

BIBLIOTECA UCM



5301690735

# ASPECTOS TAXONOMICOS EN EL GENERO *Colutea* (Fabaceae)

*Javier Hornero del Castillo*



Vº Bº

César Pérez Ruiz,  
Director de la Tesis

R. 24615

1. INTRODUCCION	
1.1. EL GENERO <i>Colutea</i> L.,2	
1.1.1. POSICION TAXONOMICA DEL GENERO <i>Colutea</i> L.,2	
1.1.2. RESEÑA HISTORICA.,3	
1.1.3. INVESTIGACION EN EL GENERO <i>Colutea</i> L.,9	
1.2. TAXONOMIA NUMERICA: FENETICISMO.,11	
1.3. ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS: LA TECNICA Y SUS APLICACIONES.,17	
1.4. PCR - RAPDs: LA TECNICA Y SUS APLICACIONES.,25	
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO.,33	
3. MATERIAL Y METODOS	
3.1. INFORMACION COROLOGICA.,35	
3.1.1. FUENTES.,35	
3.1.2. METODOLOGIA.,36	
3.2. ANALISIS MORFOLOGICO.,36	
3.2.1. CARACTERES EMPLEADOS.,37	
3.2.1.1. GENERAL.,37	
3.2.1.2. DEFINICION DE LOS CARACTERES.,38	
3.2.2. ANALISIS NUMERICO.,42	
3.2.2.1. ANALISIS UNIVARIANTE.,42	
3.2.2.2. ANALISIS MULTIVARIANTE.,43	
3.3. ANALISIS DE ISOENZIMAS.,45	
3.3.1. MATERIAL VEGETAL.,45	
3.3.2. EXTRACCION DE PROTEINA BRUTA.,46	
3.3.3. CUANTIFICACIÓN.,47	
3.3.4. ELECTROFORESIS.,47	
3.3.5. VISUALIZACION.,48	
3.3.5.1. OXIDORREDUCTASAS.,49	
3.3.5.1.1. ADH.,49	
3.3.5.1.2. SKD.,49	
3.3.5.1.3. ME.,49	
3.3.5.1.4. PGD.,50	
3.3.5.1.5. G6PDH.,50	
3.3.5.1.6. GDH.,50	
3.3.5.1.7. SOD.,51	
3.3.5.2. TRANSFERASAS.,51	
3.3.5.2.1. GOT.,51	
3.3.5.3. HIDROLASAS.,51	
3.3.5.3.1. AP.,51	
3.3.5.3.2. EST.,52	
3.3.5.4. CONSERVACION Y OBTENCION DE ZIMOGRAMAS.,52	
3.3.6. ANALISIS MULTIVARIANTE.,52	
3.4. PCR-RAPDs.,54	
3.4.1. OBTENCION DE MATERIAL VEGETAL.,54	
3.4.2. EXTRACCION DE ADN.,55	
3.4.3. AMPLIFICACIÓN.,57	
3.4.4. ELECTROFORESIS.,58	
3.4.5. VISUALIZACION.,59	
3.4.6. ANALISIS MULTIVARIANTE.,59	
3.5. COMPARACIÓN DE METODOS.,60	
3.6. ANALISIS MULTIVARIANTE CONJUNTO.,61	

4. RESULTADOS	
4.1. INFORMACION COROLOGICA	,63
4.2. ANALISIS MORFOLOGICO	,74
4.2.1. ANALISIS UNIVARIANTE	,74
4.2.1.1. INDUMENTO	,74
4.2.1.2. TALLO	,75
4.2.1.3. ESTIPULAS	,75
4.2.1.4. AMBITO	,76
4.2.1.5. FOLIOLOS	,77
4.2.1.6. BRACTEAS	,78
4.2.1.7. INFLORESCENCIA	,78
4.2.1.8. FLOR	,80
4.2.1.8.1. CALIZ	,80
4.2.1.8.2. ALAS	,83
4.2.1.8.3. ESTANDARTE	,83
4.2.1.8.4. QUILLA	,84
4.2.1.8.5. COLUMNA ESTAMINAL	,85
4.2.1.8.6. PISTILO	,85
4.2.1.9. FRUTO	,85
4.2.2. ANALISIS MULTIVARIANTE	,90
4.2.2.1. ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)	,99
4.2.2.2. ANALISIS DE AGRUPAMIENTO	,106
4.2.3. CARACTERES DISCRIMINANTES	,109
4.3. ANALISIS DE ISOENZIMAS	,112
4.3.1. EXTRACCION DE PROTEINA BRUTA Y CUANTIFICACION	,112
4.3.2. VISUALIZACION	,112
4.3.2.1. OXIDORREDUCTASAS	,116
4.3.2.1.1. ADH	,116
4.3.2.1.2. SKD	,116
4.3.2.1.3. ME	,117
4.3.2.1.4. PGD	,121
4.3.2.1.5. G6PDH	,121
4.3.2.1.6. GDH	,122
4.3.2.1.7. SOD	,125
4.3.2.2. TRANSFERASAS	,128
4.3.2.2.1. GOT	,128
4.3.2.3. HIDROLASAS	,128
4.3.2.3.1. AP	,128
4.3.2.3.2. EST	,129
4.3.3. ANALISIS MULTIVARIANTE	,133
4.3.3.1. ANALISIS DE ORDENAMIENTO	,133
4.3.3.2. ANALISIS DE ORDENAMIENTO INTRAESPECIFICO	,139
4.3.3.3. ANALISIS DE AGRUPAMIENTO	,143
4.4. PCR - RAPDs	,148
4.4.1. AMPLIFICACIONES	,148
4.4.2. VARIACION INTRAPOBLACIONAL	,149
4.4.3. VARIACION INTERPOBLACIONAL	,152
4.4.4. VISUALIZACION	,155
4.4.4.1. OP#3	,155
4.4.4.2. OP#5	,156
4.4.4.3. OP#7	,159
4.4.4.4. OP#8	,160
4.4.4.5. OP#12	,160
4.4.4.6. OP#13	,164
4.4.4.7. OP#15	,164
4.4.4.8. OP#19	,167
4.4.4.9. OP#20	,169

4.4.5. ANALISIS MULTIVARIANTE..	171
4.4.5.1. ANALISIS DE ORDENAMIENTO (PCO)..	171
4.4.5.2. ANALISIS DE ORDENAMIENTO INTRAESPECIFICO..	178
4.4.5.3. ANALISIS DE AGRUPAMIENTO..	181
4.5. COMPARACION DE METODOS..	187
4.5.1. PCO. SUBCONJUNTO DE POBLACIONES COMUNES..	187
4.5.2. ANALISIS DE AGRUPAMIENTO. SUBCONJUNTO DE POBLACIONES COMUNES..	189
4.5.3. COMPONENTES PRINCIPALES. SUBCONJUNTO DE POBLACIONES COMUNES..	192
4.6. ANALISIS MULTIVARIANTE CONJUNTO..	195
5. DISCUSION.	
5.1. DISTRIBUCION..	201
5.2. CARACTERES MORFOLOGICOS..	204
5.2.1. <i>C. arborescens</i> L. subsp. <i>atlantica</i> Bolòs & Vigo vs. <i>C. atlantica</i> Browicz..	212
5.3. CARACTERES MOLECULARES..	214
5.3.1. ISOENZIMAS..	214
5.3.2. RAPDs..	216
5.4. ANALISIS MULTIVARIANTE..	219
5.5. COMPARACION DE METODOS..	222
6. CONCLUSIONES..	226
7. BIBLIOGRAFIA..	229

## ABREVIATURAS MAS EMPLEADAS

$\lambda$  : Longitud de onda  
A: Adenina  
ADH: Alcohol deshidrogenasa  
ADN: Acido desoxiribonucleico  
AP: Fosfatasas ácidas  
bco.: barranco  
bp: pares de bases  
BSA: Seroalbúmina bovina  
C: Citosina  
C<sup>a</sup>: carretera  
ca.: *circa*  
DO: Densidad Optica  
E. S.: Error estándar  
Eds.: editores  
EDTA: Acido etilén-diamin-tetraacético  
E. S.: *Error standard*  
EST: Esterasas  
G: Guanina  
G6PDH: Glucosa-6-P-deshidrogenasa  
GDH: Glutamato deshidrogenasa  
Gly: Glicina  
GOT: Glutamato oxalacetato transaminasa  
max.: máximo  
MDS: Escalado multidimensional no métrico  
ME: Enzima málico  
min.: mínimo  
Mte.: monte  
MTT: Bromuro de (3-[4.5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio  
NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido  
NADP<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NBT: Azul de nitrotetrazolio  
P<sup>o</sup>: puerto  
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida  
PCA: Análisis de componentes principales  
PCO: Análisis de coordenadas principales.  
PCR: *Polymerase Chain Reaction*  
PGD: 6-P-gluconato deshidrogenasa  
PMS: Metosulfato de fenazina  
PVP: Polivinilpirrolidona  
PVPP: Polivinilpolipirrolidona  
RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*  
Rp: posición relativa  
s. n.: sin número  
S<sup>a</sup>: Sierra  
SKD: Shikimato deshidrogenasa  
SOD: Superóxido dismutasa  
ss.: siguientes  
subsp.: subespecie  
T: Timina  
T<sup>a</sup>: temperatura  
TE: Tris-EDTA (tampón)  
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina  
TRIS: Tris[hidroximetil]aminometano  
UPGMA: *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages*  
UTO: Unidad Taxonómica Operacional  
UV: Ultravioleta

v.: versión  
vol., vols.: volumen, volúmenes  
vs.: *versus*

# ***INTRODUCCION***

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. EL GENERO *Colutea* L.

#### 1.1.1. POSICION TAXONOMICA DEL GENERO *Colutea* L.

El género *Colutea* L. (*Fabaceae*) da nombre, *Coluteinae* Benth., a una de las cuatro subtribus en las que se divide la tribu *Galegeae* (Bronn) Torrey & Gray de la subfamilia *Papilionoideae*. Esta subtribu se separa de las otras tres (*Astragalinae*, *Galeginae* y *Glycyrrhizinae*) básicamente por tener estilos con indumento. Incluye además de *Colutea* otros ocho géneros que abarcan unas cien especies en total (Hutchinson, 1964):

Los dos únicos géneros con dotación cromosómica  $2n = 32$ , *Clanthus* Sol. ex Lindl. (dos especies) y *Swainsona* Salisb. (una especie) se distribuyen principalmente por las áreas más secas del reino florístico Austral aunque *Swainsona* se introduce también en zonas del reino Antártico (Nueva Zelanda).

El resto de los géneros presentan una dotación cromosómica  $2n = 16$  (de *Eremosparton* y *Oreophysa* no se tienen datos). Dentro de los reinos Paleotropical y Capense se encuentran *Sutherlandia* R. Br. con unas seis especies distribuidas por la república de Sudáfrica, Namibia y Botswana y *Lessertia* DC. (1802) con unas cincuenta especies repartidas por Sudáfrica. Los restantes cinco géneros de la subtribu se distribuyen casi exclusivamente por el reino florístico Holártico, fundamentalmente por el Paleártico (*Colutea abyssinica* habita lugares montañosos del este africano, desde las costas del mar Rojo al lago Nyassa):

*Oreophysa* (Bunge ex Boiss.) Bornm. y *Smimowia* Bunge son monoespecíficos y se distribuyen en lugares montañosos y secos por el norte de Irán y el Turkestán, respectivamente. *Eremosparton* Fisch. & Mey. cuenta con tres especies distribuidas en desiertos arenosos del SE de Rusia y Asia central mientras que las dos especies, halofíticas, de *Sphaerophysa* DC. se reparten por Turquía, Siria, el Cáucaso, Siberia, Asia central y el norte de China y Mongolia.

Por su parte, el género *Colutea* L. cuenta con 28 especies distribuidas desde la región mediterránea hasta el Himalaya y China y el E-NE de Africa (Figura 1). Una buena descripción del género es la aportada por Hutchinson (1964):

Arbustos o arbustillos; hojas imparipinnadas o raramente trifolioladas; folíolos enteros, sin pedúnculo; estípulas pequeñas; flores amarillas o rojizas en racimos axilares; brácteas y



bracteolas muy pequeñas o ausentes; dientes del cáliz subiguales o los dos superiores más pequeños; estandarte suborbicular, desplegado, con dos pliegues o callosidades por encima del espolón; alas oblongo-falcadas, con espolones pequeños; quilla ancha, muy incurvada, obtusa, con uñas largas, connadas; estambre vexilar libre, el resto connados en una vaina; anteras uniformes; ovario estipitado; estilo incurvado, barbado a lo largo de la cara interna, inflexo en el ápice o involuto, el estigma grueso y prominente debajo del ápice; fruto estipitado, inflado y membranoso, indehisciente o con dos valvas en el ápice; semillas reniformes, estrofioladas, con un funículo filiforme.

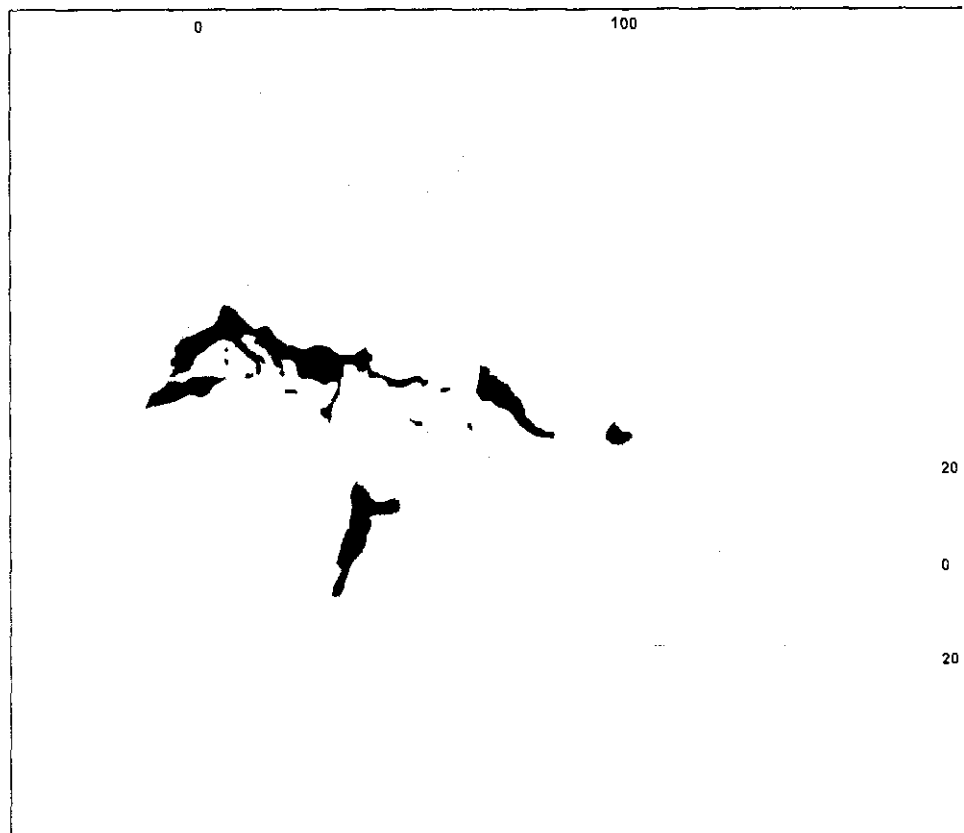


Figura 1. Area de distribución del género *Colutea* L. (Browicz, 1963).

### 1.1.2. RESEÑA HISTORICA <sup>1</sup>

El nombre genérico *Colutea* es mencionado por primera vez en la *Historia Plantarum* de Teofrasto (I.11,2 y III.17,3: *koloitea* y III.14,4 y III.17,2: *koloutea*), pero parece que este autor griego no se refería a ninguna de las especies actuales del

<sup>1</sup> La información incluida en este apartado se basó en la expuesta por Browicz (1963).

género. Según las descripciones de este autor, *Koloutea* se parecería a lo que hoy conocemos como *Trigonella* y según Koch (1884) las descripciones dadas por Teofrasto se asemejarían más a especies como *Gleditsia caspica*, *Laburnum anagyroides* o *L. alpinum* o, incluso, a *Salix cinerea* y *S. alba*. No obstante, en el siglo XVI se identificaba *Trigonella foenum-graecum* con *Colutea*.

Después de Teofrasto, el nombre genérico *Colutea* sólo aparece mencionado en *Persa*, la comedia de Plauto (I.3: 7-8):

*"Commisce mulsum: struthea, colutea appara,  
Bene ut in scutris concaleant: et calamum inice."*<sup>2</sup>

Aunque en este caso también es muy difícil saber a ciencia cierta qué significa *colutea*, desde luego no se refiere a *C. arborescens*, ya que más adelante, en la comedia, este nombre se aplica a un plato apetitoso.

En el siglo XVI, Ruellius (1537) en el capítulo "*Colycea et Colutea*" (LXX, 146-147) se refiere a las descripciones de Teofrasto e identifica *Colutea* con *Sena* (*Cassia*). Fue este autor el primero en establecer que *C. arborescens* crecía silvestre en Francia, donde recibía el nombre de *baguenaulde*. Este nombre, modificado como *baguenaudier*, ha sido usado hasta el siglo pasado. Bubani (1897-1901) propuso el nombre genérico *Baguenaudiera* y para *C. arborescens*, *B. arborea* (Ruellii) Bubani.

El primer testimonio iconográfico de la especie data de 1543 y apareció en la figura CCL de la obra de Fuchs. Representaba un arbusto de tallos con hojas, flores simples y frutos. Aunque las flores no están muy bien dibujadas, la forma de los frutos, uno de los cuales está abierto dejando ver las semillas, identifica claramente a *C. arborescens*. La especie vuelve a ser representada ese siglo, esta vez mucho más adecuadamente, por Matthioli (1565) y Lobelius (1576). Según todos estos autores, *C. arborescens* se cultivaba habitualmente como ornamental.

El primer testimonio de herbario fue establecido por Bauhinus en 1650, si bien bajo el nombre *C. vesicaria*. Aportó, además, la primera localidad (*iuxta Castellum Sponeck ad Rhenum*).

En 1700 Tournefort dio una breve diagnosis del género basándose en caracteres de la flor y del fruto. Esta diagnosis fue desarrollada más tarde por Linnaeus (1737). Dentro del género *Colutea*, el naturalista sueco incluyó *C. arborescens*, *C. frutescens* y *C. herbacea*. Estas dos últimas especies, sin embargo,

---

<sup>2</sup> "Mezcla vino con miel, prepara membrillos, colutea de modo que se calienten bien en las escudillas: y añade caña aromática."

pertenecen a otros géneros: *Sutherlandia* R. Br. y *Lessertia* DC., respectivamente. Con posterioridad a la obra linneana, el número de especies adscritas al género fue aumentado por distintos autores como Lamarck (1783-1817) y Thunberg (1794).

En 1861, basándose en pliegos de herbario y especímenes cultivados en el jardín botánico de Copenhague, Lange describió *C. breviaolata* que, en 1893, fue considerada por Dippel como una variedad de *C. arborescens*. Boissier (1872) fue el primer botánico que realizó un trabajo sistemático sobre las especies de *Colutea* en Europa y Asia; dividió el género en dos secciones, *Eucolutea* y *Oreophysa*, incluyendo *C. arborescens* en la primera de ellas. No obstante, el material revisado por el botánico suizo para la descripción de *C. arborescens* incluía material que representaba además otras tres especies: *C. cilicica* y lo que fue posteriormente descrito como *C. davisiana* y *C. insularis* (Browicz, 1963).

Schneider (1907) publicó la primera revisión crítica del género. Al igual que Boissier siguió un esquema en "grupos" basándose en el carácter de dehiscencia del fruto tras su madurez, lo que luego se demostró como muy insuficiente. Cabe destacar la atención prestada por este autor a los problemas taxonómicos que ya representaban *C. arborescens* y *C. breviaolata*.

La década de los años treinta trajo la publicación de las descripciones de nuevas variedades de *C. arborescens*: *macedonica* en los Balcanes y las variedades *atrocalix*, *brevidentata*, *longeracemosa* y *parviflora* de Africa; algunas de éstas fueron transferidas a otras especies por Browicz (1963). También data de esta época el estudio citológico de Tschchow que estableció el número cromosómico de *C. arborescens* como  $2n = 16$ . El trabajo de Czeczott (1939) fue destacable ya que enfatizó la forma de distinguir *C. cilicica* de *C. arborescens*, dos especies muy cercanas que ya entonces eran motivo de controversia botánica; además señaló el valor de algunos caracteres morfológicos en la taxonomía del género.

En el volumen 11 de la Flora de la U.R.S.S. (1941), Shaparenko describió cuatro nuevas especies y corrigió el extendido error de asignar a *C. arborescens*, en lugar de a *C. cilicica*, los especímenes colectados en Crimea y el Caucaso. En un trabajo póstumo datado en 1956 este mismo autor dividió el género en tres secciones (sin aportar las diagnósis) basándose en la forma de los foliolos a partir de material fósil: *Ovalifoliae* donde incluyó a *C. arborescens* y *Rotundifoliae* (sólo dio estos dos nombres). Esta división no resultó muy afortunada debido a la extrema variabilidad que presenta este carácter en muchas de las especies de *Colutea*, incluso dentro de un sólo individuo. También partiendo de material fósil este autor separó, sin aportar las descripciones, dos especies: *C. berryana* (= *C. primordialis* Berry) y *C. heeriana* (= *C.*

Salteri Heer); en otro trabajo, Shaparenko (1940) estableció en el Cretácico Superior la datación del primer fósil conocido del género.

Los trabajos de Shaparenko, junto con su mapa de distribución del género nunca publicado, ejercieron una notable influencia en la revisión del género realizada por Browicz (1963). Este botánico polaco describió cinco nuevas especies y varias categorías taxonómicas menores (subespecies y variedades) y estableció en 26 el número de especies en el género (Tabla 1). En el ámbito geográfico de la presente memoria, la Península ibérica, Browicz reconoció la existencia de diferencias morfológicas en el material, lo que le llevó a describir las poblaciones de, fundamentalmente, el sur de España como *C. atlantica* Browicz y como *C. arborescens* L. subsp. *gallica* Browicz las demás poblaciones. Indicó que la existencia de plantas con una morfología intermedia (posibles híbridos) y la escasez de material de herbario a su disposición dotaban de un cierto grado de incertidumbre tanto a las áreas de distribución mostradas como a la determinación de las poblaciones localizadas en el centro de la Península Ibérica. En la Tabla 2 se muestra una descripción comparativa y esquemática de ambos taxones.

El esquema taxonómico propuesto por Browicz (1963) para los individuos peninsulares fue modificado por Bolòs & Vigo (1974). Estos autores rebajaron el *status* de *C. atlantica* al de subespecie: *C. arborescens* L. subsp. *atlantica* (Browicz) O. Bolòs & Vigo. En su *Flora dels Països Catalans* vol. 1 (1984), estos autores aplicaron este criterio e indicaron la existencia de la subsp. *gallica* y la subsp. *atlantica* en el ámbito geográfico de la antedicha *Flora*; sin embargo, Mateo & Figuerola (1987) sólo reconocieron la existencia de *C. arborescens* en la provincia de Valencia, parte de los territorios incluidos en la obra anteriormente citada. De la misma forma, tampoco Rigual Magallón (1972) citó para la provincia de Alicante poblaciones determinadas como *C. atlantica*. El criterio seguido por Valdés *et al.* (1987) para Andalucía occidental coincidió con el expuesto por Browicz (1963), al igual que Molero-Mesa & Pérez-Raya (1987) en su catálogo florístico de Sierra Nevada. En cambio, para Sagredo (1987) las poblaciones almerienses serían *C. arborescens*.

**Tabla 1.** División taxonómica del género *Colutea* L. según Browicz (1963).**1. Sección *Colutea* Browicz**Subsección *Arborescentes* Browicz

- C. atlantica* Browicz
- C. arborescens* Linnaeus
- C. cilicica* Boissier et Balansa
- C. melanocalyx* Boissier et Heldreich
- C. davisiana* Browicz
- C. insularis* Browicz
- C. armena* Boissier et Huet du Pavillon

Subsección *Acutifoliae* Browicz

- C. acutifolia* Shaparenko

Subsección *Africanae* Browicz

- C. abyssinica* Kunth et Bouché

Subsección *Graciles* Browicz

- C. istria* Miller
- C. gracilis* Freyn et Sintenis
- C. persica* Boissier
- C. hybrida* Shaparenko

**2. Sección *Multiflora* Browicz**

- C. multiflora* Shaparenko et Ali
- C. delabayi* Franchet

**3. Sección *Rostrata* Browicz**Subsección *Orientalis* Browicz

- C. orientalis* Miller
- C. jarmolenkoi* Shaparenko
- C. atabajevi* B. Fedtschenko

Subsección *Centralasiaticae* Browicz

- C. buhsei* (Boissier) Shaparenko
- C. gifana* Parsa
- C. afghanica* Browicz
- C. paulsenii* Freyn
- C. nepalensis* Sims

**4. Sección *Armata* Browicz**

- C. uniflora* G. Beck
- C. armata* Hemsley et Lace
- C. komarovii* Takhtadzhian

**Tabla 2.** Descripción de los taxones propuestos por Browicz (1963) para la Península Ibérica. El signo ? señala los caracteres que carecen de descripción explícita en la monografía. El subrayado es nuestro.

<i>Colutea atlantica</i>	<i>C. arborescens</i> subsp. <i>gallica</i>
	<b>TALLOS</b>
2º año con indumento	2º año descortezados
	sin diferencias en color (muy variable)
	<b>ESTIPULAS</b>
triangular-ovadas	ovadas / ovado-lanceoladas
1,5-2 mm de longitud	<u>unos</u> 3 mm de longitud
pubescentes	pelos <u>especialmente</u> en el margen
	<b>HOJAS</b>
nº= 3-6(7)	?
3-5 cms. de longitud	5-13(15) cms. de longitud
3-5(6) pares de folíolos : 4	3-4 pares de folíolos
	raquis y peciólulos tomentosos
folíolos muy regulares : elípticos	folíolos anchamente elípticos, más raramente obovados u ovados
folíolos de 15 x 9 (10 x 7) mm de longitud	folíolos de 30 (40) x 20 (25) mm de longitud
folíolos de base redondeada o algo cuneada	?
ápice de los folíolos redondeado	ápice de los folíolos redondeado o retuso
	con mucrón
	nerviación patente
nervios laterales marcados	?
	<b>INFLORESCENCIAS</b>
1-3(4) flores	3-8 : 5 flores
3-5(6) cms < longitud hojas tectrices	? < longitud hojas tectrices
raquis tomentoso: pelos blancos con negros y/o marrones	raquis pubérulo (luego glabrescente y glabro)
pedicelos 6-10 mm de longitud	pedicelos 5-15 mm de longitud
pelos negros o marrones (alguno blanco)	pelos blancos, negros o mezcla (dependiendo del color del indumento del cáliz)
	<b>BRACTEAS</b>
1,5 - 2 mm de longitud	2 - 3 mm de longitud
ovado-lanceoladas	ovadas u ovado-lanceoladas
	pubescentes como los pedicelos
	<b>FLORES</b>
17 - 20 (22) mm de longitud	>16 (17) - 19 (20) mm de longitud
quilla redondeada en el ápice	?
alas < quilla	alas < quilla o alas > quilla, entonces siempre sin espolón
alas abiertas 120 - 130 °	alas abiertas 130 - 150° (con espolón si < 130 °)
alas <u>a veces</u> con un espolón diminuto	alas <u>generalmente</u> sin espolón
ovario tomentoso	ovario total o parcialmente pubescente
cáliz campanulado 5-7 mm de longitud	cáliz campanulado o anchamente campanulado de 6-7(8) mm de longitud
cáliz tomentoso (pelos marrones o negros y algunos blancos)	cáliz pubescente (pelos generalmente oscuros: negros)
dientes de 2 mm de longitud	longitud de los dientes < 2 longitud del tubo
	<b>FRUTOS</b>
50 - 60 x 25 - 28 mm	50 - 70(80) x 30 mm
pubescente en base y ápice	esparcidamente pubescente o glabro
estípote 2-3 veces la longitud del tubo	estípote 2 veces la longitud del tubo
<u>probablemente</u> dehiscente	indehiscente
	<b>SEMILLAS</b>
4 x 3 mm	4 x 3,5 mm

### 1.1.3. INVESTIGACIONES EN EL GENERO *Colutea* L.

A pesar de ser conocida desde antiguo como planta medicinal <sup>3</sup>, *C. arborescens* no ha sido muy empleada como objeto científico de estudio. Se han encontrado muy escasas referencias tratándose, en la mayoría de los casos, de citas dentro de estudios más amplios referidos, en su mayoría, al metabolismo secundario:

- Sobre flavonoides: Aguinagalde *et al.* (1990) emplearon PC, TLC y UV para identificar los siguientes flavonoides en *C. arborescens* y *C. atlantica*: Kaempferol 3-glucósido, Quercetin 3-glucósido, Quercetin 3-rhamnósido, Kaempferol 3-digalactósido, Kaempferol 3-rutinósido, Quercetin 3-rutinósido (Rutin), Myricetin 3-rutinósido, Kaempferol 3-rutinósido-7-glucósido y Quercetin 3-rutinósido-7-glucósido. Con diferentes ensayos de germinación, estos autores correlacionaron la presencia de estos flavonoides con las bajas tasas de germinación en estas especies y les asignaron un papel protector frente a infección por hongos, especialmente frente a *Cladosporium cladosporoides* y *Sterigmatomyces polyborus* que fueron aislados de las cubiertas seminales. Comprobaron que si las cubiertas eran lavadas (eliminando los flavonoides), las semillas eran mucho más fácilmente atacadas por estos patógenos fúngicos.

Al-Ani *et al.* (1985) suministraron isoflavonas marcadas con C<sup>14</sup> a plántulas y frutos de *Colutea arborescens* para dilucidar la síntesis de isomucronulatol (7,2'-dihidroxi-3,4'-dimetoxiisoflavan). Los mejores precursores fueron la formononetina (7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona), calicosina (7,3'-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona), koparina (7,2',3'-trihidroxi-4'-metoxiisoflavona) y 7,2'-dihidroxi-3',4'-dimetoxiisoflavona. En cambio, la 2'-hidroxiformononetina (7,2'-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona) y la cladrina (7-hidroxi-3,4'-dimetoxiisoflavona) fueron precursores bastante peores. Llegaron a la conclusión de que la formación de isomucronulatol a partir de formononetina implica una hidroxilación 3', otra hidroxilación 2' y una metilación 3'-O, seguidas de una estereorreducción específica de la 7,2'-dihidroxi-3',4'-dimetoxiisoflavona, con lo que la ruta propuesta fue formononetina → calicosina → koparina → 7,2'-dihidroxi-3',4'-dimetoxiisoflavona → (3R)-isoflavan.

Raymond (1958) aisló un nuevo flavonoide (coluteosido) a partir de *C. arborescens* que resultó ser un glucósido del dihidróximetoxiflavanol, con el punto

<sup>3</sup>...las hojas contienen un principio amargo que se supone análogo a la citisina, pero el estudio químico de esta especie es todavía muy incompleto. Según Quer (*Flora española o Historia de las plantas que se crían en España*. VI vols., Madrid 1762-1784) las hojas y semillas de colutea "purgan por vómito y cámara con mucha violencia...". Este autor comenta que se ha intentado substituir el sen por colutea pero que ésta es mucho menos efectiva. Apoya esta afirmación en una cita de Laguna, "*Materia medica*" (capítulo 79, Libro III), donde compara el sen y la colutea". (Font Quer, 1988).

de fusión a 299 °C y un  $[\alpha]_D$  de -83 °C (piridina). El espectro de ultravioleta mostró un máximo en 2680 y 3450 Å y un mínimo en 2420 y 2800 Å. El  $R_f$  en butanol-acético a 20 °C fue 0,35.

- Sobre la presencia y origen de la canavanina, un aminoácido no proteico con valor taxonómico se localizó el trabajo de Rosenthal (1977) en el que se determinó la proporción de aminoácidos totales y libres en 7 leguminosas (incluyendo *Colutea arborescens*) formadoras de canavanina. El nitrógeno fue localizado preferentemente como canavanina en las semillas de estas especies. La explicación a este fenómeno estaría en la ventaja que tendrían estas especies al acumular la mayor parte del nitrógeno como un solo metabolito. Un antecedente de este trabajo fue el publicado por Fearon & Bell en 1955.

- También referidos al metabolismo secundario se localizaron el artículo de Aynechni *et al.* (1982) con *Colutea gracilis* y *C. persica* y el de Von der Dunk (1979) con *Colutea arborescens*.

- A nivel genético, se localizó el trabajo de Hattori & Johnson (1985), en el que se usaron cDNAs clonados de la leghemoglobina de soja para realizar experimentos de hibridación en *Ceratonia siliqua*, *Colutea arborescens*, *Robinia pseudoacacia* y *Elaeagnus angustifolia*. Se detectaron secuencias híbridas de cruzamiento en estas leguminosas así como en el cinamomo, lo que sugirió que los genes codificadores de las proteínas ligadoras de oxígeno están más ampliamente distribuidos de lo que antes se pensaba. El uso en Sistemática de cDNA referido a *C. arborescens* también es descrito por Olszewska & Osiecka (1984).

- Referidos a *Colutea orientalis* se localizaron los artículos de Shannon (1983) sobre lectinas y el de Abutalybov *et al.* (1978) sobre la extracción de *physochlaine*.

- Además de los trabajos de Allué (1983, 1981a y b) se localizaron otros estudios referidos a morfometría, morfología y, sobre todo, aspectos relativos a la germinación, propagación, etc. del género:

En el trabajo de Agulló *et al.* (1991) se evaluó el tamaño, la forma, color externo, contenido proteico, peso y otros parámetros en 17 taxones de cinco géneros de la subfamilia *Papilionoideae*; también fue examinada la topografía de la testa seminal mediante microscopía electrónica de barrido. Tras un análisis multivariante se concluyó que los parámetros empleados se adecuaban a la descripción y caracterización seminal, especialmente a nivel genérico.

Ceresuela (1984) ensayó una técnica para la estimulación de la germinación de semillas de varias especies del género *Colutea* incluyendo *C. arborescens* y *C.*



*atlantica*. Empleó tres parámetros: porcentaje de germinación, tiempo de germinación y tiempo umbral. En ambos casos la germinación fue el 100 % mientras que se detectó una diferencia de un día para los otros dos parámetros (7 y 5 para *C. arborescens* y 8 y 6 para *C. atlantica*).

## 1.2. TAXONOMÍA NUMÉRICA: FENÉTICISMO.

El uso de patrones de similitud entre organismos con todos los caracteres disponibles evitando (a) considerar los episodios evolutivos que produjeron la similitud observada y (b) la ponderación *a priori* de los caracteres para la estimación de afinidades y la formulación de clasificaciones es el campo abarcado por el *feneticismo* (Cain & Harrison, 1960 y Mayr, 1978).

Aunque lejano, el primer antecedente de este tipo de estudios se encuentra en la obra de Adanson (1763) *Familles des Plantes*. Tuvieron que pasar dos siglos desde la publicación de esta obra para que se produjeran avances significativos. Fue con la divulgación de los trabajos de Michener & Sokal (1957) y Sneath (1957). Mas tarde, en 1963, Sokal & Sneath publicaron una obra general sobre esta metodología que fue remozada diez años después y que desde entonces ha sido considerada como la obra de referencia en el feneticismo (Sneath & Sokal, 1973).

Los estudios botánicos tradicionales de clasificación han sido en gran parte fenéticos. Sin embargo, con la introducción de métodos numéricos como aproximación operativa a este proceso, se considera ahora al feneticismo como una parte de lo que fue llamado *taxonomía numérica* por Sneath & Sokal (1973). El amplio campo de la taxonomía numérica incluye tanto a métodos de feneticismo como métodos cladísticos (Duncan & Baun, 1981).

Según Stuessy (1990) el método feneticista seguiría las siguientes etapas:

- selección de los organismos, grupos de organismos o Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs, Sokal & Sneath, 1963).

Para evitar cualquier juicio *a priori* de lo que son los taxones, lo óptimo sería emplear sólo individuos como UTOs en los estudios fenéticos; así se evitaría la subjetividad subyacente en la consideración de poblaciones, especies, géneros, etc. (Crovello, 1968a). Sin embargo, esta recomendación es impracticable en muchos casos debido al tiempo y esfuerzo requeridos. En general, se suelen escoger muestras representativas como UTOs que reflejen adecuadamente la diversidad existente (Stuessy, 1990).

El número y conjunto particular de UTOs empleados en un estudio fenético afecta la valoración de las afinidades obtenidas; aunque ésto puede parecer un serio problema, se ha demostrado que los cambios de composición de UTOs en un grupo determinado sólo produce pequeñas alteraciones en las afinidades obtenidas (Crovello, 1968b).

- selección de los caracteres que son las bases de la comparación.

En esta etapa se trata de obtener caracteres unitarios tal y como fueron definidos por Sneath & Sokal (1973): caracteres taxonómicos de dos o más estados que dentro del estudio no pueden ser subdivididos lógicamente. Con esta definición se intenta evitar la redundancia informativa de los datos. También deben ser seleccionados de modo que minimicen la variabilidad *intra*-UTO y que procedan de todas las partes de cada UTO, incluyendo morfología, anatomía, ultraestructura, bioquímica, etc. (Stuessy, 1990).

- descripción y /o medida de los estados de los caracteres.

Según Sneath & Sokal (1973), los caracteres pueden clasificarse en dos grupos:

(a) caracteres de dos estados (o binarios o de presencia / ausencia).

(b) caracteres multiestado. Estos pueden, a su vez, ser divididos en 1) estados cualitativos y 2) estados cuantitativos.

La mayor dificultad de codificación reside en los caracteres multiestado cualitativos (Sneath & Sokal, 1973). En Botánica es muy frecuente tener que seleccionar un carácter que describa la variación del color de una estructura y codificar sus estados blanco, rojo, naranja, amarillo, violeta, etc. como 0, 1, 2, 3, 4, etc. Sin embargo, como ya indicó Baum (1976), la distancia numérica entre los estados 0 y 1 y entre 3 y 4 es la misma que entre 1 y 2 y entre 2 y 3, lo que no es intuitivamente satisfactorio ya que, por ejemplo, la estructura de color blanco sería la más diferente (refleja todas las longitudes de onda de la luz). Para resolver este problema, entre otros métodos de recodificación, Sneath & Sokal (1973) recomendaron convertir este tipo de caracteres en varios caracteres independientes (tantos caracteres

binarios como estados tuviesen, en general). Esta solución además de ponderar esos caracteres, afectando así en un determinado grado las relaciones fenéticas, también introduce otra etapa donde la subjetividad por parte del investigador es más conspicua (Stuessy, 1990).

Los caracteres multiestado cuantitativos (o continuos) suelen transformarse matemáticamente con objeto de que afecten en una magnitud parecida a la clasificación obtenida. Esto trata de evitar el efecto distorsionador que tiene el uso de diferentes escalas a la hora de medir los caracteres (Sneath & Sokal, 1973). Una de las transformaciones más usuales es la estandarización, que consiste en sumar la media y dividir por la desviación típica de un carácter el valor de dicho carácter en cada UTO, con lo que cada carácter tiene una media 0 y una varianza igual a 1.

Como paso previo a los análisis numéricos, los datos suelen disponerse en una matriz.

- comparación de los estados para **(1)** determinar una medida de la similitud global entre cada par de UTOs (afinidad fenética) y **(2)** determinar la estructura taxonómica, ésto es, la detección de posibles grupos y subgrupos entre el conjunto de UTOs.

Ambos aspectos (1 y 2) requieren la selección de un estadístico específico para medir la afinidad y la selección de un algoritmo para determinar las relaciones fenéticas entre el conjunto de UTOs estudiados.

**(1)** Se han descrito numerosos estadísticos (por ejemplo, Clifford & Stephenson, 1975 y Dunn & Everitt, 1985), pero muchos de ellos han sido aplicados escasamente, con frecuencia sólo en el trabajo original en el que se propone su uso. Según Sneath & Sokal (1973) éstos pueden agruparse en cuatro tipos: a/ coeficientes de asociación o similitud, b/ coeficientes de distancia o disimilitud, c/ coeficientes de correlación y d/ coeficientes probabilísticos de similitud. La elección de un coeficiente requiere de un conocimiento adecuado tanto de los datos como del efecto de diferentes coeficientes (Duncan & Baum, 1981).

En taxonomía, muy pocos índices han sido aplicados extensivamente, siendo la alternativa más común la elección entre

*simple matching (SM)* y el índice de Jaccard (Sneath & Sokal, 1973) para caracteres binarios. La principal diferencia entre estos coeficientes es que el primero toma en cuenta la totalidad de coincidencias entre los objetos mientras que el índice de Jaccard (1908) excluye las coincidencias negativas (ausencia simultánea de un carácter en los UTOs sometidos a comparación).

Dentro de los coeficientes de distancia para caracteres continuos, los coeficientes denominados Distancia Euclídea y Manhattan (o *City-block*) han sido muy empleados (Crisci & López, 1983).

La aplicación de estos coeficientes sobre la matriz de los datos produce una matriz simétrica de similitud (o distancia) que suele ser el material de partida de los procedimientos descritos en el siguiente apartado.

**(2)** Para la determinación de la estructura taxonómica entre los UTOs estudiados, se debe elegir un algoritmo que relacione los UTOs usando los valores ya determinados por alguno de los coeficientes empleados en el apartado anterior. Como ocurría con los estadísticos, existen muchos tipos de algoritmos y han sido clasificados de muy diversos modos (Williams, 1971; Sneath & Sokal, 1973; Clifford & Stephenson, 1975). En general, sin embargo, pueden dividirse en dos grandes grupos, métodos de ordenación y técnicas de agrupamiento. Una revisión actualizada del uso de estas técnicas en Sistemática es la de James & McCulloch (1990).

Las técnicas de ordenación más comunes son aquellas que usan la optimización simultánea de la estructura del grupo, es decir, la estructura existente entre los UTOs se determina de una vez en lugar de por sucesivas comparaciones entre los UTOs. Estas técnicas tratan de calcular relaciones multidimensionales y condensarlas en un número reducido de planos para una mejor visualización y comprensión de las afinidades detectadas entre los UTOs. Una de las técnicas más empleadas es el análisis de componentes principales (PCA). Reduce las dimensiones de una matriz de datos al producir un menor número de variables (combinaciones lineares de las variables originales, componentes principales). Este método se basa en la maximización de la varianza de las combinaciones lineares de las variables. Muy

frecuentemente, la mayor parte de la variación puede ser acumulada en unos pocos componentes, por lo que una matriz con un elevado número de variables puede ser expuesta eficazmente en un gráfico bi- o tridimensional que use los componentes como ejes. Una generalización del PCA es el análisis de coordenadas principales (PCO); trata de describir los datos reduciendo el número de dimensiones de una matriz de distancias entre UTOs.

Los métodos de agrupamiento más comúnmente empleados son jerárquicos y aglomerativos (Stuessy, 1990). Comienzan con una matriz de similitud entre pares de UTOs; los dos más similares quedan agrupados, luego se calcula la similitud entre este grupo y los demás UTOs. De forma sucesiva, los dos grupos mas similares se combinan hasta que permanece un sólo grupo. Los resultados suelen representarse en un dendrograma, ésto es, un diagrama jerárquico bidimensional que representa las relaciones multivariantes complejas entre los UTOs.

Los métodos de agrupamiento pueden ser de tres tipos (Sneath & Sokal, 1973) que se diferencian en la forma en que cada UTO va integrándose en un grupo determinado: de ligamiento simple, completo y medio. Dentro de este último tipo, el más empleado en Sistemática (James & McCulloch, 1990), el método UPGMA (*unweighted pair-group method using averages*) es el más usado porque produce los dendrogramas menos distorsionados respecto a la matriz de similitudes en la que se basa (Duncan & Baum, 1981); dicha distorsión se mide mediante el coeficiente de correlación cofenética  $r$  (Sneath & Sokal, 1973). Este coeficiente se define como la correlación producto-momento entre la matriz de similitudes original y la matriz cofenética. Si alcanza un valor elevado ( $>0,85$ ) se puede estar razonablemente seguro de que la estructura jerárquica de los grupos se corresponde o representa con fiabilidad las relaciones implicadas por la matriz original de similitudes. Cuando el valor de este coeficiente es bajo, generalmente se aborda el análisis de estas relaciones mediante técnicas de ordenación (Sokal, 1986). Se suele usar  $r$  ya que las técnicas de agrupamiento producen agrupamientos tanto si existen realmente estos grupos como si no (ver Sokal *et al.*, 1984 para una revisión).

La descripción de estas técnicas hace innecesario el que se indique que el uso de ordenadores resulta casi imprescindible para la realización de estudios de este tipo.

- clasificación de los UTOs dentro de la jerarquía taxonómica.

