

DIVERSIDAD GENÉTICA EN *PAROLINIA*: *P. GLABRIUSCULA* Y *P. PLATYPETALA* (BRASSICACEAE: MATTHIOLEAE)

OLGA FERNANDEZ -PALACIOS, JULIA PÉREZ DE PAZ, ROSA FEBLES Y JULI CAUJAPÉ-CASTELLS

JARDIN 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: Marzo 2004

Palabras claves: Biología molecular, isoenzimas, Brassicaceae, *Parolinia*, islas Canarias, diversidad genética

Key words: Molecular biology, allozyme, Brassicaceae, *Parolinia*, Canary islands, *genetic diversity*

RESUMEN

Se comparan los niveles de diversidad genética en dos especies del género *Parolinia* (Brassicaceae: Matthioleae) endémicas de Gran Canaria, *P. glabriuscula* y *P. platypetala* ambas con una sola población conocida, la Caldera de Bandama y Barranco de Guayadeque respectivamente, con marcadas diferencias morfológicas, tamaños poblacionales y antigüedad del hábitat. La diversidad genética de *P. glabriuscula*, con menor tamaño poblacional y hábitat más reciente, fue más alta de lo esperado, siendo sus indicadores básicos de variabilidad genética un poco menores a los de su congénere *P. platypetala* (con hábitat más antiguo y mayor tamaño de población). Teniendo en cuenta el presumible aislamiento entre estas poblaciones y su diferenciación taxonómica, la divergencia genética inter-poblacional entre *P. platypetala* y *P. glabriuscula* es solamente moderada ($F_{ST} = 0.199$). Si comparamos las dos especies, objeto de este estudio, conjuntamente, con otros géneros de la familia, *Parolinia* está dentro del rango esperado de valores en cuanto a indicadores básicos de variabilidad y al componente inter-poblacional de la diferenciación genética ($G_{ST} = 0.200$)

SUMMARY

We compare the levels of genetic variation in the two Gran Canarian endemics *Parolinia glabriuscula* and *P. platypetala* (Brassicaceae: Matthioleae), whose single known populations at the Caldera de Bandama and Barranco de Guayadeque (respectively) exhibit considerable differences in terms of morphological traits, population sizes and geological age. Genetic variation in *P. glabriuscula*, whose population exhibit a very low population size and occurs in a very recent habitat, was higher than expected, with the basic indicators of variation only slightly lower than those of its congener *P. platypetala* (with a much higher population size and habitat age). Taking into account the presumable isolation between these populations and their taxonomic distinctness, the inter-population genetic divergence between *P. platypetala* and *P. glabriuscula* is only moderate ($F_{ST} = 0.199$). Basic indicators of variation and the inter-population component of genetic differentiation ($G_{ST} = 0.200$) when we merge these two species in a single analytical unit agree with the expected range of values within the family.

INTRODUCCIÓN

Parolinia Webb es un género exclusivo de las Islas Canarias enmarcado en la Tribu Matthioleae de la familia Brassicaceae. Descrito por Webb (1840) para la isla de Gran Canaria fue considerado durante más de un siglo como género monotípico, conteniendo sólo *P. ornata* Webb. Actualmente se conocen 7 especies, cuatro en Gran Canaria: *P. ornata* Webb, *P. platypetala* G. Kunkel, *P. filifolia* G. Kunkel ex Svent. y *P. glabriuscula* Montelongo & Bramwell y tres en las islas occidentales: *P. intermedia* Svent. & Bramwell en Tenerife, *P. schizogynoides* Svent. en La Gomera y *P. aridanae* Santos *nomen nudum* (SANTOS, 1996) en La Palma.

Género presumiblemente diploide con $2n=22$ (BORGÉN, 1969; BRAMWELL *et al.*, 1972; FEBLES, 1989), *Parolinia* se caracteriza por su hábito leñoso y aparente uniformidad en sus caracteres vegetativos. Su distribución es relativamente restringida, ocupando siempre el mismo tipo de hábitat en las islas, en laderas secas y soleadas del piso basal (BRAMWELL, 1970), con ligeras variantes y supuestamente con las mismas o similares presiones de selección al tratarse de taxones con situaciones ecológicas similares, aislados por barreras geográficas entre islas y entre barrancos dentro de la misma isla.

Tradicionalmente dentro de la Tribu Matthioleae, *Parolinia* ha sido relacionado con el género leñoso africano *Diceratella* Boiss. del Éste de África (JONSELL, 1978; BRAMWELL, 1986), aunque tampoco se descarta su cercanía a *Morettia* DC, género con especies herbáceas, ambos con $2n=22$ y similares características palinológicas, morfológicas del gineceo, tipos de pelos, semillas, etc. (REESE, 1957; JONSELL, 1978, 1979; HUMPHRIES *et al.*, 1978; PÉREZ DE PAZ, 1980; ARYAVAMD, 1983). Tampoco se descarta su posible relación con *Matthiola* R. Br., género con especies herbáceas y subarborescentes y una más amplia distribución alrededor de la cuenca mediterránea, este y sur de África, aunque con algunas características morfológicas similares a *Parolinia*, presenta diferencias en el número cromosómico, mayoritariamente diploide (aunque a veces tetraploide) con número básico $x=6$ y 7 y tipos polínicos diferentes también variables según aperturas (ERDTMAN, 1969; FEDEROV, 1974; HEDGES, 1976; JONSELL, 1979; PÉREZ DE PAZ, 1980; GOLDBLATT, 1981, 1984, 1985, 1988; GOLDBLATT & JOHNSON 1990, 1991, 1994, 1996, 1998 y 2000). Asimismo se prevé una posible relación con *Notoceras* (Ait) Amo ($2n=22$) y *Lonchophora* Dur. ($2n=20$) géneros de la tribu biogeográficamente cercanos (REESE, 1957; LARSEN, 1960; FEDEROV, 1974; CARRIQUE & MARTÍNEZ, 1984; DÍAZ LIFANTE *et al.*, 1996).

Las especies objeto de estudio *P. platypetala* y *P. glabriuscula* son dos endemismos de Gran Canaria con distribución restringida a una única población cada una. Ambas especies, se encuentran en las listas rojas de especies amenazadas, con categoría (CR) (FDEZ-PALACIOS & VILCHES, 2003).

P. glabriuscula se diferencia morfológicamente de *P. platypetala* por su menor panosidad en general y por sus silicuas glabriúsculas con apéndices tanto simples como agudos y ramas e inflorescencias péndulas (MONTELONGO & BRAMWELL, 2003), teniendo que señalar que *P. platypetala*, presenta pétalos largamente unguiculados (KUNKEL, 1970).

Las poblaciones donde se encuentran ambas especies están separadas por unos 12 km de distancia y muestran diferencias notorias tanto en lo que se refiere

a factores abióticos como bióticos (Tabla 1). Entre estas diferencias cabe señalar su geomorfología, la Caldera de Bandama (con unas dimensiones en torno a 1 km de diámetro y 200 metros de profundidad), es una caldera volcánica que constituye un ejemplo del resultado de una explosión magmofreática (MONTELONGO, 1990), que según datos geomorfológicos está datada en unos 5000-4000 años (HANSEN, 1993). *P. glabriuscula* se encuentra únicamente en la ladera este de la Caldera.

