of Illinois, Urbana, Illinois.
- WENDEL, F. & WEEDEN, F., 1989.- Visualization and interpretation of plant isozymes. In Soltis D. & P. Soltis (Eds.), *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press. Portland.
- WRIGHT, S., 1922.- Coefficients of inbreeding and relationship. *Amer. Naturalist* 56: 330-338.
- 1931.- Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.