Esta última etapa consiste en evaluar las relaciones de afinidad expresadas para determinar el *status* de los UTOs. Se puede realizar de manera no formal usando términos como grupo, subgrupo, entidad, etc., aunque generalmente este proceso suele implicar referencias a la jerarquía linneana (Stuessy, 1990).

Aparte del texto de Sneath & Sokal (1973), como principales revisiones de diferentes aspectos teóricos y metodológicos relacionados con los métodos fenéticos se pueden citar:

- generales: Clifford & Stephenson (1975), Jardine & Sibson (1971), Mayr (1965), McNeill (1979).
- técnicas de agrupamiento: Williams (1971).
- técnicas de estadística multivariante: Blacklith (1971), Gnanadesikan (1977), Oxnard (1978).

El número de trabajos fenéticos en Sistemática es muy elevado. Sería útil la consulta de los trabajos más citados en el presente apartado (Sneath & Sokal, 1973; Duncan & Baum, 1981; Stuessy, 1990) para tener una idea general de la amplitud de los problemas y la diversidad de grupos vegetales abordados por esta metodología.

### 1.3. ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS: LA TECNICA Y SUS APLICACIONES.

El concepto de isoenzima surge en la década de los cincuenta cuando se comprueba la existencia de múltiples formas de un mismo enzima (Gillespie *et al.*, 1952; Gillespie & Woods, 1953; Crewther & Lennox, 1953). En plantas superiores, este hecho se puso de manifiesto a partir de los trabajos de Roberts (1956) en los que se concluía que la actividad fosfatasa ácida en hojas de trigo estaba causada por un grupo de enzimas con una estrecha especificidad por el sustrato.

Un importante hito lo constituyó el desarrollo de la electroforesis sobre gel de almidón por Smithies (1955) y el subsecuente desarrollo de métodos de visualización directa sobre gel mediante tinciones histoquímicas específicas (Hunter & Markert, 1957). Estos autores acuñaron el término zimograma para referirse a las bandas en las que la localización enzimática quedaba demostrada.

El término isoenzima fue establecido por Markert & Moller (1956) para describir formas moleculares diferentes de enzimas con la misma especificidad por el sustrato, incluyendo todos los polímeros de subunidades producidos por diferentes *loci* o por diferentes alelos en el mismo *locus*. Estos autores, además, demostraron la especificidad isoenzimática a nivel de tejido, etapa de desarrollo y especie. Rápidamente, la genética de poblaciones se desarrolló como el principal usuario de la electroforesis de isoenzimas (Buth, 1984). Sin embargo, estas aplicaciones sólo usaban un grupo particular de los datos obtenidos por la electroforesis (isoenzimas *sensu stricto*) por lo que fue necesaria la partición del concepto de isoenzima y la introducción del término *alozima* para nombrar "las variantes proteicas producidas por formas alélicas del mismo *locus*" (Prakash *et al.*, 1969).

La ecuación entre fenotipo y genotipo se comprende mejor y más simplemente por medios electroforéticos que a partir de evidencias obtenidas a partir de caracteres morfológicos o de comparaciones cromatográficas de metabolitos secundarios. Esto se deriva de la colinearidad existente entre la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos así como de la especificidad de la catálisis enzimática (Gottlieb, 1977).

La técnica de electroforesis de isoenzimas se basa en la obtención de bandas de color en un gel de acrilamida o almidón que marcan la posición alcanzada por las diferentes formas moleculares de un enzima que han migrado por el gel bajo la influencia de un campo eléctrico. Las isoformas se separan debido a que poseen diferente carga eléctrica (que es función del número relativo de aminoácidos que

presentan cargas positivas y negativas). Esto es, se asume que los cambios en movilidad de enzimas en un campo eléctrico reflejan cambios en la secuencia de ADN codificadora. Así, si los patrones de bandas de dos individuos difieren, se asume que esas diferencias son genéticas y, por lo tanto, heredables (Matson, 1984). También se asume que la expresión del enzima es codominante. El tamaño y la configuración espacial de las isoformas también influyen en su movilidad a través del gel. Después de esta separación física, las isoformas se identifican mediante una reacción de tinción basada en sus actividades catalíticas. El sistema clásico de tinción de actividad enzimática está basado en la formación de un precipitado cromogénico no difusible. La amplia variedad de técnicas y compuestos hoy disponible han hecho ampliar este concepto para incluir cualquier reacción o conjunto de reacciones que revele una zona discreta (banda) de actividad enzimática por cualquier medio físico y/o químico (Vallejos, 1983).

Una reacción de tinción específica depende, básicamente, de las propiedades de la mezcla de tinción y de las condiciones de incubación. Aunque lo ideal es que la mezcla de tinción tenga un pH correspondiente al óptimo de la actividad enzimática, en muchos casos se adopta un pH diferente que es una solución de compromiso (por ejemplo, frecuentemente es necesario un conjunto de reacciones acopladas para revelar la actividad enzimática y puede ocurrir que alguna de estas reacciones tenga un pH distinto del óptimo; otras veces lo que ocurre es que el cromóforo no es estable al pH óptimo). La luz es otro factor importante ya que muchas tinciones son extremadamente sensibles y se inactivan expuestas a la luz (por ejemplo, todas aquellas que contienen sales de tetrazolio y *Fast Blue BB*, una sal de diazonio). Así, es necesario preservar de la luz estas mezclas de tinción durante la incubación. La temperatura también juega su papel; aunque la mayoría de las reacciones de tinción se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente, hay protocolos que requieren un periodo de incubación de 35 - 37 °C. También hay que tener en cuenta la duración de la tinción ya que la velocidad de formación del cromóforo depende no solo de los factores antes mencionados, también de la naturaleza de la reacción; una sobreincubación suele producir tinción excesiva de las zonas de actividad enzimática (con riesgo de solapamiento de bandas muy próximas) y difusión por el gel de los productos separados por electroforesis (pérdida de resolución de las bandas).

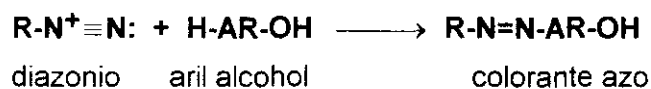
En general, los métodos de tinción implican la formación de regiones cromáticas discretas (bandas) por lo que son denominados "tinciones positivas". No obstante, algunos procedimientos se basan en la destrucción o inhibición de la formación del cromóforo mientras que se tiñe el resto del gel. En estos casos, las zonas de actividad enzimática se detectan por la presencia de regiones acromáticas;



ésto es lo que se suele denominar "tinción negativa". Dentro de las tinciones positivas, hay todo un abanico de posibilidades: reacciones de mecanismo de detección primario (uno de los productos adquiere alguna propiedad física y/o química que permite visualizarlo directamente), mecanismo de acoplamiento químico (es necesaria la adición de un compuesto que reaccione con el producto primario para formar un producto secundario detectable), de acoplamiento enzimático (a veces es necesaria la adición de una o más enzimas a la mezcla de tinción para que éstas, por acción enzimática, logren formar el compuesto que finalmente se podrá detectar) y el método *overlay* (se usa cuando el cromóforo es soluble, se difunde o ambas cosas; consiste en aplicar la mezcla de tinción en una capa sólida que suele ser de agar).

Existen varios tipos de sistemas de tinción dependiendo de cómo se forma el cromóforo. Los más comunes son:

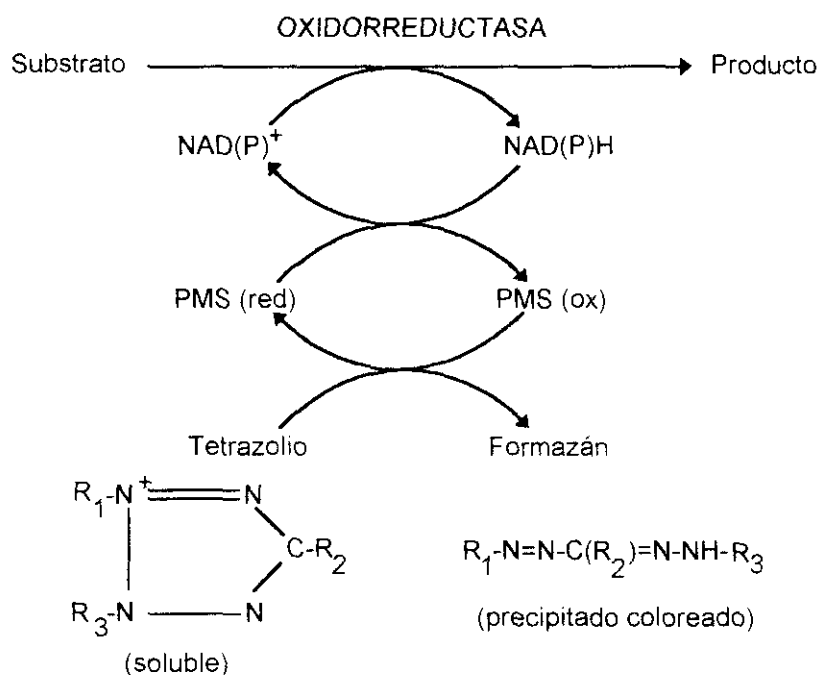
**Sistema de acoplamiento azo.** Fue introducido por Menten *et al.* (1944) para la localización de fosfatasa alcalina en tejido renal. Sintetizaron un naftilfosfato que fue hidrolizado por el enzima en presencia de una arilamina diazotizada (diazonio). Cuando el naftol fue liberado enzimáticamente, se acopló inmediatamente con la sal diazotizada formando un precipitado coloreado insoluble (colorante azo) localizando así la actividad enzimática. Desde entonces, este sistema ha sido adaptado para detectar otros enzimas hidrolíticos como fosfatasas ácidas, esterases, sulfatasas, aminopeptidasas y glicosidasas. Los iones diazonio son muy inestables en solución, por lo que cualquier mezcla de tinción que las incluya debe prepararse inmediatamente antes de su uso. La reacción es, en esquema, como sigue:



(El aril alcohol se produce por la hidrólisis enzimática del sustrato).

**Sistema tetrazolio.** Las sales de tetrazolio fueron utilizadas por primera vez en biología en 1941 cuando Kuhn & Jerkel observaron que estas sales podían ser reducidas a un precipitado coloreado (formazán) por organismos vivos como levaduras, bacterias y tejidos vegetales (Pearse, 1972). No obstante, Seligman & Rutenburg (1951) fueron los primeros en desarrollar un procedimiento histoquímico para la detección de actividad enzimática con estas sales. Esta técnica es la que Markert & Moller (1959) adaptaron para la detección de actividad enzimática en geles. Desde entonces esta técnica está implicada en la mayoría de los protocolos actuales para la detección de deshidrogenasas.

Aunque hay toda una variedad de sales de tetrazolio disponible comercialmente (por ejemplo, violeta de p-iodonitrotetrazolio -INT-, azul de tetranitrotetrazolio -TNBT-, azul de tetrazolio -TB-, cloruro de trifenil tetrazolio -TTC-, etc.), las más usadas son el azul de nitrotetrazolio (NBT) y el bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Todas estas sales son susceptibles de sufrir fotorreducción, por lo que las soluciones de tinción que las incluyen deben preservarse de la luz. Singer *et al.* (1957) fueron los que introdujeron un aceptor electrónico rápidamente reversible: fenacina metosulfato (PMS). Este compuesto acepta los electrones desde NAD(P)H y reduce las sales de tetrazolio, repitiendo el ciclo y acelerando la reacción. La reacción, de forma esquemática, sería:



**Sistema almidón-iodo.** El color azul se forma debido a la configuración de hélice lineal que las amilosas adoptan con el yodo, de tal manera que hay una molécula de yodo y seis de glucosa por espira. La formación del cromóforo almidón-yodo ha sido usada para la detección de la actividad de amilasas, fosforilasas y catalasas, en general, mediante métodos de tinción negativa.

**Colorantes REDOX.** Este grupo incluye colorantes distintos a las sales de tetrazolio y aunque abarca a una variedad de compuestos químicos muy heterogénea, todos presentan una característica común: un cambio visible en sus propiedades físico-químicas, como un desplazamiento en la longitud de onda de absorción y/o un cambio de solubilidad concomitante con cambios en su estado de oxidación. Algunos de estos compuestos son 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), metil viológeno (MV), 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMBZ) y

3-amino-9-etilcarbazol, que son empleados para la detección de actividad tipo peroxidasa.

Una de las ventajas principales de la electroforesis de isoenzimas es que la colinearidad asegura que las comparaciones sistemáticas se hacen por medio de productos de genes homólogos, lo que soslaya los problemas de convergencia y correlación funcional que a menudo aparecen cuando se emplean caracteres morfológicos. Otra ventaja es que los datos obtenidos por esta técnica son precisos y directamente cuantificables en términos del número y clases de enzimas estudiados, lo que permite cuantificar exactamente la cantidad de información genética empleada, lo que no ocurre frecuentemente con caracteres morfológicos u otros. Otra ventaja significativa la constituye el hecho de que para las comparaciones se emplean enzimas que están siempre presentes y éstos están escasamente afectados por factores ambientales.

Dentro de las desventajas que presenta esta técnica, la principal es el pequeño número de enzimas que se suele muestrear en este tipo de estudios y que, además, corresponden casi siempre a una panoplia metabólica restringida: glicolisis, algunas rutas del metabolismo secundario y la catálisis de determinados tipos de enlaces (éster, fosfato, peptídico, etc.). No obstante, esta falta de representatividad no es grave en Sistemática ya que no está restringida a los caracteres representativos. Un problema mucho más crítico para los trabajos de Sistemática basados en este tipo de datos es que, debido a la redundancia del código genético, sólo el 30% de las sustituciones de nucleótidos suelen resultar en cambios en la secuencia de aminoácidos que se reflejan, a su vez, en cambios de movilidad electroforética (Shaw, 1970). Además, los alozimas con movilidades idénticas no necesariamente tienen una secuencia de aminoácidos idéntica, por lo que es necesario "cargar" los datos correspondientes a diferencias electroforéticas frente a los de similitud. Con todo se acepta, en general, que los estudios basados en electroforesis de isoenzimas subestiman la diferencia genética entre taxones (Gottlieb, 1977). Por último, otro inconveniente de esta técnica está en el hecho de que no proporciona información sobre la "cantidad de diferencia" expresada en los geles ya que un cambio en movilidad puede corresponder a un solo cambio esencial o bien a la suma de muchos cambios en la secuencia nucleotídica.

Para estudios de Sistemática se han reconocido tres categorías principales de caracteres isoenzimáticos (Buth, 1981):

(a) El número de genes que controlan un sistema enzimático *multilocus*. Se pueden formar nuevos *loci* isoenzimáticos vía duplicación en tándem (de un solo gen)

o vía poliploidización (del genoma completo), siendo esto último lo más común. Tanto la aparición como la pérdida de un gen tiene un gran valor sistemático.

(b) La regulación de la expresión enzimática, incluyendo especificidad tisular e intensidad de la expresión (ésto es, diferenciación cualitativa y cuantitativa a nivel regulador). En estudios de Sistemática se puede aprovechar la naturaleza específica a nivel tisular de la regulación génica en sistemas enzimáticos *multilocus* o de un solo *locus* reconociendo que la expresión de un determinado *locus* enzimático en un tejido dado se puede analizar como un carácter binario (ausencia/presencia).

(c) La capacidad, o pérdida de ésta, de ensamblar heteropolímeros en enzimas multiméricos (por interacción a nivel *inter-* o *intra**locus*). Muchos enzimas tienen una naturaleza multimérica (el enzima está compuesto de subunidades que deben ensamblarse antes de que el conjunto sea funcional) por lo que, si se produce más de una clase de subunidad, se pueden formar distintos heteropolímeros que muestren moviidades electroforéticas intermedias cercanas a las de los respectivos homopolímeros.

Con estos diferentes tipos de caracteres, la aplicación de la electroforesis de isoenzimas en Sistemática es muy amplia :

- **Sistemática a nivel de especie.** Dos características comparativas hacen este método especialmente apropiado a nivel de poblaciones y especies: 1º) el polimorfismo alozímico se encuentra frecuentemente en estos niveles. Hamrick & Godt (1989), en un trabajo recopilatorio de datos isoenzimáticos de 473 especies de plantas, encontraron que la mitad de los *loci* eran polimórficos dentro de una especie vegetal y, aproximadamente, un tercio también mostraron ese carácter dentro de la población media). 2º) Las técnicas implicadas pueden manejar un elevado número de muestras que, generalmente, consisten en extractos crudos, haciendo el análisis isoenzimático barato, fácil y rápido.

Uno de los campos de aplicación de la electroforesis de isoenzimas con más potencialidad es la inferencia de la estructura poblacional a partir de la distribución geográfica de frecuencias alélicas. Sin embargo, debido a que son muy pocas las especies, tanto animales como vegetales, de los que se tienen datos demográficos adecuados, los datos isoenzimáticos no han sido muy empleados para inferencia de dispersión genética (Endler, 1979).

En cambio, esta aproximación experimental se ha demostrado muy poderosa en la delimitación de especies, constituyendo un método sencillo para la determinación rápida de la cohesión genética de especies definidas morfológicamente. Con frecuencia la evolución en los niveles morfológico y molecular está desacoplada (Wake, 1981) por lo que a menudo se revelan patrones geográficos discordantes entre los niveles de divergencia alozímica y los límites taxonómicos inferidos a través de criterios morfológicos. Así, es común el caso en que se demuestra que determinados electromorfos están consistentemente fijados en unas determinadas poblaciones pertenecientes a una especie morfológicamente definida y, además, que el intercambio genético entre éstas y el resto de las poblaciones de dicha especie no se verifica. Como ejemplos paradigmáticos podemos citar el trabajo de Jefferies & Gottlieb (1982) en el que confirmaron que *Salicornia europaea* y *S. ramosissima*, morfológicamente indistinguibles, son dos especies y el estudio de Crawford & Wilson (1979) en el que mediante esta técnica demostraron que *Chenopodium incognitum* incluía dos entidades biológicas distintas que, a su vez, eran conespecíficas respectivamente, con *C. incanum* y *C. fremontii*. Otros ejemplos interesantes son los trabajos de Arulsekhar *et al.* (1985) en especies de *Juglans* y Gastony (1986) en diferentes especies de helechos.

La divergencia en los genes codificadores de enzimas solubles también frecuentemente no está correlacionada con la especiación vegetal (Gottlieb & Piltz, 1976), lo que significa que, aunque pueda ocurrir la especiación, la divergencia entre estas especies puede no ser mayor que la que se encuentra normalmente entre poblaciones conespecíficas. Y al contrario, puede existir divergencia alozímica entre poblaciones en ausencia de especiación. Como ejemplo, se pueden citar los trabajos de Whalen (1979) en *Solanum* spp., Crawford & Bayer (1981) en *Coreopsis cyclocarpa*, Roberts (1983) en *Bidens discoidea* y Gottlieb (1984) en *Clarkia xantiana*. Esto, que a primera vista no parece sorprendente, constituye una ventaja en estudios de Sistemática ya que si la divergencia alozímica estuviese ligada inevitablemente a la especiación, los datos provenientes de la electroforesis de enzimas serían útiles únicamente como marcadores taxonómicos en estudios de delimitación taxonómica estricta (Crawford, 1989).

- **Medida de la variación genética.** Los isoenzimas son marcadores excelentes para la medida comparativa de la variación genética intrapoblacional (Brown & Weir, 1983) y la divergencia entre dos poblaciones, especialmente cuando se realiza sobre una muestra de 20 ó más *loci*. En consecuencia, estas técnicas proporcionan valiosas evidencias sobre afinidad o discontinuidad entre especies.

- **Control de procesos microevolutivos.** La capacidad de manejar un elevado número de muestras con un método directamente comparativo implica que estas técnicas son especialmente apropiadas para estudiar procesos microevolutivos como el sistema de reproducción (Brown, 1989), supresión de la recombinación, migración y variación en los progenitores (Ellstrand, 1984), hibridación y diferenciación local (Heywood, 1986). Todos estos procesos actúan sobre todas las clases de variación en el genoma vegetal.
- **Grupos problemáticos.** La aproximación metodológica isoenzimática puede ser usada para analizar porqué determinados grupos vegetales son considerados problemáticos (Crawford, 1983). Así, si la pérdida de diferencias morfológicas claras es debida a un origen evolutivo reciente de los taxones en cuestión, las distancias genéticas basadas en isoenzimas serán muy bajas, apuntando a una pérdida de divergencia genética. Y a la inversa, si el problema se debe a una plasticidad fenotípica, las distancias genéticas serían mayores que las esperadas sobre la base de la similitud morfológica percibida. Si los valores de distancia genética oscilan ampliamente, la hibridación sería la hipótesis más plausible (Brown, 1990). Por otro lado, la reproducción uniparental (autogamia o apomixis) es una fuente potencial de problemas taxonómicos. Este tipo de reproducción genera tipos parcialmente diferenciados por lo que a veces es difícil formular hipótesis fiables de afinidad basadas únicamente en morfología. De los datos isoenzimáticos, una autogamia parcial sería evidente a partir de un resultado de baja heterocigosis y altos índices de fijación, mientras que de un patrón isoenzimático que revelase una progenie uniforme y/o patrones alélicos correlacionados serían prueba de una apomixis parcial (Brown, 1990).

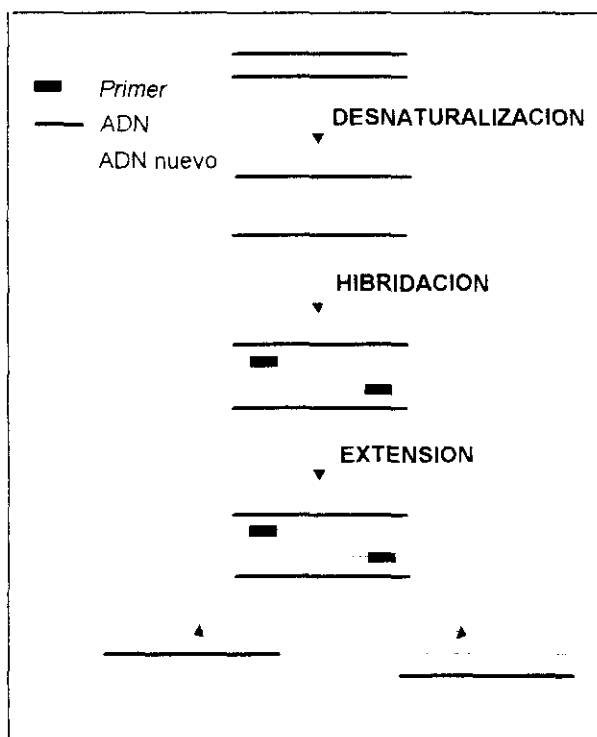
A nivel interespecífico, la electroforesis de isoenzimas se ha empleado extensivamente (aunque mucho menos que los alozimas) en estudios de relaciones filogenéticas en plantas; a Crawford (1983) se debe una completa revisión de este tema. En este contexto, también constituyen una valiosa herramienta en estudios de hibridación. Es el caso de los trabajos de Cherry *et al.* (1972) en el género *Gossypium*, Gottlieb (1973) en *Stephanomeria*, Roose & Gottlieb (1976) en el género *Tragopogon*, Werth *et al.* (1985) en diferentes especies de *Asplenium*, Holsinger & Gottlieb (1988) en *Clarkia gracilis* y Soltis & Rieseberg (1986) en *Tolmiea menziesii*. También se debe a Crawford (1989) una de las más recientes y mejores revisiones sobre estos temas de especiación híbrida a nivel diploide y determinación del origen de especies poliploides.

#### 1.4. PCR - RAPDs : LA TECNICA Y SUS APLICACIONES.

A diferencia de otras técnicas como el análisis de caracteres morfológicos y el uso de proteínas solubles o sistemas isoenzimáticos, la utilización de marcadores directamente derivados del ADN permiten una comparación directa del genoma y evitar cualquier influencia ambiental sobre la expresión génica.

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación *in vitro* de ADN ha hecho accesible a la Sistemática el muestreo de la variación en secuencia del genoma completo ya que se consigue multiplicar enormemente el ADN objeto de estudio (en los primeros estudios sobre secuenciación, la escasa cantidad de muestra genómica limitaba mucho los resultados).

Esta técnica (Fig. 2) parte de la síntesis de pequeñas secuencias de ADN (*primers*) complementarias de una parte de una hebra genómica en el comienzo de un gen y de parte de la hebra opuesta en el otro extremo del gen.



**Fig. 2.** Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante calor se desnatura el ADN muestra y se hace hibridar cada hebra con primers. Una ADN polimerasa termostable sintetiza las hebras complementarias a partir de cada *primer*. Las nuevas cadenas bifibrilares sirven como moldes para el siguiente ciclo.

Cuando la temperatura se lleva a 94 °C, las hebras de ADN se separan (desnaturalización). La siguiente etapa en la reacción (hibridación) consiste en bajar la temperatura a 30 - 45 °C, dependiendo del tamaño y secuencia del oligonucleótido, con lo que se consigue que el *primer* se hibride con sus regiones complementarias en las hebras genómicas. Al aumentar la temperatura a 72 °C en el paso final (*extensión*), los *primers* no fuertemente hibridados (no totalmente complementarios) se desligan, lo que evita la copia de secuencias distintas del gen en cuestión; en esta fase de la reacción es donde actúa el enzima ADN polimerasa que extiende el dúplex *primer*-ADN genómico mediante la incorporación de nucleótidos siguiendo la polaridad de la hebra. Como los protocolos

de PCR generalmente implican la repetición de este ciclo entre 25 y 50 veces, los

fragmentos obtenidos (de una determinada longitud) incrementan exponencialmente su concentración en la mezcla de reacción (los fragmentos sintetizados en un ciclo sirven para formar nuevos dúplex en el ciclo siguiente), llegando a ser las secuencias más abundantes. Una vez finalizada la reacción, los productos de la amplificación se someten a electroforesis sobre gel de agarosa o poliacrilamida, separándose en forma de bandas que se visualizan mediante tinción con bromuro de etidio o tinción de plata, respectivamente (Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988).

En los inicios de la metodología PCR, se empleaban tres baños sucesivos con las temperaturas de reacción y como enzima una porción de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* conocido como fragmento Klenow. Mientras que lo primero ocasionaba a menudo problemas en la repetibilidad exigible ciclo tras ciclo, lo segundo tenía el inconveniente de la inactivación del enzima después de cada paso de desnaturalización, lo que implicaba la continua adición de nuevo enzima hasta terminar la reacción. Con la introducción de una ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) obtenida por clonación de la cepa YT1 de *Thermus aquaticus*, una eubacteria termófila, se evitó tener que reponer el enzima a lo largo de la reacción, permitiendo la automatización de la reacción mediante la introducción de termocicladores, máquinas con perfiles programables de temperatura (Arnheim & Erlich, 1992).

Además de la Taq polimerasa, otros enzimas que también han sido empleados son los aislados de *Thermococcus litoralis* y *Thermus flavus*. Respecto a la primera, su uso ha sido muy restringido. Otras ADN polimerasas termoestables también han sido obtenidas a partir de una variedad de bacterias: *Thermoplasma acidophilum*, *Bacillus stearothermophilus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Sulfolobus acidocaldarius* y *S. solfataricus*, etc. (Gelfand & White, 1990; Arnheim & Erlich, 1992).

El principal obstáculo para la generalización de esta metodología en el ámbito de la genética de poblaciones y la taxonomía, por ejemplo, era que se necesitaba disponer de información previa sobre el genoma a estudiar para poder sintetizar los *primers*. Para evitar esto, varios grupos comenzaron a emplear un método basado en PCR para amplificar al azar, en condiciones poco restrictivas, segmentos de ADN usando un *primer* de secuencia arbitraria y de pequeño número de bases (9-10) (Williams *et al.*, 1990 ; Welsh & McClelland, 1990). La amplificación depende de la existencia en el genoma de algún lugar con dos sitios que sean complementarios con el *primer* y que estén situados en hebras opuestas a una distancia a la que la secuencia intermedia pueda ser rellenada mediante la síntesis *in vitro* de ADN. Aunque la probabilidad de que esto ocurra es muy pequeña, el tamaño de los



genomas hace que, virtualmente, haya una variedad ilimitada de cebadores de 10 pares de bases (pb). De hecho, de un genoma vegetal se obtienen numerosos productos de amplificación de diferentes tamaños con un *primer* arbitrario que son detectados de igual manera que en PCR convencional. Generalmente, los patrones de bandas así obtenidos son polimórficos en poblaciones. Este rasgo es el que dio nombre a la técnica, que se conoce como **RAPD** o *Random Amplified Polymorphic DNA* (Williams *et al.*, 1990). Los análisis de tipo mendeliano muestran que los polimorfismos consisten generalmente en la ausencia o presencia de un producto de amplificación de un determinado lugar del genoma, lo que probablemente represente: **a)** una sustitución de bases en el lugar de unión del *primer*; **b)** una delección de un sitio de iniciación; **c)** inserciones que producen sitios de iniciación demasiado distantes como para que se verifique la amplificación o **d)** inserciones que modifican el tamaño de un segmento de ADN sin que se impida su amplificación (Williams *et al.*, 1990; Quiros *et al.*, 1991).

Aunque es ésta la metodología más intensamente empleada desde entonces, se están desarrollando variaciones con objeto de ampliar el espectro de polimorfismos detectables en una muestra determinada. Así, la técnica DAF o *DNA Amplification Fingerprinting* (Caetano-Anollés *et al.*, 1991) emplea *primers* de sólo cinco nucleótidos; los patrones de bandas obtenidos son más complejos pero se requiere una separación electroforética y tinción de los productos mucho más sensible que la obtenida con geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio ya que se consigue la amplificación no sólo de los fragmentos mayoritarios. Requiere una mayor concentración de *primer* en la mezcla de reacción y el empleo del fragmento Stoffel (una Taq polimerasa que carece de 289 aa. en el extremo amino terminal y con actividad exonucleasa 5'-3' ) que mejora notablemente los resultados, ya que incrementa el número de primers con los que se obtienen polimorfismos y es, además, mucho más barato que cualquier ADN polimerasa (Sobral & Honeycutt, 1993). También se ha demostrado que el uso de más de un *primer* en la reacción de amplificación aumenta el número de polimorfismos ya que los obtenidos no son la mera suma de los conseguidos con cada *primer* en solitario (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991). Otro caso, mucho menos empleado, sería la técnica RAPD-DGGE o *RAPD - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* que está diseñada para permitir la resolución entre fragmentos de muy parecido o igual tamaño. Este método se basa en el hecho que la sustitución de un solo nucleótido puede modificar el perfil térmico de desnaturalización del ADN, lo que resulta en una tasa alterada de migración por electroforesis en gel (Dweikat *et al.*, 1993).

Aunque la metodología RAPD emplea primers de secuencia arbitraria, se ha comprobado que el contenido en bases G+C determina la bondad de la amplificación, estableciéndose una correlación positiva entre este contenido y el número de polimorfismos obtenidos (Williams *et al.*, 1990; Fritsch *et al.*, 1993, entre otros), lo que se podría explicar en términos termodinámicos: G se une a C con tres puentes de hidrógeno mientras que A lo hace con T sólo con dos; ésto haría físicamente más fácil al *primer* de mayor contenido G+C unirse con su secuencia homóloga en la hebra, reteniendo su complementación en el paso de extensión, donde la temperatura es superior a la de la fase de hibridación (Fukuoka *et al.*, 1992). Así, generalmente se utilizan *primers* con un contenido en G+C de, al menos, el 50% y que carecen de secuencias palindrómicas (Williams *et al.*, 1990). Los *primers* sintetizados en estas condiciones rinden un promedio de 2-10 productos de amplificación en genomas vegetales (Waugh & Powell, 1992).

Las ventajas de la técnica RAPD frente a otras metodologías de marcadores de ADN (RFLPs, cpDNA, VNTR o *Variable Number of Tandem Repeats*, CAPS o *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*, etc.) son muy variadas. En primer lugar, su simplicidad técnica ya que, aparte del termociclador y los moldes necesarios para construir los geles, no se requiere un especial equipamiento (por ejemplo, los RFLPs emplean radioisótopos). También es destacable su sencillez metodológica, lo que se refleja en un menor esfuerzo de laboratorio (el uso de cpADN implica un proceso complicado de extracción de ADN por ultracentrifugación en gradiente de CsCl; los RFLPs requieren, además de la digestión del ADN con endonucleasas, la realización de pruebas de Southern; CAPS aplica endonucleasas de restricción a productos generados por PCR, etc.). Esta técnica, además, necesita una cantidad muy pequeña (del orden de ngr) de un ADN que no necesita ser purificado como ocurre con las otras metodologías. Otra ventaja es su rapidez; un ensayo RAPD típico se lleva a cabo en solo unas horas, frente a la duración de días de algunos de los protocolos empleados en RFLPs, por ejemplo. El coste de la metodología RAPD es relativamente bajo, teniendo el precio de la ADN polimerasa la mayor contribución a dicho coste. Como los marcadores obtenidos por esta técnica (RAPDs) son selecciones al azar de secuencia de ADN, son independientes de la especie vegetal a estudiar, ésto es, los *primers* que detectan polimorfismos en una especie determinada también pueden revelarlos en otra (Andersen & Fairbanks, 1990). El número de *primers* y, por tanto, la variabilidad generada a partir de ellos son virtualmente ilimitados (Doyle, 1993).

Las limitaciones de la técnica RAPD son, básicamente, las mismas que las de la PCR en la que se basa:

a) sólo se puede amplificar eficientemente dentro de un cierto rango de tamaños de fragmentos de ADN; actualmente, la tecnología PCR no permite la amplificación de secuencias mayores de 4000 bases, por lo que las secuencias de ADN sólo serán amplificadas si dos copias del *primer* empleado se hibridan en las hebras de un fragmento de ADN y están separados por menos de 4000 bases (Newbury & Ford-Lloyd, 1993).

b) la polimerasa introduce errores; de hecho, se ha calculado una tasa de mutación acumulada del 0,3-0,8 % después de 20-30 ciclos (Keohavong & Thilly, 1989).

Debido a la gran sensibilidad del método y al altísimo número de copias que se obtienen en una reacción, la inclusión de cualquier secuencia contaminante tiene efectos desastrosos para el análisis de los resultados; este inconveniente se suele resolver separando la zona donde se realizan las amplificaciones del resto del laboratorio y usando elementos esterilizables y desechables.

Otra desventaja, sobre todo en estudios de mapeo genético, es el carácter dominante de los productos de amplificación, lo que dificulta, si no impide, la detección de *loci* heterocigóticos. No obstante, Baird *et al.* (1992) afirman que esta metodología puede ser empleada para identificar individuos heterocigóticos cuando un *primer* genera un producto de amplificación complementario polimórfico en cada parental, lo que implica análisis de prole. Williams *et al.* (1990) trabajando con *Neurospora crassa* encontraron cuatro RAPDs codominantes de un total de 88 y Tinker *et al.* (1993) llegaron a demostrar ese mismo carácter codominante en un solo RAPD de un total de 31 en un estudio sobre *Hordeum vulgare*.

Una cuestión importante a tener en cuenta es si los productos de amplificación de igual peso molecular en dos muestras diferentes son caracteres homólogos (caracteres heredados de un ancestro común) u homoplásticos (caracteres que han surgido independientemente dentro de una población). En otras palabras, si dos bandas que migran igual en dos muestras tienen la misma secuencia. Williams *et al.* (1993) demostraron que las bandas consideradas homólogas atendiendo a su movilidad relativa también lo eran por pruebas de hibridación. Estos resultados han sido confirmados por otros grupos (van Heusden & Bachmann, 1992a; Wilde *et al.*, 1992; Wilkie *et al.*, 1993). Los patrones polimórficos resultado del uso de diferentes *primers* sobre un mismo genoma no solo permiten caracterizar dicho genoma (Welsh & McClelland, 1990), también pueden ser empleados en análisis filogenéticos al tratar los distintos productos de amplificación como caracteres cualitativos de ausencia/presencia (Bachmann, 1992).

Desde su introducción, el uso de los marcadores RAPD se ha incrementado de forma exponencial. Así, los RAPDs han sido empleados con muy diversos fines:

- construcción de mapas genéticos en *Glycine max* (Williams *et al.*, 1990), *Lycopersicon esculentum* (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991; Foolad *et al.*, 1993), *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* y *Secale cereale* (Weining & Langridge, 1991), *Pseudotsuga menziesii* y *Picea glauca* (Carlson *et al.*, 1991) y en especies de *Vaccinium* (Rowland & Levi, 1994).
- identificación de híbridos en *Zea mais* (Welsh *et al.*, 1991), en *Iris* spp. (Arnold *et al.*, 1991) y en *Solanum* spp. (Xu *et al.*, 1993).
- como marcadores para genes de resistencia en *Lactuca sativa* (Michelmore *et al.*, 1991) y *Lycopersicon esculentum* (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991).
- para la identificación de fuentes de germoplasma de *Brassica oleracea* (Hu & Quirós, 1991), *Theobroma* spp. (Wilde *et al.*, 1992), *Oryza sativa* (Fukuoka *et al.*, 1992), *Apium graveolens* (Yang & Quirós, 1993), *Malus domestica* (Koller *et al.*, 1993) y *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* y *Avena sativa* (Dweikat *et al.*, 1993).
- para la evaluación de las relaciones taxonómicas entre cultivares de *Brassica oleracea* (Kresovich *et al.*, 1992), *Arachis hypogaea* (Halward *et al.*, 1992), *Carica papaya* (Stiles *et al.*, 1993), *Dendranthema grandiflora* (Wolff & Peters-Van Rijn, 1993), *Vicia faba* (van de Ven *et al.*, 1993), *Sorghum bicolor* (Tao *et al.*, 1993), *Brassica napus* (Mailer & Fristensky, 1994) y *Avena sterilis* (Heum & Phillips, 1994).
- para la evaluación de las relaciones taxonómicas entre especies de *Brassica* spp. (Demeke *et al.*, 1992), *Musa* spp. (Kaemmer *et al.*, 1992), *Clusia* spp. (Böhm *et al.*, 1993), *Populus* spp. (Castiglione *et al.*, 1993), *Stylosanthes* spp. (Kazan *et al.*, 1993), *Allium* spp. (Wilkie *et al.*, 1993) y *Coffea* ssp. (Orozco-Castillo *et al.*, 1994).
- para la evaluación de las relaciones taxonómicas entre poblaciones de *Gliricidia* spp. (Chalmers *et al.*, 1992), *Microseris bigelovii* (van Heusden & Bachmann, 1992b), *Medicago sativa* (Yu & Pauls, 1993), *Juniperus* spp. (Adams *et al.*, 1993), *Chamaecytisus palmensis* (Francisco-Ortega *et al.*, 1993) y *Buchloë dactyloides* (Huff *et al.*, 1993).

Aunque dentro de estos últimos trabajos se han demostrado divergencias tipo RAPD entre especies alógamas, la mayor parte de los trabajos han sido realizados sobre el modelo y la extensión de la variación genética detectada mediante RAPDs en especies y/o cultivares de especies autógamas. Todavía son escasos los estudios en especies de polinización cruzada.

# ***OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO***

## 2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Uno de los objetivos fue la determinación del área de distribución de los taxones incluidos en el género *Colutea* en la Península Ibérica. Para ello, la recopilación de citas se abordó en una doble vertiente, por un lado se recopilaron aquellas localidades presentes en los pliegos de herbario a los que tuvimos acceso y, por otro, se realizó una revisión bibliográfica.

Debido a la escasez de material de la Península Ibérica revisado por Browicz (1963), otro de los fines del presente estudio fue la comparación de las descripciones de Browicz (1963) para el material peninsular con los datos obtenidos a partir de nuestra revisión y, a su vez, comparar la revisión del *status* taxonómico de *C. atlantica* Browicz con el material de herbario determinado como *C. arborescens* L. subsp. *atlantica* (Browicz) Bolòs & Vigo a través de la revisión del material del género *Colutea* L. depositado en los diferentes herbarios nacionales y extranjeros mediante los caracteres empleados en la taxonomía del género para los materiales peninsulares. Con este fin, se realizó un análisis univariante de los caracteres estudiados sobre los pliegos de herbario.

Con el fin de disponer de caracteres distintos de los morfológicos que fuesen útiles en la taxonomía de *Colutea*, se empleó la electroforesis de isoenzimas y la técnica RAPD. Mientras que la primera ofrece información directamente derivada del genoma, el sujeto de la segunda es el genoma mismo. La aplicación de estas técnicas en poblaciones de *Colutea* L. previamente determinadas morfológicamente se abordó para, con los marcadores obtenidos, tratar de establecer las relaciones de afinidad interpoblacionales dentro y entre los taxones empleados mediante un análisis multivariante que incluyó técnicas de ordenamiento y agrupamiento.

Se abordó la comparación de la información obtenida por la electroforesis de isoenzimas y RAPD mediante el uso de métodos de análisis multivariante a partir de las 22 poblaciones utilizadas con ambas técnicas moleculares con objeto de verificar la compatibilidad de la información sobre las relaciones de afinidad que ofrecen dichas técnicas y, en su caso, optar por uno u otro método en futuros trabajos.

# ***MATERIAL Y METODOS***



### 3. MATERIAL Y METODOS.

#### 3.1. INFORMACION COROLOGICA.

##### 3.1.1. FUENTES.

Siguiendo los criterios expresados por Moreno Sáiz & Sáinz Ollero (1992), *a priori* consideramos de igual validez las citas aportadas por las distintas fuentes bibliográficas que la información obtenida a partir de los pliegos depositados en los diferentes herbarios consultados. A diferencia de lo indicado por estos autores sí incluimos las citas existentes en trabajos de vegetación pero sólo cuando los inventarios estaban suficientemente localizados.

Las fuentes bibliográficas examinadas fueron muy variadas, sobre todo en lo que respecta a su cobertura geográfica dentro de la Península Ibérica. Como paso previo se revisaron obras generales como *Flora dels Països Catalans* (Bolòs & Vigo, 1984 - 1990) y *Flora vascular de Andalucía Occidental* (Valdés et al., 1987). No obstante, la primera fuente consultada una vez vista la monografía del género (Browicz, 1963) fue el clásico *Prodromus Floræ Hispanicæ* (Willkomm & Lange, 1870). Para la localización de las numerosas floras y catálogos florísticos regionales, provinciales y locales que presumiblemente contenían citas del género *Colutea* L., se consultó el artículo de Moreno Sáiz & Sáinz Ollero (1989). Por último, para la búsqueda dentro de las revistas botánicas nacionales (también con diferente grado de cobertura geográfica) y otras de difusión más local pero que cuentan con trabajos botánicos, se contó tanto con la sección *Bibliografía Botánica Ibérica* que la revista *Botanica Complutensis* comenzó a publicar en 1989 como con los *Archivos de Flora Ibérica* (Velayos et al., 1991 y ss.). La revisión bibliográfica se dio por concluida en junio de 1994.

Para la revisión y localización del material herborizado en la Península, se solicitaron los pliegos del género depositados en los siguientes herbarios:

<b>BC</b>	Institut Botànic, Barcelona.
<b>BCC</b>	Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Barcelona.
<b>BCF</b>	Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.
<b>COI</b>	Instituto J. Henriques, Coimbra.
<b>COFC</b>	Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Córdoba.
<b>G</b>	Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, Ginebra.
<b>GDAC</b>	Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.
<b>JACA</b>	Instituto Pirenaico de Ecología, Jaca.
<b>K</b>	Royal Botanic Gardens, Kew.
<b>MA</b>	Real Jardín Botánico, Madrid.
<b>MACB</b>	Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
<b>MAF</b>	Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
<b>SALA</b>	Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Salamanca.

<b>SALAF</b>	Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca.
<b>SEV</b>	Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Sevilla.
<b>VAB</b>	Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia.
<b>VF</b>	Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.

Dispusimos de los pliegos solicitados de todos los herbarios mencionados excepto los de MA y COI. La redacción de *Flora Iberica* impidió el préstamo al menos en el primer caso. Los herbarios MACB y MAF fueron consultados *in situ*.

### 3.1.2. METODOLOGIA.

Para cada testimonio se registró la coordenada U.T.M., localidad (generalmente indicada por el lugar preciso y por la entidad geográfica a la que éste pertenece), altitud, fecha, recolector e identificación del pliego (entre paréntesis) o bien la referencia bibliográfica (entre paréntesis y en letras versales). Cuando en alguna fuente bibliográfica encontramos múltiples coordenadas referidas genéricamente a un único lugar o zona, éstas fueron registradas en serie dentro de la misma referencia bibliográfica. Para la determinación de las coordenadas U.T.M. se consultó la colección de mapas a escala 1:50.000 del Servicio Cartográfico del Ejército.

Con las coordenadas así obtenidas se confeccionaron mapas de distribución para cada taxón considerado mediante el programa de cartografía automática Cyanus.