Por otro lado el enclave de *P. platypetala*, Barranco de Guayadeque (con una longitud de 20 km), es un cauce incidido muy encajado, con carácter general, en coladas basálticas recientes, de la serie II (5.3-2.9 millones de años), salvo un pequeño tramo en la margen derecha de su curso bajo, donde afloran basaltos del primer episodio volcánico de Gran Canaria (MONTELONGO, 1992; RUIZ DE LA TORRE, 1996). La especie se distribuye a lo largo de 5 Km en la ladera con orientación SO, siendo anecdótica su presencia en la otra ladera.

Hasta el momento, no hay información sobre los niveles de variabilidad molecular en *Parolinia* y dado que se trata de un género endémico, se hace imprescindible la comparación de sus niveles de diversidad genética con otros taxones de la familia (GITZENDANNER & SOLTIS, 2000; KARRON, 1989, 1991; ELGAR & CLODE, 2001).

Entre los trabajos que abordan los niveles de diversidad genética en la familia, merece destacar a los endemismos canarios, *Matthiola bolleana* (Webb ex Christ.) Sund. (tribu Matthioleae), con $2n = 12$, y el complejo *Lobularia canariensis* (DC) Borgen, (Tribu Alyseae) con $2n = 22$ (VAN LOON, 1974; BORGAN, 1987; SÁNCHEZ *et al*, 2004).

Siguiendo los criterios de LOVELESS & HAMRICK (en OYAMA 1997), HAMRICK & GODT (1989, 1996), GODT & HAMRICK (1999); GITZENDANNER & SOLTIS (2000), en este trabajo se asume que para la correcta interpretación de los parámetros genéticos existen cuatro factores cuyo conocimiento es fundamental:

1.- Adscripción filogenética: requiere el conocimiento de la historia evolutiva del taxon en cuestión y obliga, por lo tanto, a una confrontación con otros congéneres con distintos modelos de distribución.

2.- Sistema de cruzamiento: la variabilidad genética está íntimamente relacionada con los sistemas de cruzamiento ya que éstos condicionan a su vez la diversidad genética de la descendencia; en este sentido hay que señalar que en la familia Brassicaceae se ha descrito la existencia de un sistema de auto-incompatibilidad esporofítico homomórfico (BATEMAN en GIBBS, 1986; THOMPSON en GIBBS, 1986; GIBBS, 1988; OLOWOKUDEJO & HEYWOOD, 1984; NIETO FELINER, 1990; RUSTAN, 1996), cuyo control genético está determinado por un único *locus* S con múltiples alelos en la población (GIBBS, 1986, 1988). Cada gametofito masculino porta un único alelo s en su núcleo pero es el esporofito diploide (a través de la ectexina del polen) el que determina la reacción de auto-incompatibilidad. El esquema puede ser más complejo debido a las posibles reacciones de dominancia-recesividad (GIBB, 1986 y 1988), disminuyendo así las posibilidades de intercambios genéticos entre ciertos individuos de la población lo que en principio supondría un aumento de la variabilidad genética poblacional al disminuir el impacto de la consanguinidad. La reacción de auto-incompatibilidad tiene lugar en la superficie estigmática, donde el

polen auto-incompatible es incapaz de rehidratarse, germinar y penetrar la papila estigmática. De forma general, en las células de las papilas adyacentes a un grano de polen auto-incompatible, se localiza una deposición de callosa (DICKINSON & LEWIS en GIBBS, 1988). Asimismo, se sabe que hay proteínas localizadas en la pared celular implicadas en esta reacción de auto-incompatibilidad (HESLOP-HARRISON *et al.* en GIBBS, 1988).

A pesar de que no existen datos definitivos de los cruzamientos artificiales realizados para determinar la presencia y niveles del sistema auto-incompatible esporofito homomórfico en el género, los primeros indicios apuntan que existen diferentes grados de auto-incompatibilidad en las distintas especies (FERNÁNDEZ-PALACIOS *et al.*, en preparación).

2- Tamaño poblacional: la estimación del censo poblacional en *P. platypetala* dio como resultado un total de 46.000 individuos, frente al censo directo realizado en *P. glabriuscula* con unos 250 individuos (Tabla 1) (FERNÁNDEZ-PALACIOS Y VILCHES, 2003)

3- Historia geológica o tiempo máximo de asentamiento de las poblaciones: los datos geomorfológicos datan los materiales más antiguos en el barranco de Guayadeque entre unos 5.9-2.3 millones de años (MONTELONGO, 1992), mientras que los mismos datos para la Caldera de Bandama data ésta entre unos 5.000-4.000 años de antigüedad (HANSEN, 1993).

Este trabajo tiene como objetivos: 1º) Estimar los niveles de diversidad genética y su estructura en las poblaciones naturales de dos de las cuatro especies endémicas del género *Parolinia* que existen en Gran Canaria: *P. glabriuscula* y *P. platypetala*, ambas con una sola población pero de tamaño poblacional muy contrastado. 2º) Relacionar la variabilidad genética con distintos factores abióticos y bióticos: tamaño poblacional, hábitat, tiempo máximo de asentamiento de las poblaciones y sistema de auto-incompatibilidad esporofítico homomórfico. 3º) Comparar los niveles de diversidad genética de los dos endemismos canarios con otros géneros de la familia Brassicaceae.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la Tabla 1 se describen las características de altitud, orientación, suelo, hábitat principal y taxones acompañantes de cada población

En ambas especies el muestreo fue realizado con el objetivo de obtener una buena representación de las áreas de distribución de los individuos en la población, que nos ofreciera una buena aproximación a los niveles de variabilidad genética. En el caso de Guayadeque (PPG) (Figura1) se recogieron hojas de 128 individuos distribuidos en 5 núcleos a lo largo del barranco (18, 23, 30, 27, 30), dos de los cuales representaban los extremos de la población, y en el caso de Bandama (PGB), se muestrearon 74 individuos repartidos en 2 núcleos (33 y 41 individuos) que representaban las dos áreas de mayor densidad de individuos. Todos los individuos fueron etiquetados para facilitar eventuales re-muestreos. El muestreo de hojas para análisis isoenzimático fue realizado en el periodo correspondiente a la formación de primordios foliares nuevos que son los que muestran mayor actividad enzimática; el material recogido se guardó en bolsas

etiquetadas y se transportó hasta el laboratorio del JBCVC en neveras de campo con bloques refrigerantes para mantener el material lo más fresco posible para evitar la desnaturalización de las enzimas. Una vez en el laboratorio, el material fue almacenado en el ultracongelador a -80°C hasta el momento de su procesamiento para análisis isoenzimático.

ESPECIE	<i>P. glabriuscula</i> Montelongo & Bramwell	<i>P. platypetala</i> G. Kunkel
POBLACION	Caldera de Bandama (PGB)	Bco. de Guayadeque (PPG)
ALTITUD	225-425 m	400-1000 m
ORIENTACIÓN	SO	S0
CENSO	250 individuos ²	46.693 individuos ²
SUELO	Asociación xeralf-ochrept-litosol ⁴	Asociación litosol y ochrept ⁴
SUSTRATO GEOLOGICO	Lava, conos de tefras, maares y "fallout" basaníticos nefelíticos localmente meliíticos	Lavas y conos de tefras basaníticos, basalticos alcalinos brechas ricas en liticas y locamente ignimbritas
SINFITOSOCIOLOGIA	Cinturón bioclimático inframediterráneo seco-semiárido superior ¹	Cinturón bioclimático Inframediterráneo desértico árido ¹
HABITAT PRINCIPAL	Riscos y laderas rocosas con relativa pendiente	En riscos y laderas rocosas
FITOSOCIOLOGÍA	<i>Pistacia lentisco-Oleetum cerasiformis</i> ass. nova ¹	<i>Euphorbietum balsamiferae</i> ³
TAXONES ACOMPAÑANTES MÁS HABITUALES	<i>Kleinia neriifolia</i> , <i>Periploca laevigata</i> , <i>Lavandula multifida</i> subsp. <i>canariensis</i> , <i>Echium decaisnei</i> , <i>Aeonium percanium</i> , <i>Euphorbia canariensis</i>	<i>Kleinia neriifolia</i> , <i>Carlina canariensis</i> , <i>Euphorbia balsamifera</i> , <i>Echium decaisnei</i> , <i>Campylanthus salsoloides</i>