Los mapas corológicos y los listados de localidades no reflejaron la totalidad de las citas obtenidas ya que:

- 1º En caso de duplicidad (testimonio de herbario y cita bibliográfica en la misma coordenada) siempre se optó por el pliego.
- 2º En caso de múltiples testimonios de herbario siempre se optó por aquel en el que constase el mayor número de datos a registrar.
- 3º El programa Cyanus sólo ofrece una resolución máxima en malla de 10 km. de lado, por lo que un punto del mapa representó todas las citas con coordenada U.T.M. de menor escala incluidas dentro del cuadrado de 10 km (citas localizadas dentro de un cuadrado de 1 km. de lado -cuatro cifras U.T.M.-).

### 3.2. ANALISIS MORFOLOGICO.

El estudio de los pliegos se realizó revisando (o, en su caso, determinando) el material según los criterios taxonómicos del monografista (Browicz, 1963). Cuando algún pliego estaba determinado según Bolòs & Vigo (1974), esto es, como *C.*

*arborescens* subsp. *atlantica*, se mantuvo esta determinación con objeto de comparar el criterio de estos autores con el de Browicz.

Sobre los testimonios de herbario se tomaron, además de los caracteres indicados por Browicz (1963) y los más usualmente empleados en las claves de determinación de uso más generalizado, otros morfométricos, principalmente referidos a las distintas piezas florales. Estos últimos fueron obtenidos mediante el uso de un equipo informático dotado de tableta digitalizadora y el programa analizador de imágenes manual VIDS III.

### 3.2.1. CARACTERES EMPLEADOS.

#### 3.2.1.1. General.

La terminología botánica empleada en la descripción de los caracteres se refirió siempre a lo descrito en Moreno (1984). La aparición de una barra "/" entre dos formas dentro de la definición de un estado se refirió a la presencia simultánea de ambas formas en el pliego.

Para el análisis morfológico del indumento soportado por las diferentes estructuras y órganos estudiados (caracteres **TAL#3**, **EST#5**, **AMB#5**, **FOL#9**, **BRA#5** y **FLO#4**) se consideraron los siguientes aspectos:

Color: blanco (a), pardo (b) o negro(c).

Aspecto: suaves y rectos (d) o de aspecto recio y anguloso.

Tamaño: <<0,5 (e), <0,5 (f) o 0,5 (g) (en mm).

Disposición: adpresa (h), subadpresa (i) o subpatente (j).

Distribución: uniforme (k), densa (l) o escasa (m); en el margen (n), en el margen apical (o) (sólo para **EST#5** y **BRA#5**); predominantemente en el nervio central (p) (sólo para **FOL#9**) y más abundante en la sutura (q) (sólo para **FRU#5**).

En el análisis univariante, la definición de los caracteres de indumento incluyó sólo aquellos aspectos que presentaron variación y se indicó la alternativa en caso de código negativo. Para el análisis multivariante, estos caracteres fueron reducidos al aspecto de distribución, codificándose como caracteres discretos multiestado (de 0= glabrescente a 2 ó 3= tomentoso dependiendo del carácter considerado: se consideró el estado 3 sólo en aquellos caracteres definidos en estructuras que podían presentar indumento sólo en el margen). Estos caracteres se denotaron mediante un símbolo ✕.

Los valores de los caracteres continuos fueron media aritmética de al menos tres medidas tomadas para cada carácter en cada pliego. Se prefirieron estos valores medios frente a medidas individuales debido a que aquellos reducen en gran medida los fuertes efectos ambientales tan característicos de los órganos vegetativos en leguminosas (Gil & Cubero, 1993).

### 3.2.1.2. Definición de los caracteres.

**TAL#1** (Patrón de descortezamiento): binario. Desgajamiento o no en finas tiras de la corteza en tallos de más de un año. Se asignó el código 1 al evento positivo.

**TAL#2** (Color del tallo): cualitativo multiestado. 0= verde, 1= pardo, 2= gris y 3= negro. Fue observado en tallos de más de un año.

**TAL#3** <sup>✕</sup>(Indumento del tallo): cualitativo multiestado (estados 0 a 2). Se observó en tallos de un año.

**EST#1** (Forma de las estípulas): cualitativo multiestado. Se codificó como 0= triangular, 1= triangular / lanceolada, 2= lanceolada, 3= ovada / lanceolada y 4= ovada.

**EST#2** (Color de las estípulas): cualitativo multiestado. 0= verde, 1= pardo, 2= negro.

**EST#3** (Longitud de las estípulas): continuo. Distancia máxima entre la base y el ápice. En mm

**EST#4** (Anchura de las estípulas): continuo. Anchura máxima. En mm

**EST#5** <sup>✕</sup>(Indumento de las estípulas): cualitativo multiestado. Color: blanco / negro; Disposición: adpresa / subadpresa. Estados 0 a 3.

**EST#6** (Coeficiente de forma de las estípulas): Cociente **EST#3 / EST#4**.

**AMB#1** (Ambito): cualitativo multiestado. Forma de la hoja. Se codificó como 0= elíptica, 1= lanceolada, 2= ovada / lanceolada y 4= ovada (Figura 3).

**AMB#2** (Longitud de la hoja): continuo. Distancia desde la base del peciolo al ápice del foliolo central. En mm (Figura 3).

**AMB#3** (Anchura de la hoja): continuo. Anchura máxima de la hoja. En mm (Figura 3).

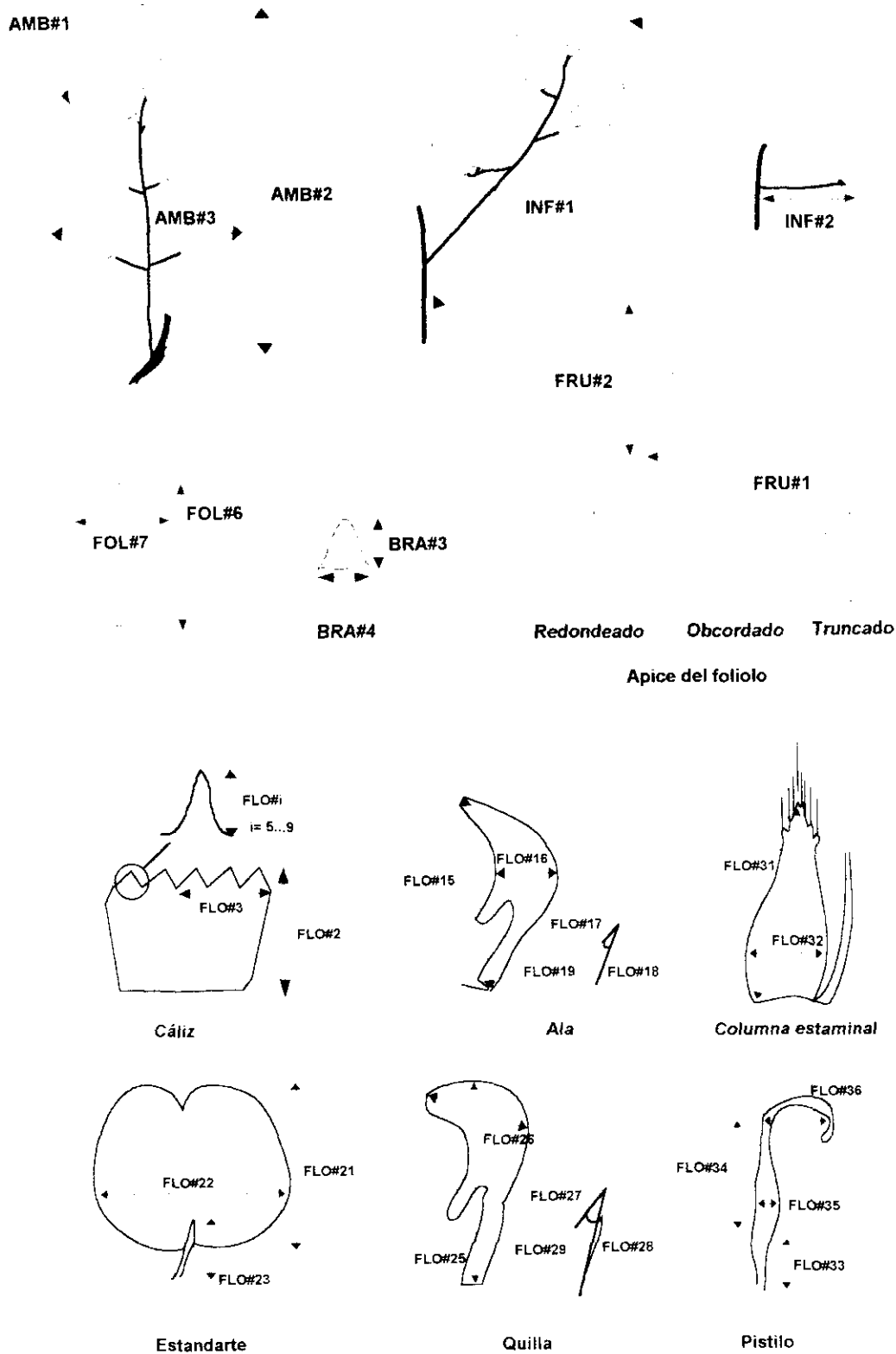
**AMB#4** (Coeficiente de forma de la hoja): Cociente **AMB#2 / AMB#3**.

**AMB#5** <sup>✕</sup>(Indumento del raquis): cualitativo multiestado. Estados 0 a 2.

**FOL#1** (Número de foliolos): continuo.

**FOL#2** (Forma de los foliolos): cualitativo multiestado. Se codificó como 0= elípticos, 1= elíptico / obovados, 2= circular / elípticos, 3= obovados y 4= circular / obovados.

- FOL#3** (Forma del ápice del foliolo central): cualitativo multiestado. Se codificó como 0= redondeado, 1= obcordado y 2= truncado. (Figura 3). Cuando se observó la presencia simultánea de ápices levemente obcordados y truncados o levemente obcordados y redondeados, se optó siempre por codificar la presencia de esta última forma (truncada o redondeada).
- FOL#4** (Longitud del foliolo terminal): continuo. En mm
- FOL#5** (Anchura del foliolo terminal): continuo. En mm
- FOL#6** (Longitud de los foliolos laterales): continuo. Longitud máxima de foliolos laterales en diferentes hojas. En mm (Figura 3).
- FOL#7** (Anchura de los foliolos laterales): continuo. Anchura máxima de foliolos laterales en diferentes hojas. En mm (Figura 3).
- FOL#8** (Mucrón): binario. Presencia o no de un pequeño mucrón en el ápice de los foliolos.
- FOL#9** <sup>\*</sup>(Indumento de los foliolos): cualitativo multiestado. Disposición: adpresa / subadpresa; Distribución: uniforme / margen. Estados 0 a 3.
- FOL#10** (Coeficiente de forma del foliolo terminal): Cociente **FOL#4 / FOL#5**.
- FOL#11** (Coeficiente de forma de los foliolos laterales): Cociente **FOL#6 / FOL#7**.
- BRA#1** (Forma de las brácteas): cualitativo multiestado. Se codificó como 0= ovadolanceolada, 1= lanceolada, 2= triangular y 3= ovada.
- BRA#2** (Margen de las brácteas): binario. Entero o no.
- BRA#3** (Longitud de las brácteas): continuo. Distancia máxima entre la base y el ápice. En mm (Figura 3).
- BRA#4** (Anchura de las brácteas): continuo. Anchura máxima. En mm (Figura 3).
- BRA#5** <sup>\*</sup>(Indumento de las brácteas): cualitativo multiestado. Estados 0 a 3.
- BRA#6** (Coeficiente de forma de las brácteas). Cociente **BRA#3 / BRA#4**.
- INF#1** (Longitud de la inflorescencia): continuo. Distancia entre su inserción con el tallo y el extremo distal. En mm
- INF#2** (Longitud del pedicelo floral): continuo. Distancia entre la base del cáliz y el punto de inserción en el raquis de la inflorescencia. En mm (Figura 3).
- FLO#1** (Número de flores): continuo.
- FLO#2** (Longitud del cáliz): continuo. Distancia entre la base y el ápice del diente mayor (si existe). En mm (Figura 3).
- FLO#3** (Anchura del cáliz): continuo. Anchura máxima. En mm (Figura 3).



**Figura 3.** Descripción gráfica de algunos de los caracteres morfológicos empleados. Escala libre.

**FLO#4** ✕ (Indumento del cáliz): binario. Color: pardo / negro; Disposición: adpresa / subadpresa; Distribución: uniforme / predominantemente en los dientes del cáliz. Estados 0 y 1.

**FLO#5 - FLO#9** (Longitud de cada diente del cáliz): continuos. En mm (Figura 3).

**FLO#10** (Longitud media de los dientes del cáliz): Cociente (**FLO#5 + FLO#6 + FLO#7 + FLO#8 + FLO#9**) / 5.

**FLO#11** (Coeficiente de forma del cáliz): Cociente **FLO#2 / FLO#3**.

**FLO#12** : Cociente **FLO#2 / FLO#10**.

**FLO#13** (Color de la flor): binario. A la vista del material disponible, se codificó como un carácter discreto cualitativo: perfectamente amarillo (1) o cualquier tono anaranjado o rojizo (0).

**FLO#14** (Indumento del ovario): carácter cualitativo multiestado. Se codificó como 0= indumento predominantemente en la sutura, 1= pubescente y 2= glabrescente.

**FLO#15** (Longitud del ala): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#16** (Anchura del ala): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#17** (Longitud del espolón del ala): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#18** (Distancia entre el inicio del espolón y la base del ala): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#19** (Angulo del espolón del ala): continuo. En grados sexagesimales (Figura 3).

**FLO#20**. Cociente **FLO#15 / FLO#16**.

**FLO#21** (Longitud del estandarte): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#22** (Anchura del estandarte): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#23** (Longitud de la uña del estandarte): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#24**. Cociente **FLO#22 / FLO#23**.

**FLO#25** (Longitud de la quilla): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#26** (Anchura de la quilla): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#27** (Longitud del espolón de la quilla): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#28** (Distancia entre el inicio del espolón y la base de la quilla): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#29** (Angulo del espolón de la quilla): continuo. En grados sexagesimales (Figura 3).

**FLO#30** (Coeficiente de forma de la quilla). Cociente **FLO#25 / FLO#26**.

**FLO#31** (Longitud de la columna estaminal): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#32** (Anchura de la columna estaminal): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#33** (Longitud del ginóforo): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#34** (Longitud del ovario): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#35** (Anchura del ovario): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#36** (Longitud del estilo): continuo. En mm (Figura 3).

**FLO#37**. Cociente **(FLO#33+FLO#34) / FLO#35**

**FRU#1** (Longitud del fruto): continuo. Distancia entre la base del cáliz y el ápice del fruto (se excluye el rostro si está). En mm (Figura 3).

**FRU#2** (Anchura del fruto): continuo. Anchura máxima. En mm (Figura 3).

**FRU3** (Rostro): binario. Persistencia o no del estilo en el fruto maduro.

**FRU#4** (Coeficiente de forma del fruto): Cociente **FRU#1 / FRU#2**.

**FRU#5** (Indumento del fruto). Color: blanco / negro; Disposición: adpresa / subadpresa.

### 3.2.2. ANALISIS NUMERICO.

#### 3.2.2.1. Análisis univariante.

Con los caracteres cualitativos se realizó un simple recuento de cada estado para cada taxón.

Se realizó para todos los caracteres continuos un Análisis Exploratorio de los Datos o AED (Tukey, 1977) que incluyó el cálculo de la media, error estándar, valor máximo y mínimo y una representación gráfica (*boxplot*) de la simetría, apuntamiento y dispersión de los datos para cada taxón considerado (*C. arborescens* subsp. *arborescens* no entró en estos análisis ya que sólo se dispuso de un pliego). Los *boxplots* incluyeron el valor mínimo, el máximo, el de la mediana y el espacio intercuartil. Empleamos el paquete estadístico SPSS/PC+ v. 4.0 (Norusis, 1986) para los cálculos estadísticos y el programa MicroCal Origin v. 2,94 (MicroCal, 1993) para la realización de los gráficos.



### 3.2.2.2. Análisis multivariante.

Con objeto de comprobar el carácter subigual de la longitud de los dientes del cáliz, mencionado por Willkomm & Lange (1870), Browicz (1963) y Hutchinson (1964) para el género *Colutea*, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) seguidos del test de Duncan donde procediese con los pliegos empleados en el análisis multivariante.

Cada pliego de herbario fue considerado como Unidad Taxonómica Operacional o UTO. Con objeto de no distorsionar el análisis por sobreabundancia de valores perdidos, sólo se incluyeron aquellos pliegos que contaban con valores para todos los caracteres empleados. Aún así, ninguno de los caracteres continuos referidos al fruto se pudo emplear ante el bajo número de valores registrados. La lista de pliegos empleados finalmente es:

#### *Colutea arborescens* subsp. *gallica*

(1) Requena, Valencia (VAB886083), (2) Titaguas, Valencia (VAB800448), (3) Villafamés, Castellón (VAB820812), (4) Benialí, Alicante (VAB852563), (5) Benicassim, Castellón (VAB841802), (6) Gilet, Valencia (VAB900806), (7) Ontígola, Toledo (BC807720), (8) Ubeda, Jaén (SALA27001), (9) Peñalver, Guadalajara (SALA11650), (10) Lumbier, Navarra (JACA394486), (11) Puente la Reina de Jaca, Huesca (JACA149969), (12) Aledo, Murcia (SEV93514), (13) Rute, Córdoba (SEV85683), (14) Los Llanos, Córdoba (SEV129224), (15) Algodonales, Cádiz (SEV61915), (16) Rigoréixer, Barcelona (BCC s.n.) (17) Valfogona de Riucorb, Barcelona (BC125456), (18) Montsec d'Ares, Barcelona (BC656217), (19) Maresme, Barcelona (BC653879), (20) Gallimpezo, Navarra (JACA41588).

#### *C. arborescens* subsp. *arborescens*

(21) Sierra de Espuña, Murcia (SALA26961).

#### *C. arborescens* subsp. *atlantica*

(22) Serra, Valencia (VAB891932), (23) Cocentaina, Alicante (VAB872284), (24) Sepúlveda, Segovia (SALA40965), (25) Mora de Rubielos, Teruel (JACA83790).

#### *C. atlantica*

(26) Chera, Valencia (VAB880696), (27) Chodes, Zaragoza (JACA542588), (28) Villar del Olmo, Madrid (JACA180668), (29) Serra, Valencia (JACA122289), (30) Forniche Alto, Teruel (JACA2590), (31) Río Santa María, Córdoba (COFC20529), (32) Mojonera, Córdoba (COFC20526), (33) S<sup>a</sup> Elvira, Granada (GDA1744), (34) S<sup>a</sup> Huétor, Granada (GDA9338).

Se construyó una matriz de datos con los valores obtenidos de la que fueron excluidos los correspondientes a los caracteres binarios y se estandarizó (a cada valor se le restó la media y se le dividió por la desviación *standard* del carácter al que

pertenecía). A partir de esta matriz se realizó el análisis de ordenamiento por componentes principales o PCA (Sneath & Sokal, 1973), considerándose aquellos componentes principales que expresaron el 75,00 % de la varianza total.

Para la realización del análisis de agrupamiento de las muestras se escogieron los caracteres que resultaron discriminantes según el PCA (aquellos con una contribución  $\geq 0,500$  en los tres primeros componentes principales) y se calculó la matriz de coeficientes de correlación de Pearson entre ellos, tras lo que se escogieron aquellos caracteres no altamente correlacionados ( $< 0,900$ ). Para este análisis fueron empleados los índices de similitud Distancia Taxonómica Media ( $d_{ij}$ ) y Distancia Media Manhattan ( $M_{ij}$ , *city block*), definidos como:

$$d_{ij} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_k (x_{ki} - x_{kj})^2}$$

$$M_{ij} = \frac{1}{n} \sum_k |x_{ki} - x_{kj}|$$

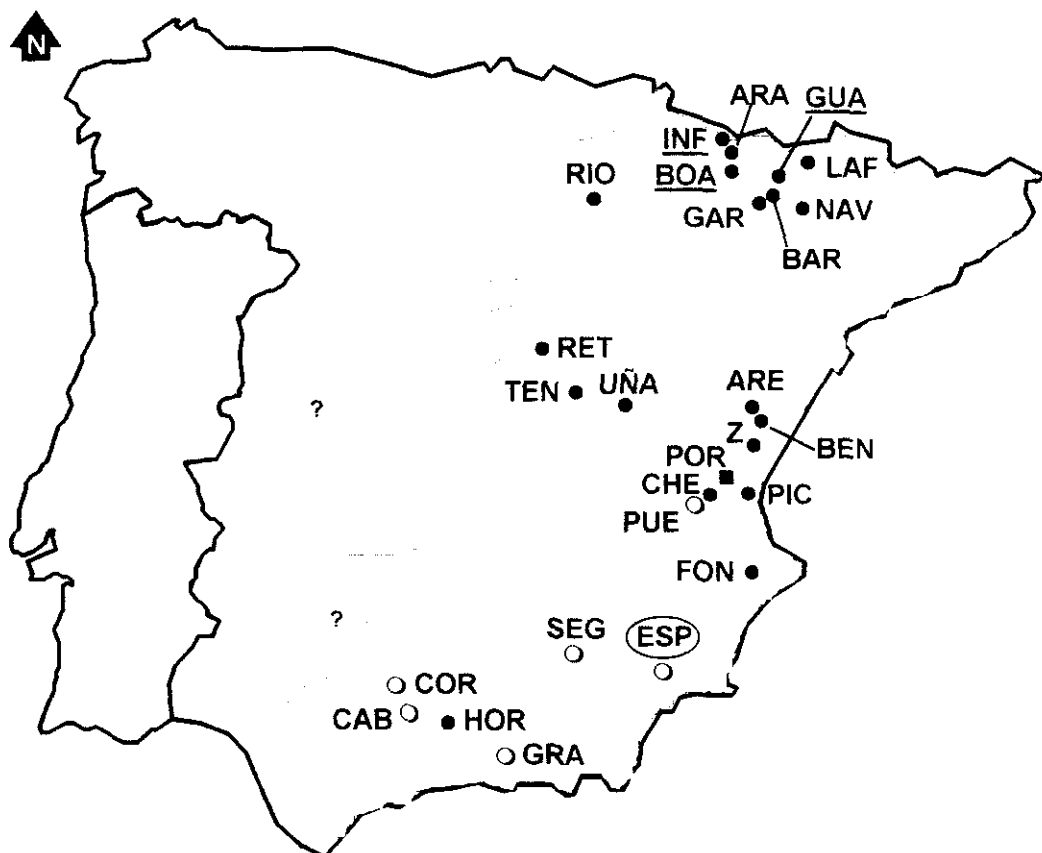
para construir las respectivas matrices simétricas de similitud. Cada una de éstas fue sometida al procedimiento *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages* (UPGMA), obteniéndose de esta manera los dendrogramas correspondientes. La bondad de ajuste entre los valores de distancia originales y las resultantes del UPGMA se realizó mediante el cálculo del coeficiente de correlación cofenética  $r$  (Rohlf & Sokal, 1981).

Todos los cálculos y rutinas matemáticas empleadas en estos análisis se realizaron con el paquete de análisis multivariante NTSYS-pc (Rohlf, 1990) en un ordenador personal.

### 3.3. ANALISIS DE ISOENZIMAS.

#### 3.3.1. MATERIAL VEGETAL.

Durante el periodo de fructificación, de julio a septiembre de 1992, se realizó una serie de viajes de recolección de semillas. Se proyectó intentando abarcar una diversidad geográfica suficiente, de acuerdo con la información corológica por entonces disponible. En la Figura 4 y en la Tabla 3 se muestra la identificación y localización de las poblaciones de las que se obtuvo el material empleado en los análisis de isoenzimas y RAPDs <sup>4</sup>. Se recolectaron frutos maduros de todos los individuos localizados en cada población. En el laboratorio se extrajeron las semillas de las legumbres, separándose las semillas pertenecientes a cada planta. Se conservaron en cámara fría (4 °C) hasta el momento de su uso.



**Figura 4.** Localización geográfica de las poblaciones de *Colutea* empleadas en el estudio de isoenzimas y RAPDs. ESP sólo en isoenzimas y BOA, INF y GUA sólo en RAPDs. □ : área de distribución del género *Colutea* en la Península Ibérica (basada en el apartado 4.1. de la presente memoria).

●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

<sup>4</sup> Las semillas de RIO me fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Cabello y las de ESP, GRA y SEG por D. José Luis Ceresuela.

**Tabla 3.** Identificación y localización de las poblaciones de *Colutea* empleadas en el análisis de isoenzimas.● = *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■ = *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○ = *C. atlantica*.

Nº	TAXON	MUESTRA	LOCALIDAD	PROVINCIA	U.T.M.
1	●	TEN	Tendilla	Guadalajara	30TWK0590
2	●	RET	Retiendas	Guadalajara	30TVL7434
3	●	RIO	Valvanera	Logroño	30TWM1075
4	●	UÑA	Uña	Cuenca	30TWK8653
5	●	ARA	Aragüés del Puerto	Huesca	30TXN8727
6	●	GAR	Bco. de las Gargantas	Huesca	31TBG5775
7	●	NAV	Pº de los Pinos	Huesca	31TBG6779
8	●	LAF	Lafortunada	Huesca	31TBH7219
9	●	BAR	Colungo	Huesca	31TBG5676
10	●	FON	Font Rotja	Alicante	30SYH1482
11	■	POR	Portacoeli	Valencia	30SYJ1693
12	●	CHE	Chera	Valencia	30SXJ7383
13	○	PUE	Fte. de la Puerca	Valencia	30SXJ7682
14	●	PIC	Mte. Picayo	Valencia	30SYJ3593
15	●	ARE	Coll d'Ares	Castellón	30TYK4379
16	●	BEN	Benassal	Castellón	30TYK4475
17	●	Z	Fanzara	Castellón	30TYK2831
18	○	SEG	Casicas de Río Segura	Jaén	30SWH0833
19	○	CAB	Cª Priego-Cabra	Córdoba	30SUG8245
20	●	HOR	Sª Horconera	Córdoba	30SUG8739
21	○	COR	Espejo	Córdoba	30SUG5767
22	○	GRA	Torvizcón	Granada	30SVF4736
23	○	ESP	Sª Espuña	Murcia	30SXG3-8-

### 3.3.2. EXTRACCION DE PROTEINA BRUTA.

Con objeto de asegurar la representatividad de las muestras, para cada población se pesaron cantidades equivalentes de semilla de cada individuo, se mezclaron en un recipiente y de aquí se obtuvo la muestra que después se empleó para hacer los extractos proteicos.

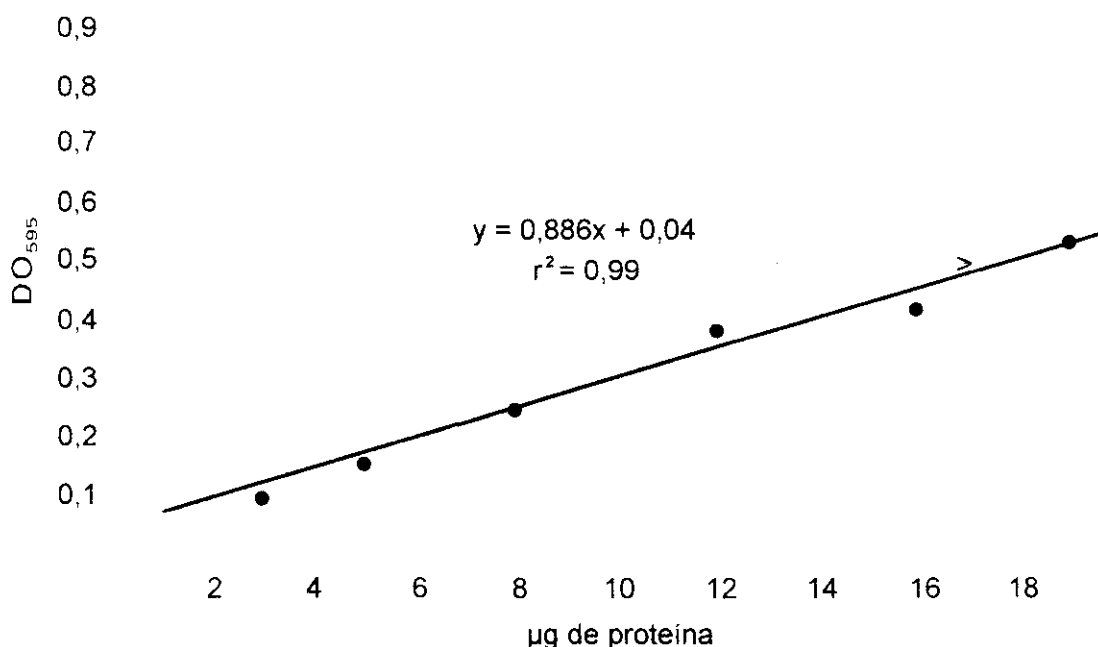
Los extractos se realizaron homogeneizando las semillas en tampón de extracción Tris-fosfórico 260 mM pH 6,9 (1:10, p/v) y una punta de espátula de PVPP por ml de tampón en morteros previamente enfriados (8-12 horas a -20 °C). Los homogeneizados se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 30' a 4 °C de temperatura en una centrífuga Hermle Z 320 K. Se descartó el precipitado y el sobrenadante fue sometido a un segundo paso de centrifugación en las mismas condiciones. Se tomaron alícuotas de 750 µl del sobrenadante y se mezclaron con un volumen igual de agua destilada fría (4 °C). Para evitar pérdidas en la actividad enzimática de los extractos, el análisis electroforético de los distintos sistemas isoenzimáticos se realizó inmediatamente después del procesado de las muestras siempre que ésto fue posible. En caso contrario, los extractos proteicos se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

### 3.3.3. CUANTIFICACION.

Para la estimación de la concentración de proteína total extraída, se siguió el método de Bradford (1976) basado en el uso del reactivo BIO-RAD Protein Assay (suministrado por Bio-Rad, Munich) mediante el protocolo de microensayo:

20  $\mu$ l muestra  
780  $\mu$ l H<sub>2</sub>O destilada  
200  $\mu$ l BIO-RAD

Las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro Beckman 24 ajustado a  $\lambda = 595$  nm entre 5' y 60' después de haber aplicado BIO-RAD. La concentración de proteína bruta, medida como  $\mu$ g/ $\mu$ l de extracto, se extrapoló mediante una recta obtenida con BSA como patrón:



**Figura 4.** Recta - patrón de concentración de proteína. DO<sub>595</sub>: densidad óptica a 595 nm

### 3.3.4. ELECTROFORESIS.

La separación electroforética se realizó en geles verticales de poliacrilamida (PAGE) en un sistema discontinuo no disociante según el método de Conejero & Semancik (1977) modificado por Sánchez-Yélamo (1990). Los geles empleados fueron de 1 mm de grosor y tres capas (Tabla 5), con capacidad para 10 muestras.

Se partió de una solución stock de acrilamida al 30% (30 g Acrilamida + 0,8 g Bisacrilamida + H<sub>2</sub>O). En todos los casos, antes de añadir TEMED a la mezcla, ésta se desgasificó durante 10'.

**Tabla 5.** Composición de las capas del gel empleado en las electroforesis (en  $\mu\text{l}$ ). Altura de capa en mm

	Capa superior (gel concentrador)	Capa media (gel separador)	Capa inferior (gel de resolución)
Acrilamida-Bisacrilamida	665	1.440	6.670
TRIS 0,5 M pH 8,0	1.250	-	-
TRIS 1,5 M pH 8,8	-	1.700	3.600
H <sub>2</sub> O	3.085	3.670	9.600
Persulfato amónico (10%)	30	31,5	122
TEMED	5	5	10
% Final acrilamida	4	6,3	10
Altura de capa	32	18	100

La electroforesis se realizó en cubetas SE 600 (suministrado por Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco) refrigeradas por un circuito abierto de agua. Los geles se sometieron a una intensidad constante de 20 mA (2 mA/muestra) y voltaje libre en tampón de electrodos 0,025 M Tris - 0,192 M Gly pH 8,3 - 8,4 en todos los casos. Se controló la marcha de la electroforesis registrando el incremento del voltaje respecto al tiempo.

Dependiendo del sistema isoenzimático a visualizar, se aplicaron distintos volúmenes de muestra de acuerdo con los valores obtenidos en la cuantificación de proteína total extraída. Así, por muestra, se aplicó un volumen equivalente a 100  $\mu\text{g}$  de proteína para las hidrolasas y 200  $\mu\text{g}$  para GOT (transferasa) y las oxidorreductasas (excepto para SKD y ME, 150  $\mu\text{g}$ ).

Como marcador del frente electroforético se añadieron ca. 0,2  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol al 0,005 % en todas las muestras.

### 3.3.5. VISUALIZACION.

A continuación se describe para cada sistema isoenzimático estudiado el nombre sistemático con indicación del número *Enzyme Code* (E.C.) y la reacción catalizada, según el comité de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímicos (International Union of Biochemistry Committee, 1984). También se indica el tipo de tinción empleado y la composición de la mezcla de tinción con su referencia. Se especifican las temperaturas y tiempos de incubación para cada sistema isoenzimático estudiado.

### 3.3.5.1. Oxidorreductasas

#### 3.3.5.1.1 Alcohol deshidrogenasa (ADH).

Nombre Sistemático: Alcohol:NAD<sup>+</sup> oxidorreductasa (E.C. 1.1.1.1).

Reacción: Alcohol + NAD<sup>+</sup> → Aldehído ó cetona + NADH

Tinción: sistema tetrazolio (Tanksley, 1979):

Tris	100 mM	pH 7,5
Etanol (96%)	6%	
NAD <sup>+</sup>	0,45 mM	
MTT	0,48 mM	
PMS	0,13 mM	

El gel se incubó a 35 °C en oscuridad durante 90' - 120'.

#### 3.3.5.1.2. Shikimato deshidrogenasa (SKD).

Nombre Sistemático : Shikimato:NADP<sup>+</sup> oxidorreductasa (E.C. 1.1.1.25)

Reacción: Shikimato + NADP<sup>+</sup> → 3-Dehydroshikimato + NADPH

Tinción: sistema tetrazolio (Tanksley & Rick, 1980):

Tris	100 mM	pH 7,5
Acido shikímico	6 mM	
NADP <sup>+</sup>	0,23 mM	
MTT	0,48 mM	
PMS	0,13 mM	

El gel se incubó a 30 °C en oscuridad durante 45'-60'.

Aunque este enzima tiene un pH óptimo de 9,1 (Lourenco & Neves, 1984) la mejor resolución se consiguió ajustando la solución de tinción a pH 8,0. Así se evitó la intensa tinción de fondo que se observa al pH óptimo.

#### 3.3.5.1.3 Enzima málico (ME).

Nombre Sistemático: L-malato:NAD<sup>+</sup> oxidorreductasa (oxaloacetato-descarboxilante) (E.C. 1.1.1.38)

Reacción: L-malato + NAD<sup>+</sup> → piruvato + CO<sub>2</sub> + NADH

Tinción: sistema tetrazolio (Murphy *et al.*, 1990):

Tris	100 mM	pH 8,0
Acido L-málico	37 mM	
NBT	0,25 mM	
NADP <sup>+</sup>	0,15 mM	
PMS	0,16 mM	
MgCl <sub>2</sub>	0,1 mM	

El gel se incubó a 37 °C en oscuridad durante 90' - 120'.

**3.3.5.1.4. 6-P-gluconato deshidrogenasa (PGD).**

Nombre Sistemático : 6-fosfo-D-gluconato:NADP<sup>+</sup> 2-oxidorreductasa (descarboxilante) (E.C. 1.1.1.44)

Reacción : 6-fosfo-D-gluconato + NADP<sup>+</sup> → D-ribulosa-5-fosfato + CO<sub>2</sub> + NADPH

Tinción : sistema tetrazolio (Vallejos, 1983):

Tris 100 mM pH 7,5	
Acido 6-fosfogluconico	0,42 mM
MgCl <sub>2</sub>	10,31mM
NADP <sup>+</sup>	0,23 mM
MTT	0,48 mM
PMS	0,13 mM

El gel se incubó a 30 °C en oscuridad durante 45'.

**3.3.5.1.5. Glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH).**

Nombre Sistemático: D-glucosa-6-fosfato : NADP<sup>+</sup> 1-oxidorreductasa (E.C. 1.1.1.49)

Reacción: D-glucosa-6-fosfato + NADP<sup>+</sup> → D-glucono-δ-lactona-6-fosfato + NADPH

Tinción: sistema tetrazolio (Brewer & Sing, 1970):

Tris 0.05 M pH 7,1	
Glucosa-6-fosfato	0,33 mM
MgCl <sub>2</sub>	48 mM
PMS	0,07 mM
NBT	0,24 mM
NADP <sup>+</sup>	0,03 mM

El gel se incubó a 37 °C en oscuridad durante 45'-60'.

**3.3.5.1.6. Glutamato deshidrogenasa (GDH).**

Nombre Sistemático: L-glutamato:NAD<sup>+</sup> oxidorreductasa (desaminante) (E.C.1.4.1.2)

Reacción: L-glutamato + H<sub>2</sub>O + NAD<sup>+</sup> → 2-oxoglutarato + NH<sub>3</sub> + NADH

Tinción: sistema tetrazolio (Fransz *et al.*, 1989):

Tris 100 mM pH 7,5	
Acido L-glutámico	54 mM
NAD <sup>+</sup>	0,45 mM
NBT	0,25 mM
PMS	0,13 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,02 mM

El gel se incubó a 30 °C durante 60' - 120' en oscuridad.



**3.3.5.1.7. Superóxido dismutasa (SOD).**

Nombre Sistemático : superóxido:superóxido oxidoreductasa (E.C. 1.15.1.1)

Reacción:  $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$

Tinción : sistema tetrazolio, tinción negativa (Wendel & Weeden, 1990a):

Tris 50 mM pH 8,0  
 Riboflavina 0,1 mM  
 EDTA 5 mM  
 NBT 0,25 mM

El gel se incubó a 30 °C en oscuridad durante 45', exponiéndose posteriormente a un foco de luz intensa. La actividad enzimática se detecta en forma de bandas acromáticas sobre un fondo azul oscuro uniforme.

**3.3.5.2. Transferasas.****3.3.5.2.1. Glutamato oxalacetato transaminasa (Aspartato amino transferasa) (GOT).**

Nombre Sistemático : L-aspartato:2-oxoglutarato aminotransferasa (E.C. 2.6.1.1)

Reacción: L-aspartato + 2-oxoglutarato  $\longrightarrow$  Oxalacetato + L-glutamato

Tinción : sistema diazonio (Sánchez-Yélamo, 1990):

Tris 50 mM pH 9,0  
 Acido D,L-aspártico 80 mM  
 Acido  $\alpha$ -cetoglutárico 7,3 mM  
 Fast Blue BB salt 1,5 mM  
 Piridoxal 5-fosfato 2 mM

El gel se incubó a 35 °C en oscuridad durante 60'-90'.

**3.3.5.3. Hidrolasas.****3.3.5.3.1. Fosfatasas ácidas (AP).**

Nombre Sistemático: ortofosforil-monoéster fosfohidrolasa (E.C. 3.1.3.2)

Reacción: Ortofosfomonoéster + H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  Alcohol + Ortofosfato

Tinción: sistema diazonio (Schwennensen *et al.*, 1982):

Acetato sódico 100 mM pH 4.0  
 Fast Garnet GBC salt 3 mM  
 MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM  
 $\alpha$ -naftil-ácido-fosfato 4 mM

El gel se incubó a 35 °C en oscuridad durante 120'-150'.

### 3.3.5.3.2. Esterasas (EST).

Nombre Sistemático: éster hidrolasas (E.C. 3.1.1.6)

Reacción: hidrólisis inespecífica de enlaces tipo éster.

Tinción: sistema diazonio (Brewer & Sing, 1970):

Tris-fosfórico 260 mM pH 6,9

Fast Blue RR salt 1,8 mM

$\alpha$ -naftil acetato 54 mM

El substrato se disolvió en 8 ml de acetona 50%.

### 3.3.5.4. Conservación y obtención de zimogramas.

Una vez finalizado el periodo de tinción específica para cada sistema, el proceso se detuvo mediante varios lavados con agua. Los geles se limpiaron de los depósitos ocasionados por la actividad enzimática y se fotografiaron sobre un transiluminador con película estándar de diapositiva para luz artificial.

Para la preservación de los geles ya teñidos, éstos se fijaron en una mezcla de metanol / agua en proporciones variables para ser posteriormente montados y secados entre dos láminas de celofán.

Para cada gel se realizó un esquema con el programa Harvard Graphics versión 3.0 (Software Publishing Corporation, 1991) en el que se diferenciaron tres tipos de bandas dependiendo de la intensidad de tinción mostrada en el gel:

las bandas con una intensidad de tinción más generalizada ("normales") se trazaron como una línea continua y respecto a éstas se diferenciaron las que se tiñeron en mayor grado mediante un trazo grueso ("intensas") y las que presentaron una tinción más débil por una línea de puntos ("tenues").

La separación electroforética y las diferentes tinciones específicas se repitieron al menos tres veces en todos los casos.

### 3.3.6. ANALISIS MULTIVARIANTE.

Sobre los geles teñidos se obtuvo la posición relativa o  $R_p$  de cada isoforma visualizada dividiendo la distancia recorrida por la distancia alcanzada por el marcador de frente. Se consideró que una determinada isoforma se encontraba en dos poblaciones si los respectivos  $R_p$  eran iguales (tolerancia de  $\pm 0,5\%$ ). Para el análisis numérico los datos se registraron en una matriz donde la presencia de una determinada banda de actividad se denotó con un "1" y su ausencia, con un "0".

Para cuantificar el nivel detectado de polimorfismo se aplicaron el coeficiente de similitud de Jaccard **J** (Jaccard, 1908) y el coeficiente **R** (Rogers, 1972), obteniéndose las correspondientes matrices simétricas de similitud. Los coeficientes se definen:

$J = a / (n - d)$ , donde **a** es el número de bandas comunes a dos muestras, **n** el número de casos posibles y **d** el número de ausencias mutuas.

$R = n_{AB} / N$ , donde  $n_{AB}$  es el número de bandas diferentes entre las muestras A y B y **N** el número total de bandas consideradas en el estudio.

Las matrices de distancia obtenidas con estos coeficientes se utilizaron, considerando como UTOs las poblaciones, para:

1º) la realización de un análisis de coordenadas principales (PCO) para el conjunto de poblaciones estudiadas (Gower, 1966).

2º) la estimación de las relaciones de afinidad intraespecíficas entre poblaciones con procedencias geográficas comunes tal y como se definieron en la Tabla 6 mediante el cálculo de los valores medios de similitud conjuntos y mediante MDS (Kruskal, 1964). La bondad de ajuste de los ordenamientos producidos por este método se estimó mediante el cálculo del *stress* final obtenido (Kruskal, 1964).

**Tabla 6.** Grupos de poblaciones definidos por taxón y procedencia geográfica en el análisis multivariante de RAPD.

TAXON	ORIGEN	POBLACIONES
<i>C. arborescens</i>		
" subsp. <i>gallica</i>	centro	TEN, RET, UÑA
	norte	ARA, GAR, NAV, LAF, BAR
	levante	FON, CHE, PIC, ARE, BEN, Z
	sur	HOR
" subsp. <i>atlantica</i>	levante	POR
<i>C. atlantica</i>	sur	SEG, CAB, COR

3º) la construcción de los dendrogramas correspondientes al análisis de agrupamiento efectuado mediante UPGMA. La bondad del agrupamiento se comprobó mediante el cálculo de la correlación cofenética **r** (Rohlf & Sokal, 1981).

Todos los análisis se realizaron con paquete de análisis multivariante NTSYS-pc v 1,60 (Rohlf, 1990) excepto el cálculo de las distancias **R**, que se realizó con la hoja de cálculo Excel v. 3.0 (Microsoft, 1985-1991).

### 3.4. PCR-RAPDs.

#### 3.4.1. OBTENCION DE MATERIAL VEGETAL.

Se pusieron a germinar cuatro semillas por individuo y población (Figura 4, Tabla 7) sobre una doble capa de papel de filtro en placa de Petri. El papel se embebió en 2 ml de agua destilada. Las placas se cubrieron con papel de aluminio para conseguir la total ausencia de luz y se introdujeron en una cámara a 25°C constantes. El papel de filtro se mantuvo permanentemente húmedo mediante la adición diaria de 1 ml de agua destilada. Se consideró que la germinación había tenido lugar cuando la semilla emitía la radícula y ésta alcanzaba un tamaño igual o superior a 4 mm

**Tabla 7.** Identificación y localización de las poblaciones de *Colutea* empleadas en RAPD. ● = *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■ = *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○ = *C. atlantica*.

Nº	TAXON	MUESTRA	LOCALIDAD	PROVINCIA	U.T.M.
1	●	TEN	Tendilla	Guadalajara	30TWK0590
2	●	RET	Retiendas	Guadalajara	30TVL7434
3	●	RIO	Valvanera	Logroño	30TWM1075
4	●	UÑA	Uña	Cuenca	30TWK8653
5	●	GUA	Guaso	Huesca	31TBH6001
6	●	BOA	Boalar de Jaca	Huesca	30TXN9413
7	●	INF	Hecho	Huesca	30TXN8641
8	●	ARA	Aragüés del Puerto	Huesca	30TXN8727
9	●	GAR	Bco. de las Gargantas	Huesca	31TBG5775
10	●	NAV	Pº de los Pinos	Huesca	31TBG6779
11	●	LAF	Lafortunada	Huesca	31TBH7219
12	●	BAR	Colungo	Huesca	31TBG5676
13	●	FON	Font Rotja	Alicante	30SYH1482
14	■	POR	Portacoeli	Valencia	30SYJ1693
15	●	CHE	Chera	Valencia	30SXJ7383
16	○	PUE	Fte. de la Puerca	Valencia	30SXJ7682
17	●	PIC	Mte. Picayo	Valencia	30SYJ3593
18	●	ARE	Coll d'Ares	Castellón	30TYK4379
19	●	BEN	Benassal	Castellón	30TYK4475
20	●	Z	Fanzara	Castellón	30TYK2831
21	○	SEG	Casicas de Río Segura	Jaén	30SWH0833
22	○	CAB	Cª Priego-Cabra	Córdoba	30SUG8245
23	●	HOR	Sª Horconera	Córdoba	30SUG8739
24	○	COR	Espejo	Córdoba	30SUG5767
25	○	GRA	Torvizcón	Granada	30SVF4736

Cada semilla germinada se dispuso en un contenedor cónico de plástico (35 x 220 mm) relleno con un substrato formado por vermiculita, tierra y una mezcla comercial de pH neutro compuesta por diferentes tipos de turba (1:1:1). Se mantuvieron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo 18 h luz : 6 h oscuridad a 25 °C constantes. Una vez aparecida la primera hoja postcotiledonar, las plántulas se expusieron a temperatura ambiente e iluminación natural. Se dejaron crecer en estas

condiciones durante dos o tres semanas, hasta que todas las plántulas alcanzaron un tamaño similar.

### 3.4.2. EXTRACCION DE ADN.

Se extrajo el ADN genómico modificando el protocolo de Torres *et al.* (1993):

1.- Se cortaron 3-5 folíolos de mediano tamaño (0,35 - 0,40 g) y se sumergieron en nitrógeno líquido (NL) dentro de un tubo Eppendorf. Cuando el NL se evaporó, los folíolos se trituraron hasta su completa pulverización.

2.- Se añadió 1 ml de tampón de extracción y se agitó vigorosamente. La composición del tampón fue:

- tampón CTAB 2x
- Bisulfito de sodio (3,8 g/l)
- $\beta$ -mercaptoetanol (0,4%)
- PVP (1-2%)

Se preparó justo antes de usar.

Composición del tampón CTAB 2x :

- 100 mM Tris-HCL pH 8,0
- 1,4 M NaCl
- 20 mM EDTA
- 2% bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, p/v)

3.- Una vez formado el extracto, se vertió a un Eppendorf. Se añadieron 100  $\mu$ l de cloroformo/octanol (24:1) y se calentó al baño María a 60 °C durante 30'.

4.- Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió cloroformo/octanol hasta llenar el Eppendorf. Se agitó vigorosamente hasta formar una emulsión.

5.- Se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 15'. Se transfirió la fase acuosa superior a un Eppendorf. Se añadió cloroformo/octanol y se centrifugó en las mismas condiciones. Se recogió de nuevo la fase superior acuosa.

6.- Se precipitó el ADN añadiendo 0,8-1,0 ml (hasta llenar el Eppendorf) de etanol al 100% helado. Se dejó reposar de 10' a 20' minutos a temperatura ambiente.

7.- Se mantuvo en el congelador a -20 °C durante 60'-90'.

8.- Se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 15' y se eliminó el sobrenadante.

9.- Se añadió 1 ml de acetato sódico 0,2 M en etanol al 76% y se dejó reposar durante 10'.

10.- Se centrifugó 5' a 15.000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante.

11.- Se añadió 1 ml de acetato sódico 0,01M en etanol al 76%, dejándose reposar 10'. Se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 5', se eliminó el sobrenadante y se secó el Eppendorf.

12.- Se disolvió el precipitado en 150  $\mu$ l de tampón TE estéril.

Composición del tampón TE :

- Tris-HCl 10 mM pH 8,0
- EDTA 1 mM

13.- Se añadió 1  $\mu$ l de RNAsa A (10 mg/ml) y se dejó reposar 1 h .

14.- Las muestras de ADN así obtenidas se conservaron a una temperatura por debajo de 4 °C.

Con objeto de eliminar posibles contaminantes del ADN en el extracto crudo, se procedió a fenolizar las muestras siguiendo el método de Maniatis *et al.* (1989) :

1.- Se añadieron en un tubo Eppendorf volúmenes equivalentes de fenol y de muestra (150  $\mu$ l).

2.- Se agitó a mano y se dejó reposar 5'.

3.- Se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 10'.

4.- Se transfirió la fase acuosa superior a un Eppendorf y se repitieron los pasos anteriores hasta obtener un extracto limpio.

5.- Se añadieron a la fase acuosa superior 15  $\mu$ l de acetato sódico 3M pH 5,6 y 300  $\mu$ l de etanol al 100% helado y se mantuvo a -20 °C durante 60'.

6.- Se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 15' y se decantó el sobrenadante.

7.- Se añadió 1 ml de etanol al 70% helado al precipitado.

8.- Se centrifugó 10' a 15.000 r.p.m. y se dejó secar el tubo a temperatura ambiente.

9.- Se resuspendió el ADN en 30  $\mu$ l de TE. Las muestras se conservaron a una temperatura inferior a -20°C.

Se midió la concentración del ADN así obtenido por fluorimetría mediante el uso de un mini-fluorímetro TKO 100 (suministrado por Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante.

### 3.4.3. AMPLIFICACION.

Con objeto de minimizar los errores volumétricos, se preparó una mezcla madre de volumen suficiente para las reacciones correspondientes a cada *primer*. Siempre que se empleó un nuevo *primer* se hizo un blanco negativo (todos los componentes de la reacción excepto la muestra de ADN). La composición de la mezcla de reacción para una muestra (25  $\mu$ l/reacción) fue la siguiente:

	VOLUMEN ( $\mu$ l)	CONCENTRACION FINAL
Agua destilada y esterilizada	13,60	
20x PCR <i>buffer</i>	2,50	
Mezcla dNTPs	1,25	200 nM c/u
<i>primer</i>	0,50	200 nM
ADN polimerasa	0,20	2.5 u./100 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2,00	2.0 M
Muestra ADN	5,00	2-3 ng/ $\mu$ l

Composición del PCR *buffer* :

200 mM TRIS-HCl (pH 8,3), 1.0 mM KCl, 0.10% Tween 20 y 0.10% NP-40.

Se emplearon los *primers* decámeros del *kit* O (suministrado por Operon Technologies, Alameda, USA):

Núm.	Secuencia 5'-3'	Núm.	Secuencia 5'-3'
01	GGCACGTAAG	11	GACAGGAGGT
02	ACGTAGCGTC	12	CAGTGCTGTG
03	CTGTTGCTAC	13	GTCAGAGTCC
04	AAGTCCGCTC	14	AGCATGGCTC
05	CCCAGTCACT	15	TGGCGTCCTT
06	CCACGGGAAG	16	TCGGCGGTTC
07	CAGCACTGAC	17	GGCTTATGCC
08	CCTCCAGTGT	18	CTCGCTATCC
09	TCCCACGCAA	19	GGTGACAGTT
10	TCAGAGCGCC	20	ACACACGCTG

Como ADN polimerasa se usó Replitherm® termoestable (suministrado por Epicentre Technologies, Madison, USA), un enzima derivado de una bacteria termofílica diferente de *Thermus aquaticus*. Al igual que la Taq polimerasa clásica, tiene una temperatura óptima de síntesis por encima de 65 °C.

Para evitar la evaporación de la mezcla de reacción, se añadieron 1-2 gotas de aceite mineral. La PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer 480 para 48 muestras. El perfil térmico programado fue el indicado por Martín & Pérez (1994):

- 1 ciclo            94°C 30"
- 35 ciclos        92°C 45"
- 32°C 60"
- 72°C 45"

Al final de los 35 ciclos de reacción, las muestras se mantuvieron a 4 °C dentro del termociclador hasta su almacenamiento o uso.

La repetibilidad de la técnica se comprobó llevando a cabo, al menos dos veces, las reacciones correspondientes a cuatro de los *primers* empleados. Se realizaron repeticiones adicionales sólo en el caso de que las amplificaciones obtenidas presentasen alteraciones (por ejemplo, ausencia de amplificación para alguna muestra).

Como aproximación a una estimación de la variabilidad intrapoblacional, se escogieron cuatro individuos (Kazan *et al.*, 1993) de cuatro poblaciones de *C. arborescens* subsp. *gallica* (RET, ARA, FON y BEN) y dos individuos de dos poblaciones de *C. atlantica* (COR y GRA) y los *primers* OP#5, OP#7 y OP#20.

#### 3.4.4. ELECTROFORESIS.

Las muestras se cargaron en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE (TRIS-acético 0,04 M, EDTA 0,001 M) de 8,5 cms. y 15 pocillos. En todos los geles y para cada *primer*, se cargaron además, 2 µl del marcador *100 base-pair ladder* (suministrado por Pharmacia) como escala estándar. Como marcador de frente se empleó una mezcla de azul de bromofenol, cianol de xileno FF y ficoll Tipo 400. Esta mezcla, además de colorear la mezcla de amplificación (lo que facilita separar la mezcla del aceite mineral) le confiere una mayor densidad, lo que asegura que el ADN entre en el pocillo (Maniatis *et al.*, 1989).

Las condiciones de electroforesis fueron 80 voltios constantes durante 150-180 minutos en tampón TAE.



### 3.4.5. VISUALIZACION.

Para visualizar los productos de amplificación, los geles se tiñeron en bromuro de etidio 0,5 µg/ml durante 45' (Maniatis *et al.*, 1989). Generalmente fue necesario un lavado en agua destilada durante 15' para eliminar el exceso de tinción.

Los geles se fotografiaron a la luz UV ( $\lambda = 300 \text{ nm}$ ) con una cámara Polaroid cargada con película instantánea blanco /negro tipo 667 de Polaroid.

Se realizó una representación gráfica o *bandmap* de los RAPDs ordenándolos, de forma decreciente, de acuerdo a sus frecuencias relativas. A su vez, las muestras se ordenan de acuerdo a los RAPDs en común que poseyeran (Powell *et al.*, 1991). También se realizaron los mapas de bandas parciales correspondientes a cada *primer*.

### 3.4.6. ANALISIS MULTIVARIANTE.

Los productos de amplificación se designaron de acuerdo al código alfanumérico de cada *primer* seguido del tamaño aproximado en pares de bases (bp). Para el análisis numérico los datos se registraron en una matriz de presencia (1) / ausencia (0) de un determinado producto de amplificación. Cuando la banda tuvo un carácter ambiguo, se designó con un código "9". Para cuantificar el nivel detectado de polimorfismo se aplicó el coeficiente de similitud de Jaccard **J** (Jaccard, 1908), el coeficiente **F** (Nei & Li, 1979) y el *Simple Matching coefficient* **SM** (Rohlf, 1990), obteniéndose las correspondientes matrices simétricas de similitud. Los coeficientes se definen:

**J** =  $a / (n - d)$ , donde **a** es el número de bandas comunes a dos muestras, **n** el número de casos posibles y **d** el número de ausencias mutuas.

**F** =  $2n_{ij} / (n_i + n_j)$ , donde  $n_{ij}$  es el número de bandas comunes a las muestras *i* y *j* mientras que  $n_i$  y  $n_j$  son los números de bandas en la población *i* y *j*, respectivamente.

**SM** =  $m / n$ , donde **m** es el número de coincidencias (positivas y negativas) entre dos muestras y **n** el número de casos posibles.

Las matrices de distancia obtenidas con estos coeficientes se utilizaron, considerando como UTOs las poblaciones, para:

1º) la realización de un análisis de ordenamiento por PCO (Gower, 1966) para el conjunto de poblaciones estudiadas.

2º) la estimación de las relaciones de afinidad intraespecíficas entre poblaciones con procedencias geográficas comunes tal y como se definieron en la Tabla 8 mediante el cálculo de los valores medios de similitud conjuntos y mediante MDS (Kruskal, 1964). La bondad de ajuste de los ordenamientos producidos por este método se estimó mediante el cálculo del *stress* final obtenido (Kruskal, 1964).

**Tabla 8.** Grupos de poblaciones definidos por taxón y procedencia geográfica en el análisis multivariante de RAPD.

TAXON	ORIGEN	POBLACIONES
<i>C. arborescens</i>		
" subsp. <i>gallica</i>	centro	TEN, RET, UÑA
	norte	GUA, BOA, INF, ARA, GAR, NAV, LAF, BAR
	levante	FON, CHE, PIC, ARE, BEN, Z
	sur	HOR
" subsp. <i>atlantica</i>	levante	POR
<i>C. atlantica</i>	sur	SEG, CAB, COR

3º) la construcción de los dendrogramas correspondientes al análisis de agrupamiento efectuado mediante el método UPGMA. La bondad del agrupamiento se comprobó mediante el cálculo de la correlación cofenética *r* (Rohlf & Sokal, 1981).

Excepto el cálculo de los valores correspondientes al coeficiente *F* que fue realizado mediante la hoja de cálculo Excel v. 3.0 (Microsoft, 1985-1991), todos los análisis fueron realizados con el paquete de análisis multivariante NTSYS-pc v 1,60 (Rohlf, 1990).

### 3.5. COMPARACION DE METODOS.

Con objeto de comparar la capacidad de discriminación y la topología de los ordenamientos y dendrogramas basados en los datos de naturaleza isoenzimática y los de tipo RAPD, se escogieron aquellas poblaciones comunes (22) al análisis de isoenzimas y de RAPDs. En isoenzimas, todas las poblaciones menos ESP (*C. atlantica*) y en RAPDs, todas menos GUA, BOA e INF (*C. arborescens* subsp. *gallica*). Se construyó una matriz de presencia (1) / ausencia (0) para cada tipo de datos. En ambas matrices se computaron los valores de similitud de Jaccard (*J*) para obtener las correspondientes matrices de distancia. Estas fueron la base del análisis multivariante por PCO y análisis de agrupamiento, previamente descrito en los apartados 3.3.6. y 3.4.6.

La correspondencia entre las matrices de distancia obtenidas con ambos métodos fue calculada usando el el procedimiento de comparación de matrices MXCOMP incluido en el paquete de taxonomía numérica NTSYS-pc (Rohlf, 1992). Se computó la correlación producto-momento de Pearson entre los elementos de ambas matrices (Smouse *et al.*, 1986).

Para identificar los sistemas isoenzimáticos y *primers* mas efectivos en el establecimiento de las relaciones de afinidad entre las poblaciones estudiadas, se llevó a cabo un PCA sobre las matrices de presencia (1) / ausencia (0) para los dos tipos de datos. Se empleó el paquete de análisis multivariante NTSYS-pc v. 1,60 (Rohlf, 1990) para la realización de estos análisis numéricos. Con este fin, se consideró como carácter cada banda resultante de la electroforesis de isoenzimas o RAPDs, se computaron las respectivas matrices simétricas de varianzas - covarianzas y se obtuvieron los autovalores y las contribuciones de cada carácter al primero de los componentes principales, considerándose un carácter como discriminante si su contribución a dicho componente era  $-0,10 \leq x \leq 0,10$  (Heun *et al.*, 1994). Se comparó el porcentaje de bandas discriminantes y el porcentaje de la varianza explicado por el primer componente principal para cada tipo de datos.

### **3.6. ANALISIS MULTIVARIANTE CONJUNTO.**

Con los caracteres moleculares (isoformas y RAPDs) de las 22 poblaciones comunes a ambas técnicas (isoenzimas y RAPD) se construyó una matriz conjunta de presencia (1) / ausencia (0) que sirvió para la realización del análisis de ordenamiento por coordenadas principales y del análisis de agrupamiento tal y como se han definido en el apartado anterior.

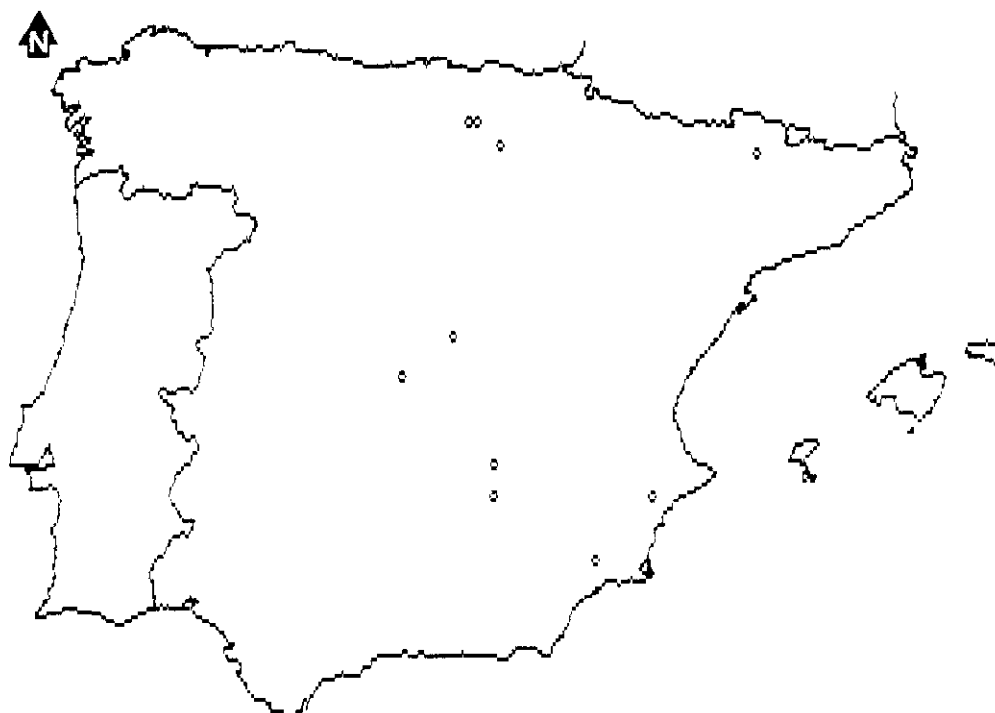
# ***RESULTADOS***

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. INFORMACION COROLOGICA.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la revisión bibliográfica y de la recopilación de las localidades nombradas en los pliegos de herbario.

#### ***Colutea arborescens* L. subsp. *arborescens***



**Figura 5.** Mapa de distribución según el retículo UTM de 10 x 10 km. Referencias corológicas de *C. arborescens* L. subsp. *arborescens*

**ALAVA:** 30TVN8834, Sobrón, 600 m (ASEGUINOLAZA ET AL., 1985). 30TVN9236, Peñas Rojas, S<sup>a</sup> Arcena, 800 m (IBIDEM). 30TWN2607, Baños de Ebro, 500 m (IBIDEM).

**ALICANTE:** 30SYH06, Maigmó (DE LA TORRE, 1989).

**ALBACETE:** 30SWJ1100, Cañada de las Hazadillas, 770-850 m, 1/5/1981, Velayos (MACB2289).

**CIUDAD REAL:** 30SWH1863, Albaladejo, 14/7/1978, Fuertes et al. (MA261097).

#### **GUADALAJARA:**

Sin asignar coordenada: Monte de la Alcarria, Aranzueque, 4/6/1972, Ron (MACB4700).

**LERIDA:** 31TCG39, La Mina, 1100 m, 9/8/1983, Pineda (BCC s.n.).

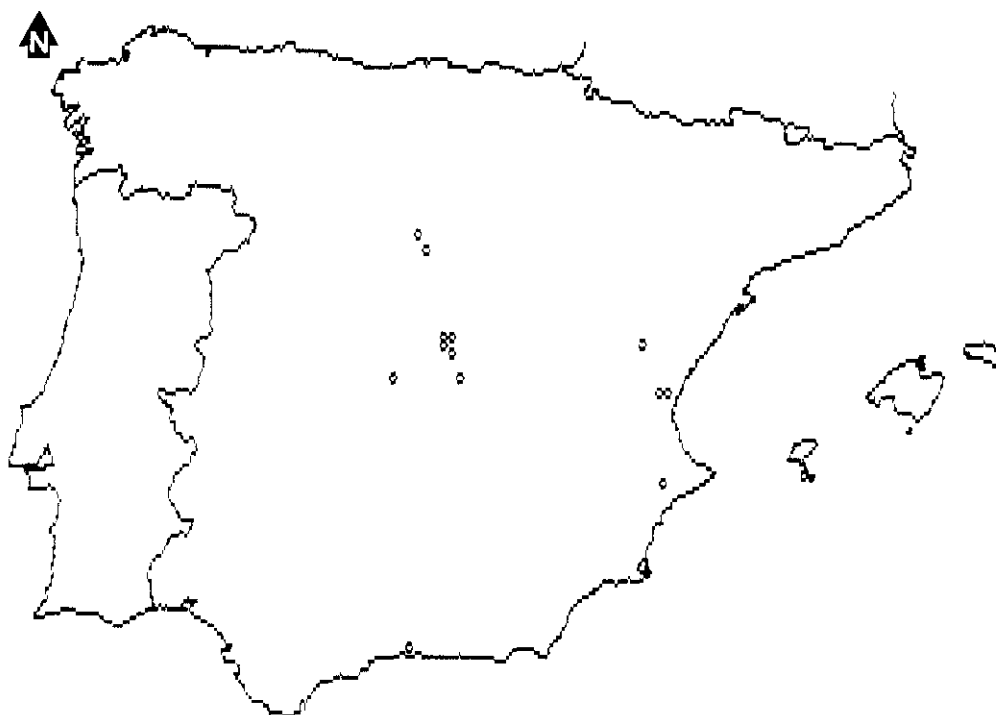
**LOGROÑO:** 30TWN2700, Cenicero-Huércanos (ARIZAGA in ASEGUINOLAZA ET AL., 1985).

**MADRID:** 30TVK66, Dehesa de Arganda, 7/5/1982, Carrasco & Velayos (MACB19083).

**MURCIA:** 30SXG38, S<sup>a</sup> Espuña, Aledo, 10/3/1982, Fernández Díez (SALA26961)

**TOLEDO:** 30SVK0713, Carretera de Toledo a Puebla de Montalván, 544 m (EGIDO PÉREZ, 1984). 30SVK0812, Dehesa de San Bernardo, Toledo, 550 m (IBIDEM).

***Colutea arborescens* L. subsp. *atlantica* (Browicz) O.Bolòs et J.Vigo**



**Figura 6.** Mapa de distribución según el retículo UTM de 10 x 10 km. Referencias corológicas de *C. arborescens* L. subsp. *atlantica* (Browicz) O.Bolòs & Vigo

**ALICANTE:** 30SYH18, Font Rotja, L'Alcoiá, 950 m, 31/10/1969, Bolòs & Escarré (BC604245). Ibidem, Barranc de Vilanova, Cocentaina, 650 m, 30/5/1987, Nebot (VAB872284).

**MADRID:** 30TVK5650, Base del cerro de Pingarrón, Chinchón, 9/6/1967, Izco (MAF91078). 30TVK56, Cerros del Piul, 30/4/1966, Izco (MAF72143). Ibidem, Vaciamadrid, VII/1907, Vicioso (BC17198). 30TVK64, Chinchón, VI/1915, Coto (MAF38392) 30TVK66, Dehesa de Arganda, 30/4/1966 Izco (MAF72417). 30TVK75, Perales de Tajuña, 21/5/1967, Izco (MAF91057).

Sin asignar coordenada: Villamanrique de Tajo, 31/5/1972, Izco & Valdés (MAF83476). Cerros áridos de Ontigola, Aranjuez, 2/6/1935, Pau (MAF3755).

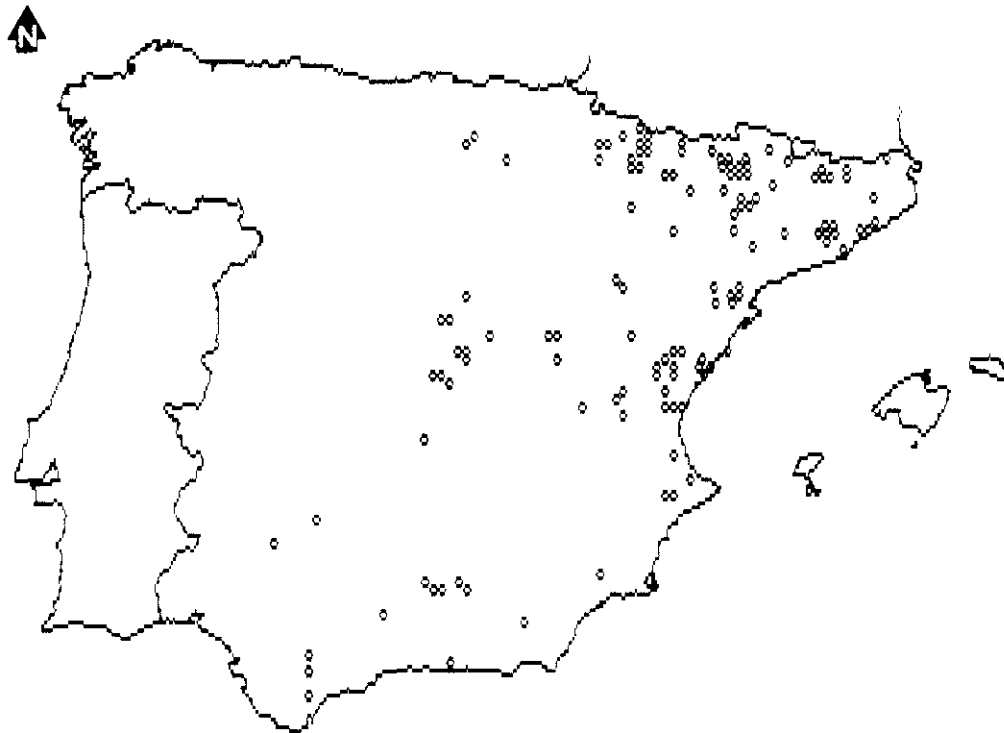
**SEGOVIA:** 30TVL2293, Convento de San Bernardo, Sacramenia, 900 m, 26/6/1983, Romero & Rico (SALA39997). 30TVL3572, Rendilón, Sepúlveda, 960 m, 1/7/1984, Romero & Rico (SALA40965). 30TVL3671, barranco tributario del río Casilla, Sepúlveda (CEBOLLA ET AL., 1983). 30TVL3771, quejigar, Sepúlveda (IBIDEM).

**TERUEL:** 30TXK9056, Mora de Rubielos, 1000 m, 15/5/90, Montserrat (JACA83790).

**TOLEDO:** 30SUK9914, Moraleda de la Portusa, Polan, 14/5/1982, Laorga (MAF110816). 30SVK71, Cerros del arroyo Testillo, Villatobas, 700 m, 1/6/1982, Laorga (MAF110817).

Sin asignar coordenada: Arroyo Seseña, Seseña, Laorga (MAF110818).

**VALENCIA:** 30SYJ1693, Sanatorio de Porta-Coeli, Serra, 200 m, 8/6/1989, Mateo & Crespo (VAB891932) 30SYJ29, El Camp de Morvedre, Sant Esperit, 17/4/1973, Bolòs (BC608562).

***Colutea arborescens* L. subsp. *gallica* (Browicz)**

**Figura 7.** Mapa de distribución según el retículo UTM de 10 x 10 km. Referencias corológicas de *C. arborescens* subsp. *gallica* Browicz

**ALAVA:** 30TVN83, Sobrón, VI-1936, Losa (BCF38088, sub *C. arborescens*).

**ALICANTE:** 30SYH18, Font Rotja, Alcoy, 1000 m, V-1977, Mateo (VAB770264, sub *C. arborescens* L.). 30SYH28, El Planet, Benifallim, 800 m, 5/11/1989, Serra (VAB921278, sub *C. arborescens* L.). 30SYJ40, Benialí, 500 m, 9/4/1985, Mateo *et al.* (VAB852563, sub *C. arborescens* L.). *Ibidem.*, Benirrama, 11/7/1986, Crespo & Nebot (VAB902366, sub *C. arborescens* L.).

**ALMERIA:** 30SWG42, de Bacares a la Venta de Leira, 5/6/1929, Gros (BC807719, sub *Colutea* spp.).

**BARCELONA:** 31TCF79, Boixedes de La Llacuna (BOLÒS & MASCLANS, 1990). 31TCG90, Anoia, 500 m, 25/6/1980, Nuet i Badia (BC632219, sub *C. arborescens* L.). *Ibidem.*, Can Soters, S<sup>a</sup> Castelluvi, 648 m, 20/6/1976, Alvaro *et al.* (BCC s.n., sub *C. arborescens* L.). 31TCG9003, La Pobla de Claramunt, 425 m, 4/6/1978, Nuet Badia (BC629598, sub *C. arborescens* L.). *Ibidem.*, Font del Llop, Els Mollons, 430 m (NUET I BADIA, 1987). 31TCG9004, Cal Soterons, La Pobla de Claramunt, 515 m (IBIDEM). 31TCG9077, Anoia, 725 m, 19/5/1981, Nuet i Badia & Panareda (BC642146). 31TDF0299, Masdengall, Esparraguera, 14/5/1967, Barrau i Andreu (BC612246, sub *C. arborescens* L.). 31TDF28, Massif du Tibidabo et de Montalegre, IV-1916, Sennen (BC17214, sub *C. breviaolata* Lge.). *Ibidem.*, Vallvidrera, Montalegre, 1868-1869, (Dr. Trémols) (BC17191, sub *C. arborescens* L.). 31TDG0106, Sant Jeroni, 1180 m (BOLÒS in NUET & PANAREDA, 1991). 31TDG0203, Vers Collbató (LAPRAZ in NUET & PANAREDA, 1991). 31TDG0915, Els Ermitanets, L'Obac, 500 m (HERNÁNDEZ I CARDONA, 1993). 31TDG07, sobre El Vilar, Guardiola de Berguedà, 1100 m, 25/8/1978, Soriano (BCC s.n., sub *C. arborescens* L.). 31TDG08, camí als Empedrats, Bagà, 1000 m, 23/6/1985, Soriano (BCC s.n., sub *C. arborescens* L.). *Ibidem.*, Estret de Rigoréixer, Alt Berguedà, 900 m, 21/6/1984, Carrillo & Soriano (BCC s.n., sub *C. arborescens* L.). 31TDG1308, Avenc la serra Llarga, L'Obac, 600 m (HERNÁNDEZ I CARDONA, 1993). 31TDG1309, Turó Roig, L'Obac, 675 m (IBIDEM). 31TDG1405, Font de l'Alber, L'Obac, 440 m (IBIDEM). 31TDG1407, Els Caus del Guitard, L'Obac, 485 m (IBIDEM). 31TDG1212, Turó de l'Espluga, L'Obac, 700 m (IBIDEM). 31TDG1310, Paller de Tot l'Any, L'Obac, 775 m (IBIDEM). 31TDG1312, Coll de Tanca, L'Obac, 830 m (IBIDEM). 31TDG1314, Puig Andreu, L'Obac, 740 m (IBIDEM). 31TDG1410, Collet Estret, L'Obac, 865 m (IBIDEM). 31TDG1414, Turó dels Ducs, 810 - Pla de la Serra Llarga, 830 m, L'Obac (IBIDEM). 31TDG1513, Font Freda, L'Obac, 840 m (IBIDEM). 31TDG1513, La Mata, L'Obac, 915 m (IBIDEM). 31TDG1612, Canal de Teixonerres, 765 m - Sot de la Bóta, 785 m, Sant Llorenç (IBIDEM). 31TDG1615, La Roureda, L'Obac, 740

m (IBIDEM). 31TDG1711, Canal del Pi Tort, Sant Llorenç, 910 m (IBIDEM). 31TDG1712, Revolt de la Guineu, Sant Llorenç, 880 m (IBIDEM). 31TDG1813, Torrent del Marquet, Sant Llorenç, 600 m (IBIDEM). 31TDG1814, Obaga del Marquet, Sant Llorenç, 580 m (IBIDEM). 31TDG1910, Turó de Matalonga, Sant Llorenç, 655 m (IBIDEM). 31TDG4404, Granollers, 160 m, VI-1926, Font i Quer (BC807714, sub *Colutea* spp.). 31TDG5202, Turó d'En Dorí, Cirera, 360 m, 15/7/1946, Montserrat (BC653879, sub *C. arborescens* L.). 31TDG6411, Casa Nova de Masponé, Maresme, 500 m, 23/7/1948, Montserrat (BC653927, sub *C. arborescens* L.). 31TCG9707 31TCG9806 31TCG9807 31TCG9907 31TDG0004 31TDG0005 31TDG0006, El Bruc, Montserrat (NUET i BADIA, 1987).

Sin asignar coordenada: Prop del pla dels Eскурçons, 960 m (BOLÓS in NUET & PANAREDA, 1991). Sant Llorenç de Munt, 9/5/1926, Cuatrecasas (MAF38397, sub *C. arborescens* L.). Sant Bartomeu des Gorgues, 6/6/1924, Hno. Gonzalo (BC807700, sub *C. arborescens* L.). Sta. Coloma de Cervelló, 9/7/1939, A. de B. (BC96934, sub *C. arborescens* L.). Nura, Bagès, 24/10/1909, Font i Quer (BC17193, sub *C. arborescens* L. raça *brevialata* Lge.). Alella, Maresme, 2/8/1919, EX HERB. Barnades (BC604846, sub *C. arborescens* L.). Horta, 4/5/1948, Font i Quer (BC807713, sub *Colutea* spp.). Ametlla del Vallés 10/4/1974, (EX HERB. A.C. Costa BC611380, sub *C. arborescens* L.). Moncada, Vayreda (EX HERB. A.C. Costa BC611369, sub *C. arborescens* L.). Montjuic, 1945, Gabarra (BCF38085, sub *C. arborescens* L.).

**BADAJOS**: 29STH42, Pico de Bienvenida, 710 m, 8/4/1988, Ladero & Amor (SALAF18673).

**BURGOS**: 30TVN72, Bujedo, 20/6/1918, Hno. Elías (BC17200, sub *C. arborescens* L.).

Sin asignar coordenada: Monte de Oña, Monte de Herrera (BCF38086, sub *C. arborescens* L.)

#### CACERES:

Sin asignar coordenada: Fuente de la Pª (?), Rivas Mateos (MAF38384, sub *C. arborescens* L.).

**CADIZ**: 30STF8539, Jimena de la Frontera, 125-175 m, 19/4/1990, Sánchez (MA493612). 30STF86, Benaocaz, 22/6/1883, Pérez-Lara (MAF38386, sub *C. arborescens* L.). 30STF88, Algodonales, Sierra de Lijar, 700 m, 20/5/1981, Aparicio (SEV61915, sub *C. arborescens* L.).

**CORDOBA**: 30STH9153, Los Llanos, 21/3/1978, Talavera & Valdés (SEV129224, sub *C. arborescens* L.). 30SUG73, Fuente de las Cañas, Rute, 15/4/1983, Arroyo (SEV94790, sub *C. arborescens* L.).

**CASTELLON**: 30TYK0133, Pina de Montalgrao, 1080 m (ROSELLÓ, 1992). 30TYK0840, Montanejos, 700 m (IBIDEM). 30SYK11, Segorbe, V-1910, Pau (BC807702, sub *C. arborescens* L.). 30TYK1852, Villahermosa del Río, 900 m (ROSELLÓ, 1992). 30TYK2247, Castillo de Villamalefa, 600 m (IBIDEM). 30TYK2640, Ludiente, 420 m (IBIDEM). 30TYK2768, Vistabella del Maestrazgo, 1100 m 14/6/1987, Fabregat (VAB901358, sub *C. arborescens* L.). 30TYK2831, Fanzara, 300 m (ROSELLÓ, 1992). 30TYK2867, Cap al Más del Pla, Penyagolosa, 1150 m (VIGO, 1968). Ibidem, Vistabella, Penyagolosa, 1100 m (IBIDEM). 30TYK2964, Tossal de L'Alforí, Penyagolosa, 1250 m (IBIDEM). Ibidem, Vistabella del Maestrat, 1275 m, 15/7/1962, Vigo (BC261335, sub *C. arborescens* L.). 30TYK3064, Vistabella del Maestrat, 1225 m, VII-1962, Vigo (BC372880). 30TYK3266, Vers el Más Vell, Penyagolosa, 1200 m (VIGO, 1968). 30TYK3765, Benafigos, 600 m, 8/6/1986, Fabregat (VAB901358, sub *C. arborescens* L.). 30TYK54, Villafamés, 450 m, 24/5/82, Mateo (VAB820812, sub *C. arborescens* L.). 31TBE4638, Font de la Porreta, Benicassim, 2/11/1959, Calduch (VAF3790, sub *C. arborescens* L.). 31TBE45, Desierto de las Palmas, Benicassim, 500 m, III-1984, Mateo (VAB841802, sub *C. arborescens* L.). 31TBE54, Cabanes, 400 m, IV-1978, Mateo (VAB780153, sub *C. arborescens* L.). 31TBE7365, Barranco de Irla, Peñiscola, IV-1909, Sennen (BC140419 sub *C. breviaata* Lge.).

Sin asignar coordenada: Entre Cinctorres y Castellfort, X-1984, Peris & Stübing (VAF10887, sub *C. arborescens* L.).

**CUENCA**: 30TWK85, Laguna de Uña, 9/7/1982, Casaseca & Fernández Diez (SALA48555, sub *C. arborescens* L.). 30TWK8088, Laguna Grande de El Tobar, 22/6/1935, Caballero (MA66494, sub *C. arborescens* L.). 30SXJ19, Hoz del Gabriel, (JIMÉNEZ & LÓPEZ, 1976). 30TXK78, Hoz de Beteta, 17/5/1933, Caballero (K s.n.). Ibidem, Solán de Cabras, 19/7/1941, Caballero (MA66492, sub *C. arborescens* L.).

Sin asignar coordenada: Talayueias a Sinarcas, 1000 m, VI-1980, Mateo (VAB902368, sub *C. arborescens* L.). Serranía de Cuenca, Hoces del río Huécar, VI-1962, Borja (MAF76267, sub *C. arborescens* L.).

**GERONA**: 31TDG37 31TDG38 : vers el Sagnari, 800 m; sota Estèguel, 800 m; cap a Can Gorra, sobre Torroella, 1050 m (VIGO, 1983). 31TDG6747, Bosch de can Cios, La Sellera i Sant Julià del Llor.



3/6/1920, (?) (BC17209, sub *C. arborescens* L.). 31TDG89, Darnius-Maçanet de Cabrenys, 300-400 m (BOU I TOMÁS, 1985).

**GRANADA:** 30SVF57, Azud de Vélez, 19/4/1983, Cueto (GDA15597, sub *C. arborescens* L.).

Sin asignar coordenada: S<sup>a</sup> Tejada, 26/5/1982, Nieto (GDA28024, sub *C. arborescens* L.).

**GUADALAJARA:** 30TVL73, Tamajón, 13/6/1943, Rivas Goday & Monasterio (MAF72036, sub *C. arborescens* L.). 30TWK0589, Tendilla, 16/6/1962, Galiano (SEV1857, sub *C. arborescens* L.).

Sin asignar coordenada: Peñalver, 12/5/1977, Fernández Díez *et al.* (SALA11650, sub *C. arborescens* L.).

**HUESCA:** 30TXM7993, Agüero-San Felices, 650 m, 20/6/1972, Villar (JACA327172, sub *C. arborescens* L.). 30TXN8113, Puente la Reina de Jaca, 630 m, 22/5/1969, Montserrat (JACA149969, sub *C. arborescens* L.). 30TXN8023, Biniés, 800 m, 30/6/1980, Montserrat & Montserrat (JACA192080, sub *C. arborescens* L.). 30TXN8727, Valle de Hecho, 800 m, 2/8/1968, Montserrat (JACA336968, sub *C. arborescens* L.). 30TXN8641, Hecho, 1000 m, 10/8/1964, Montserrat (JACA671969, sub *C. arborescens* L.). 30TXN9413, Boalar de Jaca, 760 m, 11/10/1968, Montserrat (JACA450468, sub *C. arborescens* L.). 30TXN9221, Las Tiesas, 830 m, 8/8/1969, Montserrat (JACA663669, sub *C. arborescens* L.). 30TXN9436, Labati, 1500-1600 m, 4/8/1970, Montserrat & Villar (JACA463870, sub *C. arborescens* L.). 30TYM1981, San Julián de Banzo, 830 m, 10/8/1977, Montserrat (JACA112377, sub *C. arborescens* L.). 30TYM4268, Abiego, 580 m, 8/6/1973, Villar (JACA152973, sub *C. arborescens* L.). 30TYM4378, S<sup>a</sup> de Rufas, Rodellar, 850 m, 10/10/1989, Martín (MA505102, sub *C. arborescens* L.). 30TYN3412, Asin de Broto-Bergua, 850 m, 30/6/1973, Montserrat & Villar (JACA239373, sub *C. arborescens* L.). 30TYN3726, Puente de los Navarros, Torla, 1100 m, 27/6/1978, Montserrat (JACA129878, sub *C. arborescens* L.). 30TYN3826, Puente de los Navarros, Ordesa, 1030-1250 m, 5/8/1970, Montserrat & Villar (JACA471670, sub *C. arborescens* L.). 31TBG8567, Graus, 560 m, 2/6/1986, Montserrat (JACA663986). 31TBG8697, L'Obago, Campo, 1100 m (NINOT *ET AL.*, 1993). 31TBG8899, Hordialón, Biescas, 740 m (IBIDEM). 31TBG9938, Castillonroy, 300-350 m, 13/5/1985, Montserrat (JACA140585, sub *C. arborescens* L.). 31TBG9939, Castillonroy, 340-360 m, 28/5/87, Montserrat (JACA439987, sub *C. arborescens* L.). 31TBG9283, Roda de Isábena, 1050-1150 m, 1/8/87, Montserrat (JACA739887). 31TBG99, Turbó, Eixeia, 1000 m, 5/7/1987, Ninot (BCC s.n.). 31TBG9195, Eixeia, 980 m (NINOT *ET AL.*, 1993). 31TBH7013, Paso de las Devotas, 850 m (MONTSERRAT I MARTÍ, 1987). 31TBH7014, Camino de Badain al Paso de las Devotas, Lafortunada, 730 m (IBIDEM). 31TBH7015, Paso de las Devotas, 750 m (IBIDEM). 31TBH7016, Paso de las Devotas, 800 m (IBIDEM). 31TBH7111, Lafortunada-Cotiella, 780-900 m, 14/8/1979, Montserrat & Montserrat (JACA375579, sub *C. arborescens* L.). Ibidem, Valle del río La Garona, Laspuña, 830-960 m (MONTSERRAT I MARTÍ, 1987). 31TBH7311, Cotiella, 840-900 m, 14/8/1979, Montserrat & Montserrat (JACA380879, sub *C. arborescens* L.). 31TBH8501, Río Esera, 730 m (NINOT *ET AL.*, 1993). 31TBH9107, Congosto del Ventanillo, Castejón de Sos, 900 m (MONTSERRAT I MARTÍ, 1987). 31TCG0585, Iscies, 1000 m (NINOT *ET AL.*, 1993). 31TCG0090, Bascas de Obarra, 900 m (IBIDEM). 31TCG0293, Beranuy, 1000 m (IBIDEM). 31TCG1488, Congosto de Escalles, 900 m (IBIDEM). 31TCG1093, Arroyo de Aulet, 1200 m (IBIDEM). 31TCG1491, Sopeira-Aulet, 930 m, 4/7/1971, Montserrat (JACA399271, sub *C. arborescens* L.). 31TYM2881, Sierra de Guara, 900 m, 1/7/1972, Montserrat & Villar (JACA407172, sub *C. arborescens* L.).

Sin asignar coordenada: Torla, VII-1873, Bordère (G s.n.).

**JAEN:** 30SVG27, Jabaluz, 900 m (GARCÍA MARTÍNEZ & FERNÁNDEZ LÓPEZ, 1986). 30SVG36, Otiñar, Jaén, 800 m (IBIDEM). 30SVG46, Pegalajar (Km. 363 carretera J-GR), 700 m (IBIDEM). 30SVG67, Entre Solera y Venta del Capataz, 1000 m, 23/7/1925, Cuatrecasas (BC s.n., sub *C. arborescens* L.). Ibidem, Sierra de Cabra, entre Solera y el río, 1000 m, 23/7/1925, Cuatrecasas (MAF38388, sub *C. arborescens* L.). 30SVG76, Ubeda-Arquillos, (BOLAÑOS & *ET AL.* in GARCÍA MARTÍNEZ & FERNÁNDEZ LÓPEZ, 1986).