Tabla 1 – Características de las poblaciones estudiadas, Barranco de Guayadeque y Caldera de Bandama. ¹ DEL ARCO *et al.* (2002); ² FERNANDEZ-PALACIOS & VILCHES (2003); ³ SUNDING (1972); SÁNCHEZ DIAZ, (1978)

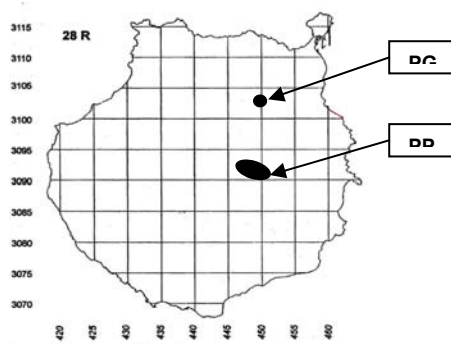


Figura 1.- mapa de distribución geográfica de *P. glabriuscula* (PGB) y *P. platypetala* (PPG)

A. Técnica molecular de electroforesis de isoenzimas

Los extractos proteicos se obtuvieron machacando las hojas en morteros de cristal mantenidos fríos en nevera y 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 fue realizada en geles horizontales de almidón (Aldrich 23.402-8) al 12% (p/v) usando tres sistemas tampon gel/electrodo: 1) Histidina 7.0 (Sistema E de SHIELDS *et al.*, 1983); 2) Borato-litio 8.3 (Sistema C de SHIELDS *et al.*, 1983), y 3) Morfolina-citrato 6.1 (CLAYTON & TRETIAK, 1972) donde se ensayaron los siguientes *loci* enzimáticos:

1) SISTEMA E: Fosfoglucoisomerasa (PGI, E.C.5.3.1.9), Fosfoglucomutasa (PGM, E.C.5.4.2.2), Isocítrico deshidrogenasa (IDH, E.C.1.1.1.42), Malato deshidrogenasa (MDH, E.C.1.1.1.37).

2) SISTEMA C: Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT, E.C.2.6.1.1), Esterasa (EST, E.C.3.1.1.), Acido fosfatasa (ACP, E.C.4.2.1.3), Leucil-aminopeptidasa (LAP, E.C.3.4.11.1) y Glutamato deshidrogenasa (GDH, E.C.1.4.1.2).

3) MORFOLINA-CITRATO 6.1: Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD, E.C.1.1.1.44), Síkimico deshidrogenasa (SKD, E.C.1.1.1.25) y el Enzima Málico (ME, E.C.1.1.1.40)

Los protocolos de tinción seguidos, están basados en ARÚS (1983), MURPHY *et al.* (1996); WENDEL & WEEDEN (1989) con ligeras modificaciones que afecta principalmente a las cantidades de sustrato y a los pH finales y que resultan en una mejor resolución de las bandas de actividad enzimática.

Cuando un enzima mostró actividad para más de un *locus* genético, los diferentes loci fueron codificados siguiendo la secuencia numérica desde la región de actividad más cercana al ánodo. Dentro de cada *locus*, los alelos fueron denominados siguiendo el alfabeto y asignando "a" para la banda de migración más anodal. La verificación y homologación de las movilidades enzimáticas interespecificas se determinó a través de comparaciones de los diferentes electromorfos en el mismo gel.

El desarrollo detallado de la técnica de electroforesis de isoenzimas en gel de almidón se describe en CAUJAPÉ-CASTELLS *et al.* (sin publicar)

B. Análisis de datos

Se compara la diversidad genética a nivel intrapoblacional teniendo en cuenta los distintos núcleos de cada población; asimismo, se compara la diversidad genética interespecifica (que este caso coincide con la inter-poblacional) tomando cada población como una entidad única. Los descriptores elementales de variabilidad isoenzimática poblacional: nº medio de alelos por *locus* (*A*), porcentaje de *loci* polimórficos (*P*- considerando como *locus* polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no excede de 0.95), desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg, heterocigosidad observada (*Ho*) y heterocigosidad esperada (*He*), fueron calculados en el programa BIOSYS-1 versión 1.7 (SWOFFORD & SELANDER, 1989).

Tanto los *F*- estadísticos (WRIGHT, 1951), como las distancias (*D*) e identidades (*I*) genéticas (NEI, 1978) para todos los pares de combinaciones de

los núcleos muestreados se calcularon por medio del análisis de los genotipos en el programa BIOSYS-1 versión 1.7 (SWOFORD & SELANDER, 1989), con el cual también se obtuvieron las matrices de identidad genética para construir el dendrograma de acuerdo al método UPGMA. Los estadísticos de diversidad genética interpoblacional de NEI (1973) se calcularon mediante el programa GENESTAT-PC 3.31 (LEWIS 1993)

Aplicamos el test propuesto por CORNUET y LUIKART (1996) para detectar si estas poblaciones han sufrido cuellos de botella recientes utilizando el programa Bottleneck (PIRY, LUIKART Y CORNUET 1998). El test está basado en el número significativo de *loci* polimórficos con exceso de heterocigotos.

El programa POPGENE 32 (YEH *et al.* 1997), fue usado para estimar el n° de migrantes Inter.-poblacional, por medio de la fórmula $N_m = [(1/F_{ST}) - 1]/[4(n/n-1)^2]$ (CROW & AOKI 1984), y calcular el test Ewens & Watersson de Neutralidad .

La tasa de alogamia (*t*) entre las poblaciones fue calculada por medio de los índices de fijación de WRIGHT (1931) (*F*), usando la fórmula $t = (1 - F)/(1 + F)$ (WEIR 1990). Un valor cercano a 1 indica apareamiento al azar.

El formateo de los datos genotípicos individuales para su implementación en los programas de ordenador usados para estimar los parámetros de variabilidad genética fue llevado a cabo con el programas TRANSFORMER-1 (CAUJAPÉ-CASTELLS, 2001).

RESULTADOS

A. Interpretación de las isoenzimas:

De las 12 isoenzimas ensayadas, 13 *loci* (*Pgi-1*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Pgm-3*, *Idh-1*, *Mdh-1*, *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Acp-1*, *Acp-2*) mostraron un grado de resolución suficiente para garantizar la interpretación, y de las 6 restantes, dos presentaron una mala resolución y cuatro no han sido interpretadas hasta el momento, SKD, 6PGD, ME, y GOT que merece mención especial, porque fue interpretada únicamente en *P. glabriuscula*, pero fue excluida de este estudio puesto que *P. platypetala* presenta un patrón muy complicado que necesitará estudios detallados de herencia que confirmen su base genética.

En la familia se prodigan las duplicaciones génicas en taxones tanto diploides como poliploides, pudiendo encontrar numerosos trabajos en los que se menciona su presencia (BROCHMANN, 1993; HURKA & NEUFFER, 1997; ANDERSON & WARWICK, 1999; NEUFFER & HOFFROGGE, 2000; SIMILLION *et al.*, 2002, etc.), destacando *Lobularia* (Tribu Alysseae), por su presencia en Canarias, (BORGÉN, 1987).