Sin asignar coordenada: Ubeda, 13/4/1982, Rico (SALA27001, sub *C. arborescens* L.).

**LERIDA:** 31TBG91, Rimat, 19/4/1948, Bolòs (BC106530, sub *C. arborescens* L.). 31TCF19, De Les Borges cap a Castellí dans, prop de l'Arangó, 6/5/1972, Boldú (?) (BCF17831, sub *C. arborescens* L.). 31TCG0249, Os de Balaguer, 400 m, 5/6/1988, Montserrat (JACA153288). 31TCG0859, Montsec d'Ares, 700 m, 25/5/1979, Romo (BC656217, sub *C. arborescens* L.). 31TCG14, La Noguera, 380 m, 8/8/1982, Romo (BC656216, sub *C. arborescens* L.). 31TCG19, 31TCH10, 31TCH41: (valle de Espot) Extrem nord-oriental del Pui de Finestrelles, 1020 m; Borda del Terrissaire, 1160 m y (valle de Boi) Sota de Castelló, 900 m; Cap a Còll, 1050 m; Sarais - Durro, 1400 m (CARRILLO & NINOT, 1992). 31TCG2557, Congosto de Terradets, 350-400 m, 6/7/1986, Montserrat & Montserrat (JACA471386, sub *C. arborescens* L.). 31TCG46, Abella de la Conca (ROMO I DIEZ, 1989). 31TCG69, vora Aravell, 800 m (CARRERAS I RAURELL, 1985). 31TCH10, Sota Sarais, 1260 m, 28/7/1979, Carrillo & Ninot (BCC s.n.). Ibidem, Sarroqueta, 975 m (CARRERAS RAURELL *ET AL.*, 1993). 31TCH41, Vall d'Espot, 1290 m, 12/7/1979, Carrillo & Ninot (BCC s.n.).

31TDG17, Alt Berguedà-La Clusa, 1300 m, 21/7/1976, Rosell (BC621679, sub *C. arborescens* L.).  
Ibidem, Pas de l'Escalet, La Clusa (ROSELL, 1978)

**MADRID:** 30TVK43, Mar de Ontígola, Aranjuez, 5/6/1986, Giráldez (SALA41767, sub *C. arborescens* L.).  
30TVK66, Dehesa de Arganda, 19/6/1966, Bellot & Monasterio (SALA39175, sub *C. arborescens* L.).  
30TVL4805, San Agustín de Guadalix, 15/5/1981, Moreno (MA448576).

Sin asignar coordenada: Aranjuez, 12/5/1924, Font i Quer & Gros (BC807721, sub *Colutea* spp.).  
Carretera de Arganda a Titulcia, 5/5/1966, Bellot & Monasterio (SALA28740, sub *C. arborescens* L.).  
Villaconejos, 19/6/1966, Bellot (SALA28177, sub *C. arborescens* L.). Arganda, 13/6/1924, Rivas Goday  
(MAF38393, sub *C. arborescens* L.). Campo Real, 20/3/1972, Belmonte (MAF120039, sub *C. arborescens* L.).  
Alcalá, Graells (K s.n., sub *C. arborescens* L.). Orusco, 31/5/1966, Izco (MAF72416).

#### MALAGA:

Sin asignar coordenada: Serranía de Ronda, VI-1849, Reuter (G s.n.). Benahavis, 600, 31/3/1973,  
Brinton-Lee (SEV83798, sub *C. arborescens* L.). S<sup>a</sup> Almijara, 24/4/1936, Laza Palacios (MAF38387, sub  
*C. arborescens* L.).

**MURCIA:** 30SXG38, Aledo, 4/5/1975, Garcia *et al.* (SEV93514, sub *C. arborescens* L.).

**NAVARRA:** 30TXN1519, Ermita de Santa Cruz, Solchaga, 750 m (ERVITI, 1991). 30TXN3108, Caparreta,  
Gallipienzo, 550 m (IBIDEM). 30TXN3009, Gallimpiezo, 470-560 m, 15/5/1988, Montserrat & Montserrat  
(JACA41588). 30TXN3921, Lumbier, 440 m, 3/6/1986, Villar (JACA394486 sub *C. arborescens* L.).  
30TXN4121, S<sup>a</sup> de Leyre-Trinidad, Lumbier, 600 m (ERVITI, 1991). 30TXN4821, Monasterio de Leyre,  
Yesa, 700 m (IBIDEM). 30TXN6230, Burgui, 640-820 m, 4/7/1974, Montserrat & Villar (JACA361474, sub  
*C. arborescens* L.). 30TXN6331, foz del río Esca, Burgui, 650 m (ERVITI, 1991)

#### SEVILLA:

Sin asignar coordenada: San Nicolás del Puerto, 2/6/1984, Aguilera *et al.* (SEV111433, sub *C. arborescens* L.).

**TARRAGONA:** 31TBF62, cap al Parrissal, Beseit (ROVIRA in TORRES ESPUNY, 1989). 31TBF82, Alfara-  
Tortosa, 100 m (TORRES ESPUNY, 1989). 31TBF83, Xerta-Paüls, 200 m (IBIDEM). 31TBF93, Más de  
Beltrán, 20 m (IBIDEM). Ibidem, Benifallet-Rasquera, 40 m (IBIDEM). 31TBF94, El Pinell (IBIDEM).  
31TCG5302, Vallfogona de Riucorb, 600-700 m, VII-1918, Sra. Gallardo (BC125456, sub *C. arborescens*  
L.).

Sin asignar coordenada: Mont-Roig, Baix Camp, 13/5/1926, Font i Quer (BC 807715 sub *Colutea* spp.).  
Montaigre, Conca de Barberá, IV-1921, Font i Quer (BC 807716 sub *Colutea* spp.) L'Espluga de  
Francolí, 900 m 8/6/1950, Batalla & Masclans (BC 141203, sub *C. arborescens* L.).

**TERUEL:** 30TBF64, Más de la Cruz, Calaceite, 500 m, 27/5/1989, Mateo (VAB891194 sub *C. arborescens* L.).  
30TXK96, Mora de Rubielos a Linares de Mora, 1400 m, 8/6/1985, Mateo (VAB851349  
sub *C. arborescens* L.). 30TXL5950, La Modorra, Badenas, 1040 m (FERRER, 1986). 30TXL6145,  
Piedrahita, 1100 m (IBIDEM).

Sin asignar coordenada: Monreal del Campo, 1000 m, 25/6/1921, Font i Quer (BC 807711 sub *Colutea*  
spp.). Alrededores de Mora de Rubielos, 1000 m, VI-1976, Mansanet & Mateo (VAB760341, sub *C. arborescens* L.).  
Mora de Rubielos, 1350 m, 18/6/1976, Segura Zubizarreta (SEV100951).

**TOLEDO:** 30SVJ25, Emperador (MAF38396). 30TVK52, Ontígola, 600 m, 28/4/1991, García  
(VAB913325, sub *C. arborescens* L.). 30TVK33, Borox, 20/5/1980, Belmonte (MAF129290, sub *C. arborescens* L.).

Sin asignar coordenada: Castilla Nova, Gutarrón, 27/5/1924, Font i Quer (BC 807709 sub *Colutea* spp.).  
Ontígola, 13/5/1924, Font i Quer & Gros (BC 807720 sub *Colutea* spp.) Arganda?/Emperador?  
(MAF38395).

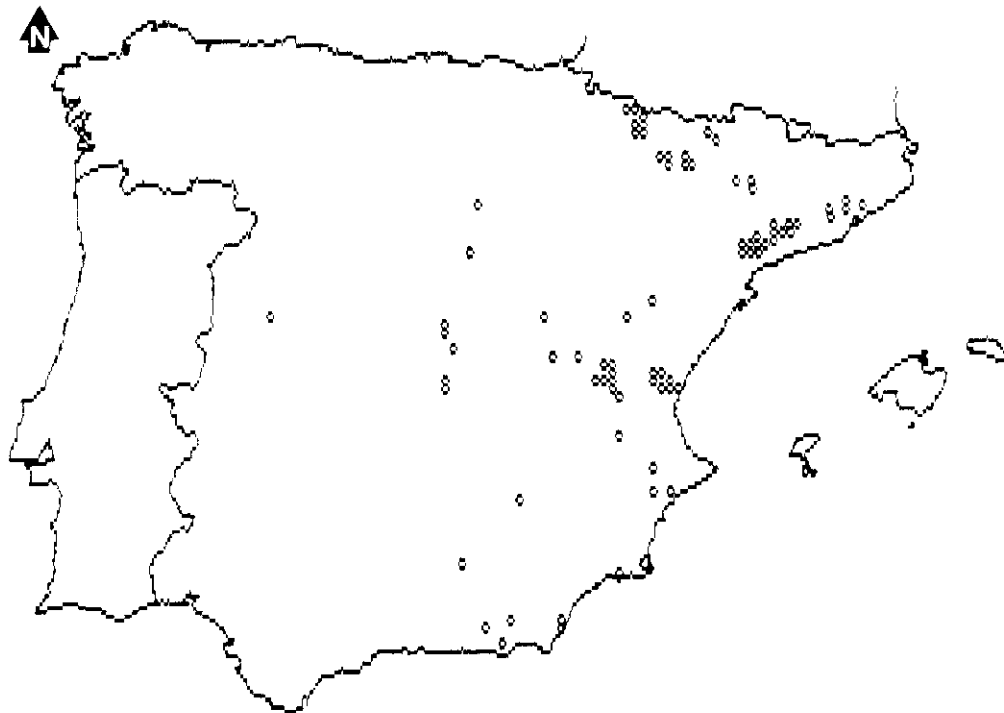
**VALENCIA:** 30SXJ68, umbria del Jaral, Requena, 980 m, 12/6/1986, García (VAB886083, sub *C. arborescens* L.).  
Ibidem, umbria de la Estenilla, Requena, 980 m, 10/4/1987, García (VAB890188, sub *C. arborescens* L.).  
30SXX50, Los Blancos, 1000 m, 11/6/1980, Mateo (VAB800449, sub *C. arborescens* L.).  
30SXX61, Titaguas, 800 m, V-1980, Mateo (VAB800448, sub *C. arborescens* L.). 30SYJ19, Olocou, 300  
m, 20/5/1986, Crespo (VAB910301, sub *C. arborescens* L.). Ibidem, La Pobleta-Portaceli, Serra, 400 m,  
27/4/1985, Mateo (VAB852561, sub *C. arborescens* L.). 30SYJ2834, Sierra de Murta, 200-300 m, Borja  
(MAF38389, sub *C. arborescens* L.). 30SYJ29, Serra (castillo), 500 m, 17/5/1986, Crespo (VAB861056,

sub *C. arborescens* L.). 30SYJ3095, Barranco de la Maldicha, Gilet, 75 m, 20/4/1990, Lillo (VAB900806, sub *C. arborescens* L.).

Sin asignar coordenada: S<sup>a</sup> de Corbera, VI-1945, Borja (VAF864, sub *C. arborescens* L.). Xeresa, 28/5/1923, Font i Quer & Gros (BC807717 sub *Colutea* spp.). S<sup>a</sup> de Chiva, 15/3/1984, Peris & Stübing (SALA33089, sub *C. arborescens* L.). Ayelo de Rugat, 400 m, 19/4/1985, Mateo & Figuerola (VAB852562, sub *C. arborescens* L.). Montes de Calles a Higuerales, V-1987, Murgui *et al.* (VAB870772, sub *C. arborescens* L.). Hoz del Tunia, 750 m, VII-1980, Mateo (VAB800450, sub *C. arborescens* L.). Segart, 400 m, IV-1979, Mateo (VAB790315, sub *C. arborescens* L.). Font del Berro, Serra, 500 m, VI-1977, Mateo (VAB770265, sub *C. arborescens* L.).

**ZARAGOZA:** 30TXM7243, Castejón de Valdejara, 0-550, 12/6/1973, Villar & Lanaspá (JACA169773, sub *C. arborescens* L.). 30TXM8592, La Peña-Murillo, 500 m, 29/7/1969, Montserrat (JACA500769, sub *C. arborescens* L.). 30TXN7306, Longas, 980-1000, 25/9/1969, Montserrat (JACA702469, sub *C. arborescens* L.). 30TYM21, Monegrillo, 550-600 m, 29/5/1988, Monserrat & Montserrat (JACA124388).

### Citas sub *Colutea arborescens* L.



**Figura 8.** Mapa de distribución según el retículo UTM de 10 x 10 km. Referencias corológicas de *C. arborescens*

**ALICANTE:** 30SYH06, El Maigmo, (RIGUAL MAGALLÓN, 1972). 30TYH2466, Alt d'Espi, Busot, 350 m, 10/4/1992, Solanas (MA537162)

Sin asignar coordenada: Barranco del Lagrimal, S<sup>a</sup> Salinas, (RIGUAL MAGALLÓN, 1972).

**ALBACETE:** 30SWH4956, Los Chorros del Mundo, S<sup>a</sup> Alcaraz, (HERRANZ SANZ & GÓMEZ CAMPO, 1986). 30SXX50, Pico Murgón (PERIS, 1983).

**ALMERIA:** 30SWF09, Fuente Victoria (SAGREDO, 1987). 30SWF27, Barranco del Cañuelo (IBIDEM). 30SWG9507, Barranco del Nacimiento, S<sup>a</sup> Victoria (IBIDEM). 30SWF9899, Barranco del Algarrobico, S<sup>a</sup> Victoria (IBIDEM). 30SWG72, Códbar (IBIDEM). 30SWG30, Nacimiento, (IBIDEM).

**BARCELONA:** 31TCF4898, Coll de Burriac Cabrils-Cabrera (LOSA, 1975). 31TCF6997, Bellprat, Alto Gayá, 600-700 m (MALAGARRIGA, 1971). 31TCF7197, Castillo de Queralt, Alto Gayá, 820 m (IBIDEM). 31TDG10, Coll d'Estenalles, 850 m (BOLÓS & BOLÓS, 1950) Ibidem, Entre la Font d'Estenalles, el Coll d'Estenalles i la Torre de l'Angel (LAPRAZ, 1954). 31TDG1809, Sota el Cavall Bernat (CENTRE EXCURSIONISTA DE TERRASSA, 1986). 31TDG1610, Entre la Barata i Can Pèlags - Entre Can Pèlags i la

canal del Pi Tort (CENTRE EXCURSIONISTA DE TERRASSA, 1987). 31TDG31 31TDG32 31TDG51, Macizo del Turó de l'Home i Santa Fe - Pla de Calma, 250-450 m (BOLÓS & ET AL., 1986).

Sin asignar coordenada: Pont de les Cases, (VIVES CODINA, 1964). Collsuspina (BARNOLA, 1916). Entre la Carena de les Animes i la cova del Drac (CENTRE EXCURSIONISTA DE TERRASSA, 1988). Canal de Santa Agnès (PÉREZ DÍAZ ET AL., 1989). Bosques del Montnegre (MONSERRAT, 1968).

**CASTELLON:** 30TYL3707, Villors, 700 m 28/5/1987 (MA448319).

**CUENCA:** 30TWK83, Las Torcas, 8/6/1974, González *et al.* (MA343933). 30TXK13, Cañete-Boniches, 1120 m (LÓPEZ, 1976).

#### **GRANADA:**

Sin asignar coordenada: Puerto de la Gaviana, S<sup>a</sup> Tejada y Almirajara (LAZA PALACIOS, 1945).

**GUADALAJARA:** 30TVL86, Galve, (MAYOR LÓPEZ, 1965).

Sin asignar coordenada: Valdesotos-Retiendas, 800-900 m (FUENTE, 1982). Padilla de Hita, Escopete, Pastrana, Irueste, Aranzueque, Fuentenovilla, Trillo, Pareja, Cañizar, Cívica, Brihuega, Valderrebollo, Barriopedro, (BELLOT & ET AL., 1979). S<sup>a</sup> Enmedio, Jabalera, (COSTA TENORIO, 1978).

**HUESCA:** 30TXN7848, entrada a Zuriza, Ansó, 1100 m (VILLAR, 1980). 30TXN8213, Puente la Reina de Jaca, 630 m (IBIDEM). 30TXN8727, Carrascal del río Osia, Santa Isabel, 800 m (IBIDEM). 30TXN8641, Boca del Infierno, Hecho, 1000 m (IBIDEM). 30TXN9413, Boalar, Jaca, 760 m (IBIDEM). 30TXN9221, Malletón, Las Tiesas, Jaca, 830 m (IBIDEM). 30TXN9436, Lizara, Aragüés del Puerto, 1500 m (IBIDEM). 30TYM1980, Barranco de Val de Onsera, San Julián de Banzo, 820 m (MONSERRAT I MARTÍ, 1987). 30TYM2479, Vadiello, 740 m (IBIDEM). 30TYM2782, Gargantas de Fabana, 900 m (IBIDEM). 30TYM4270, Puente sobre el río Isuaba, Abiego, 500 m (IBIDEM). 30TYM4381, Barranco Fondo, Las Almunias, 800 m (IBIDEM). 31TBG5775, Barranco de las Gargantas, Colungo, 680 m (IBIDEM). 31TBH7111, Confluencia del río Irués con La Garona, 750-900 m (MONSERRAT I MARTÍ & GÓMEZ GARCÍA, 1981). 31TBH8501, Campo-Seira, 700 m (IBIDEM).

**JAEN:** 30SVG77, Cabra de Santo Cristo, 23/7/1947, García Martínez & Fernández (JAEN Monast 365).

Sin asignar coordenada: Martos-Santiago de Calatrava, 19/5/1976, García Martínez & Fernández (JAEN76-587). Villacarrillo, S<sup>a</sup> de las Cuatro Villas, 3/7/1980, García Martínez & Fernández (JAEN82-2475). Ubeda-Arquillos, 15/9/1979, García Martínez & Fernández (JAEN-1623).

**LERIDA:** 31TCG0558, Voltants de Montfalcó, Montsec d'Estall, 760 m (ROMO I DIEZ, 1989). 31TCG0859, Vers el portell de Mont-rebei, Montsec d'Ares, 700 m (IBIDEM). Ibidem, Más dels Carlets - Más de la Pardina, Montsec d'Ares, 800 m (IBIDEM). 31TCG2044, Santa Linya, Montsec de Rúbies, 380 m (IBIDEM). 31TCG2557, Congost dels Terradets, Montsec de Rúbies, 330 m (IBIDEM). 31TCG2658, Ribes del Barcedana, Montsec de Rúbies, 400 m (IBIDEM). 31TCG2957, Obaga del sant del Bosc, Monsec de Rúbies, 540 m (IBIDEM).

Sin asignar coordenada: Tiurana, 370 m (BOLÓS, 1960). Pont de Les Cases, Cuenca del Cardener (VIVES CODINA, 1964). Almatret (MASCLANS I GIRVÉS, 1966).

**MADRID:** 30TVK5764, Piul, (Izco, 1972). 30TVK5771, Rivas-Vaciamadrid, 650, VI-82, Luceño (MA343936). 30TVK64, Cerros de Butarrón, Chinchón, VI-1919, Vicioso (MA66463). 30TVK73, Monte de la Encomienda Mayor de Castilla, 725 m (COSTA, 1974). 30TVK7662, Valdilecha (RUIZ DE LA TORRE, 1982). 30TVL4907 30TVL5007, Solana de Pedrezuela (IBIDEM).

Sin asignar coordenada: Aranjuez, 586 m (COSTA, 1974). Pozuelo del Rey, 850 m (IBIDEM).

#### **MALAGA:**

Sin asignar coordenada: Puerto de Cómpea, S<sup>a</sup> Tejada y Almirajara (LAZA PALACIOS, 1945).

**SALAMANCA:** 29TQE5183, Cepeda (HOYOS DE ONÍS in FERNÁNDEZ DIEZ, 1974).

Sin asignar coordenada: San Esteban de la Sierra (HOYOS DE ONÍS in FERNÁNDEZ DIEZ, 1974). Sequeros (IBIDEM). Tamames (IBIDEM).

**SORIA:** 30TVM9225, Cañón del río Lobos (BUADES, 1987).

**TARRAGONA:** 31TCF06 31TCF07 La Bisbal de Falset - Cabassers (MOLERO, 1976). 31TCF16, Gratallops - Falset, 440 m (IBIDEM). 31TCF17, S<sup>a</sup> La Llana - Margalef, 400 - 600 m (IBIDEM). 31TCF26, Coll d'Alforja - Cornudella (IBIDEM). 31TCF27, Cornudella - Albarca (IBIDEM). Ibidem, Ullidemolins - Las cadolles Fondes (IBIDEM). Ibidem, Serra la Llana (MASALLES & PUJADAS, 1977). Ibidem, Vilanova de Prades (MASALLES I SAUMELL, 1983). 31TCF28, Poble de Cervoles (IBIDEM). 31TCF37, Vall del Titllar (IBIDEM). 31TCF3175, Prades, S<sup>a</sup> Prades, 950 m (MALAGARRIGA, 1971). 31TCF3271, Febró, S<sup>a</sup> Prades, 800-900 m (IBIDEM). 31TCF3473, Capafons, S<sup>a</sup> Prades, 750 m (IBIDEM). 31TCF3776, Rojals, S<sup>a</sup> Prades, 900-1000 m (IBIDEM). 31TCF3975, Farena, S<sup>a</sup> Prades (IBIDEM). 31TCF4676, La Riba, S<sup>a</sup> Prades, 400-600 m (IBIDEM). 31TCF48, Montblanquet, Tallat (MASALLES & PUJADAS, 1977). Ibidem, Bosc de Cellers, Blancafort y

*l'Espluga sota la Coma d'en Bon* (MASALLES I SAUMELL, 1983). 31TCF49, *Serra del Tallat* (IBIDEM). *Ibidem*, *Senant i Blancafort, Tallat* (IBIDEM). 31TCF5887, *Cogulló, Alto Gayá, 800 m* (MALAGARRIGA, 1971). 31TCF6085, *Torrent de Rupit, 500 m* (BATALLA & MASCLANS, 1950). 31TCF6885, *Montagut, 900 m* (IBIDEM). 31TCF6987, *S<sup>a</sup> Formigosa, 800-1000 m* (IBIDEM). 31TCF7093, *Sant Magi, Alto Gayá, 750 m* (MALAGARRIGA, 1971)

Sin asignar coordenada: *Cabassers - La Vilella Baixa, Covaloques* (MOLERO, 1976). *Más de la Canaleta, Seró* (IBIDEM). *Coll de las Llores, Siurana de Prades* (IBIDEM). *Juncosa, Alto Gayá* (MALAGARRIGA, 1971). *Les Pobles, Alto Gayá* (IBIDEM). *Montagut, Alto Gayá* (IBIDEM). *Montclar, Alto Gayá* (IBIDEM). *Montmell, Alto Gayá* (IBIDEM). 31TCF6687, *Querol, Alto Gayá, 500 m* (IBIDEM). *Montagull, Alto Gayá* (IBIDEM). *Salmella, Alto Gayá* (IBIDEM). *Vilavert, S<sup>a</sup> Prades* (IBIDEM). *Montblanch, S<sup>a</sup> Prades* (IBIDEM). *Espluga de Francolí, S<sup>a</sup> Prades*, (IBIDEM). *Riudavella, S<sup>a</sup> Prades* (IBIDEM). *Coll de Montblanquet* (MASALLES I SAUMELL, 1983). *Más d'en Llord i Hortal* (IBIDEM).

**TERUEL**: 30TYL0802, *Villarluengo de la Palomita* (RIVAS GODAY & BORJA, 1961).

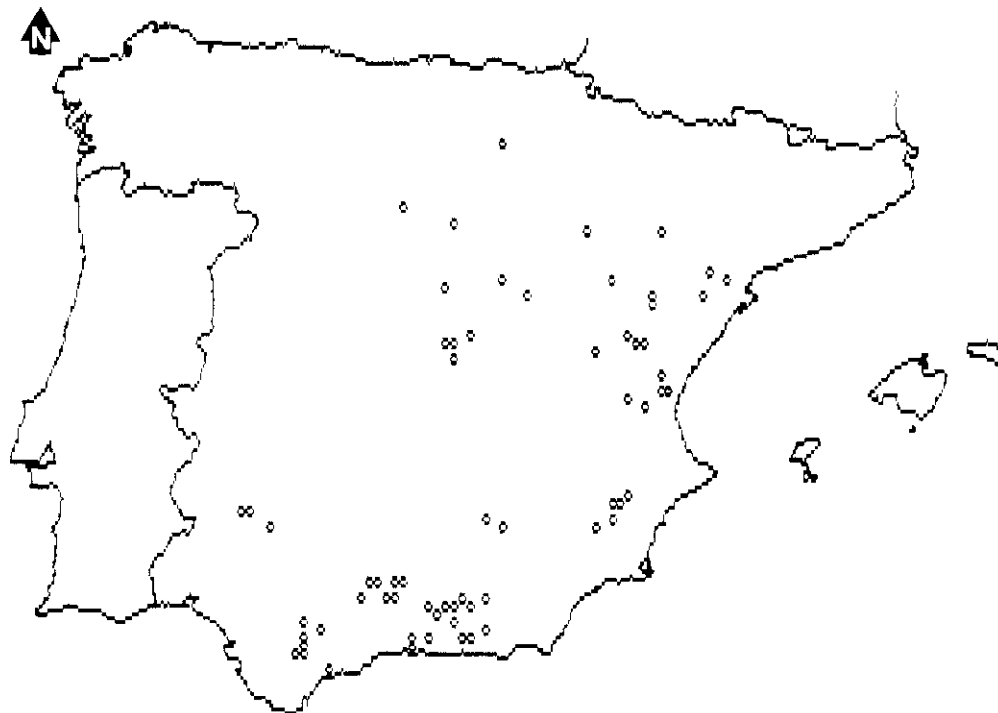
Sin asignar coordenada: *Altiplano de Sarrión, Valvona-Muela*, (RIVAS GODAY & BORJA, 1961).

**TOLEDO**: 30SVJ5994, *Los Navalmorales - Los Navalucillos* (VELASCO ET AL., 1989). 30SVK5906, *La Guardia, 700 m* (RIVAS-MARTÍNEZ & COSTA, 1969-70).

**VALENCIA**: 30SXJ63, *Jalance* (PERIS, 1983). 30SXJ68, *Los Mancebones, Utiel, 900, 1/5/1986* (MA383654). 30SYH09, *Barranc de Morera i la Vall Seca* (CONCA FERRÚS & GARCIA ALONSO, 1994). 30SYJ29, *Barraix* (GARCIA FAYOS & ET AL., 1984). 30SYJ39, *Monte Picayo* (IBIDEM). 30SYK20, *L'Atochar, 300 m* (IBIDEM). 30SYJ19, 30SYJ29, 30SYJ39, 30SYK00, 30SYK01, 30SYK11, 30SYK20, *Serra Calderona* (CRESPO VILLALBA, 1989). 30TXK30, 30TXK40, 30TXK42, 30TXK50, 30TXK51, 30TXK52, 30TXJ59, *Sierras de Mira y Talayuelas* (MATEO, 1984).

Sin asignar coordenada: *S<sup>a</sup> Corbera*, (BORJA, 1950). *Corbera*, (RIVAS GODAY & FERNANDEZ GALIANO, 1951). *La Hunde* (PERIS, 1983).

### ***Colutea atlantica* Browicz**



**Figura 9.** Mapa de distribución según el retículo UTM de 10 x 10 km. Referencias corológicas de *C. atlantica* Browicz

**ALMERIA**: 30SWF0990, *Cerro Alto, Fuente Victoria, S<sup>a</sup> Gádor, 900-1100 m, 18/6/1988* Valdés *et al.* (G415342).

**BADAJOS**: 29SQC3141, *Caserio de la Argamasa, Fuente de Cantos, 540 m, 8/4/1988*. Ladero & *et al.* (SALAF16522). 29STH42, *El Puerto, Fuente del Arco, 14/7/1986*, Gómez Hernández & Ortega (ITA-

UNEX431), 29SQC4841, Pico de Bienvenida, Bienvenida, 710 m, 21/6/1988, Ladero, & *et al.* (SALAF16514).

**CADIZ:** 30STF7669, Casa de Vihuelo, 300-700 m (APARICIO & SILVESTRE, 1987). 30STF86, Dehesa del Boyar, 300-700 m (IBIDEM). 30STF8768, S<sup>a</sup> del Reloj, Villaluenga del Rosario, 300-700 m (IBIDEM). 30STF87, El Bosque hacia Benamahoma, 300-700 m (IBIDEM). *Ibidem*, Grazalema, 10/6/1890, Reverchon (K s.n., G s.n.). 30STF88, Algodonales, S<sup>a</sup> de Lijar, 300-700 m (IBIDEM).

**CORDOBA:** 30SUG53, Río Anzur, Lucena, (MUÑOZ ALVAREZ & DOMÍNGUEZ VILCHES, 1985). 30SUG65, "Cerro Moreno", Mojonera, 12/5/1986, García Montoya (COFC20526). *Ibidem*, Arroyo Rihuelo (GARCIA MONTOYA, 1989). *Ibidem*, Cresta de la Cuchilleja, Cabra, (IBIDEM). 30SUG75, Río Santa María, 9/4/85, García Montoya (COFC20529). *Ibidem*, Río Santa María-Arroyo Encinilla, 15/5/86, García Montoya (COFC20528). 30SUG83, S<sup>a</sup> Horconera (MUÑOZ ALVAREZ & DOMÍNGUEZ VILCHES, 1985). 30SUG93, S<sup>a</sup> Albayate, (IBIDEM). 30SUG95, Priego de Córdoba-Fuente Alhama, (IBIDEM). 30SVG05, Cerro de los Yesos, Priego de Córdoba, (IBIDEM). 30SVG8328, Iznájar, 540 m, 11/6/1977, Fernández Casas (SALA11893, G136070).

Sin asignar coordenada: Cuenca del río Bembézar (FERNÁNDEZ CORRALES, 1984). Villa Carmen, 26/1/86, García Montoya (COFC20527).

**CASTELLON:** 30SYK11, Segorbe, 350 m, 5/3/1905, Reverchon (G s.n.).

**GRANADA:** 30SVF1086 30SVF1087, Cortijo del Robledal, S<sup>a</sup> Tejeda y Almjara (NIETO & CABEZUDO, 1988). 30SVF3883, Barranco del Cañuelo (MARTÍNEZ PARRAS, 1978). 30SVF43, El Cercado, Torvizcón, 750-920 m (MAY, 1987). 30SVF7185, Pico del Cofillo, Pitres, S<sup>a</sup> Mecina, 1200 m, Molero Mesa (GDA9871). 30SVF88, S<sup>a</sup> Mecina, 1400 m (VALLE, 1987). 30SVG32, Albolote, S<sup>a</sup> Elvira, 670 m, 21/5/1989, Alvarez Sánchez (GDA32747). *Ibidem*, S<sup>a</sup> Elvira, V-1968, Varo (GDA1744). *Ibidem*, S<sup>a</sup> de Atarfe (SANCHEZ GARCIA, 1974). 30SVG41, Dehesa del Generalife, 22/4/1988, Morales *et al.* (GDA 29562). *Ibidem*, Fuente del Avellano, 14/5/1989, Malla & Berenguer (GDA30287). 30SVG52, S<sup>a</sup> Huetor, 14/6/1978, Valle (GDA9338). 30SVG60, Encinar de Gúejar-Sierra, 5/6/1970, Morales (GDA1610). 30SVG62, Fuente de la Higuera, S<sup>a</sup> Harana, 1050 m (VALLE, 1987). 30SVG73, Diezma, 1180 m (IBIDEM). 30SWG03, Barranco del Gor, S<sup>a</sup> de Baza (BLANCA & MORALES, 1991).

Sin asignar coordenada: Cortijo de la Víbora, S<sup>a</sup> Nevada, 28/6/1851, Bourgeau (K s.n., G s.n.).

**GUADALAJARA:** 30TWL23, Mandayona, 28/5/1983, Llansana (MACB14597). 30TWL5412, El Hundido, Armallones (MAZIMPAKA, 1982).

Sin asignar coordenada: S<sup>a</sup> Enmedio, Jabalera (COSTA TENORIO, 1978).

**JAEN:** 30SWH0833, Beas de Segura, 700 m, 12/10/1982, Pajarón (G286691). 30SWH2121, Cortijo de la Cerrada (SORIANO & GONZÁLEZ in PAJARON, 1988).

Sin asignar coordenada: Crujala, 1849, Blanco (G s.n.).

**LOGROÑO:** 30TWN2607, Torremontalvo, 14/7/1986, Uribe & Alejandro (JACA598380, cf.).

**MADRID:** 30TVK5753, Morata de Tajuña-San Martín de la Vega (RUIZ DE LA TORRE *ET AL.*, 1982). 30TVK6357, Arganda, 700 m, 1/5/1968, Montserrat. *et al.* (JACA40568). 30TVK6361, Monte Calleja, Dehesa de Arganda (RUIZ DE LA TORRE *ET AL.*, 1982). 30TVK65, Morata de Tajuña-Perales de Tajuña (CASAS *ET AL.*, 1989). 30TVK66, Dehesa del Carrascal, Arganda, 1/6/1971, Bellot *et al.* (MACB42516). 30TVK8165, Villar del Olmo, 730 m, 26/5/1968, Montserrat *et al.* (JACA 180668). 30TVL5420, Torrelaguna (GALÁN MERA, 1985).

Sin asignar coordenada: Entre Villamanrique de Tajo y Colmenar de Oreja, 600, 19/7/1978, Charpin *et al.* (G146491). Perales de Tajuña (CASAS *ET AL.*, 1989). En cerros, Aranjuez, 5/6/1986, Carrasco & Giráldez (MACB30368). Cerro de Guttaron, 10/6/1854, Bourgeau (G s.n.).

**MALAGA:** 30SUF14, Benahavís, (SMYTHIES, 1976). 30SVF17, Canillas de Albaida, 30/7/1919, Estremera (BC17208, sub *C. arborescens* L.).

Sin asignar coordenada: Ronda, 5/8/1889, Reverchon (G s.n.).

**MURCIA:** 30SXH32, S<sup>a</sup> Ricote, Archena (OLMO & ALCARAZ, 1985). 30SXH55 30SXH53 30SXH76 (ALCARAZ, 1984). 30SXH5957 30SXH6256, S<sup>a</sup> de El Carche, Jumilla, 800 m (IBIDEM).

**PALENCIA:** 30TVM6800, San Cebrián de Buenamadre, 30/5/1987, López & Romero (MACB26628).

**SEVILLA:** 30STG80, Morón-Coripe, 16/4/1978, Ruiz de Clavijo & Cabezudo (SEV31232). 30SUF09 (RUIZ DE CLAVIJO *ET AL.*, 1984).

**TARRAGONA:** 31TBF83, Cherta, 27/3/1986, Giráldez (SALA 39717, MACB20478).

**TERUEL:** 30TBF64, Calaceite (MATEO, 1990). 30TXK34, Alobras (IBIDEM). 30TXK76, Forniche Alto, 1200 m, 21/6/1988, Uribe-Echevarría (JACA2590). 30TXK8455, Royuela, 1000 m (ASSO in MATEO, 1990).

30TXK95, Mora de Rubielos (MATEO, 1990). 30TXL53, Olalla (IBIDEM). 30TYL00, Pitarque (ASSO in MATEO, 1990). 30TYL01, Ejulve (MATEO, 1990). 30TYL19, Tronchón (ASSO in MATEO, 1990). 31TBF51, Peñarroya (IBIDEM).

Sin asignar coordenada: Calanda (LOSCOS & PARDO in MATEO, 1990). Torrecilla, (PARDO in MATEO, 1990). Monreal (ZAPATER in MATEO, 1990). Gea (IBIDEM).

**VALENCIA**: 30SXJ7682, Fuente de la Puerca, Chera, 18/5/1984, Sanchis & Roig (VAB880696). 30SXJ97, Chiva, 540 m, 13/4/1986, Peris (MA426126). 30SYJ19, Montañas de Portaceli, 8/3/1987, Peris & Esteso(VAF14859). 30SYJ2397, Serra, 550 m, 8/6/1989, Montserrat & Villar (JACA122289).

**VALLADOLID**: 30TVM0921, Encinas de Esgueva (FERNÁNDEZ ALONSO, 1986).

**ZARAGOZA**: 30TXL2993, Chodes-Jabacín, 520 m, 4/6/1987, Martínez (JACA333387).

4.2. ANALISIS MORFOLOGICO.

4.2.1. ANALISIS UNIVARIANTE.

4.2.1.1. Indumento.

En todas las estructuras en las que se examinó el indumento, excepto en las brácteas y cáliz, los pelos fueron hialinos, rectos y de aspecto suave (Tabla 9). En las brácteas y el cáliz, donde predominó el color pardo o negro en los pelos, éstos tuvieron, en general, un aspecto no suave (recio) y rizado. Esta correspondencia entre color y aspecto se pudo observar en la mayoría de los pliegos, constatándose una cierta relación entre edad de la estructura y color / aspecto de su indumento (a mayor edad, mayor abundancia de pelos no rectos y no suaves de color negro o pardo).

Tabla 9. Caracteres de indumento. Frecuencia de los aspectos considerados (columna de la izquierda). ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*. Debajo del símbolo de cada taxón se indica el respectivo tamaño muestral (n).

n	CARACTERES																				
	TAL#3			EST#5			AMB#5			FOL#9			BRA#5			FLO#4			FRU#5		
	●	■	○	●	■	○	●	■	○	●	■	○	●	■	○	●	■	○	●	■	○
	86	6	14	86	6	14	86	6	14	86	6	14	81	4	14	47	4	6	47	3	5
a				86	5	12							31	1	9				42	3	5
b													21	2	1	13	4	2			
c													41	3	8						
d				82	5	13	85	5	13	85	5	14	12	1	4				42	3	5
e	35	2	9	44	2	10	36	3	10	44	3	8	67	4	13	27	4	6	37	2	3
f	35	3	3	33	3	3	39	1	2	36	2	5	12	-	-	5	1	-			
g	26	1	2	16	-	2	20	1	1	18	-	1	2	-	1	4	-	-			
h	72	4	11	38	2	8	50	4	8	66	4	12	20	-	6	7	3	3	30	3	3
i	17	2	2				34	1	5				19	-	2						
j	1	-	-				5	-	-				10	1	2						
k				49	2	10				85	5	14	41	1	7	32	3	6	42	3	5
l	29	3	3	4	-	1	2	1	-	3	1	3	3	-	2						
m	8	1	1	33	1	7	19	-	5				25	-	3				31	1	1
n				49	3	6							54	3	7						
o				29	1	1							53	2	5						
p										27	2	1									
q																			21	2	2



En cuanto al tamaño, los pelos de cada estructura tuvieron varios tamaños en varios de los pliegos pertenecientes a cada taxón y no predominaron en ningún caso aquellos con una longitud de 0,5 mm (Tabla 9). Sin embargo, el tamaño si fue uniforme ( $\ll$  0,5 mm) en los frutos, en las brácteas de los pliegos de la subsp. *atlantica* y en el cáliz de los correspondientes a *C. atlantica*.

La disposición del indumento fue mayoritariamente adpresa para los tres taxones en los foliolos y fruto y subadpresa en el cáliz. En el tallo y raquis, aunque la disposición predominante también fue la adpresa, también se presentaron las otras consideradas si bien en menor número de casos (la disposición subpatente fue, de largo, la más escasa). En las estípulas y brácteas, los casos en que el indumento se distribuía por toda la lámina, la disposición más común fue la adpresa, si bien en las brácteas de la subsp. *gallica* la disposición subadpresa fue también muy abundante. En estas estructuras lo más general fue encontrar el indumento distribuido por el margen, la porción apical de éste o en ambas localizaciones. Dentro de los foliolos, sólo en la subsp. *gallica* fueron abundantes los casos en los que el nervio central concentraba el indumento. Lo mismo ocurrió con el fruto y la sutura ventral (Tabla 9).

#### 4.2.1.2. Tallo.

La presencia de un patrón de descortezamiento (TAL#1) fue predominante en los tres taxones (Tabla 10). Sólo apareció en todos los casos en la subsp. *atlantica*, mientras que la frecuencia en la subsp. *gallica* fue mayor que en *C. atlantica* (ca. 75 % y 57 %, respectivamente).

La mayor variabilidad respecto al color del tallo (TAL#2) se dio en *C. atlantica* ya que presentó todos los estados posibles. El color negro (estado 3) sólo apareció en una ocasión y sólo en este taxón. Los colores pardo y gris (únicos presentes en la subsp. *atlantica*) fueron los predominantes, pero mientras que el gris fue mayoritario en la subsp. *gallica*, en *C. atlantica* apareció con la misma frecuencia que el pardo. El color verde fue proporcionalmente más abundante en este mismo taxón que en la subsp. *gallica* (Tabla 10).

#### 4.2.1.3. Estípulas.

En la subsp. *gallica* y *C. atlantica*, la forma de las estípulas (EST#1) fue predominantemente triangular. Las demás formas, también presentes en estos taxones (excepto la forma ovada -estado 4- en la subsp. *gallica*), aparecieron con una frecuencia mucho menor. La subsp. *atlantica* presentó las estípulas de forma triangular y ovada / lanceolada con igual frecuencia; esta subespecie presentó estípulas triangular / lanceoladas en un solo pliegue (Tabla 10).

Los tres taxones presentaron los tres estados posibles en el carácter color de las estípulas (EST#2). El color más frecuente fue el verde en la subsp. *gallica* y en *C. atlantica* aunque el color pardo (estado 1), el predominante en las estípulas de la subsp. *atlantica*, también fue muy frecuente en ambos taxones, de forma más acusada en la subsp. *gallica* que en *C. atlantica*. Las estípulas de color negro fueron las menos frecuentes en los tres taxones (Tabla 10).

La longitud media de las estípulas (EST#3) para el conjunto de los taxones estuvo comprendida entre 1,58 y 5,00 mm (extremos del intervalo de variación para *C. arborescens* subsp. *gallica*) con un valor medio en torno a los 2,50 mm. Para la subsp. *atlantica* y *C. atlantica*, la longitud media fue muy similar y algo inferior, a su vez, a la de la subsp. *gallica*. La anchura media (EST#4) de las estípulas fue de ca. 1,35 mm, desde un valor mínimo de 0,75 a otro máximo de 2,50 mm (otra vez el intervalo de variación de la subsp. *gallica*). Mientras que el valor medio para la subsp. *gallica* y *C. atlantica* fue muy similar, fue algo mayor para la subsp. *atlantica*. La relación longitud / anchura (EST#5) llegó hasta un valor medio de 2,00 para la subsp. *gallica* mientras que para los otros dos taxones esta relación fue algo inferior (ca. 1,75). El intervalo de variación de este carácter en la subsp. *gallica* fue más de dos veces el intervalo correspondiente a los otros taxones (Tabla 11).

#### 4.2.1.4. Ambito.

Respecto a la forma de la hoja (AMB#1) *C. atlantica* fue el taxón más variable ya que presentó hojas con las cuatro formas consideradas; la forma más frecuente fue la elíptica, al igual que en la subsp. *gallica*. En esta subespecie aparecieron todas las formas excepto la ovada / lanceolada (estado 2). La subsp. *atlantica* fue el taxón menos variable ya que en todos los casos presentó hojas lanceoladas (Tabla 10).

Aunque la longitud media del ámbito (AMB#2) para la subsp. *gallica* y *C. atlantica* fue muy similar, el intervalo de variación para esta última fue más estrecho y contó, además, con el valor máximo. La subsp. *atlantica*, por su parte, mostró una longitud media de la hoja un 10% superior. El valor medio más bajo para la anchura de la hoja (AMB#3) se presentó en *C. atlantica* y fue muy similar para los otros dos taxones. El intervalo de variación para este carácter fue, a su vez, muy semejante entre la subsp. *atlantica* y *C. atlantica* (Tabla 11).

La relación longitud / anchura de la hoja (AMB#4) resultó muy similar para la subsp. *atlantica* y *C. atlantica*: las hojas fueron, por término medio, dos veces más largas que anchas. En *C. arborescens* subsp. *gallica* esta relación no llegó a este

valor (1,86) aunque su intervalo de variación para este carácter incluyó los extremos de variación para el conjunto de los taxones (Tabla 11).

#### 4.2.1.5. Foliolos.

Con respecto a la forma de los foliolos (FOL#2), la subsp. *gallica* mostró la máxima variabilidad. Los tres taxones, de forma mayoritaria, presentaron hojas con foliolos elípticos y elíptico / obovados (estados 0 y 1). Hojas compuestas exclusivamente por foliolos obovados aparecieron, en bajo número, en *C. atlantica* y en la subsp. *gallica*. Sólo esta subespecie, también en bajo número, se encontraron hojas con foliolos circular / elípticos (estado 2) y con foliolos circular / obovados (estado 4). La subsp. *atlantica* fue el taxón menos variable respecto a este carácter (Tabla 10).

La forma del ápice del foliolo terminal (FOL#3) fue predominantemente redondeado a lo largo de los tres taxones. No obstante, la forma obcordada no fue rara, presentándose en aproximadamente un 20 % de los casos correspondientes a la subsp. *gallica* y *C. atlantica* (Tabla 10).

Los foliolos de los tres taxones considerados presentaron un mucrón (FOL#8) menor de 1 mm (Tabla 10). En los pocos casos en que éste no estuvo presente, fue bien visible la cicatriz dejada al desprenderse. Se pudo observar cómo en las hojas de más edad con foliolos de ápice obcordado, el mucrón tendía a empardecer antes de caerse.

En cuanto al número de foliolos (FOL#1), la subsp. *gallica* y *C. atlantica* tuvieron 9 como valor más frecuente (moda). De los cinco pliegos correspondientes a la subsp. *atlantica*, dos mostraron cinco o más pares de foliolos (11 foliolos por hoja, Tabla 11).

El valor medio de la longitud del foliolo terminal (FOL#4) más elevado estuvo en la subsp. *gallica*, seguido de los correspondientes a la subsp. *atlantica* y a *C. atlantica*. Este esquema se repitió para la anchura (FOL# 5) y fue justo el contrario para la relación longitud / anchura (FOL#10). En lo que respecta a estos caracteres, pero referidos a los foliolos laterales (FOL#6, FOL#7 y FOL#11, respectivamente), se repitió la situación antes comentada. Destaca el hecho de que los valores de relación longitud / anchura resultaran menores para el foliolo terminal que para los laterales. Habida cuenta que los valores para los respectivos caracteres de longitud fueron muy similares, los valores de anchura resultaron significativamente más pequeños para los foliolos no centrales (Tabla 11).

#### 4.2.1.6. Brácteas.

Los tres taxones presentaron la panoplia completa de formas consideradas en las brácteas (BRA#1). Tanto en la subsp. *gallica* como en *C. atlantica* la forma predominante fue la ovadolanceolada; las demás formas fueron mucho menos frecuentes en estos taxones, si bien las brácteas lanceoladas y las triangulares no fueron raras en la subsp. *gallica* y *C. atlantica*, respectivamente. La subsp. *atlantica*, por su parte, no tuvo una forma claramente predominante (Tabla 10).

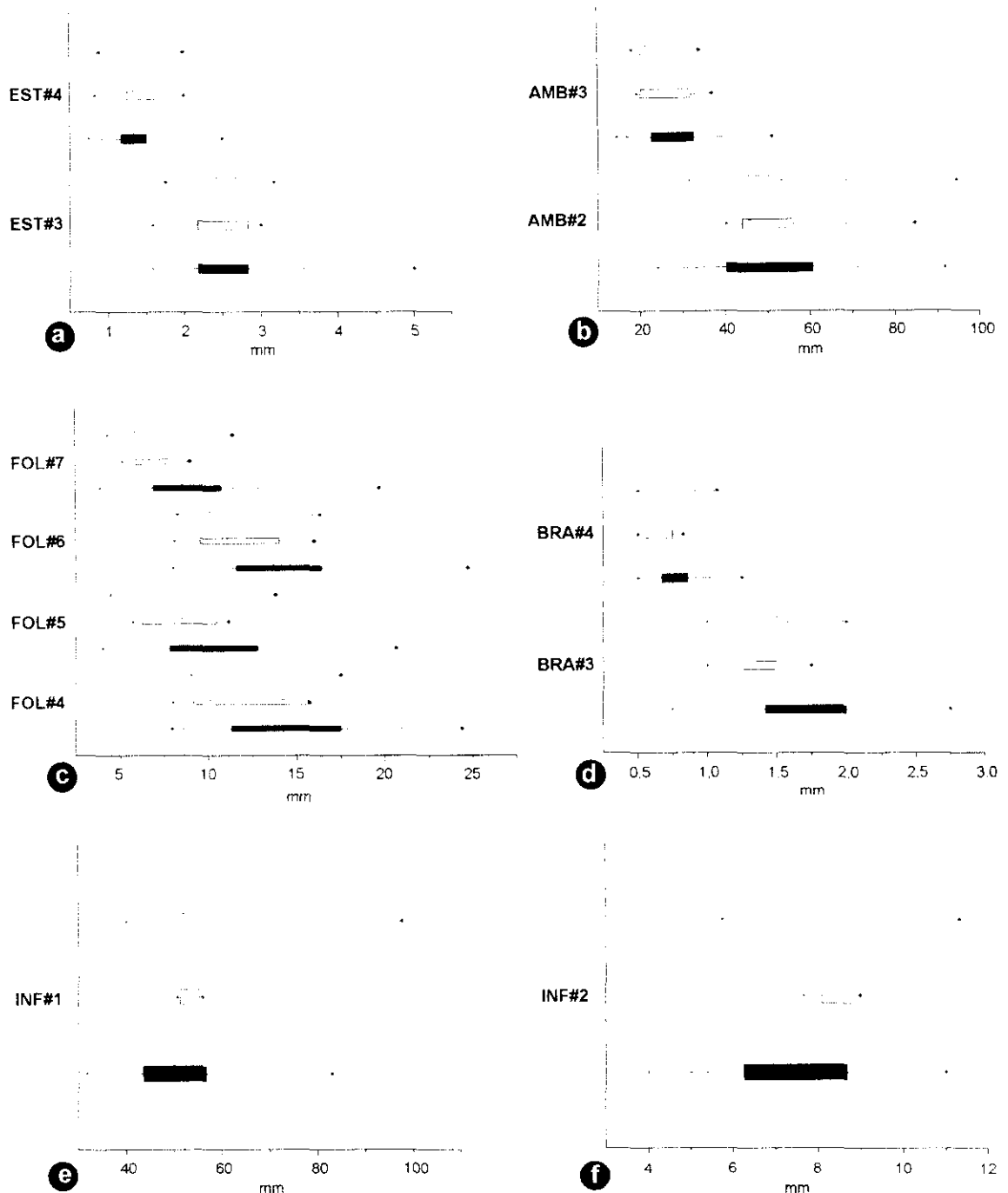
El margen de las brácteas (BRA#2) fue generalmente entero (Tabla 10). Aparte de un caso de la subsp. *atlantica*, sólo dentro de la subsp. *gallica* se encontraron brácteas con el margen no entero. Se encontraron "penachos" de pelos ocupando el margen de la bráctea.

Las brácteas resultaron muy similares en la subsp. *gallica* y *C. atlantica* en las dos dimensiones estudiadas (BRA#3 y BRA#4) y sólo ligeramente más pequeñas en la subsp. *atlantica*. Así, la relación longitud / anchura (BRA#6) apenas difirió en los tres taxones: las brácteas fueron, como media, algo más de dos veces más largas que anchas (Tabla 11).

#### 4.2.1.7. Inflorescencia.

El mayor tamaño medio de la inflorescencia (INF#1) se encontró en los pliegos correspondientes a *C. atlantica*. Contando con el mayor intervalo, la subsp. *gallica* mostró el menor valor para este carácter. La subsp. *atlantica* mostró un valor intermedio y un intervalo de variación muy estrecho (Tabla 11).

El valor medio más elevado de la longitud del pedicelo floral (INF#2) se presentó en la subsp. *atlantica*, si bien, dentro del menor de los intervalos de variación. Los otros dos taxones mostraron valores similares aunque el intervalo de variación fue mayor en la subsp. *gallica* que en *C. atlantica* (Tabla 11).



**Figura 10.** Boxplots correspondientes a los caracteres continuos de las estípulas (a), del ámbito (b), de los folíolos (c), de las brácteas (d) y de la inflorescencia (e) - (f). Ver apartado 3.2.1.2. para la definición de los caracteres. □: *C. atlantica*; □: *C. arborescens subsp. atlantica*; ■: *C. arborescens subsp. gallica*.

#### 4.2.1.8. Flor.

En general, de un número relativamente elevado de flores producidas, sólo una fracción llega a desarrollarse completamente. Durante el trabajo de campo se pudo comprobar cómo las inflorescencias jóvenes mostraban un gran número de botones florales de los que pocos conseguían desarrollarse por completo, bien por aborto, bien por servir de alimento a diferentes insectos. Así, el número medio de flores (FLO#1) en cada pliego resultó relativamente bajo (Tabla 11). El número medio estuvo entre las dos y tres flores en los tres taxones, aunque en la subsp. *gallica* y *C. atlantica* no fueron raros los pliegos con racimos de más de tres flores.

##### 4.2.1.8.1. Cáliz.

Para los tres taxones, el cáliz presentó un aspecto casi rectangular ya que la relación longitud / anchura (FLO#11) estuvo muy próxima a la unidad en los tres casos aunque fue algo superior en *C. atlantica*. Este taxón presentó una longitud media (FLO#2) netamente superior mientras que las subsp. *gallica* y *atlantica* mostraron valores similares. En lo que respecta a la anchura (FLO#3), la subsp. *gallica* presentó el valor medio más bajo, siendo similar para los otros taxones (Tabla 11).

Con objeto de probar la hipótesis de que los dientes del cáliz seguían un esquema de dos pequeños + tres grandes, con la matriz de datos correspondientes a estos caracteres (FLO#5 - FLO#9) se realizaron diversos análisis de varianza (ANOVA, proc ONEWAY) con los siguientes resultados:

● Matriz conjunta:

ANOVA				
Fuente	DF	SS	MS	F
Dientes	4	4,6110	1,1528	5,8741
Error	160	31,3987	0,1962	
Total	164	36,0097		

**TEST DE DUNCAN**  
(nivel 0,05)

Media	Dientes	FLO#9	FLO#5	FLO#8	FLO#6	FLO#7
1,2197	FLO#9					
1,2300	FLO#5					
1,4797	FLO#8	★	★			
1,5082	FLO#6	★	★			
1,6485	FLO#7	★	★			

★ denota pares de grupos que difieren significativamente.

El análisis de varianza de la matriz conjunta de las longitudes de los cinco dientes resultó en la separación clara en dos subconjuntos: a) FLO#9 - FLO#5 y b) FLO#6 - FLO#7 - FLO#8.

● Entre taxones:

ANOVA				
FLO#5				
Fuente	DF	SS	MS	F
Taxones	2	0,1793	0,0896	0,5827
Error	30	4,6149	0,1538	
Total	32	4,7942		
FLO#6				
Fuente	DF	SS	MS	F
Taxones	2	0,0786	0,0393	0,2026
Error	30	5,8157	0,1939	
Total	32	5,8943		
FLO#7				
Fuente	DF	SS	MS	F
Taxones	2	0,0505	0,0252	0,0645
Error	30	11,7282	0,3909	
Total	32	11,7786		
FLO#8				
Fuente	DF	SS	MS	F
Taxones	2	0,0104	0,0052	0,0267
Error	30	5,8683	0,1956	
Total	32	5,8787		
FLO#9				
Fuente	DF	SS	MS	F
Taxones	2	0,0067	0,0033	0,0328
Error	30	3,0462	0,1015	
Total	32	3,0529		

Del análisis de varianza se pudo concluir que no existían diferencias significativas en la longitud de los dientes del cáliz entre los taxones considerados.

● Dentro de cada taxón:

*C. arborescens* subsp. *gallica*

ANOVA				
Fuente	DF	SS	MS	F
Dientes	4	2,6688	0,6672	2,4755
Error	95	25,6050	0,2695	
Total	99	28,2738		

**TEST DE DUNCAN**

(nivel 0,05)

Media	Dientes	FLO#9	FLO#5	FLO#8	FLO#6	FLO#7
1,2160	FLO#9					
1,2780	FLO#5					
1,4940	FLO#8					
1,5435	FLO#6					
1,6485	FLO#7	★	★			

★ denota pares de grupos que difieren significativamente.

*C. arborescens subsp. atlantica***ANOVA**

Fuente	DF	SS	MS	F
Dientes	4	0,2639	0,0660	0,4908
Error	15	2,0166	0,1344	
Total	19	2,2805		

*C. atlantica***ANOVA**

Fuente	DF	SS	MS	F
Dientes	4	1,9139	0,4785	5,5447
Error	40	3,4518	0,0863	
Total	44	5,3657		

**TEST DE DUNCAN**

(nivel 0,05)

Media	Dientes	FLO#5	FLO#9	FLO#8	FLO#6	FLO#7
1,1100	FLO#5					
1,2111	FLO#9					
1,4589	FLO#8	★				
1,4767	FLO#6	★				
1,6900	FLO#7	★	★			

★ denota pares de grupos que difieren significativamente.

Del análisis de varianza y test de Duncan de las longitudes de los dientes del cáliz dentro de cada taxón en la subsp. *atlantica* no se detectaron diferencias significativas. En la subsp. *gallica* se detectaron dos subgrupos; el primero contó con los dientes 4 y 2 además de los dientes 1 y 5 que como se recordará eran los integrantes del primer subconjunto detectado en la matriz conjunta. El segundo subconjunto es idéntico al segundo obtenido por el análisis de la matriz conjunta. De



los tres subconjuntos encontrados para *C. atlantica*, el 1º y el 3º coinciden con los hallados en la matriz conjunta mientras que el segundo relaciona el diente número 5 con el 4 y el 2.

En general, la relación longitud media de los dientes / longitud del cáliz (FLO#12) fue bastante similar para los tres taxones. Se hizo máxima en *C. atlantica* alcanzando casi un factor de cinco mientras que para los otros taxones se situó por encima de cuatro, siendo sólo ligeramente superior en la subsp. *gallica* (Tabla 11).

Respecto al color de la flor (FLO#13) en la subsp. *gallica* y *C. atlantica*, ambos estados de este carácter se presentaron, aproximadamente, con la misma frecuencia. Dentro de la subsp. *atlantica* las flores presentaron el color amarillo exclusivamente (Tabla 10).

Cuando se calculó la frecuencia de los estados del indumento del ovario (FLO#14), se comprobó que, a diferencia de la subsp. *atlantica* y *C. atlantica*, en los que predominaron las flores con ovario pubescente, en la subsp. *gallica* el estado más frecuente correspondió al que describía un indumento predominantemente en la sutura. Sólo en esta subespecie se observó la presencia de flores con el ovario glabrescente (Tabla 10). En ningún caso el indumento impidió ver las paredes del ovario.

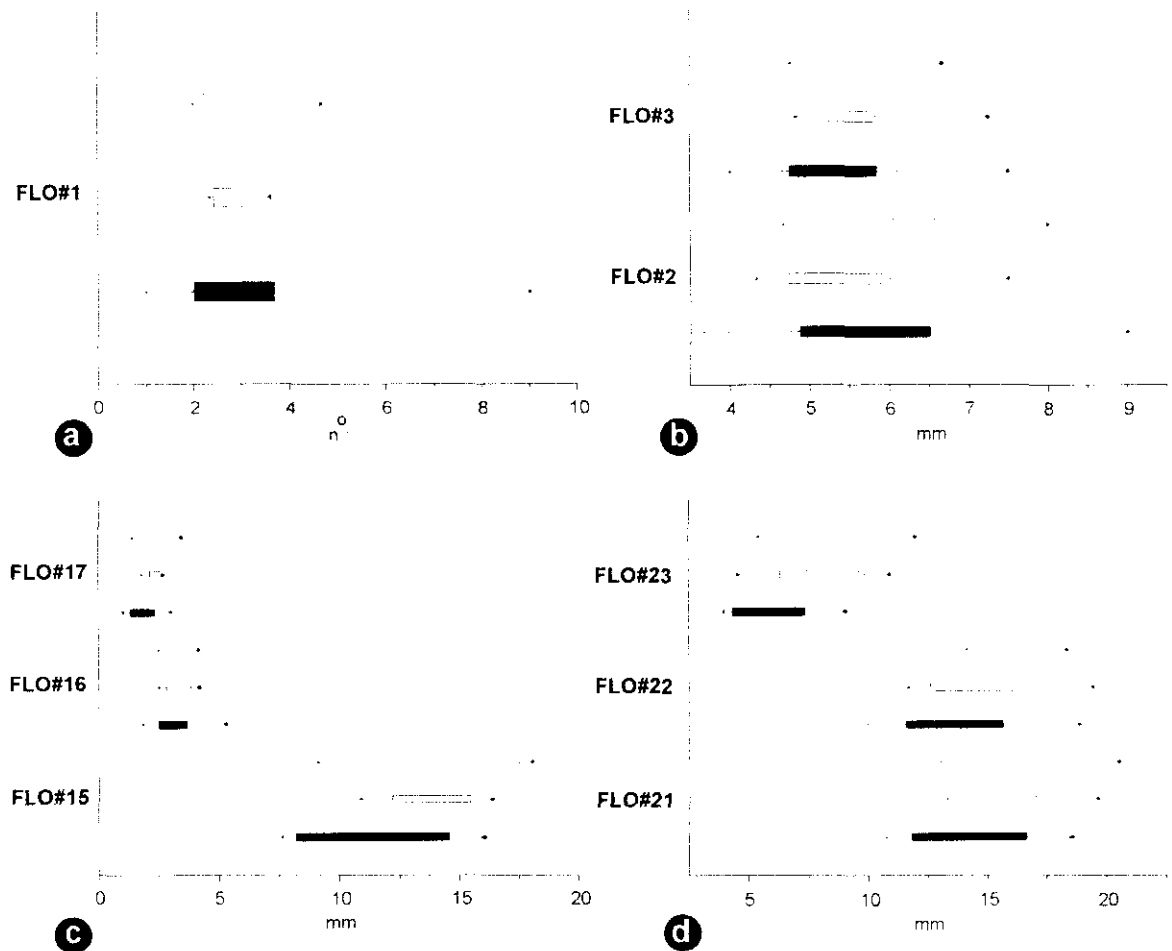
#### 4.2.1.8.2. Alas.

El valor medio de la longitud de las alas (FLO#15) de la subsp. *atlantica* fue intermedio respecto a los de *C. atlantica* que mostró el valor máximo y la subsp. *gallica* que presentó el mínimo. La anchura media de las alas (FLO#16) fue similar en los tres casos. Tanto la subsp. *atlantica* como *C. atlantica* tuvieron espolones de más de 2 mm (FLO#17) mientras que la subsp. *gallica* no alcanzó este valor. A su vez, fue en esta subespecie donde los espolones nacían más próximas a la base del ala (FLO#18). En lo que respecta al ángulo formado por el espolón respecto del ala (FLO#19), éste fue netamente más agudo en la subsp. *atlantica* y *C. atlantica* que en la subsp. *gallica*. En esta subespecie, la relación longitud / anchura (FLO#20) fue inferior a cuatro, valor que la subsp. *atlantica* y *C. atlantica* superaron (Tabla 11).

#### 4.2.1.8.3. Estandarte.

Los valores medios de longitud, anchura y longitud de la uña del estandarte (FLO#21, FLO#22 y FLO#23, respectivamente) fueron superiores en la subsp. *atlantica* y *C. atlantica* que los encontrados en la subsp. *gallica*. Sin embargo, la

relación longitud / anchura (FLO#24) se situó en torno a la unidad para los tres taxones considerados (Tabla 11).



**Figura 11.** Boxplots correspondientes a caracteres continuos de las flores: (a) número de flores, (b) cáliz, (c) alas y (d) estandarte. Ver apartado 3.2.1.2. para la definición de los caracteres. □: *C. atlantica*; ◻ : *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ■ : *C. arborescens* subsp. *gallica*.

#### 4.2.1.8.4. Quilla.

Los valores medios para la longitud y anchura de la quilla (FLO#25 y FLO#26, respectivamente) resultaron más bajos en la subsp. *gallica* y muy similares para los otros dos taxones, aunque algo más bajos para la subsp. *atlantica*. La relación longitud / anchura (FLO#30) fue muy similar para los tres taxones considerados. Aunque la longitud media del espolón de la quilla (FLO#27) fue de una longitud similar en los tres taxones, su origen respecto a la base de la quilla (FLO#28) estuvo a mayor distancia en *C. atlantica* que en la subsp. *gallica*, situándose en posición intermedia en la subsp. *atlantica*. El ángulo formado por el espolón respecto de la quilla (FLO#29) fue muy similar entre las subsp. *gallica* y *atlantica*, resultando en éstas mayor que en *C. atlantica* (Tabla 11).

#### 4.2.1.8.5. Columna estaminal.

Mientras que la anchura de la columna estaminal (FLO#32) resultó en valor medio muy similar para los tres taxones considerados, la longitud de ésta (FLO#31) fue netamente superior en *C. atlantica*. La subsp. *atlantica* mostró un valor intermedio para este carácter (Tabla 11).

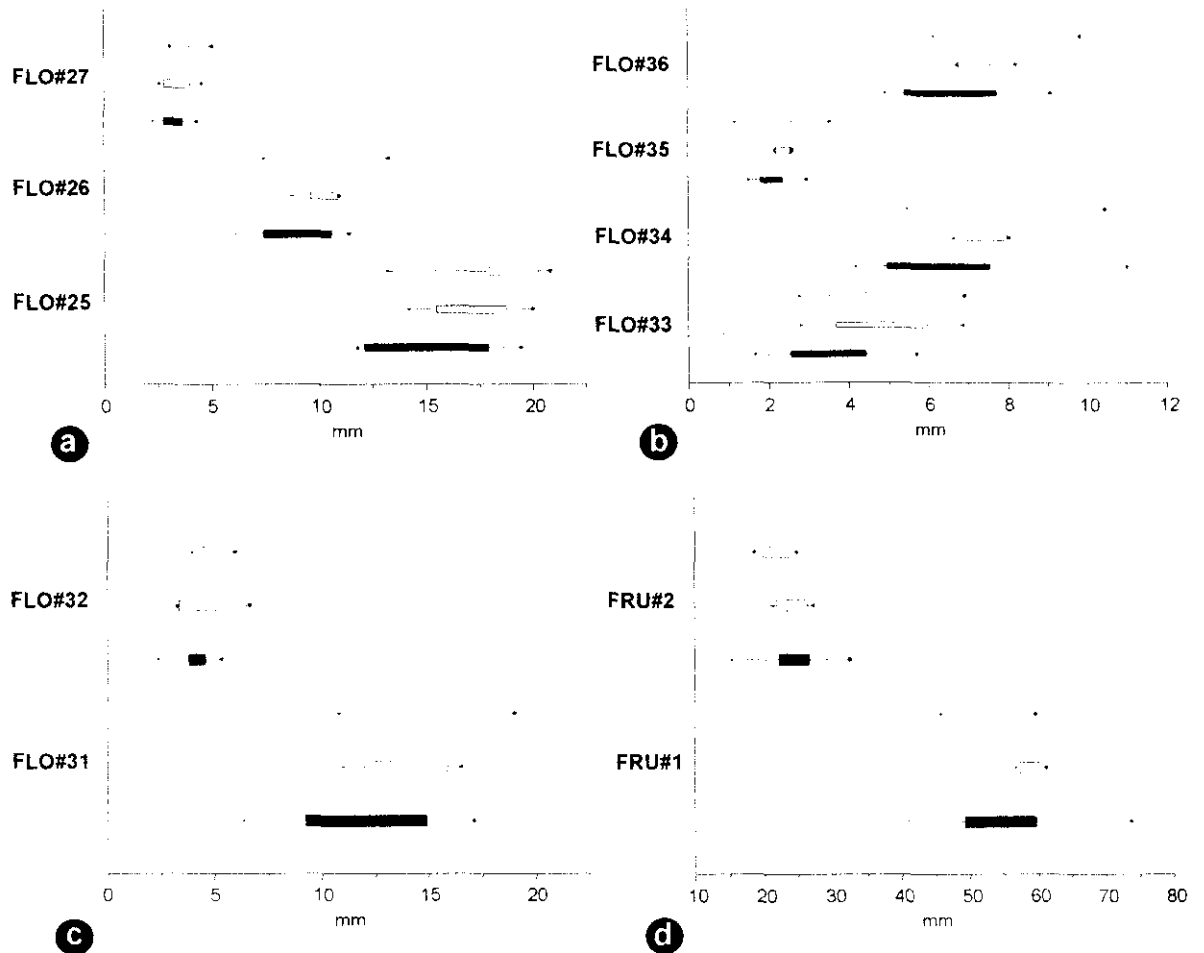
#### 4.2.1.8.6. Pistilo.

La longitud del ginóforo (FLO#33) fue netamente inferior en la subsp. *gallica* a los valores (muy similares) encontrados en la subsp. *atlantica* y *C. atlantica*. Lo mismo se encontró para el siguiente carácter, longitud del ovario (FLO#34). En lo que respecta a la anchura del ovario (FLO#35), los valores encontrados para la subsp. *atlantica* y *C. atlantica* fueron idénticos y sólo ligeramente inferior para la subsp. *gallica*. Para los otros caracteres considerados en el ovario (FLO#36 y FLO#37), los valores mínimos correspondieron a la subsp. *gallica* y los máximos, a *C. atlantica*, situándose la subsp. *atlantica* en una posición intermedia.

#### 4.2.1.9. Fruto.

La longitud media de los frutos (FRU#1) se situó por encima de los 50 mm, siendo la menor la correspondiente a *C. atlantica*. La anchura media (FRU#2) fue muy similar para las dos subespecies e inferior a la de los frutos de *C. atlantica*. La relación longitud / anchura (FRU#4) estuvo por encima de 2 en los tres casos: en torno a 2,40 para la subsp. *atlantica* y *C. atlantica* y algo inferior para la subsp. *gallica* (Tabla 11).

En los tres taxones considerados, los frutos conservaron mayoritariamente el estilo persistente en su madurez (FRU#3). El mal estado de conservación de algunos pliegos impidió la observación de este carácter indubitadamente, por lo que se optó por codificar en estos casos el estado 0 (Tabla 10).



**Figura 12.** *Boxplots* correspondientes a caracteres continuos de las flores y los frutos: (a) quilla, (b) pistilo, (c) columna estaminal y (d) fruto. Ver apartado 3.2.1.2. para la definición de los caracteres. □: *C. atlantica*; □: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ■: *C. arborescens* subsp. *gallica*.

**Tabla 10.** Análisis morfológico. Caracteres cualitativos. Frecuencias absolutas por taxón y estado. n= tamaño muestral. Para la definición de los estados y sus caracteres, ver apartado 3.2.1.2.

Carácter	Estado	subsp. <i>gallica</i>	subsp. <i>atlantica</i>	<i>C. atlantica</i>
		n	87	5
TAL#1	1	65	5	8
	0	22	-	6
TAL#2	0	5	-	3
	1	24	3	5
	2	58	2	5
	3	-	-	1
EST#1	0	58	2	7
	1	9	1	2
	2	8	-	1
	3	12	2	3
	4	-	-	1
EST#2	0	45	1	6
	1	36	3	5
	2	6	1	3
AMB#1	0	59	-	9
	1	4	4	1
	2	-	-	1
	3	10	-	1
FOL#2	0	40	3	6
	1	34	2	6
	2	4	-	-
	3	6	-	2
	4	3	-	-
FOL#3	0	62	3	8
	1	16	1	3
	2	9	1	3
FOL#8	1	80	4	14
	0	7	1	-
BRA#1	0	41	1	7
	1	19	2	2
	2	11	1	3
	3	10	1	1
BRA#2	1	53	3	12
	0	23	1	-

(Continúa)

FLO#13		<b>n</b>	<b>39</b>	<b>4</b>	<b>9</b>
	1		19	4	5
	0		20	-	4
FLO#14		<b>n</b>	<b>20</b>	<b>4</b>	<b>9</b>
	0		10	1	3
	1		7	3	6
	2		3	-	-
FRU#3		<b>n</b>	<b>53</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
	1		42	3	4
	0		10	-	1

**Tabla 11.** Análisis morfológico. Caracteres cuantitativos. Se indica el valor medio ( $\bar{x}$ ), el error *standard* (E.S.) y los valores mínimo (*mín.*) y máximo (*máx.*) observado en cada carácter de los tres taxones de *Colutea* estudiados. *n*= tamaño muestral. Para la definición de los caracteres, ver apartado 3.2.1.2.

Carácter	subsp. <i>gallica</i>		subsp. <i>atlantica</i>		<i>C. atlantica</i>	
	$\bar{x} \pm$ E.S.	Intervalo mín. - max.	$\bar{x} \pm$ E.S.	Intervalo mín. - max.	$\bar{x} \pm$ E.S.	Intervalo mín. - max.
	n= 87		n= 5		n= 14	
EST#3	2,64 ± 0,07	1,58 - 5,00	2,39 ± 0,25	1,58 - 3,00	2,36 ± 0,13	1,75 - 3,17
EST#4	1,34 ± 0,03	0,75 - 2,50	1,41 ± 0,20	0,83 - 2,00	1,36 ± 0,08	0,88 - 2,00
EST#6	2,02 ± 0,06	1,11 - 4,75	1,82 ± 0,29	1,19 - 2,61	1,75 ± 0,08	1,25 - 2,27
AMB#2	50,47 ± 1,50	24,00 - 91,67	55,73 ± 7,82	40,25 - 84,75	49,49 ± 4,21	31,33 - 94,50
AMB#3	27,91 ± 0,84	14,50 - 51,00	28,03 ± 3,57	19,17 - 37,00	23,21 ± 1,31	18,00 - 34,00
AMB#4	1,86 ± 0,05	1,20 - 3,90	2,05 ± 0,24	1,38 - 2,80	2,15 ± 0,14	1,44 - 2,99
FOL#1	8,27 ± 0,15	5,00 - 11,67	10,16 ± 0,95	7,00 - 12,00	9,58 ± 0,38	7,00 - 11,86
FOL#4	14,55 ± 0,42	7,94 - 24,38	12,02 ± 1,61	8,00 - 15,75	11,30 ± 0,73	9,00 - 17,50
FOL#5	10,49 ± 0,37	4,00 - 20,63	8,07 ± 1,14	5,75 - 11,17	7,11 ± 0,69	4,50 - 13,83
FOL#6	14,15 ± 0,39	8,00 - 24,70	12,18 ± 1,47	8,08 - 16,00	11,11 ± 0,57	8,25 - 16,33
FOL#7	8,95 ± 0,29	3,92 - 19,70	6,85 ± 0,70	5,17 - 9,00	6,44 ± 0,53	4,33 - 11,42
FOL#10	1,43 ± 0,02	1,11 - 2,36	1,50 ± 0,09	1,37 - 1,84	1,64 ± 0,06	1,25 - 2,00
FOL#11	1,62 ± 0,02	1,22 - 2,27	1,77 ± 0,10	1,56 - 2,13	1,78 ± 0,07	1,43 - 2,41
	n= 80		n= 5		n= 13	
BRA#3	1,64 ± 0,04	0,75 - 2,75	1,35 ± 0,13	1,00 - 1,75	1,52 ± 0,07	1,00 - 2,00
BRA#4	0,77 ± 0,02	0,50 - 1,25	0,67 ± 0,07	0,50 - 0,83	0,75 ± 0,04	0,50 - 1,08
BRA#6	2,18 ± 0,05	1,33 - 3,45	2,06 ± 0,16	1,67 - 2,50	2,07 ± 0,10	1,50 - 2,67
	n= 52		n= 3		n= 8	
INF#1	50,68 ± 1,78	31,67 ± 83,00	54,05 ± 2,66	51,83 ± 56,00	57,34 ± 6,33	47,50 - 97,67

(Continúa)

	n= 64		n= 3		n= 11	
INF#2	7,22 ± 0,20	4,00 - 11,00	8,45 ± 0,15	7,67 - 9,00	7,75 ± 0,48	5,75 - 11,33
	n= 61		n= 4		n= 11	
FLO#1	2,87 ± 0,17	1,00 - 6,33	2,76 ± 0,29	2,33 - 3,60	2,71 ± 0,29	2,00 - 4,67
	n= 65		n= 5		n= 14	
FLO#2	5,74 ± 0,15	3,67 - 9,00	5,68 ± 0,56	4,33 - 7,50	6,58 ± 0,28	4,67 - 8,00
FLO#3	5,29 ± 0,10	4,00 - 7,50	5,77 ± 0,41	4,83 - 7,25	5,68 ± 0,18	4,75 - 6,67
FLO#11	1,09 ± 0,02	0,62 - 1,45	0,98 ± 0,05	0,82 - 1,12	1,16 ± 0,03	0,93 - 1,33
	n= 20		n= 4		n= 9	
FLO#5	1,29 ± 0,01	0,55 - 2,53	1,26 ± 0,15	1,07 - 1,71	1,11 ± 0,09	0,71 - 1,47
FLO#6	1,54 ± 0,11	0,80 - 2,89	1,40 ± 0,19	0,95 - 1,88	1,48 ± 0,11	0,95 - 2,09
FLO#7	1,65 ± 0,16	0,69 - 3,17	1,56 ± 0,30	0,96 - 2,39	1,69 ± 0,13	1,07 - 2,36
FLO#8	1,49 ± 0,12	0,64 - 2,96	1,46 ± 0,12	1,21 - 1,77	1,46 ± 0,05	1,26 - 1,67
FLO#9	1,25 ± 0,08	0,58 - 2,10	1,26 ± 0,07	1,09 - 1,42	1,21 ± 0,09	0,87 - 1,67
FLO#10	1,44 ± 0,09	0,76 - 2,58	1,39 ± 0,12	1,09 - 1,59	1,39 ± 0,08	1,02 - 1,81
FLO#12	4,67 ± 0,37	2,57 - 8,58	4,38 ± 0,59	2,72 - 5,50	4,95 ± 0,32	3,28 - 6,43
FLO#15	10,83 ± 0,73	7,65 - 16,08	13,81 ± 1,15	10,88 - 16,37	15,44 ± 0,93	9,10 - 18,05
FLO#16	3,03 ± 0,19	1,82 - 5,27	3,30 ± 0,35	2,48 - 4,18	3,30 ± 0,21	2,45 - 4,15
FLO#17	1,80 ± 0,15	1,02 - 3,01	2,38 ± 0,20	1,79 - 2,69	2,79 ± 0,22	1,41 - 3,46
FLO#18	3,24 ± 0,26	1,96 - 5,56	4,32 ± 0,52	2,86 - 5,17	4,83 ± 0,42	2,08 - 6,18
FLO#19	29,23 ± 2,37	4,61 - 48,65	21,45 ± 6,75	6,83 - 39,43	17,17 ± 2,41	7,02 - 30,45
FLO#20	3,65 ± 0,20	2,17 - 5,91	4,23 ± 0,19	3,92 - 4,68	4,74 ± 0,27	3,40 - 6,00
FLO#21	13,85 ± 0,59	10,76 - 18,59	16,31 ± 1,30	13,30 - 19,64	17,86 ± 0,84	13,05 - 20,53
FLO#22	13,46 ± 0,55	9,97 - 18,87	15,06 ± 1,67	11,67 - 19,45	16,47 ± 0,57	14,14 - 18,35
FLO#23	5,88 ± 0,40	3,95 - 9,06	8,08 ± 1,32	4,55 - 10,91	8,69 ± 0,69	5,42 - 12,00
FLO#24	1,03 ± 0,02	0,84 - 1,20	1,10 ± 0,05	1,01 - 1,20	1,08 ± 0,04	0,91 - 1,26
FLO#25	14,39 ± 0,65	11,80 - 19,44	17,12 ± 1,19	14,20 - 20,00	18,56 ± 0,79	13,23 - 20,83
FLO#26	8,76 ± 0,39	6,12 - 11,41	10,26 ± 0,51	8,76 - 10,97	10,98 ± 0,53	7,45 - 13,27
FLO#27	3,27 ± 0,13	2,28 - 4,35	3,36 ± 0,44	2,58 - 4,58	3,74 ± 0,22	3,07 - 5,07
FLO#28	6,84 ± 0,48	4,57 - 10,72	8,89 ± 0,74	6,76 - 9,92	10,04 ± 0,72	5,79 - 12,88
FLO#29	38,37 ± 3,72	9,00 - 62,64	37,24 ± 7,37	16,69 - 50,55	27,23 ± 5,09	7,31 - 61,39
FLO#30	1,65 ± 0,03	1,43 - 2,05	1,67 ± 0,08	1,53 - 1,91	1,70 ± 0,04	1,55 - 1,88
FLO#31	11,50 ± 0,72	6,33 - 17,09	14,14 ± 1,18	11,01 - 16,54	16,09 ± 0,83	10,81 - 19,02
FLO#32	4,12 ± 0,15	2,37 - 5,33	4,29 ± 0,80	3,24 - 6,66	4,64 ± 0,22	3,91 - 5,96
FLO#33	3,42 ± 0,26	1,67 - 5,70	4,82 ± 0,84	2,81 - 6,88	4,68 ± 0,46	2,77 - 6,92
FLO#34	6,33 ± 0,39	4,19 - 11,03	7,42 ± 0,34	6,62 - 8,04	8,27 ± 0,50	5,46 - 10,44
FLO#35	2,08 ± 0,08	1,50 - 2,95	2,37 ± 0,12	2,14 - 2,61	2,37 ± 0,23	1,17 - 3,55
FLO#36	6,59 ± 0,29	4,92 - 9,09	7,17 ± 0,35	6,73 - 8,22	8,31 ± 0,32	6,16 - 9,85
FLO#37	4,75 ± 0,27	3,42 - 7,33	5,15 ± 0,32	4,29 - 5,83	6,05 ± 0,82	3,82 - 11,68
	n= 53		n= 3		n= 5	
FRU#1	54,50 ± 1,12	41,25 - 74,00	59,17 ± 1,30	57,00 - 61,00	50,83 ± 2,56	46,00 - 60,00
FRU#2	24,44 ± 0,56	15,50 - 32,75	24,22 ± 1,75	21,50 - 27,50	21,55 ± 1,28	18,75 - 25,00
FRU#4	2,26 ± 0,04	1,67 - 3,09	2,46 ± 0,12	2,24 - 2,65	2,40 ± 0,19	1,87 - 2,86

## 4.2.2. ANALISIS MULTIVARIANTE.

**Tabla 12.** Valores de los caracteres empleados en la revisión morfológica empleados en el análisis multivariante. La primera columna (en negrita) alude a la numeración de los pliegos (ver apartado 3.2.2.2). La primera fila (en negrita y mayúsculas) son las siglas que nombran los caracteres (para su definición, consultar apartado 3.2.1.2.).