Detectamos heterocigotos asimétricos y “bandas fantasmas” en IDH, MDH, PGI, PGM (ARÚS & SHIELDS, 1983; KEPHART, 1990; COULHART & DENFORD en ANDERSON & WARWICK, 1999; WILLIAMSON & WERTH, 1999). Este hecho sugiere la presencia de duplicaciones génicas en *Parolinia* a pesar de tratarse de un género presumiblemente diploide. Dado que no se realizó ningún cruzamiento controlado para ayudar a verificar la interpretación genética de las duplicaciones putativas y por tanto en ausencia de conocimientos más profundos sobre la herencia de cada uno de estos *loci*, la interpretación que se siguió para asignar

genotipos individuales, basada en estudios en otras Brassicaceae (ANDERSON & WARWICK, 1999), fue conservativa, de tal manera que no asume la presencia de *loci* duplicados adicionales y solo asigna genotipos heterocigotos a los individuos donde las dos bandas correspondientes son de igual intensidad (Figura 2). Esta interpretación garantiza una base comparativa suficiente hasta que se conozcan mejor los mecanismos de herencia de los *loci*, aunque esto suponga una subestimación de la variabilidad genética.

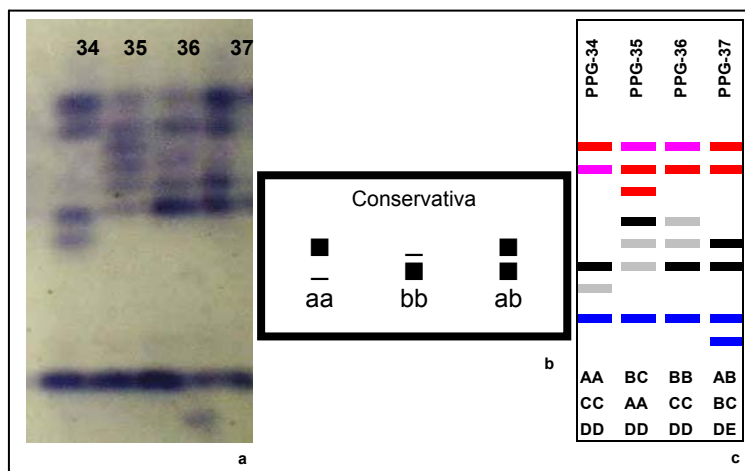


Figura 2.- a - patrón representativo de la PGM en *P. platypetala*; b.- interpretación conservativa; c.- muestra de la interpretación de bandas para la entrada al Transformer1.

B. Análisis de los datos: parámetros de variabilidad intra / interespecífico

La electroforesis enzimática de las seis enzimas analizadas dio patrones de bandas que resultaron en la interpretación de 13 *loci* putativos. En la Tabla 2 se muestran las frecuencias alélicas de dichos *loci*

Comparando ambas especies se observa que del total de los 43 alelos isoenzimáticos detectados, 20 fueron exclusivos de PPG (*Pgi-2b*, *Pgi-2d*, *Pgi-2e*, *Acp-1a*, *Acp-1c*, *Mdh-1a*, *Mdh-2a*, *Mdh-3a*; *Mdh-3c*, *Pgm-1a*, *Pgm-2a*, *Pgm-2b*, *Pgm-3a*, *Pgm-3b*, *Pgm-3c*, *Pgm-3e*, *Pgm-3f*, *Est-1a*, *Est-1b*, *Est-1d*) y dos de PGB (*Idh-1c*, *Acp-2a*). Los 21 alelos restantes estaban compartidos por ambas poblaciones. PGB presenta seis *loci* monomórficos (*Acp-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgm-3*), uno de ellos (*Est-2*) también monomórfico en PPG.

Los indicadores básicos de variabilidad genética se muestran en la Tabla 3. En *P. platypetala*, la proporción media de *loci* polimórficos fue $P = 64.5$ y el número medio de alelos por *locus* $A = 2.4$. El valor de la heterocigosidad esperada media ($H_e = 0.307$) es superior al de la heterocigosidad observada media ($H_o = 0.225$). En *P. glabriuscula* la proporción media de *loci* polimórficos fue $P=46.2$, y el número medio de alelos por *locus* fue $A = 1.8$. La heterocigosidad esperada media en la población ($H_e = 0.205$) fue inferior a la heterocigosidad observada ($H_o = 0.249$), detectando un exceso de heterocigotos, al contrario que en *P. platypetala*.

<i>Locus/Alelo</i>	PPG	PGB	<i>Locus/Alelo continuación</i>	PPG	PGB
PGI-2			PGM-1		
a	0.100	0.959	a	0.421*	0.000
b	0.017*	0.000	b	0.509	0.588
c	0.008	0.041	c	0.069	0.413
d	0.821*	0.000	N	108	40
e	0.054*	0.000	PGM-2		
N	120	74	a	0.176*	0.000
IDH-1			b	0.167*	0.000
a	0.048	0.518	c	0.536	0.543
b	0.952	0.474	d	0.122	0.457
c	0.000	0.009*	N	111	58
N	104	57	PGM-3		
ACP-1			a	0.004*	0.000
a	0.022*	0.000	b	0.117*	0.000
b	0.973	1.000	c	0.004*	0.000
c	0.004*	0.000	d	0.809	1.000
N	112	73	e	0.035*	0.000
ACP-2			f	0.030*	0.000
a	0.000	0.021*	N	115	57
b	0.979	0.925	EST-1		
c	0.021	0.055	a	0.005*	0.000
N	118	73	b	0.121*	0.000
MDH-1			c	0.088	0.562
a	0.005*	0.000	d	0.522*	0.000
b	0.995	1.000	e	0.264	0.438
N	101	74	N	91	73
MDH-2			EST-2		
a	0.141*	0.000	a	1.000	1.000
b	0.859	1.000	N	117	73
N	99	74	EST-3		
MDH-3			a	0.356	0.068
a	0.281*	0.000	b	0.176	0.219
b	0.694	1.000	c	0.468	0.712
c	0.026*	0.000	N	108	73
N	98	74			

Tabla 2. Frecuencias alélicas de los 13 loci isoenzimáticos interpretados en las dos poblaciones muestreadas. N: tamaño de muestra/ *locus*/ población. Los alelos exclusivos se señalan con asterisco.

Población	T	P	A _i	H _o	H _e	F	t
PGB1	22	46.2	1.7	0.254 (0.08)	0.205 (0.06)	-0.220	1.563
PGB2	23	46.2	1.8	0.247 (0.08)	0.203 (0.06)	-0.193	1.479
MEDIA		46.2	1.8	0.250	0.204	-0.206	1.521

Población	T	P	A _i	H _o	H _e	F	t
PPG1	30	69.2	2.3	0.211 (0.06)	0.298 (0.07)	0.187	0.685
PPG2	32	69.2	2.3	0.222 (0.05)	0.312 (0.07)	0.215	0.647
PPG3	32	53.8	2.5	0.239 (0.07)	0.279 (0.07)	0.057	0.892
PPG4	29	61.5	2.2	0.209 (0.05)	0.289 (0.06)	0.193	0.677
PPG5	32	69.2	2.5	0.235 (0.05)	0.282 (0.05)	0.136	0.761
MEDIA		64.5	2.4	0.23	0.292	0.157	0.734

Tabla 3.- Indicadores básicos de la variabilidad isoenzimática para los núcleos muestreados en las dos poblaciones estudiadas. T: número total de alelos estudiados; A_i: número medio de alelos por *locus*; P: proporción de *loci* polimórficos; H_o y H_e: heterocidad observada y esperada; F: índice de fijación; t: tasa de alogamia

Para *P. glabriuscula*, el índice de fijación o de autogamia (F) fue negativo (F = -0.206), indicando un exceso de heterocigotos y una tasa de alogamia (t = 1.521), en cambio *P. platypetala*, presentó un índice de fijación positivo (F = 0.157) y una tasa de alogamia (t = 0.734), indicando un defecto de heterocigotos, y una tasa de alogamia más baja que *P. glabriuscula*.

Los valores de Identidad genética de NEI (1978) y flujo génico entre ambas especies fueron 0.834 y 1.03, respectivamente. En la figura 3 se muestra el dendrograma obtenido a partir de la identidad genética de NEI (1978).

En la Tabla 4, se muestran los valores estadísticos de estructura de población. La diversidad media total (F_{IT}) fue igual a 0.255, y la diversidad media dentro de las poblaciones (F_{IS} = 0.070) y entre poblaciones (F_{ST} = 0.199). Los valores de F_{IT} indican un bajo grado de divergencia en las poblaciones. La diferencia interpoblacional contribuye más a la diversidad total que la diferencia intrapoblacional

De los 13 *loci* analizados, seis (*Idh-1*, *Acp-1*, *Acp-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Pgm-1*) presentaron valores negativos para el componente de variación intrapoblacional (F_{IS}), indicando que hay muchos más heterocigotos de los esperados (Tabla 4).

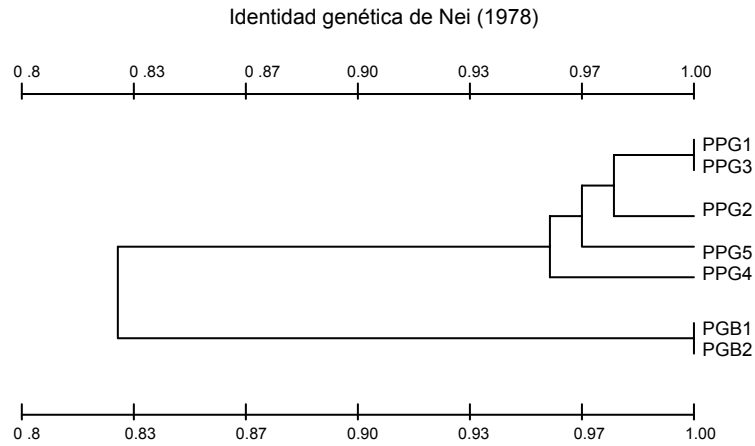


Figura 3.- Cluster UPGMA donde se representa la proximidad genética de *P. glabriuscula* y *P. platypetala* según los valores de identidad genética de Nei (1978)

Locus	F- estadísticos de Wrigth (1951)			Estadísticos de Nei (1973)			
	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	H_S	H_T	D_{ST}	G_{St}
<i>PGI-2</i>	0.046	0.661	0.644	0.195	0.549	0.354	0.644
<i>IDH-1</i>	-0.065	0.225	0.273	0.299	0.411	0.112	0.273
<i>ACP-1</i>	-0.024	-0.012	0.012	0.026	0.026	0.000	0.011
<i>ACP-2</i>	-0.055	-0.042	0.012	0.091	0.092	0.001	0.012
<i>MDH-1</i>	-0.005	-0.002	0.002	0.005	0.005	0.000	0.002
<i>MDH-2</i>	0.584	0.616	0.076	0.121	0.131	0.009	0.075
<i>MDH-3</i>	-0.069	0.107	0.165	0.219	0.262	0.043	0.164
<i>PGM-1</i>	-0.169	-0.022	0.126	0.521	0.596	0.075	0.126
<i>PGM-2</i>	0.308	0.357	0.070	0.567	0.610	0.042	0.070
<i>PGM-3</i>	0.131	0.195	0.074	0.164	0.177	0.013	0.073
<i>EST-1</i>	0.120	0.291	0.194	0.563	0.699	0.013	0.193
<i>EST-3</i>	0.028	0.090	0.064	0.531	0.567	0.036	0.063
MEDIA	0.070	0.255	0.199	0.254	0.317	0.063	0.199

Tabla 4. F estadísticos de Wrigth, estadísticos de estructura de población de NEI (1973).

Los valores más altos de H_T fueron observados en *Pgm-2* (0.610) y los más bajos en *Mdh-1* (0,005). De los 13 loci estudiados, uno (*Pgi-2*), el componente intrapoblacional (H_S) fue menor que el componente interpoblacional (D_{ST}), indicando altos niveles de diferenciación genética entre ambas poblaciones (Tabla 4).

La media de G_{ST} para todos los *loci* polimórficos estudiados fue 0,199 con un rango de 0,002 (*Mdh-1*) a 0,644 (*Pgi-2*). El test de neutralidad no dio significativo para ninguno de los *loci* analizados, indicando que no están sometidos a presión selectiva (datos no mostrados). De la misma manera, los resultados del test cuello de botella muestran que en ninguno de los núcleos de las dos poblaciones fueron significativos (datos no mostrados).

DISCUSION

Según ELISENS & CRAWFORD (en BORGÉN, 1997), los alelos únicos y a menudo fijados, debido a eventos de mutación parecen caracterizar a especies antiguas y relicticas. El hecho de que *P. glabriuscula* y *P. platypetala* compartan solamente 21 alelos de los 43 detectados (Tabla 2) sugiere un elevado tiempo de aislamiento que presumiblemente ha fomentado la diferenciación genética entre estos dos endemismos grancanarios. Además, el hecho de que *P. platypetala* posea veinte alelos exclusivos frente a los dos exclusivos de *P. glabriuscula* delata una mucho mayor antigüedad de la primera especie que está en consonancia directa con las diferentes edades de los sustratos geológicos de distribución de estos endemismos. Tanto BORGÉN (1997), en poblaciones de *Lobularia canariensis* en Canarias, como WESTERBERGH & SAURA (1994) en poblaciones de *Silene* en Hawaii, encuentran relación entre la presencia de alelos únicos y la antigüedad del hábitat apareciendo dichos alelos en las poblaciones más antiguas.

En principio, a la espera de datos de las otras especies del género, los resultados obtenidos en este estudio pueden ser comparados con otros taxones de la familia Brassicaceae. Los indicadores básicos de variabilidad indican que tanto *P. platypetala* como *P. glabriuscula* poseen unos niveles de variabilidad genética considerablemente altos, tanto si son comparados con los valores detectados en otras Brassicaceae a nivel de poblaciones de un mismo taxón como a nivel inter-específico o inter-taxones (Tabla 5). Se observa que los valores de *P. platypetala* con una sola población ($P=64\%$, $A_1=2.4$, $H_o=0.230$, $H_e=0.292$) en líneas generales superan a los valores detectados en otras especies de más amplia distribución como *Matthiola bolleana*, con 8 poblaciones ($P=65\%$, $A_1=2.0$, $H_o=0.204$, $H_e=0.238$), *Arabis serrata* con 10 poblaciones ($P=16\%$, $A_1=2.0$, $H_e=0.050$) o *Warea carteri* con 23 poblaciones estudiadas ($P=7\%$, $A_1=1.8$, $H_o=0.018$, $H_e=0.026$); encontrándose valores más altos únicamente en *Raphanus raphanistrum*, 6 poblaciones ($P=94\%$, $A_1=3.1$, $H_e=0.436$). *P. platypetala* incluso supera a los valores obtenidos para distintos taxones del mismo género, con algunas excepciones en los valores del porcentaje de *loci* polimórficos de los cinco taxones de *Lobularia canariensis* ($P=74\%$), alelos por *locus*, $A=2.6$ en 14 taxones de 10 especies del género *Brassica* y la heterocigosidad observada, $H_o=0.247$, en 10 taxones de tres especies del género *Streptanthus*.