●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ◆: *C. arborescens* subsp. *arborescens*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

	TAL#1	TAL#2	TAL#3	EST#1	EST#2	EST#3	EST#4	EST#5	EST#6
● 1	1	1	1	2	0	4,50	1,40	1	3,21
● 2	1	1	1	2	1	2,83	1,50	1	1,89
● 3	0	0	1	2	0	2,83	1,00	1	2,83
● 4	1	0	1	1	0	2,83	1,67	1	1,69
● 5	0	2	2	1	0	2,17	1,33	2	1,63
● 6	0	1	2	0	2	2,00	1,33	2	1,50
● 7	1	2	1	0	1	2,58	1,42	2	1,82
● 8	1	2	2	0	0	3,25	1,31	1	2,48
● 9	1	2	2	1	0	2,05	1,00	1	2,05
● 10	1	1	2	0	0	2,33	1,33	2	1,75
● 11	1	2	1	0	0	3,25	1,50	1	2,17
● 12	0	2	1	0	0	1,83	1,50	0	1,22
● 13	1	2	1	0	1	1,83	1,17	1	1,56
● 14	1	2	1	0	0	2,67	1,50	2	1,78
● 15	0	2	2	0	0	2,17	1,42	0	1,53
● 16	1	2	2	0	0	2,17	1,17	1	1,85
● 17	0	1	1	0	1	3,00	1,25	2	2,40
● 18	1	2	1	0	0	5,00	2,50	1	2,00
● 19	0	1	1	0	1	2,33	1,42	1	1,64
● 20	1	2	2	0	2	2,25	1,38	0	1,63
◆ 21	1	2	2	0	0	2,90	1,70	1	1,71
■ 22	1	1	2	1	1	2,17	0,83	1	2,61
■ 23	1	1	1	3	0	2,83	2,00	2	1,42
■ 24	1	2	2	0	1	3,00	1,25	1	2,40
■ 25	1	1	0	3	1	2,38	1,63	1	1,46
○ 26	1	3	1	3	2	2,00	0,88	2	2,27
○ 27	0	1	1	0	0	2,67	1,50	3	1,78
○ 28	1	2	2	4	0	2,50	2,00	1	1,25
○ 29	1	2	2	1	2	2,13	1,25	2	1,70
○ 30	1	2	1	3	1	1,94	1,31	0	1,48
○ 31	0	0	1	0	1	1,83	1,08	2	1,69
○ 32	0	1	1	0	0	3,00	1,50	0	2,00
○ 33	1	2	2	0	0	2,17	1,33	1	1,63
○ 34	1	1	1	0	0	3,17	1,83	1	1,73

(Continúa)



	AMB#1	AMB#2	AMB#3	AMB#4	AMB#5	FOL#1	FOL#2	FOL#3	FOL#4
● 1	0	33,00	19,00	1,74	1	5,00	3	0	14,00
● 2	0	49,67	30,67	1,62	0	7,00	1	1	16,67
● 3	0	47,75	32,00	1,49	1	7,00	0	0	14,25
● 4	0	52,00	31,33	1,66	0	8,33	0	0	16,17
● 5	0	61,00	32,00	1,91	1	11,00	1	0	14,00
● 6	1	47,67	18,50	2,58	1	11,00	2	1	9,67
● 7	0	39,83	18,50	2,15	1	8,33	1	2	9,83
● 8	--	49,33	23,00	2,14	1	11,67	0	0	10,33
● 9	--	39,00	26,67	1,46	1	7,00	1	0	13,33
● 10	0	43,67	27,67	1,58	1	6,33	1	0	15,33
● 11	3	61,63	47,50	1,30	1	6,00	3	0	24,38
● 12	0	33,00	18,50	1,78	1	11,00	1	0	8,00
● 13	0	32,50	15,00	2,17	1	9,00	0	2	8,50
● 14	0	37,50	17,00	2,21	1	8,00	1	1	10,00
● 15	0	46,50	22,50	2,07	1	7,00	1	0	15,50
● 16	3	37,67	23,00	1,64	1	7,00	0	0	16,00
● 17	0	46,00	24,00	1,92	1	8,33	0	0	13,50
● 18	0	63,00	29,50	2,14	1	8,33	4	0	19,00
● 19	0	58,50	15,00	3,90	1	9,00	0	0	11,50
● 20	0	51,00	35,00	1,46	0	7,00	1	2	16,00
◆ 21	--	72,50	33,00	2,20	1	9,50	0	0	14,38
■ 22	1	56,00	32,00	1,75	1	11,00	1	2	11,50
■ 23	1	84,75	37,00	2,29	1	12,00	0	0	15,75
■ 24	--	44,00	32,00	1,38	2	7,00	0	0	15,67
■ 25	1	40,25	20,00	2,01	1	9,00	1	0	8,00
○ 26	0	39,00	18,00	2,17	1	9,00	0	0	9,00
○ 27	3	49,00	34,00	1,44	1	7,00	1	0	17,33
○ 28	--	50,83	20,33	2,50	1	10,33	0	1	9,33
○ 29	2	56,00	27,50	2,04	1	11,00	0	0	10,50
○ 30	0	38,67	25,33	1,53	1	7,67	1	0	11,67
○ 31	0	39,00	21,00	1,86	0	8,00	3	0	11,50
○ 32	0	53,00	18,50	2,86	0	11,00	3	0	11,00
○ 33	0	42,00	20,00	2,10	1	9,40	0	0	9,50
○ 34	0	94,50	32,00	2,95	1	11,00	1	2	17,50

(Continúa)

	FOL#5	FOL#6	FOL#7	FOL#8	FOL#9	FOL#10	FOL#11	BRA#1	BRA#2
● 1	10,00	12,00	7,83	1	2	1,40	1,53	1	0
● 2	12,83	15,00	10,08	1	1	1,30	1,49	0	0
● 3	10,50	15,33	9,08	1	1	1,36	1,69	0	0
● 4	10,67	15,75	10,83	1	1	1,52	1,45	3	0
● 5	9,00	15,58	8,50	0	2	1,56	1,83	1	1
● 6	6,00	9,40	5,60	1	2	1,61	1,68	1	1
● 7	6,33	9,92	5,25	1	2	1,55	1,89	1	1
● 8	5,67	8,75	4,38	1	2	1,82	2,00	2	--
● 9	10,33	10,42	6,50	1	2	1,29	1,60	2	--
● 10	11,17	14,25	10,00	1	2	1,37	1,43	0	0
● 11	20,63	24,70	19,70	1	2	1,18	1,25	0	0
● 12	5,00	8,00	4,42	1	2	1,60	1,81	0	1
● 13	5,75	9,00	5,17	1	2	1,48	1,74	3	1
● 14	6,50	9,75	5,33	1	2	1,54	1,83	0	1
● 15	8,50	14,08	8,08	1	2	1,82	1,74	0	1
● 16	12,50	12,67	8,42	1	3	1,28	1,50	0	1
● 17	10,50	13,17	9,00	1	0	1,29	1,46	0	1
● 18	16,50	19,00	13,92	1	2	1,15	1,36	2	1
● 19	7,00	10,83	6,25	1	1	1,64	1,73	1	0
● 20	12,75	16,58	12,42	1	2	1,25	1,33	1	1
◆ 21	9,13	14,83	7,50	1	2	1,58	1,98	2	--
■ 22	6,25	13,33	6,25	1	3	1,84	2,13	1	1
■ 23	10,50	16,00	9,00	1	2	1,50	1,78	0	1
■ 24	11,17	14,00	7,90	1	1	1,40	1,77	2	--
■ 25	5,75	8,08	5,17	1	2	1,39	1,56	1	0
○ 26	4,50	10,42	4,33	1	2	2,00	2,41	0	1
○ 27	13,83	14,25	10,00	1	3	1,25	1,43	0	1
○ 28	6,33	10,60	6,90	1	2	1,47	1,54	2	1
○ 29	5,75	11,50	5,75	1	2	1,83	2,00	0	1
○ 30	6,50	10,38	6,13	1	3	1,80	1,69	3	1
○ 31	7,00	10,08	5,42	1	2	1,64	1,86	2	1
○ 32	5,75	11,92	6,58	1	2	1,91	1,81	0	1
○ 33	7,00	8,25	5,42	1	3	1,36	1,52	0	1
○ 34	12,00	16,33	11,42	1	2	1,46	1,43	0	1

(Continúa)

	BRA#3	BRA#4	BRA#5	BRA#6	INF#1	INF#2	FLO#1	FLO#2	FLO#3
● 1	2,17	0,92	1	2,36	56,50	9,00	4,40	5,50	5,67
● 2	1,67	1,00	0	1,67	50,80	7,33	3,67	5,50	4,75
● 3	1,75	0,88	2	1,99	52,00	8,00	3,50	4,50	4,75
● 4	1,83	1,00	1	1,83	40,67	7,67	3,00	6,00	5,33
● 5	2,00	1,00	2	2,00	62,50	8,67	5,50	7,75	5,75
● 6	1,08	0,58	1	1,86	44,00	7,50	3,00	6,50	6,00
● 7	1,83	0,75	2	2,44	60,50	11,00	2,00	8,00	5,50
● 8	1,58	0,83	0	1,90	--	--	--	6,75	6,13
● 9	2,00	0,58	2	3,45	--	--	--	5,38	4,50
● 10	1,50	0,75	2	2,00	58,67	6,17	2,00	6,00	5,25
● 11	2,50	1,00	0	2,50	62,50	6,67	4,80	6,63	5,00
● 12	1,50	0,83	2	1,81	48,00	6,25	2,67	6,50	5,00
● 13	1,08	0,58	0	1,86	55,00	9,00	2,33	5,83	5,67
● 14	1,42	0,83	0	1,71	35,00	4,00	3,67	7,00	6,00
● 15	1,42	0,83	0	1,71	50,00	7,67	2,00	7,50	7,50
● 16	1,75	0,75	2	2,33	44,00	7,50	1,67	6,50	5,50
● 17	1,42	0,67	1	2,12	47,33	4,83	3,00	5,33	4,50
● 18	2,08	0,83	1	2,51	66,00	9,75	2,33	6,50	5,17
● 19	1,50	0,75	1	2,00	70,75	5,67	3,50	5,50	4,67
● 20	2,17	0,75	3	2,89	60,17	6,50	2,00	5,00	4,50
◆ 21	1,50	0,50	2	3,00	66,17	8,67	5,00	6,80	6,90
■ 22	1,00	0,50	1	2,00	54,33	7,67	2,33	6,00	5,83
■ 23	1,75	0,75	1	2,33	56,00	9,00	2,50	7,50	7,25
■ 24	1,25	0,50	2	2,50	--	--	--	4,33	4,83
■ 25	1,50	0,83	1	1,81	51,83	8,67	3,60	5,88	5,25
○ 26	1,50	1,00	1	1,50	47,50	7,50	2,25	7,33	6,67
○ 27	1,83	0,75	2	2,44	50,17	6,00	2,33	4,67	5,00
○ 28	1,67	1,08	1	1,55	--	9,00	--	7,38	6,38
○ 29	1,50	0,75	2	2,00	55,00	7,67	2,00	5,50	4,75
○ 30	1,50	0,75	3	2,00	53,67	7,00	2,00	7,00	5,33
○ 31	1,58	0,83	2	1,90	48,67	7,67	2,00	6,00	5,50
○ 32	1,50	0,67	1	2,24	57,50	7,50	2,50	7,25	6,25
○ 33	1,42	0,58	3	2,45	48,50	6,33	2,33	8,00	6,00
○ 34	2,00	0,75	0	2,67	97,67	11,33	4,67	7,67	6,50

(Continúa)

	FLO#4	FLO#5	FLO#6	FLO#7	FLO#8	FLO#9	FLO#10	FLO#11	FLO#12
● 1	0	1,51	1,84	2,10	1,58	1,43	1,69	0,97	3,25
● 2	0	1,42	1,58	2,24	1,75	1,42	1,68	1,16	3,27
● 3	1	1,72	1,09	0,92	0,93	1,11	1,15	0,95	3,90
● 4	0	1,45	1,05	0,69	0,64	1,06	0,98	1,13	6,13
● 5	0	0,87	1,41	0,73	1,24	0,73	1,00	1,35	7,78
● 6	0	0,86	0,89	1,11	1,07	0,97	0,98	1,08	6,63
● 7	0	1,18	1,15	1,33	1,09	1,73	1,30	1,45	6,17
● 8	0	1,07	1,57	1,93	1,81	1,25	1,53	1,10	4,42
● 9	0	1,15	1,95	2,51	1,37	0,76	1,55	1,20	3,48
● 10	0	1,28	1,87	2,33	1,98	1,32	1,76	1,14	3,42
● 11	0	1,79	2,89	3,17	2,96	2,10	2,58	1,33	2,57
● 12	0	0,55	0,80	1,04	0,82	0,58	0,76	1,30	8,58
● 13	0	1,24	1,50	1,64	1,67	1,32	1,47	1,03	3,96
● 14	0	1,32	1,57	1,04	1,81	1,18	1,38	1,17	5,06
● 15	0	0,94	1,25	1,58	1,45	1,04	1,25	1,00	5,99
● 16	0	2,53	1,84	1,41	1,38	1,80	1,79	1,18	3,63
● 17	0	1,00	1,24	1,48	1,30	1,04	1,21	1,18	4,40
● 18	0	1,09	2,23	2,82	2,37	1,51	2,00	1,26	3,24
● 19	0	0,97	1,63	1,89	1,37	1,13	1,40	1,18	3,93
● 20	0	1,78	1,44	1,08	1,10	1,53	1,39	1,11	3,61
◆ 21	0	0,81	0,81	0,70	0,86	1,11	0,86	0,99	7,93
■ 22	0	1,07	0,95	0,96	1,21	1,26	1,09	1,03	5,50
■ 23	0	1,71	1,88	1,39	1,35	1,42	1,55	1,03	4,84
■ 24	0	1,12	1,41	2,39	1,77	1,26	1,59	0,90	2,72
■ 25	1	1,14	1,37	1,48	1,49	1,09	1,31	1,12	4,47
○ 26	1	1,46	1,83	1,98	1,67	1,67	1,72	1,10	4,26
○ 27	0	1,16	1,35	2,06	1,27	1,28	1,42	0,93	3,28
○ 28	0	0,92	1,52	1,58	1,45	1,04	1,30	1,16	5,67
○ 29	0	0,73	0,95	1,07	1,27	1,07	1,02	1,16	5,40
○ 30	0	1,04	1,18	1,45	1,54	1,39	1,32	1,31	5,30
○ 31	1	1,26	1,46	1,60	1,26	1,12	1,34	1,09	4,48
○ 32	1	1,24	1,36	1,52	1,50	1,00	1,32	1,16	5,48
○ 33	0	0,71	1,55	1,59	1,50	0,87	1,24	1,33	6,43
○ 34	0	1,47	2,09	2,36	1,67	1,46	1,81	1,18	4,24

(Continúa)

	FLO#13	FLO#14	FLO#15	FLO#16	FLO#17	FLO#18	FLO#19	FLO#20	FLO#21
● 1	1	2	8,13	1,85	1,54	2,33	37,54	4,39	12,89
● 2	0	0	9,07	3,61	1,80	2,99	32,36	2,51	11,87
● 3	1	1	8,55	2,71	1,27	2,31	43,25	3,15	11,79
● 4	1	0	7,65	2,61	1,13	2,23	36,73	2,93	12,33
● 5	0	1	16,08	3,93	2,64	4,92	28,01	4,09	17,39
● 6	1	1	15,13	2,56	2,81	4,91	17,90	5,91	17,38
● 7	0	0	14,62	3,64	2,98	4,16	22,34	4,02	18,59
● 8	1	0	15,78	3,54	2,02	5,56	31,06	4,46	18,31
● 9	1	1	8,22	1,82	1,34	2,63	27,34	4,52	11,36
● 10	1	1	9,02	2,63	1,51	2,23	48,65	3,43	12,04
● 11	1	0	9,87	2,47	1,76	2,98	40,29	4,00	13,59
● 12	0	0	14,55	3,27	1,70	3,65	15,91	4,45	16,21
● 13	0	0	15,42	5,27	2,83	4,21	22,90	2,93	17,10
● 14	0	2	10,22	2,45	1,08	1,96	39,47	4,17	13,31
● 15	0	1	13,65	3,70	3,01	5,22	4,61	3,69	14,43
● 16	1	0	8,45	2,63	1,18	2,76	32,78	3,21	11,99
● 17	0	1	7,69	2,44	1,02	2,03	30,54	3,15	10,76
● 18	1	0	7,69	2,51	1,62	2,60	17,41	3,06	11,50
● 19	0	2	8,50	3,91	1,42	2,68	23,57	2,17	11,63
● 20	1	0	8,21	3,00	1,32	2,33	31,96	2,74	12,56
◆ 21	1	0	13,73	3,29	2,68	4,14	19,72	4,17	18,09
■ 22	1	1	14,50	3,10	2,69	4,33	6,83	4,68	16,27
■ 23	1	0	16,37	4,18	2,45	4,91	39,43	3,92	19,64
■ 24	1	1	10,88	2,48	1,79	2,86	18,35	4,39	13,30
■ 25	1	1	13,48	3,44	2,60	5,17	21,18	3,92	16,01
○ 26	0	0	15,94	3,62	2,99	4,65	18,20	4,40	18,89
○ 27	1	1	9,10	2,68	1,41	2,08	30,45	3,40	13,05
○ 28	0	1	17,46	4,15	3,18	6,18	24,89	4,21	20,53
○ 29	1	0	15,61	2,60	2,99	4,49	19,24	6,00	17,89
○ 30	1	1	13,10	2,45	2,23	4,28	7,02	5,35	14,72
○ 31	1	1	16,30	4,13	3,45	5,28	14,88	3,95	17,90
○ 32	1	1	17,54	3,62	2,97	5,67	12,14	4,85	20,42
○ 33	0	1	15,83	3,07	2,45	4,71	10,62	5,16	17,75
○ 34	0	0	18,05	3,39	3,46	6,12	17,10	5,32	19,55

(Continúa)

	FLO#22	FLO#23	FLO#24	FLO#25	FLO#26	FLO#27	FLO#28	FLO#29	FLO#30
● 1	12,37	4,25	1,04	12,61	7,75	2,80	5,80	50,68	1,63
● 2	11,42	4,75	1,04	12,89	8,15	2,96	5,38	36,18	1,58
● 3	11,18	4,26	1,05	12,25	6,62	2,94	5,24	61,32	1,85
● 4	12,63	4,78	0,98	12,07	6,63	2,63	4,81	60,30	1,82
● 5	15,80	7,00	1,10	18,98	11,34	3,89	9,09	30,80	1,67
● 6	15,76	7,75	1,10	17,86	11,41	4,12	9,06	17,70	1,57
● 7	16,36	8,02	1,14	18,05	10,54	3,39	9,87	29,88	1,71
● 8	18,87	9,06	0,97	19,44	11,12	3,96	10,01	19,52	1,75
● 9	12,51	5,11	0,91	11,85	7,12	2,94	5,09	43,95	1,66
● 10	12,39	4,16	0,97	12,74	8,15	3,17	5,34	59,57	1,56
● 11	11,69	5,80	1,16	13,79	8,76	3,32	6,10	62,64	1,57
● 12	15,57	6,98	1,04	16,35	10,56	3,29	8,48	9,00	1,55
● 13	17,64	8,86	0,97	18,35	10,80	4,17	9,81	19,91	1,70
● 14	11,09	4,22	1,20	12,54	6,12	3,33	4,57	42,24	2,05
● 15	14,58	6,32	0,99	17,97	10,66	4,35	10,72	24,44	1,69
● 16	9,97	3,95	1,20	12,17	7,87	2,80	5,35	21,29	1,55
● 17	10,97	4,77	0,98	11,82	7,46	2,28	5,68	55,76	1,58
● 18	12,23	4,63	0,94	11,80	7,34	3,48	5,38	46,09	1,61
● 19	13,87	8,52	0,84	12,10	8,44	2,73	5,65	32,81	1,43
● 20	12,37	4,41	1,02	12,13	8,38	2,81	5,33	43,22	1,45
◆ 21	17,68	8,39	1,02	19,47	10,74	3,37	8,59	19,72	1,81
■ 22	13,53	10,91	1,20	17,52	10,81	4,58	9,92	44,49	1,62
■ 23	19,45	8,76	1,01	20,00	10,48	2,93	9,91	37,22	1,91
■ 24	11,67	4,55	1,14	14,20	8,76	2,58	6,76	50,55	1,62
■ 25	15,60	8,08	1,03	16,76	10,97	3,35	8,96	16,69	1,53
○ 26	18,35	9,75	1,03	18,15	11,42	4,29	9,07	7,31	1,59
○ 27	14,30	5,42	0,91	13,23	7,45	3,07	5,79	61,39	1,78
○ 28	17,69	10,70	1,16	20,25	11,50	3,56	11,50	15,39	1,76
○ 29	18,06	7,76	0,99	17,93	11,56	3,96	9,02	31,06	1,55
○ 30	14,34	6,59	1,03	17,28	9,98	3,15	9,21	15,86	1,73
○ 31	16,76	7,64	1,07	18,92	10,75	3,57	9,59	29,28	1,76
○ 32	17,46	9,46	1,17	20,72	13,27	5,07	12,23	25,89	1,56
○ 33	14,14	8,86	1,26	19,75	11,80	3,07	11,05	28,93	1,67
○ 34	17,09	12,00	1,14	20,83	11,10	3,91	12,88	29,99	1,88

(Continúa)

	FLO#31	FLO#32	FLO#33	FLO#34	FLO#35	FLO#36	FLO#37
● 1	9,93	4,39	2,96	4,19	1,50	5,84	4,77
● 2	9,89	4,10	3,10	5,25	1,80	5,22	4,64
● 3	10,48	3,80	3,14	6,23	2,12	5,41	4,42
● 4	8,24	4,55	2,50	4,52	1,92	4,92	3,66
● 5	14,93	4,61	3,62	7,99	2,95	8,53	3,94
● 6	14,79	4,63	4,19	8,67	2,09	8,43	6,15
● 7	16,48	5,33	5,70	7,87	2,38	8,21	5,70
● 8	17,09	4,42	5,20	7,05	1,81	9,09	6,77
● 9	8,94	2,37	2,88	4,35	1,63	5,10	4,44
● 10	10,01	4,16	2,39	5,68	2,32	6,24	3,48
● 11	10,93	3,79	2,56	5,85	1,98	6,47	4,25
● 12	14,21	3,79	4,97	8,01	1,77	7,26	7,33
● 13	15,10	4,82	5,07	7,23	1,92	8,27	6,41
● 14	6,33	4,49	1,67	5,09	1,57	5,18	4,31
● 15	15,87	3,95	4,63	11,03	2,73	7,08	5,74
● 16	9,54	3,78	2,76	6,00	2,01	5,40	4,36
● 17	8,67	3,36	2,55	4,82	2,10	6,44	3,51
● 18	9,97	5,08	2,30	6,04	2,44	6,28	3,42
● 19	8,57	3,25	2,85	5,88	2,39	6,06	3,65
● 20	9,94	3,68	3,41	4,83	2,09	6,27	3,94
◆ 21	14,67	4,84	4,74	7,86	1,94	8,41	6,49
■ 22	16,54	3,24	6,88	7,07	2,61	6,79	5,34
■ 23	15,16	6,66	5,05	8,04	2,54	8,22	5,15
■ 24	11,01	3,43	2,81	6,62	2,20	6,73	4,29
■ 25	13,84	3,81	4,54	7,93	2,14	6,93	5,83
○ 26	15,04	4,34	5,24	8,26	2,57	8,24	5,25
○ 27	10,81	4,45	2,86	5,46	2,18	6,16	3,82
○ 28	18,20	5,96	6,92	9,66	2,28	8,19	7,27
○ 29	15,17	4,19	4,41	7,52	3,07	8,72	3,89
○ 30	14,75	4,95	4,64	7,85	2,53	8,23	4,94
○ 31	16,68	4,08	5,15	8,51	1,17	8,46	11,68
○ 32	17,67	4,50	6,02	9,57	3,55	9,85	4,39
○ 33	17,49	3,91	5,74	7,16	1,94	8,49	6,65
○ 34	19,02	5,35	2,77	10,44	2,02	8,48	6,54

(Continúa)

	FRU#1	FRU#2	FRU#3	FRU#4	FRU#5
					a d e h k m q
● 1	--	--	--	--	--
● 2	--	--	--	--	--
● 3	--	--	--	--	--
● 4	--	--	--	--	--
● 5	--	--	--	--	--
● 6	55,25	21,00	1	2,63	1 1 1 1 1 0 0
● 7	--	--	--	--	--
● 8	--	--	--	--	--
● 9	--	--	--	--	--
● 10	50,00	30,00	1	1,67	1 1 1 1 1 1 0
● 11	--	--	--	--	--
● 12	--	--	--	--	--
● 13	41,50	18,50	1	2,24	1 1 1 1 1 1 0
● 14	--	--	--	--	--
● 15	--	--	--	--	--
● 16	--	--	--	--	--
● 17	--	--	--	--	--
● 18	52,00	22,33	1	2,33	0 0 0 0 0 0 1
● 19	--	--	--	--	--
● 20	--	--	--	--	--
◆ 21	--	--	--	--	--
■ 22	57,00	21,50	1	2,65	1 1 0 1 1 1 0
■ 23	61,50	27,50	1	2,24	1 1 1 1 1 1 0
■ 24	59,00	23,67	1	2,49	1 1 1 1 1 1 1
■ 25	--	--	--	--	--
○ 26	--	--	--	--	--
○ 27	46,67	25,00	1	1,87	1 1 0 0 1 1 0
○ 28	--	--	--	--	--
○ 29	52,50	19,00	1	2,76	1 1 0 0 1 1 0
○ 30	--	--	--	--	--
○ 31	--	--	--	--	--
○ 32	--	--	1	--	--
○ 33	--	--	--	--	--
○ 34	--	--	--	--	--



#### 4.2.2.1. Análisis de componentes principales (PCA).

Se obtuvieron veinte componentes principales con un autovalor  $\geq 1,000$  que acumularon el 95,02 % de la varianza total. Con los nueve primeros se alcanzó la cota del 75,00 % de la varianza (Tabla 13). Los tres primeros componentes principales expresaron el 31,41 %, 13,27 % y 5,98 % respectivamente, acumulando el 50,66 % de la varianza total (Tabla 13).

**Tabla 13.** Análisis de Componentes Principales. Contribución de los caracteres. \*: caracteres considerados significativos en el PCA. \*\*: caracteres considerados significativos para el análisis de agrupamiento por UPGMA. Ver apartado 3.2.1.2 de Material y Métodos para la definición de los caracteres.

COMPONENTES PRINCIPALES									
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9
autovalor	20,416	8,627	3,886	3,501	2,787	2,706	2,583	2,372	2,065
varianza (%)	31,41	13,27	5,98	5,39	4,29	4,16	3,97	3,65	3,18
(%) varianza acumulada	31,41	44,68	50,66	56,04	60,33	64,50	68,47	72,12	75,30
Carácter									
TAL#2	0.206	-0.103	-0.524	0.041	0.028	0.230	-0.113	-0.267	-0.487
TAL#3	0.134	0.115	-0.396	-0.482	0.034	-0.094	-0.096	-0.032	-0.097
EST#1	0.168	-0.032	0.227	0.279	0.326	-0.094	-0.044	-0.067	-0.086
* EST#2	0.193	0.281	-0.317	0.059	0.082	-0.136	0.565	-0.115	-0.039
EST#3	-0.428	-0.502	0.215	0.077	-0.345	-0.089	-0.200	0.074	0.065
EST#4	-0.044	-0.572	0.469	-0.086	-0.128	0.332	-0.079	-0.117	-0.188
EST#5	-0.069	0.028	0.093	0.041	0.198	-0.428	-0.157	-0.090	-0.291
EST#6	-0.395	0.017	-0.184	0.160	-0.213	-0.530	-0.156	0.209	0.261
AMB#1	-0.240	-0.219	-0.439	-0.182	0.354	-0.250	-0.057	-0.140	-0.116
AMB#2	0.100	-0.693	0.304	-0.437	-0.127	-0.260	0.134	-0.130	-0.054
AMB#3	-0.437	-0.511	-0.031	-0.519	0.239	-0.234	0.088	-0.036	0.123
AMB#4	0.487	-0.136	0.307	0.175	-0.486	-0.012	0.136	-0.200	-0.170
AMB#5	0.019	-0.006	-0.302	-0.088	-0.261	-0.303	-0.402	-0.040	-0.559
** FOL#1	0.764	-0.097	0.202	-0.222	-0.079	-0.110	0.060	-0.208	-0.106
* FOL#2	-0.171	-0.374	-0.147	0.190	-0.258	0.284	-0.118	0.092	0.554
FOL#3	0.205	-0.133	-0.024	0.012	0.110	0.010	0.335	0.339	-0.020
FOL#4	-0.677	-0.598	-0.024	-0.253	0.055	-0.088	0.052	-0.048	0.149
FOL#5	-0.774	-0.553	-0.063	-0.197	0.062	0.030	0.041	0.000	0.061
FOL#6	-0.544	-0.651	0.047	-0.288	0.077	-0.144	0.141	-0.171	0.215
FOL#7	-0.651	-0.638	0.012	-0.196	0.066	0.051	0.131	-0.121	0.187
FOL#9	0.319	-0.153	-0.509	-0.098	0.324	0.174	-0.285	0.107	-0.012
** FOL#10	0.740	0.213	-0.065	0.141	-0.058	-0.259	0.054	-0.229	0.182
** FOL#11	0.641	0.294	-0.108	0.110	0.023	-0.414	-0.009	-0.088	-0.062
* BRA#1	0.095	0.108	0.140	-0.023	-0.111	0.221	0.122	0.505	-0.183
BRA#3	-0.512	-0.573	0.084	-0.083	0.136	0.282	-0.047	-0.010	0.058
BRA#4	-0.158	-0.262	0.380	0.446	0.339	0.180	-0.050	-0.338	0.164
BRA#5	-0.025	0.365	-0.273	-0.529	0.202	0.309	-0.005	0.100	-0.066
BRA#6	-0.326	-0.288	-0.269	-0.581	-0.215	0.106	-0.022	0.365	-0.178
INF#1	0.095	-0.687	0.036	-0.251	-0.463	0.013	0.243	0.152	-0.148
INF#2	0.357	-0.575	0.141	-0.067	0.007	0.012	0.124	0.395	-0.096
FLO#1	-0.140	-0.342	0.388	-0.135	-0.275	-0.127	-0.313	-0.046	0.055

(Continúa)

** FLO#2	0.611	-0.421	0.042	0.066	0.137	0.300	-0.337	-0.244	-0.048
** FLO#3	0.628	-0.352	0.148	0.079	0.131	-0.206	-0.302	-0.029	-0.005
* FLO#5	-0.493	-0.302	-0.078	0.228	0.502	-0.164	0.138	0.135	0.065
FLO#6	-0.428	-0.674	-0.222	0.384	-0.062	0.074	-0.104	-0.025	-0.150
FLO#7	-0.405	-0.510	-0.363	0.377	-0.351	0.039	-0.007	0.103	-0.143
FLO#8	-0.300	-0.574	-0.386	0.459	-0.205	0.010	-0.146	-0.141	-0.072
FLO#9	-0.337	-0.544	-0.317	0.314	0.324	-0.134	0.210	0.067	-0.114
FLO#10	-0.485	-0.643	-0.348	0.440	-0.020	-0.024	0.004	0.035	-0.110
* FLO#11	0.094	-0.174	-0.115	-0.004	0.025	0.696	-0.094	-0.336	-0.064
** FLO#12	0.652	0.235	0.275	-0.411	0.078	0.254	-0.222	-0.216	0.095
FLO#14	-0.111	0.405	0.068	0.198	-0.409	-0.112	-0.441	-0.014	0.186
** FLO#15	0.944	-0.231	-0.042	0.007	0.061	-0.056	-0.062	0.022	0.024
** FLO#16	0.618	-0.166	0.289	0.258	0.104	0.028	0.384	0.063	-0.119
** FLO#17	0.859	-0.316	-0.088	0.050	0.000	-0.057	0.100	0.125	0.121
** FLO#18	0.897	-0.320	-0.019	0.056	-0.006	0.014	-0.001	0.048	0.085
FLO#19	-0.652	-0.076	0.318	0.105	0.311	-0.205	-0.093	-0.073	-0.177
** FLO#20	0.568	-0.059	-0.379	-0.215	-0.081	-0.099	-0.419	-0.006	0.095
** FLO#21	0.905	-0.300	0.015	-0.013	0.125	-0.074	-0.057	0.047	-0.019
** FLO#22	0.846	-0.229	0.130	0.015	0.024	-0.118	0.137	0.028	-0.195
** FLO#23	0.841	-0.284	0.009	0.032	-0.130	-0.131	0.119	0.063	-0.067
FLO#24	0.268	-0.175	-0.279	-0.033	0.296	0.039	-0.429	0.047	0.309
** FLO#25	0.931	-0.289	-0.014	-0.069	0.049	-0.054	-0.074	0.067	0.024
** FLO#26	0.914	-0.194	-0.194	-0.035	-0.045	0.029	0.096	-0.069	0.094
** FLO#27	0.703	-0.210	-0.226	0.145	-0.104	-0.174	0.069	-0.139	0.330
** FLO#28	0.913	-0.297	-0.071	-0.021	-0.053	0.000	-0.022	0.083	0.091
FLO#29	-0.792	-0.080	0.098	-0.202	-0.047	-0.288	-0.058	0.046	0.201
FLO#30	0.126	-0.166	0.472	-0.050	0.274	-0.252	-0.511	0.280	-0.111
** FLO#31	0.896	-0.300	-0.125	-0.067	0.031	-0.002	0.011	0.145	0.107
FLO#32	0.402	-0.524	0.426	0.043	0.290	0.012	-0.101	0.007	-0.237
** FLO#33	0.842	0.038	-0.136	0.032	0.163	0.027	0.085	0.123	0.112
** FLO#34	0.837	-0.298	-0.007	-0.005	-0.032	0.010	0.003	-0.064	0.122
FLO#35	0.351	-0.163	-0.147	-0.203	-0.108	-0.166	0.242	-0.626	0.112
** FLO#36	0.862	-0.251	-0.126	-0.081	-0.077	-0.008	0.036	-0.017	-0.012
** FLO#37	0.600	-0.006	0.048	0.177	0.122	0.168	-0.101	0.541	0.138

El primer componente principal explicó el 31,41 % de la varianza total (Tabla 13) y la práctica totalidad de las variables consideradas significativas (contribución  $\geq 0,500$ ) en el PCA tuvieron unas contribuciones elevadas a este componente. Las mayores contribuciones al este componente provinieron principalmente de caracteres definidos en la flor (Figura 13):

- caracteres del ala, con unas contribuciones que fueron desde 0,859 de la longitud del espolón del ala (FLO#17) a 0,944 de la longitud (FLO#15) pasando por 0,897 de la distancia entre el inicio del espolón y la base del ala (FLO#18).
- caracteres del estandarte; la máxima contribución la realizó la longitud (FLO#21) con 0,905, seguida de la anchura (FLO#22) y la longitud de la uña (FLO#23) con unas contribuciones de 0,846 y 0,841, respectivamente.

- caracteres de la quilla; tanto la longitud (FLO#25), anchura (FLO#26) como la distancia entre el inicio del espolón y la base de la quilla (FLO#28) tuvieron unas contribuciones superiores a 0,900 (0,931, 0,914 y 0,913, respectivamente). La longitud del espolón (FLO#27) tuvo una contribución menor, de sólo 0,703.

- la longitud de la columna estaminal (FLO#31) tuvo una contribución de 0,896.

- caracteres del gineceo; las contribuciones fueron de 0,842 para la longitud del estípite (FLO#33), 0,837 para la longitud (FLO#34) y de 0,862 para la longitud del estilo (FLO#36).

Por encima del valor de significación elegido (0,500) también estuvieron caracteres de la flor como la longitud y anchura del cáliz (FLO#2 y FLO#3) con unas contribuciones de 0,611 y 0,628, respectivamente, la anchura del ala (FLO#16) con 0,618, el cociente longitud / anchura del ala (FLO#20) con 0,568 y el cociente FLO#37 con 0,600. Los demás caracteres con unas contribuciones superiores al valor de significación estuvieron referidos a los folíolos: número de folíolos (FOL#1) con 0,764 y los coeficientes de forma de los folíolos centrales (FOL#10) y no centrales (FOL#11) con 0,740 y 0,641, respectivamente.

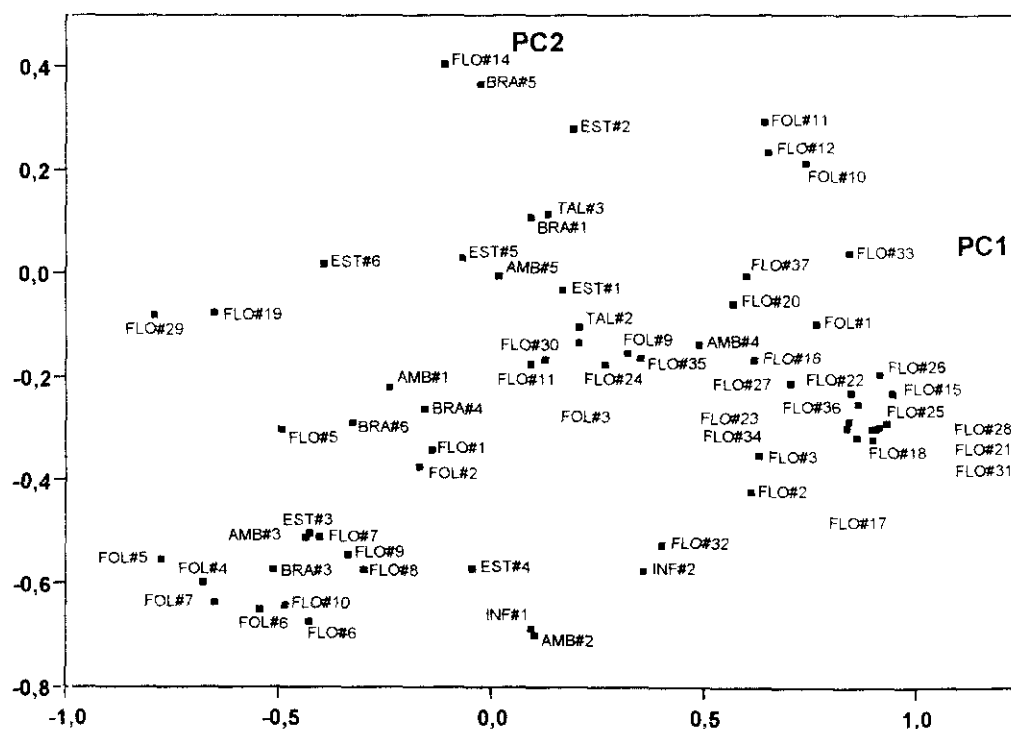


Figura 13. PCA. Proyección de los caracteres sobre CP1 y CP2.

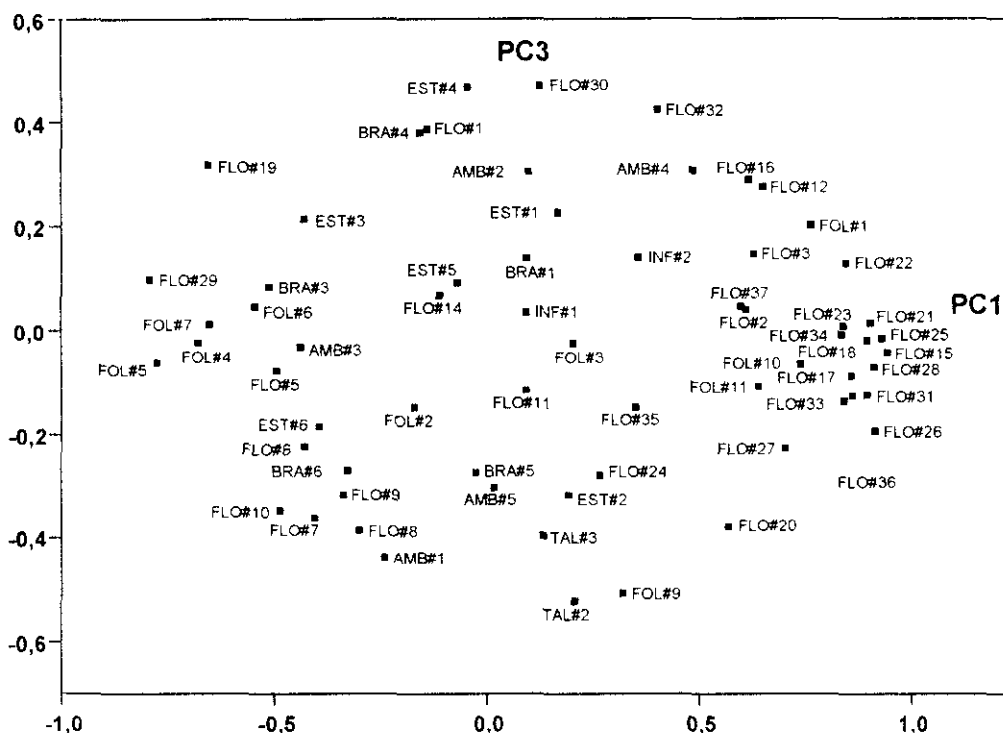


Figura 14. PCA. Proyección de los caracteres sobre CP1 y CP3.

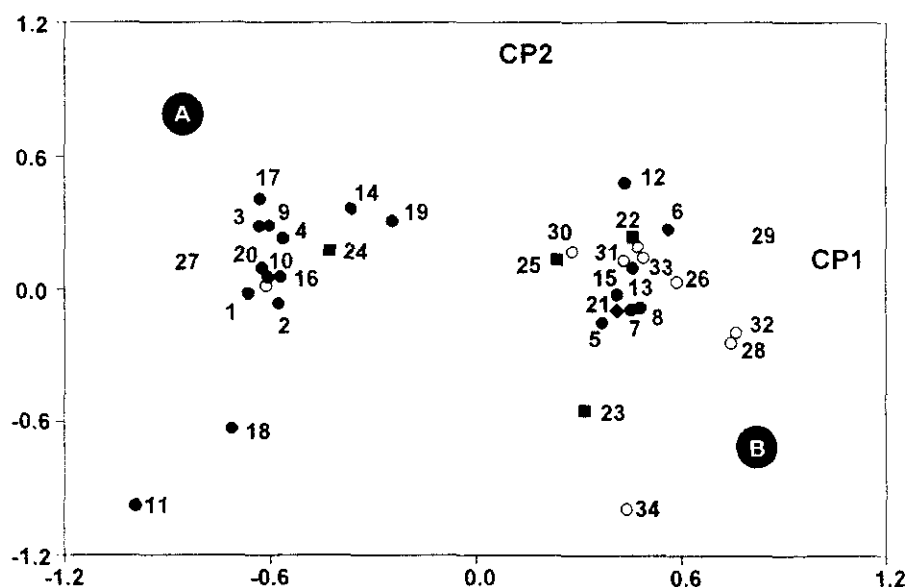
El segundo componente principal expresó el 13,27 % de la varianza total (Tabla 13). Muy pocos caracteres tuvieron una contribución de signo positivo a este componente y ninguno de ellos sobrepasó el nivel de discriminación ( $\geq 0,500$ ). Si bien la mayor parte de los caracteres que tuvieron una contribución de esta naturaleza estuvieron definidos en órganos vegetativos (Figura 13), fue el indumento del ovario (FLO#14) el carácter con la máxima contribución (0,405, Tabla 13):

- indumento del tallo (TAL#3) con una contribución de sólo 0,115.
- caracteres de las estípulas como el color (EST#2, 0,281); el indumento (EST#5) y el coeficiente de forma (EST#6) tuvieron unas contribuciones aún más bajas, en la práctica, despreciables (0,028 y 0,017, respectivamente).
- caracteres del foliolo: ambos coeficientes de forma, FOL#10 y FOL#11, con unas contribuciones respectivas de 0,213 y 0,294.
- indumento de las brácteas (BRA#5) con una contribución de 0,365.
- caracteres de la flor además del indumento del ovario fueron el cociente FLO#10 y la longitud del estípite del ovario (FLO#33) con unas contribuciones de 0,235 y 0,038, respectivamente.

El tercer componente principal explicó el 5,98 % de la varianza total (Tabla 13). La situación con este componente fue del todo similar a la referida para el

anteriormente comentado. Ningún carácter superó el nivel de 0,500 en su contribución. La anchura de las estípulas (EST#4) y el coeficiente de forma de la quilla (FLO#30) fueron los caracteres con una mayor contribución, 0,469 y 0,472, respectivamente. Los otros 26 caracteres tuvieron unas contribuciones muy bajas, sobre todo teniendo en cuenta el porcentaje (bajo) de la varianza explicado por este componente (Figura 14).

Con respecto a CP1 las muestras se ordenaron en dos grupos muy bien definidos, A y B (Figura 15). El grupo A, definido en la parte negativa del componente, resultó bastante homogéneo ya que, a excepción de las muestras nº 24 (*C. arborescens* subsp. *atlantica*) y nº 27 (*C. atlantica*), estuvo compuesto por muestras determinadas como *C. arborescens* subsp. *gallica*. Mostró una estructura compacta de la que las muestras nº 11, 14, 19 y 24 se mantuvieron a una cierta distancia. En la parte positiva del componente quedó definido el grupo B. Mostró una estructura igualmente compacta de la que quedaron un tanto alejadas las muestras nº 25 (*C. arborescens* subsp. *atlantica*) y nº 30 (*C. atlantica*) en el extremo inferior del intervalo y las muestras nº 28 y 32 (*C. atlantica*) en el extremo superior del mismo. También fue más heterogéneo ya que incluyó individuos de los cuatro taxones considerados.

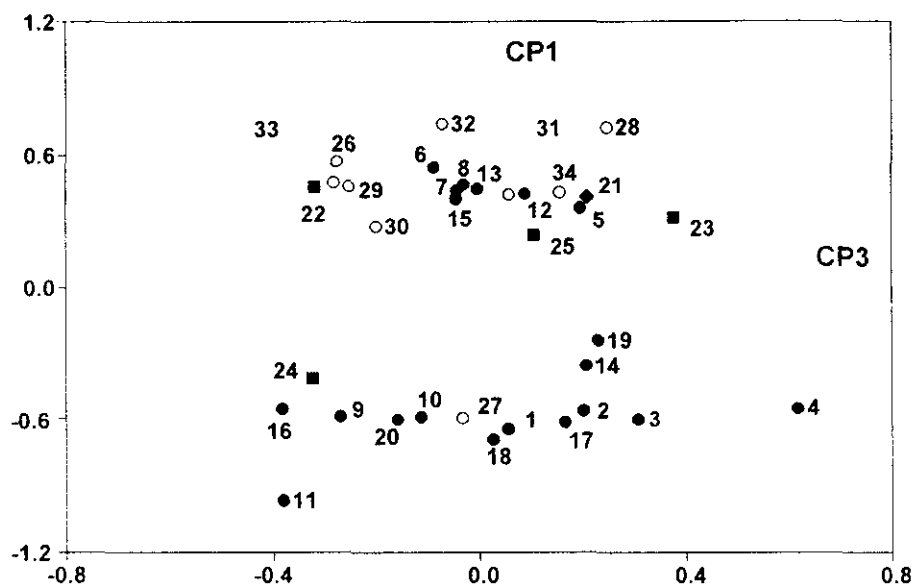


**Figura 15.** PCA. Ordenación de las muestras respecto al 1º y 2º componentes principales. Se indican los dos grupos (A y B) definidos por CP1 (ver texto). Numeración de los pliegos como en el apartado 3.2.2.2. de Material y Métodos. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ◆: *C. arborescens* subsp. *arborescens*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

Con las bajas contribuciones mostradas por los caracteres, CP2 no produjo un ordenamiento estructurado. Las muestras quedaron agrupadas fundamentalmente en la parte positiva del componente y sólo quedaron alejadas del resto, en la parte

negativa del componente, las muestras nº 11y 18 (*C. arborescens* subsp. *gallica*), nº 23 (*C. arborescens* subsp. *atlantica*) y nº 34 (*C. atlantica*) (Figura 15).

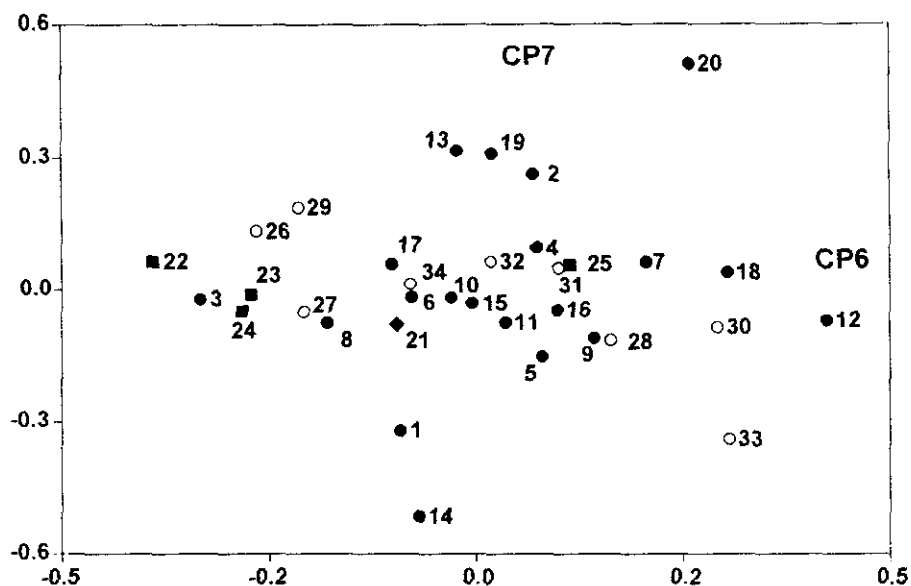
Como se puede ver en la Figura 16, el ordenamiento de las muestras respecto a CP3 fue muy similar al referido anteriormente para el segundo componente principal. Sólo la muestra nº 4 (*C. arborescens* subsp. *gallica*) quedó alejada del resto.