Si tenemos en cuenta la Identidad genética (I) de NEI (1978) entre las dos especies de *Parolinia* estudiadas, $I=0.834$, en relación con los resultados de otros géneros de Brassicaceae podemos decir que entre ambas poblaciones existe una diferenciación genética moderadamente alta, lo cual induce a pensar que no han tenido un tiempo suficiente que les permita una mayor diferenciación (Tabla 5).

GENERO	Nº pob	TRIBU	Indicadores básicos de variabilidad				I de Nei (1978)	F- estadísticos de Wright' (1978)			Estadísticos de Nei (1973)				REFERENCIAS
			P	A _i	H _o	H _e		F _{is}	F _{IT}	F _{ST}	H _s	H _T	D _{ST}	G _{ST}	
Nivel poblacional															
<i>Parolinia glabriuscula</i>	1	Matthioleae	46	1.8	0.250	0.204	No procede	-0.302	-0.294	0.005	0.230	0.230	0.000	0.000	FDEZ-PALACIOS et al. (2004)
<i>Parolinia platypetala</i>	1	Matthioleae	64	2.4	0.230	0.292	No procede	0.217	0.358	0.179	0.340	0.340	0.051	0.150	FDEZ-PALACIOS et al. (2004)
<i>Matthiola bolleana</i>	8	Matthioleae	65	2.0	0.204	0.238	0.750	—	—	0.367	—	—	—	—	SÁNCHEZ et al. (1994)
<i>Arabis serrata</i>	10	Arabideae	16	2.0	—	0.050	0.852	—	—	—	0.101	0.212	0.112	0.416	OYAMA, 1998
<i>Warea carteri</i>	23	Stanleyeae	7	1.8	0.018	0.026	0.989	—	—	0.304	—	—	—	—	EVANS et al., 2000
<i>Raphanus raphanistrum</i>	6	Brassicaceae	94	3.1	—	0.436	0.866	0.06	0.19	0.140	—	—	—	—	KERCHER & CONNER, 1996
Inter-taxa															
<i>Parolinia</i>	2	Matthioleae	55	2.1	0.237	0.256	0.834	0.070	0.255	0.199	0.254	0.317	0.063	0.199	FDEZ-PALACIOS et al. (1994)
<i>Lobularia</i>	5	Alysseae	74	2.3	0.213	0.278	0.759	0.222	0.518	0.381	—	—	—	—	BORGEN, 1997
<i>Arabis</i>	6	Arabideae	26	1.3	0.018	0.043	—	—	—	—	—	—	—	—	ROY, 1995
<i>Brassica</i>	14	Brassicaceae	55	2.6	—	0.244	0.760	—	—	—	0.239	0.358	0.118	0.330	LAZARO & AGUINALDE, 1998
<i>Leavenworthia</i>	5	Arabideae	20	2.4	—	—	—	—	—	—	—	0.503	0.142	0.277	CHARLESWORTH & YANG, 1998
<i>Streptanthus</i>	10	Streptanthaeae	51	1.8	0.247	0.227	0.785	—	—	—	—	—	—	—	MAYER et al., 1994

Tabla 5. Parámetros de variabilidad y estructuración genética en distintos géneros de la familia Brassicaceae: comparaciones entre los niveles poblacionales de algunas especies e inter-taxa de algunos géneros

Asimismo se podría pensar que el presumible aislamiento entre *P. platypetala* y *P. glabriuscula* y su clara diferenciación taxonómica parecen haber afectado solamente de manera moderada a la divergencia genética entre ellas.

En cuanto a los valores de los parámetros de estructuración genética de estas dos especies (F_{ST} y $G_{ST} = 0.199$) puede observarse que son inferiores al resto de los taxones comparados, excepto en las seis poblaciones de *Raphanus raphanistrum* ($F_{ST}=0.140$). Estos valores más bajos de F_{ST} y G_{ST} en *Parolinia*, están indicando niveles altos de alogamia, que al mismo tiempo, se confirma por la elevada tasa o índice de alogamia detectada asimismo (Tabla 3) donde *P. glabriuscula* ($t=1.521$) ostenta incluso valores mayores que *P. platypetala* ($t=0.734$), lo cual se ve reforzado además por los ratios P/O observados en PGB con 3374 en relación a PPG con 2853 (FERNÁNDEZ-PALACIOS *et al.* en preparación). Ambos valores se encuentran dentro del rango que CRUDEN (1977) tiene establecido para la xenogamia obligada.

Asimismo, la xenogamia obligada sugiere que la estrategia reproductiva de los sistemas de cruzamientos en las especies de este género, están contemplando la presencia del sistema de auto-incompatibilidad esporofítico homomórfico considerado como el más eficaz, por tener la reacción de auto-incompatibilidad a nivel del estigma, además de ser el más restrictivo y exigente, porque elimina la posibilidad de apareamiento entre individuos que comparten los alelos de auto-incompatibilidad al mismo tiempo, podría ser uno de los sistemas más flexibles en poblaciones grandes, donde pueden estar implicados mayor número de alelos. Este sería el caso de *P. platypetala* con una población grande en relación a *P. glabriuscula*, pero en relación a poblaciones continentales se trata de una población isleña de relativamente pequeño tamaño, por lo que este sistema puede estar operando y configurando una gran variabilidad genética eliminando probablemente los cruces con los parientes más allegados que comparten los alelos auto-incompatibles,

El flujo génico entre las dos especies (y al mismo tiempo poblaciones) de *Parolinia* (con $Nm=1.03$) indica que podría existir un cierto intercambio de migrantes (polen y/o semillas) entre ellas, a pesar de las barreras geográficas que existen entre ambas poblaciones, con una distancia lineal entre ambas de solo 12 km que podría ser salvadas por algunos polinizadores y algunas migraciones de sus semillas aladas anemócoras (BRAMWELL, 1986); no obstante, también es plausible que la estimación de flujo génico obtenida no delate el intercambio genético en el presente, sino que sea una indicación de que lo hubo en el pasado.

Al comparar los valores de diversidad genética total en las dos especies objeto de este estudio, con otros géneros de la familia (Tabla 5) se puede observar que *Parolinia* ($H_T=0.317$) presenta valores intermedios siguiendo las tendencias en relación a su adscripción filogenética a nivel de familia. Estos niveles son similares o superan a los encontrados en otros endemismos canarios con sistema de auto-incompatibilidad como *Sonchus*, *Chamaecytisus*, etc. (FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000), *Cistus* (BATISTA *et al.*, 2001), y siguen la tendencia general de que los endemismos de las islas Canarias tienen mayor variabilidad genética que los de otras islas oceánicas.

Se puede admitir la mutación como una de las fuerzas evolutivas en el desarrollo de esta variabilidad, pero no la única, toda vez que la selección queda descartada por los resultados no significativos del test de neutralidad. Se identifica

pues a los sistemas de cruzamiento con el sistema de auto-incompatibilidad esporofítico como una de las causas responsables de esta gran variabilidad genética. Es importante hacer hincapié en que *P. glabriuscula* posee una heterogeneidad genética especialmente alta para una población con muy pocos efectivos y cuyo origen es muy reciente (la caldera de Bandama tiene una antigüedad no superior a 4.000 años) a pesar de que se esté subestimando dicha variabilidad al no considerar las duplicaciones genéticas observadas pero hasta el momento no confirmadas por cruzamientos artificiales.

El hecho que *P. platypetala* con una población estimada en unos 46.000 individuos ostente valores de diversidad genética sólo ligeramente superiores que en *P. glabriuscula* con una población de 250 individuos, sigue la línea general de que las poblaciones grandes ostentan mayor variabilidad que las pequeñas (HAMRICK & GODT, 1989; FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000) pero al mismo tiempo como la diferencia con *P. glabriuscula* sigue siendo muy escasa, pues ésta mantiene niveles altos de variabilidad, que revelan su dependencia filogenética íntimamente relacionada al sistema de cruzamiento fundamentalmente alógamo de la familia y en principio del género.

Los casos de *P. platypetala* y *P. glabriuscula* muestran, pues, que la distribución geográfica restringida y la talla poblacional pequeña no determinan necesariamente niveles bajos de variabilidad genética, lo que está en consonancia con GITZENDANNER & SOLTIS (2000) que atribuyen una relación directa entre la variabilidad genética y la historia evolutiva o adscripción filogenética del grupo que configura su sistema de cruzamiento. No obstante, para saber si una parte de esta variación genética es exclusiva y puede haber surgido por selección natural estimulada por las peculiaridades de su hábitat es indispensable la comparación de la variabilidad de estas especies con la de sus otros congéneres isleños.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al Cabildo Insular de Gran Canaria, por la concesión de una Beca de Investigación en la Sección de Investigación del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" a Olga Fernández-Palacios. Este trabajo forma parte del proyecto PI 043/98 subvencionado por la Dirección General de Universidades e Investigación del Gobierno de Canarias (investigadora principal a la Dra. Julia Pérez de Paz).. Asimismo, agradecer al personal del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" por la plantación y mantenimiento del stock de plantas en el Jardín Canario, tan necesarios para la consecución del trabajo. Por último, y no menos importante, agradecer a Lourdes Vega por su asistencia bibliotecaria.

REFERENCIAS

- ANDERSON, J.K. & S.I. WARWIC, 1999.- Chromosome number evolution in the tribe Brassiceae (Brassicaceae): evidence from isozyme number. *Plant Syst. Evol.* 215: 255-284
- ARÚS, P., 1983.- Metodología de electroforesis horizontal en gel de almidón para muestras de hoja de almendra. IRTA, Cabriels.

- ARYAVAMD, A., 1983.- *In*: Index to plant chromosome numbers 1986-1987. GOLDBLATT, P. & D.E. JOHNSON (eds). Missouri Botanical Garden (1990)
- BAÑARES, A. BLANCA, G., GÜEMES, J. MORENO, J.C. & S. ORTIZ (eds), 2003.- *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid. 1072 pp
- BARRET, S.C.H., HARDER, L.D. & A.C. WORLEY, 1997.- The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *In*: SILVERTOWN, J., FRANCO, M. & J.L. HARPER (eds). *Plant Life Histories: Ecology, Phylogeny and Evolution*. U.K. Cambridge University Press: 57-76
- BATISTA, F., BAÑARES BAUDET, A., CAUJAPÉ-CASTELLS, J., CARQUÉ, E., MARRERO-GÓMEZ, M. & 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): 1582-1592
- BORGEN, L., 1987.- *Lobularia* (Cruciferae). A biosystematic study with special reference to the Macaronesian. *Opera Bot.* 91: 1-96
- , 1997.- Genetic differentiation in endemic *Lobularia* (Brassicaceae) in the Canary Islands. *Nord. J. Bot.* 16: 487-503
- BRAMWELL, D., HUMPHRIES, C.J., MURRAY, B.G. & S.J. OWENS (1972).- Chromosome Studies in the Flora of Macaronesia. *Bot. Notiser* 125: 139-152
- BROCHMANN, C., 1993.- Reproductive strategies of diploid and polyploid populations of arctic *Draba* (Brassicaceae). *Plant Systematics and Evolution* 185: 55-83
- CARRIQUE, M.C. & A.J. MARTINEZ (1984).- *In*: Index to plant chromosome numbers 1984-1985. GOLDBLATT, P. (ed.). Missouri Botanical Garden (1988)
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J., 2001.- Transformar-1. Un programa de formateo de datos y calculos estadísticos en genética de poblaciones
- , PÉREZ DE PAZ, J., FEBLES, R., FERNÁNDEZ-PALACIOS, O., SUÁREZ, C., MORA, V., NAVARRO, P., OLANGUA, M., JAÉN, M., SOSA, F., & R. TORRENT, 2001.- Manual de laboratorio del Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo" I. Isoenzimas en gel horizontal de almidón (sin publicar).
- CHARLESWORTH, D. & Z. YANG, 1998.- Allozyme diversity in *Leavenworthia* populations with different inbreeding levels. *Heredity* 81: 453-461
- 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
- CORNUET J. M. & G. LUIKART, 1996.- Description and evaluation of two tests for detecting recent bottlenecks. *Genetics* 144, 2001-2014
- 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.- Polle-Ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32-46.
- DÍAZ LIFANTE, Z., LUQUE, T. & C. SANTA BÁRBARA, 1992.- *In*: Index to plant chromosome numbers 1992-1993. GOLDBLATT, P. & D. E. JOHNSON (eds). *Monogr.Syst.Bot.* Missouri Botanical Garden (1996): 81
- DICKINSON, H.G. & D. LEWIS, 1973: *en*: GIBBS, P.E, 1988.- Self-incompatibility mechanisms in flowering plants: some complications and clarifications. *Lagasalia*. 15 (Extt.): 17-28.
- ELGAR, M. A. & CLODE, D., 2001.- Inbreeding and extinction in island populations: a cautionary note. *Conservation Biology* 15(1): 284-286
- EVANS, M. E. K.; DOLAN, R. W.; MENGES, E. S., & 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):372-381.
- FEBLES, R., 1989.- Estudios en la flora Macaronésica: algunos números de cromosomas VI. *Bot. Macaronésica* 17: 57-76
- FEDEROV, 1974.- *Chromosome numbers of Flowering Plant*. Otto Koeltz Science Publishers. West Germany: 1-926
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, O. & B. VILCHES, 2004.- *en*: BAÑARES, A. BLANCA, G. GÜEMES, J. MORENO, J. C. & S. ORTIZ (eds), 2003.- *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid. 1072 pp
- FRANCISCO-ORTEGA, J., SANTOS-GUERRA, A., KIM, S.-C., & D. J. CRAWFORD, 2000.- Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *Amer. J. Bot.* 87(7): 909-919
- GIBBS, P.E., 1986.- Do Homomorphic and Heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism?. *Pl. Syst. Evol.* 154:285-323.
- , 1988.- Self-incompatibility mechanisms in flowering plants: some complications and clarifications. *Lagasalia*. 15 (Extt.): 17-28.

- GITZENDANNER, M.A. & SOLTIS, P.S., 2000.- Patterns of genetic variation in rare, and widespread plant congeners. *Amer. J. Bot.* 87(2): 783-792
- GOLDBLATT, P. & D. E. JOHNSON (eds.), 1990.- Index to plant chromosome numbers 1986-1987. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden*. Vol. 30: 1-239
- , 1991.- Index to plant chromosome numbers 1988-1989. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden* Vol.40: 1-234
- , 1994.- Index to plant chromosome numbers 1990-1991. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden* Vol.51: 1-262
- , 1996.- Index to plant chromosome numbers 1992-1993. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden* Vol.58: 1-271
- , 1998.- Index to plant chromosome numbers 1994-1995. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden* Vol.69: 1-204
- , 2000.- Index to plant chromosome numbers 1994-1995. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden* Vol.81: 1-185
- HAMRICK, J.L., 1989.- Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E. & P.S. SOLTIS 8 eds.). *Isozymes in Plant Biology, Advances in Plant Sciences* .Series 4. Dioscorides Press. Hong Kong: 87-105
- & M. J. W. GODT, 1989.- Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D., CLEGG, M. T., KAHLER, A. L. & B. S. WEIR (eds.). *Plant Population Genetics, breeding and Genetic Resources*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA: 43-63
- & M. J. W. GODT, 1996.- Conservation genetic of endemic plant species. In: J. L. Avise & J. C. Hamrick (eds.) *Conservation Genetic: Case Histories From Nature*: 281-304. Hapman & Hall. Madrid, London, Paris, New York
- HANSEN MACHÍN, A., 1993.- *Bandama. Paisaje y evolución*. 1ª edición. Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria. Área de Política Territorial, Arquitectura, Medio Ambiente y Vivienda.
- HURKA, H. & B. NEUFFER, 1997.- Evolutionary processes in the genus *Capsella* (Brassicaceae). *Plant Systematic and Evolution* 206: 295-316
- 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
- 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, *Raphanua raphanistrum* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 83(11): 1416-1421
- KUNKEL, G., 1970.- Dos nuevas especies de *Parolinia* (Brassicaceae) de Gran Canaria. *Cuad. Bot. Canar.* 23/24: 61-68.
- LARSEN, K., 1960.- In: *Federov. Chromosome numbers of Flowering Plant*. (1974): 176
- LÁZARO, A. & A. AGUINAGALDE, 1998.- Genetic diversity in *Brassica oleraceae* L. (Cruciferae) and wild relatives (2n= 18) using isozymes. *Annals of Botany* 82: 821-828
- LEWIS P. O. & R. WHITKUS, 1993.- Genestat-PC version 3.3. North Carolina State University. Raleigh. North Carolina.
- 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.
- MAYER, M., SOLTIS, P. S., & D. E. SOLTIS, 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
- MONTELONGO PARADA, V., 1990.- Espacios Naturales de Gran Canaria. Bandama. *Aguayro* 189-190:25
- , 1992.- Espacios Naturales de Gran Canaria. Guayadeque. *Aguayro* 199: 39
- , BRAMWELL, D. & O. FERNÁNDEZ-PALACIOS (2003).- *Parolinia glabriuscula* (Brassicaceae), una nueva especie para Gran Canaria (Islas Canarias, España). *Bot. Macaronesica* 24: 67-72
- MURPHY, R. W., J. W. SITES, D. G. BUTH & C. H. HAUFLE, 1996.- Proteins: isozyme electrophoresis. In: HILLIS, D. M., MORITZ C. & B. K. MABLE (eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. USA.: 51-120
- NEI, M., 1973.- Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*: 3321-3323
- NEI, M., 1978.- Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

- NIETO FELINER, G., 1990.- Breeding systems and related floral traits in several *Erysimum* (Cruciferae). *Can. J. Botany*.69:2515-2521.
- OLWOKUDEJO, J. D. & V. H. HEYWOOD, 1984.- Cytotaxonomy and breeding system of the genus *Biscutella* (Cruciferae). *Pl. Syst. Evol.* 145 (3): 291-309
- OYAMA, K., 1998.- Genetic differentiation among populations of *Arabis serrata* (Brassicaceae) along its geographic distribution. *Plant Systematic and Evolution* 213: 91-102
- PÉREZ DE PAZ, J., 1980.- Contribución al atlas palinológico de endemismos canario-macaronésicos 3. *Bot.Macaronésica* 7: 77-112
- PURVIS, M. J. 1966.- In: DAFNI, A., (1992). *Pollination ecology. A practical approach*. Ed. IRL Press. Oxford.: 231
- REESE, G. (1957).- In: Federov. Chromosome numbers of Flowering Plant (1974)
- ROY, B. A., 1995.- The breeding systems of six species of *Arabis* (Brassicaceae). *Amer. J. Bot.*82(7): 869-877.
- RUIZ DE LA TORRE, J. L.,1996.- *Mapa forestal de España. Escala 1:200.00. Las Palmas de Gran Canaria. Hoja 11-11*. DIRECCIÓN GENERAL DE CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA (ed.) Madrid.
- RUSTAN, O.H., 1996.- Revision of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) in the Cape Verde Islands, W Africa. *Nordic Journal of Botany* 16(1):19-50
- SÁNCHEZ DÍAS, J., (1978). *Características y distribución de los suelos en la Isla de Gran Canaria*. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna
- SÁNCHEZ, J. L. REYES-BETANCOR, J. A., SCHOLZ, S. & J. CAUJAPÉ-CASTELLS, (2004).- Patrones de variación genética poblacional en el endemismo canario *Matthiola bolleana* WEBB ex CHRIST. *Bot. Macaronesica* (este volumen)
- SANTOS GUERRA, A. 1996.- *Parolinia aridanae* Santos sp. nova. (Brassicaceae). In: *Libro Rojo de especies vegetales amenazadas de las islas Canarias*. 1ª edición. Viceconsejería de Medio Ambiente: 474-475.
- 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: TANSKLEY, S. D. & T.J. ORTON (eds.). *Isozymes in Plant Genetics Breeding, Part A*. Elsevier Science Publishing Company Inc. New York, U.S.A.: 443-468
- SCHULZ, O. E., (1936).- In: Die Natürlichen Pflanzenfamilien A. ENGLER & H. HARMS (1960) 2ª Edición, Duncker & Humblot/Berlin
- 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).
- 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
- TREMETSBERGER, K.; KÖNIG, C.; SAMUEL, R.; PINSKER, W. & T. F STUESSY, 2002.- Intraspecific genetic variation in *Biscutella laevigata* (Brassicaceae): new focus on Irene Manton's hypothesis. *Plant Systematics and Evolution* .; 233:163-181
- VALLEJOS, C. E., 1983.- Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S. D. & T. J. ORTON (eds.). *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*. Elsevier Science Publishing Company Inc. New York, U.S.A.: 469-516
- VAN LOON, J. C., 1974.- A cytological investigation of flowering plants from Canary Islands. *Acta bot. neerl.* 23: 113-124
- WEBB, P. B., 1840.- *Parolinia ornata* sp.nov. *Annls. Sci. Nat.* 2: 133-134
- WEBB, C. J., 1984.- Constraints on the Evolution of Plant Breeding Systems and their Relevance to Systematics. In In W. F. Grant (ed.): *Plant Byosystematics*: 249-270
- WENDEL, J.F. & N. F. WEEDEN, 1989.- Visualization and interpretation of plant isozymes. In D. E. Soltis & P. S. Soltis (eds.) *Isozymes in Plant Biology*: 5-45. Dioscorides Press. Oregon.
- WESTERBERGH, A. & A. SAURA, (1994).- Genetic differentiation in endemic *Silene* (Caryophyllaceae) on the Hawaiian islands. *American Journal of Botany* 81 (1): 1487-1493
- 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: 293-391
- WRIGHT, S., 1951.- The genetical structure of populations. *Ann.Eugen.* 15: 323-354