**Figura 16.** PCA. Ordenación de las muestras respecto al 1º y 3º componentes principales. Numeración de los pliegos como en el apartado 3.2.2.2. de Material y Métodos. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ◆: *C. arborescens* subsp. *arborescens*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

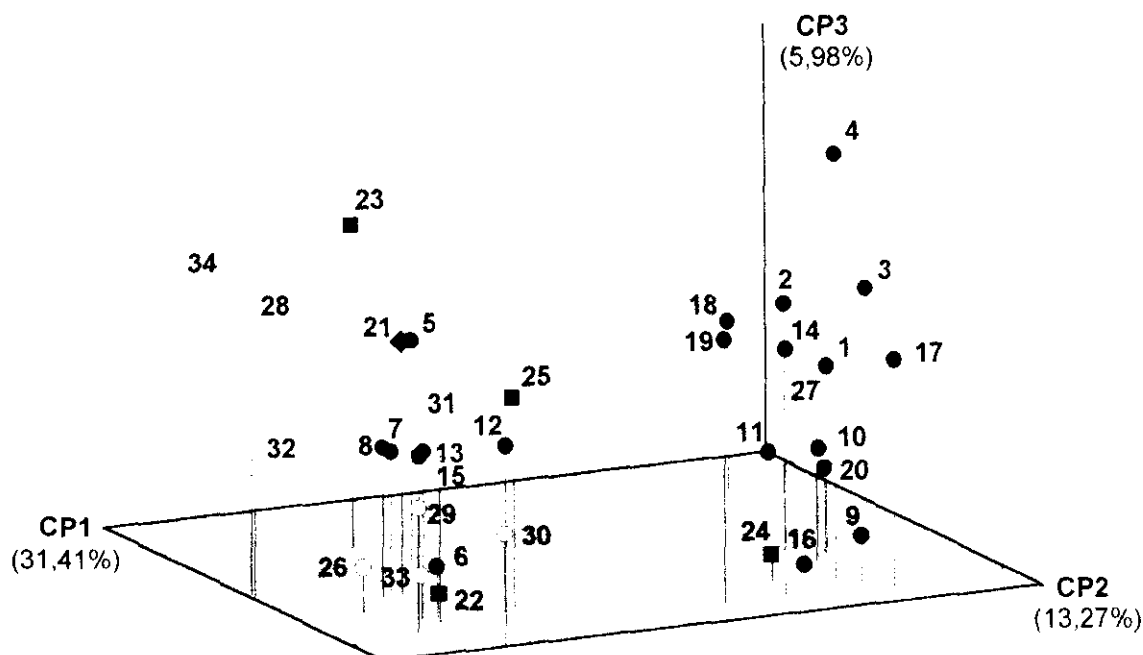
Excepto para CP4, hubo caracteres con una contribución superior al nivel de discriminación en los restantes componentes principales hasta acumular el 75 % de la varianza. No obstante, debido al bajo porcentaje de la varianza que explicaron, el ordenamiento de las muestras resultó homogéneo y poco estructurado, esto es, sólo un bajo número de muestras se alejaron de un núcleo más o menos central o más o menos extendido a lo largo de cada componente. En el caso más favorable, por ejemplo, el coeficiente de forma del cáliz (FLO#11), con una contribución de 0,696 (Tabla 13) al CP6 sólo separó del resto (en el intervalo positivo del componente) a las muestras nº 12, 18, 20 (*C. arborescens* subsp. *gallica*), 30 y 33 (*C. atlantica*) (Figura 17). El carácter que tuvo la máxima contribución al CP7 fue el color de las estípulas (EST#2) con 0,565; en el intervalo negativo de este componente quedaron separadas las muestras nº 1, 14 (*C. arborescens* subsp. *gallica*) y 33 (*C. atlantica*) mientras que

en el positivo se situaron los n° 2, 13, 19 y 20, todas ellas de la subespecie *gallica* (Figura 17).



**Figura 17.** PCA. Ordenación de las muestras respecto al 6º y 7º componentes principales. Numeración de los pliegos como en el apartado 3.2.2.2. de Material y Métodos. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ◆: *C. arborescens* subsp. *arborescens*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

Ante la gran diferencia de porcentaje de varianza expresada por CP1 respecto al resto de componentes principales considerados en el análisis y los escasos caracteres con contribuciones significativas a los mismos, el ordenamiento respecto a los tres primeros componentes (Figura 18) coincidió en la práctica con los grupos ya detectados al analizar el ordenamiento de las muestras respecto a CP1.



**Figura 18.** PCA. Ordenación de las muestras respecto a los tres primeros componentes principales (se indica el % de la varianza explicado por cada uno de ellos). Numeración de los pliegos como en el apartado 3.2.2.2. de Material y Métodos. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ◆: *C. arborescens* subsp. *arborescens*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

#### 4.2.2.2. Análisis de agrupamiento.

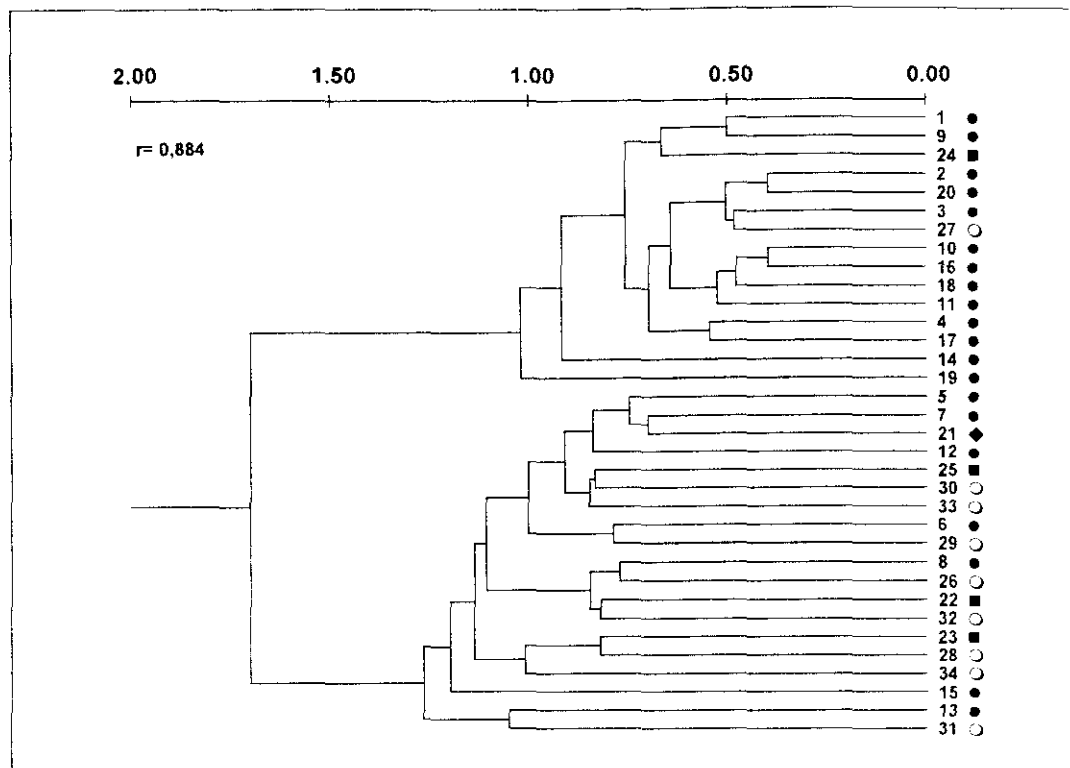
Al analizar la matriz de coeficientes de correlación entre los caracteres que mostraron un buen poder discriminatorio según el PCA (Tabla 14), se pudo observar como varios caracteres estaban altamente correlacionados entre sí (valores  $\geq 0,900$ ):

distancia entre el inicio del espolón y la base del ala (FLO#18), longitud del estandarte (FLO#21), la longitud y la anchura de la quilla (FLO#25 y FLO#26, respectivamente), la distancia entre el inicio del espolón y la base de la quilla (FLO#28), la longitud de la columna estaminal (FLO#31) y la longitud del estilo (FLO#36).

Los agrupamientos producidos por ambos coeficientes,  $d_{ij}$  y  $M_{ij}$ , se muestran en las Figuras 19 y 20. Mostraron un elevado valor de correlación cofenética, aunque algo superior en el caso del coeficiente Manhattan, por lo que el análisis se basó en el dendrograma producido a partir de este índice. No obstante, los dendrogramas obtenidos fueron muy similares.

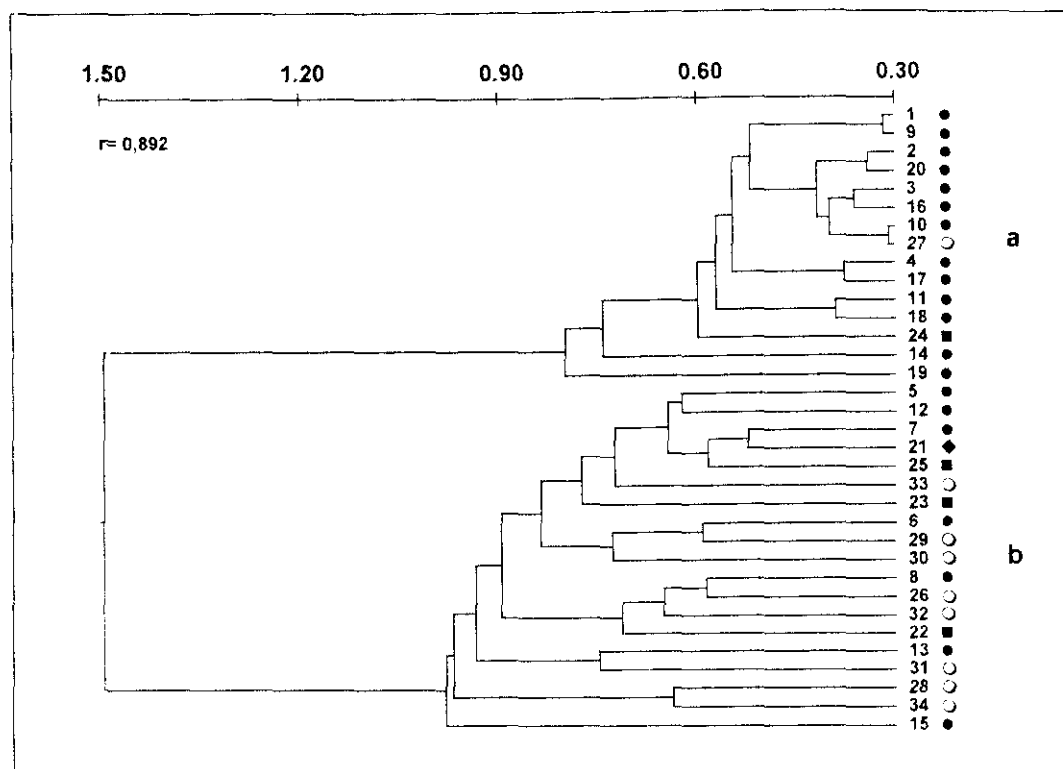
Las muestras quedaron agrupadas en dos ramas principales, **a** y **b** (Figura 20) que coincidieron con los grupos detectados en el PCA (Figura 18).





**Figura 19.** UPGMA (análisis morfométrico, coeficiente  $d_{ij}$ ).  $r$ : correlación cofenética. Numeración de los pliegos como en el apartado 3.2.2.2. de Material y Métodos. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ◆: *C. arborescens* subsp. *arborescens*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

En la primera quedaron agrupados la mayor parte de los pliegos determinados como *C. arborescens* subsp. *gallica* y los UTOs 24 y 27, *C. arborescens* subsp. *atlantica* y *C. atlantica*, respectivamente. El subagrupamiento formado por este último pliego y el n° 10 fue el que mostró la máxima similitud, pudiéndose detectar su proximidad geográfica. El resto de subagrupamientos incluyó pliegos de procedencia geográfica muy dispar.



**Figura 20.** UPGMA (análisis morfométrico, coeficiente  $M_{ij}$ ).  $r$ : correlación cofenética. **a** y **b** son los subgrupos principales comentados en el texto. Numeración de los pliegos como en el apartado 3.2.2.2. de Material y Métodos. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ◆: *C. arborescens* subsp. *arborescens*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

En la rama **b**, mucho menos homogénea, el único pliego de *C. arborescens* subsp. *arborescens* (nº 21) quedó agrupado con la mínima disimilitud dentro de esta rama con uno de *C. arborescens* subsp. *gallica*; este emparejamiento, a su vez, quedó estrechamente agrupado junto con otros dos pliegos determinados también como subsp. *gallica* (el nº 12 tenía una procedencia muy próxima, igualmente murciana). De otra parte, fue notable el subagrupamiento formado por los pliegos nº 13 (*C. arborescens* subsp. *gallica*) y nº 31 (*C. atlantica*) con procedencias geográficas muy próximas. También cabe destacar el comportamiento de los dos pliegos colectados en Serra (Valencia): mientras que el nº 29 (*C. atlantica*) se agrupó con un pliego de *C. arborescens* subsp. *gallica* de procedencia geográfica muy cercana (nº 6 de Gilet, Valencia), el nº 22 (*C. arborescens* subsp. *atlantica*) quedó como el más disímil dentro de un subagrupamiento formado por dos pliegos de *C. atlantica* (nº 26 y 32) y otro determinado como de la subsp. *gallica* (nº 8).

En líneas generales, si tenemos en cuenta la procedencia geográfica de los pliegos (apartado 3.2.2.2), la topología de tanto el diagrama tridimensional (PCA) como de los dendrogramas (UPGMA) son similares en el sentido de que permiten observar mismos dos grandes grupos. Uno de ellos, por ejemplo, el denominado **a** en

la Figura 20 incluye los UTOs de procedencia geográfica centro y norte y a una parte de los levantinos. El otro, denominado **b** en la misma figura, agrupa los UTOS procedentes del sur y a los restantes de levante.

#### 4.2.3. CARACTERES DISCRIMINANTES.

Después de realizado el PCA y el análisis de agrupamiento, sólo dieciséis de los 65 caracteres probaron tener poder discriminatorio. Excepto tres referidos a los foliolos, los demás estuvieron definidos en la flor:

- **En los foliolos.** Si bien el extremo superior del intervalo de variación de FOL#1 fue prácticamente el mismo en los tres taxones, el extremo inferior fue netamente inferior en la subsp. *gallica*. Fue este taxón el que tuvo un menor número medio de foliolos por hoja. Respecto a este carácter, la subsp. *atlantica* y *C. atlantica* resultaron indistinguibles. Para las dos relaciones longitud / anchura (FOL#10 y FOL#11) la subsp. *gallica* contó con los valores medios más bajos, esto es, la anchura de los foliolos (tanto del terminal como de los laterales) no fue mucho menor que la longitud, situación que si se dio para los otros dos taxones. La subsp. *atlantica* quedó en situación intermedia entre la subsp. *gallica* y *C. atlantica* (Figura 10b). Desde ahora anticipamos que este patrón se repitió para la mayor parte de los caracteres.
- **Del cáliz.** Con respecto a la longitud del cáliz (FLO#2), las subespecies *gallica* y *atlantica* resultaron indistinguibles. *C. atlantica* tuvo cálices de longitud netamente superior. En cuanto a la anchura (FLO#3), los valores mostrados por la subsp. *atlantica* y *C. atlantica* fueron similares y algo superiores al encontrado para la subsp. *gallica*. Según FLO#12, la longitud del cáliz en *C. atlantica* resultó ser superior a la longitud media de los dientes del cáliz en un factor de cinco mientras que para los otros dos taxones este factor se situó entre cuatro y ese valor.
- **De las alas.** Respecto a la longitud (FLO#15), la subsp. *atlantica* mostró el menor intervalo de variación y contó con un valor intermedio entre el valor mínimo mostrado por la subsp. *gallica* y el máximo que correspondió a *C. atlantica* (estos taxones presentaron un intervalo de variación prácticamente igual en amplitud). La subsp. *atlantica* y *C. atlantica* resultaron indistinguibles respecto al intervalo de variación y al valor medio de la anchura (FLO#16). La subsp. *gallica* presentó las alas más estrechas. También respecto a la longitud del espolón (FLO#17) fue la subsp. *gallica* el taxón que mostró el valor medio mínimo mientras que los otros dos taxones tuvieron valores

bastante similares, aunque algo superior en el caso de *C. atlantica*. De acuerdo con lo visto para FLO#15 y FLO#16, la relación longitud / anchura (FLO#20) fue máxima en *C. atlantica* y mínima en la subsp. *gallica*. La subsp. *atlantica*, en posición intermedia, estuvo más cerca de *C. atlantica* (Figura 11c).

- **Del estandarte.** La subsp. *gallica* tuvo el menor valor medio de anchura (FLO#22). *C. atlantica*, que contó con el menor intervalo de variación, mostró el valor máximo mientras que la subsp. *atlantica*, de nuevo en posición intermedia, también estuvo más cerca de *C. atlantica* que de la subsp. *gallica*. Respecto a la longitud de la uña del estandarte, se repitió esta situación, sólo que las diferencias se hicieron aún más pequeñas entre la subsp. *atlantica* y *C. atlantica*.

- **De la quilla.** En términos absolutos, el valor medio de la longitud del espolón de la quilla en los tres taxones fue muy parecido. No obstante, al igual que para la mayoría de los caracteres comentados anteriormente, el valor máximo residió en *C. atlantica* y el mínimo en la subsp. *gallica*, quedando esta vez, en cambio, la posición intermedia de la subsp. *atlantica* más próxima a la subsp. *gallica* (Figura 12a). Los intervalos de variación fueron idénticos para los tres taxones en amplitud (2,00), pero tanto el valor máximo como el mínimo fueron aumentando según la secuencia subsp. *gallica* → subsp. *atlantica* → *C. atlantica*.

- **Del pistilo.** Tanto para la longitud del estipite del ovario (FLO#33) como para la longitud del ovario (FLO#34) la subsp. *gallica* mostró los menores valores. Sin embargo, mientras que para FLO#33 apenas se diferenció la subsp. *atlantica* de *C. atlantica*, respecto a FLO#34 esta subespecie mostró un valor equidistante entre los correspondientes a los otros dos taxones. Respecto a FLO#37, los taxones siguieron el patrón de comportamiento ya comentado: el valor mínimo correspondió a la subsp. *gallica*, la subsp. *atlantica* tuvo un valor intermedio mientras que *C. atlantica* mostró el valor máximo.

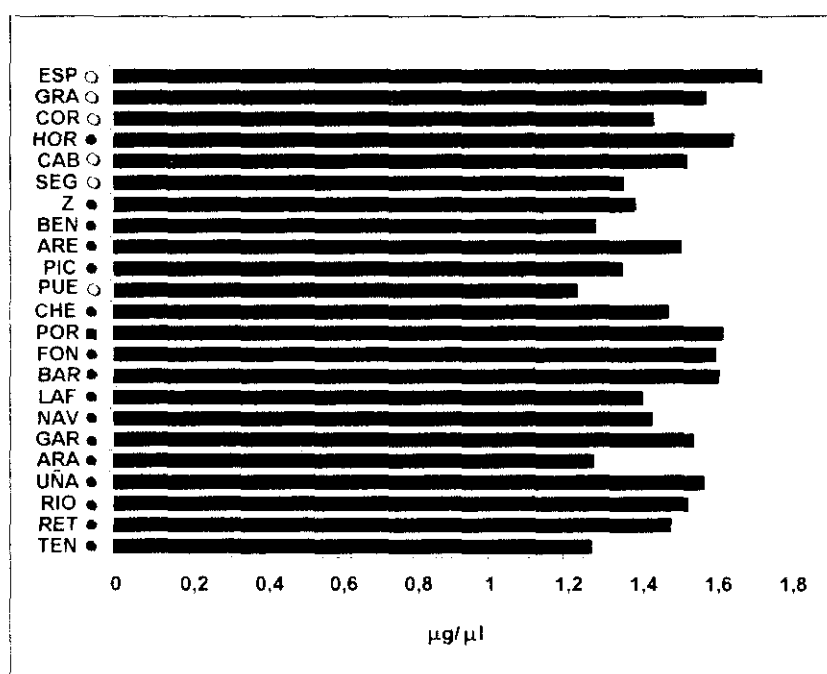
**Tabla 14.** UPGMA Coeficientes de correlación entre los caracteres con buena capacidad discriminatoria entre grupos (según PCA). Ver apartado 3.2.2.2 de Material y Métodos para la definición de los caracteres.

	FOL#1	FOL#10	FOL#11	FLO#2	FLO#3	FLO#12	FLO#15	FLO#16	FLO#17	FLO#18	FLO#20	FLO#21	FLO#22	FLO#23	FLO#25	FLO#26	FLO#27	FLO#28	FLO#31	FLO#33	FLO#34	FLO#36	FLO#37	
FOL#1	1.000																							
FOL#10	0.524	1.000																						
FOL#11	0.478	0.827	1.000																					
FLO#2	0.467	0.370	0.235	1.000																				
FLO#3	0.422	0.489	0.397	0.726	1.000																			
FLO#12	0.598	0.466	0.404	0.542	0.408	1.000																		
FLO#15	0.755	0.623	0.542	0.642	0.637	0.529	1.000																	
FLO#16	0.473	0.334	0.336	0.368	0.431	0.254	0.621	1.000																
FLO#17	0.538	0.559	0.464	0.555	0.600	0.387	0.897	0.601	1.000															
FLO#18	0.691	0.575	0.411	0.637	0.649	0.439	0.936	0.602	0.905	1.000														
FLO#20	0.449	0.464	0.360	0.378	0.317	0.382	0.619	-0.209	0.527	0.550	1.000													
FLO#21	0.742	0.577	0.524	0.651	0.661	0.513	0.964	0.591	0.865	0.893	0.588	1.000												
FLO#22	0.731	0.609	0.557	0.487	0.587	0.437	0.858	0.649	0.783	0.810	0.429	0.896	1.000											
FLO#23	0.758	0.568	0.479	0.536	0.549	0.380	0.852	0.615	0.800	0.840	0.448	0.848	0.799	1.000										
FLO#25	0.719	0.598	0.499	0.668	0.702	0.543	0.977	0.613	0.900	0.943	0.593	0.960	0.866	0.847	1.000									
FLO#26	0.695	0.624	0.491	0.575	0.544	0.513	0.927	0.581	0.878	0.914	0.580	0.895	0.812	0.820	0.930	1.000								
FLO#27	0.525	0.676	0.526	0.460	0.541	0.317	0.707	0.424	0.724	0.691	0.459	0.656	0.591	0.636	0.674	0.718	1.000							
FLO#28	0.676	0.579	0.407	0.649	0.654	0.473	0.947	0.586	0.898	0.948	0.580	0.904	0.791	0.867	0.962	0.923	0.693	1.000						
FLO#31	0.651	0.552	0.429	0.600	0.598	0.466	0.937	0.566	0.904	0.936	0.581	0.905	0.801	0.845	0.956	0.924	0.685	0.973	1.000					
FLO#33	0.571	0.596	0.556	0.446	0.478	0.493	0.776	0.569	0.722	0.753	0.395	0.781	0.694	0.746	0.789	0.815	0.583	0.793	0.832	1.000				
FLO#34	0.570	0.567	0.383	0.619	0.681	0.482	0.854	0.564	0.868	0.892	0.474	0.784	0.696	0.717	0.855	0.823	0.685	0.890	0.859	0.636	1.000			
FLO#36	0.691	0.587	0.474	0.570	0.524	0.466	0.901	0.528	0.819	0.847	0.595	0.895	0.853	0.751	0.920	0.920	0.642	0.879	0.887	0.709	0.763	1.000		
FLO#37	0.291	0.280	0.295	0.300	0.371	0.322	0.621	0.486	0.617	0.622	0.285	0.580	0.513	0.500	0.609	0.522	0.294	0.579	0.633	0.575	0.540	0.497	1.000	

### 4.3. ANALISIS DE ISOENZIMAS.

#### 4.3.1. EXTRACCION DE PROTEINA BRUTA Y CUANTIFICACION.

La cantidad media de proteína extraída de las semillas osciló entre los 1,2 y 1,7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en todos los casos (Figura 21). Se detectó una fracción lipídica asociada a las cubiertas seminales que no pudo ser eliminada con la inclusión en el tampón de extracción de detergentes aniónicos (Nonidet P-40, por ejemplo) ni con la introducción de un lavado previo de las semillas con disolventes orgánicos (éter de petróleo y/o metanol). Así, los extractos obtenidos resultaron muy densos y fue necesaria su dilución (ver Material y Métodos, 2.3.2.) para facilitar la carga de los geles.



**Figura 21.** Proteína total extraída de semillas de las 23 poblaciones de Colutea empleadas en el análisis de isoenzimas (valores medios de cuatro extracciones). ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

#### 4.3.2. VISUALIZACION.

Todas las muestras estudiadas mostraron actividad en los sistemas enzimáticos empleados. No se encontró variación entre repeticiones, permaneciendo invariables los patrones de bandas para cada muestra en lo que respecta a movilidad electroforética e intensidad de tinción de cada banda.

Las tinciones específicas para cada sistema isoenzimático permitieron visualizar un total de 144 bandas de actividad (Tabla 15).

**Tabla 15.** Matriz conjunta de las isoformas visualizadas. Se numeran de acuerdo con su movilidad relativa respecto del cátodo. (1 : presencia; 0 : ausencia). La primera fila denota las poblaciones numeradas como en Tabla 3. P: poblaciones; I: isoformas.

	P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
<b>I</b>																									
<b>ADH</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	9	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>SKD</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>ME</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	8	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	9	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
	14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>PGD</b>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	8	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	9	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

(Continúa)

<b>G6PDH</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
	6	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	9	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	11	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>GDH</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<b>SOD</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>GOT</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(Continúa)





### 4.3.2.1. Oxidorreductasas.

#### 4.3.2.1.1. ADH.

Se obtuvo una única zona de actividad enzimática en la parte superior del gel ( $R_p$  máx.= 0,28). Se visualizaron nueve bandas de actividad para el conjunto de las muestras, en general de tinción muy débil. Las isoformas nº 4, 5, 6, 7 y 8 aparecieron en todas las muestras. La banda nº 1, muy poco intensa, caracterizó las muestras ARE, COR, GRA y ESP mientras que la nº 2 apareció sólo en UÑA y POR. El electromorfo nº 3 fue exclusivo de la subsp. *gallica*. La isoforma nº 9, también débil, se integró en los patrones de bandas de las muestras de *C. atlantica* (excepto PUE) y en Z, RIO, ARA, GAR, NAV, CHE y HOR de *C. arborescens* subsp. *gallica* (Figura 22).

Las poblaciones RIO, ARA, GAR y NAV mostraron un patrón de bandas común, formando un grupo homogéneo dentro de las muestras de la subsp. *gallica*. Otro patrón común a varias poblaciones de este taxón fue el mostrado por TEN, RET y LAF.

Se obtuvieron dos patrones de bandas comunes a la subsp. *gallica* y *C. atlantica*: BAR, FON, PIC y BEN (subsp. *gallica*) con PUE (*C. atlantica*) y CHE, Z y HOR (subsp. *gallica*) con SEG y CAB (*C. atlantica*).

Sólo tres de las seis poblaciones de *C. atlantica* presentaron un mismo perfil de bandas (COR, GRA y ESP). UÑA (subsp. *gallica*) y POR (subsp. *atlantica*) mostraron un patrón de bandas único.

#### 4.3.2.1.2. SKD.

La tinción específica de este sistema isoenzimático reveló una zona de actividad en la parte superior del gel ( $R_p$  máx.= 0,26). El sistema SKD se resolvió en ocho bandas de actividad, de las que los nº 4, 6, 7 y 8 fueron comunes a todas las muestras. La banda nº 1 sólo apareció en la subsp. *atlantica* (POR). Las isoformas nº 2 y nº 3 estuvieron en los patrones de todas las muestras excepto en PUE, PIC y ARE. La banda nº 5, teñida débilmente, sólo faltó en CHE (subsp. *gallica*) y PUE, COR, GRA y ESP de *C. atlantica* (Figura 23).

En general, la tinción específica para este sistema isoenzimático reveló patrones de bandas comunes a poblaciones tanto de la subsp. *gallica* como de *C. atlantica*. Así, TEN, RET, RIO, UÑA, ARA, GAR, NAV, LAF, BAR, BEN, Z y HOR (subsp. *gallica*) compartieron el patrón más común, formado por las isoformas nº 2 - 8, con SEG y CAB (*C. atlantica*) mientras que COR, GRA y ESP, pertenecientes a este último taxón, mostraron el mismo que CHE (subsp. *gallica*).

Por su parte, PIC y ARE (subsp. *gallica*) mostraron el único patrón común a más de una población de un mismo taxón. PUE, otra muestra de *C. atlantica* mostró un patrón único. Por último, POR (*C. arborescens* subsp. *atlantica*) presentó un perfil de bandas único que contenía la totalidad de las isoformas.

#### 4.3.2.1.3. ME.

Esta oxidorreductasa presentó dos zonas de actividad, una netamente catódica ( $R_p$  máx.= 0,10) con las bandas de actividad nº 1 - 10 y otra en posición intermedia ( $R_p$  máx.= 0,42) con las bandas nº 14 - 18. La primera de estas zonas mostró, en general, las bandas más intensamente teñidas. En la zona catódica, las isoformas nº 1, 2, 4 y 5 fueron comunes a todas las muestras. La banda nº 3 sólo apareció en BAR y HOR, pero mientras que en la primera muestra se tiñó intensamente (casi enmascarando la banda nº 2), en la segunda apenas se detectó. La banda nº 6 sólo faltó en ARA y GAR. La banda nº 7 apareció en POR, CHE, PUE, PIC, ARE, BEN y SEG. Las isoformas nº 8 y nº 9 estuvieron en los patrones de todas las muestras excepto en el de GAR. Dos isoformas sólo aparecieron en una población, la banda nº 10 en RET y la nº 11 en UÑA. La banda nº 12 se detectó en Z, CAB, COR, HOR y GRA. HOR, COR y GRA presentaron la nº 13, aunque en el caso de las dos primeras poblaciones de forma poco intensa. En la segunda zona de actividad las isoformas nº 14, 17 y 18 fueron comunes a todas las muestras. La banda nº 15 faltó en los patrones de Z, CAB, HOR, COR, GRA y ESP y la nº 16, sólo en estas tres últimas poblaciones (Figura 24).

El conjunto de muestras que presentó el patrón de bandas mayoritario fue heterogéneo ya que incluyó poblaciones de todos los taxones estudiados: CHE, PIC, ARE y BEN de la subsp. *gallica*, POR de la subsp. *atlantica*, y PUE y SEG de *C. atlantica*. Sin embargo, por procedencia geográfica fue muy homogéneo ya que, a excepción de SEG, todas las poblaciones eran levantinas.

Los otros dos patrones de bandas comunes a más de una muestra fueron el que compartieron TEN, RIO, LAF, NAV y FON (subsp. *gallica*) y el mostrado por COR y GRA (*C. atlantica*). El resto de las muestras presentó un perfil de bandas distinto para cada una de ellas.

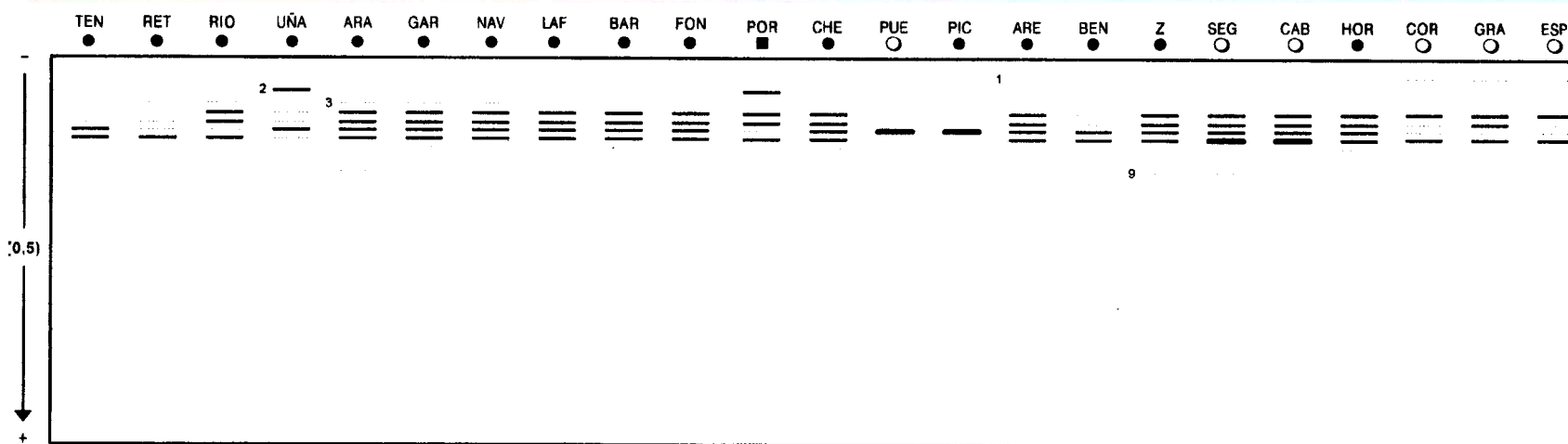
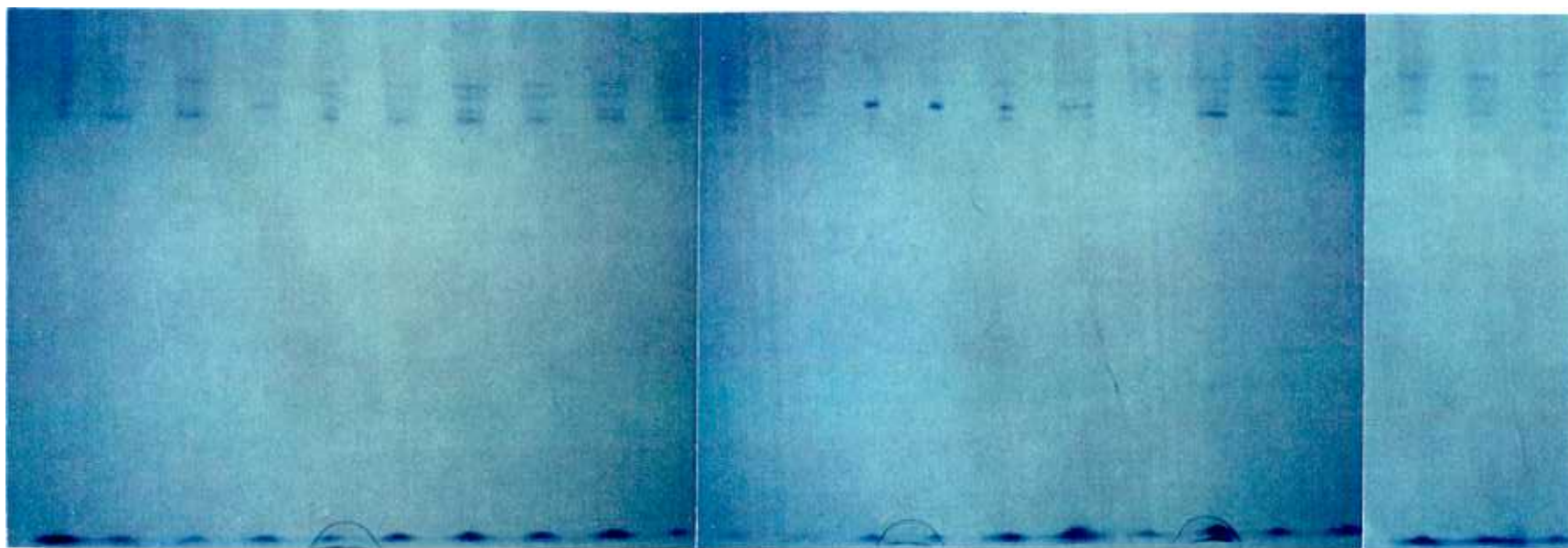


Figura 22. Zimograma correspondiente a ADH. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

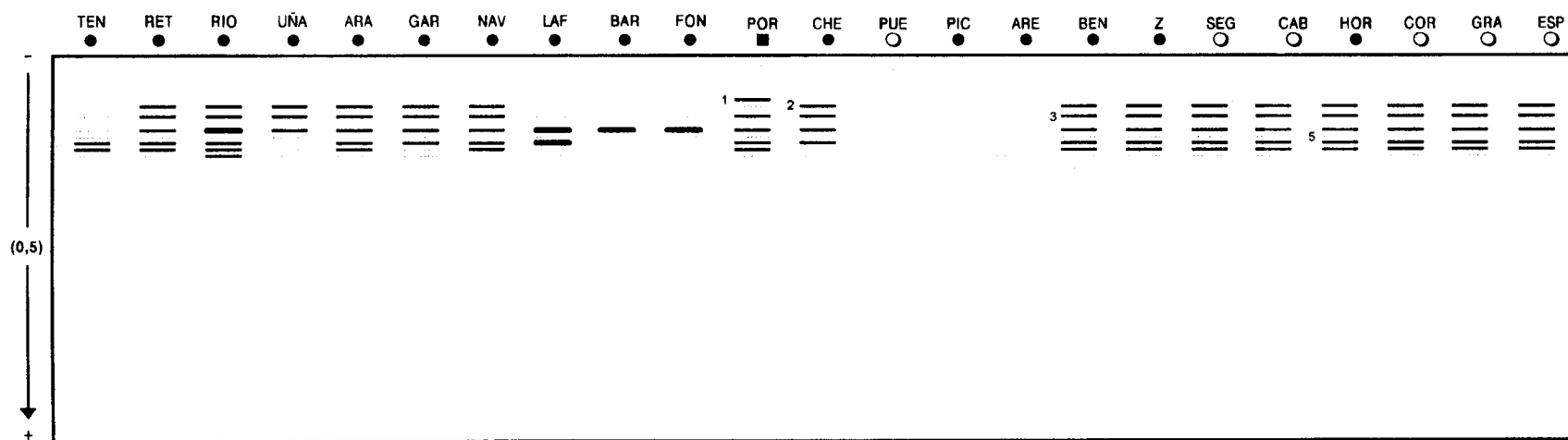
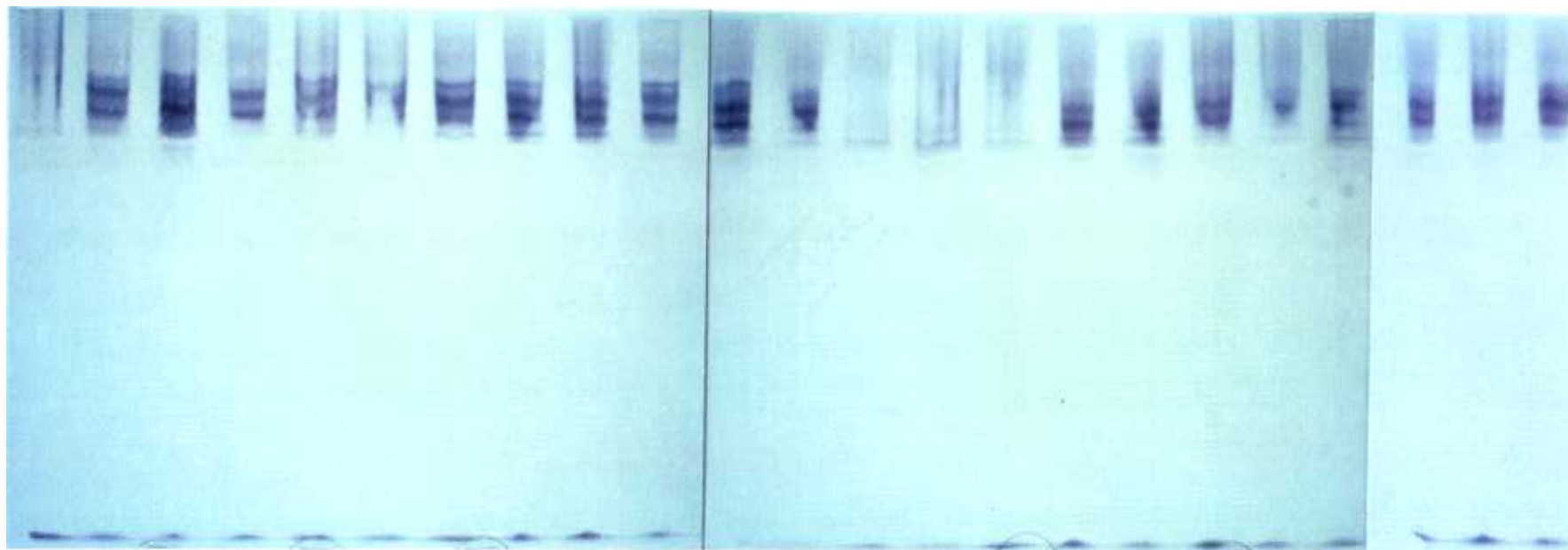


Figura 23. Zimograma correspondiente a SKD. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

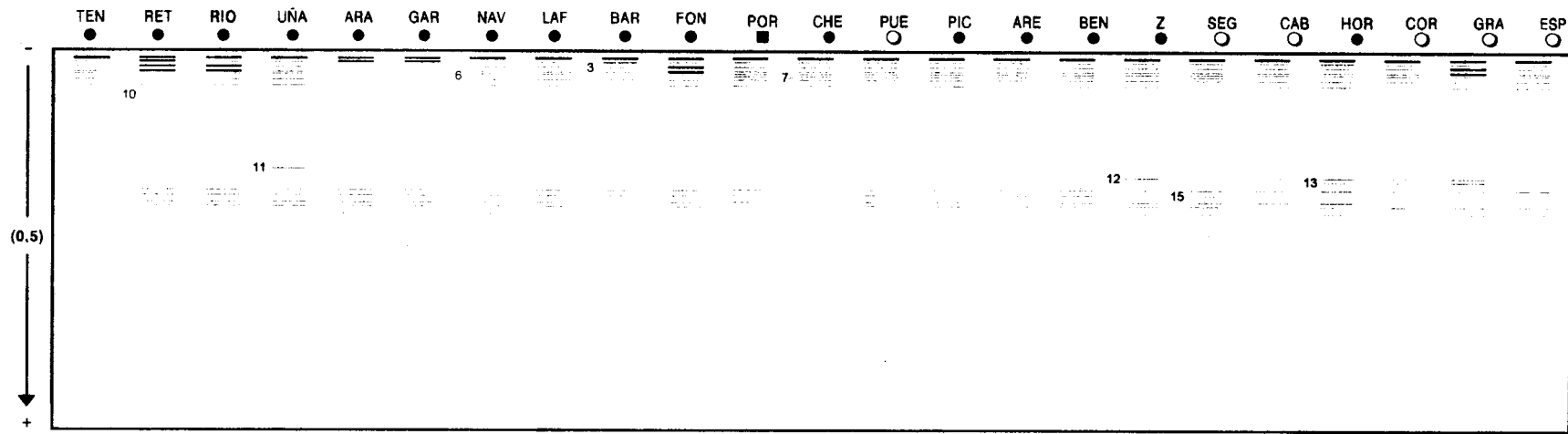
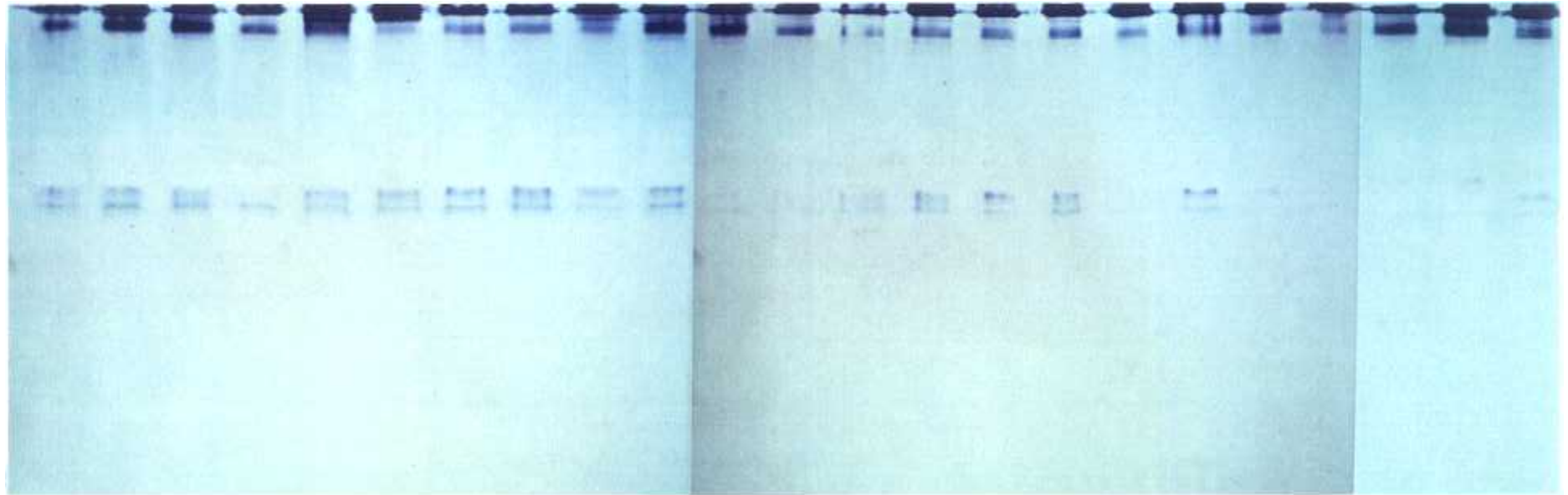


Figura 24. Zimograma correspondiente a ME. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

#### 4.3.2.1.4. PGD.

PGD presentó una zona de actividad con  $R_p$  máx. = 0,21. Se pudo individualizar un total de nueve isoformas, de las que sólo la nº 4 estuvo presente en todas las muestras aunque la nº 9 sólo faltó en BAR y Z. El electromorfo nº 2 apareció en seis poblaciones: UÑA, ARA y GAR (*C. arborescens* subsp. *gallica*) y COR, GRA y ESP (*C. atlantica*). La banda de actividad nº 7 apareció sólo en Z y GRA. La banda nº 8 se presentó en los patrones correspondientes a ARA y BAR (subsp. *gallica*) y ESP de *C. atlantica* (Figura 25).

La mitad de las poblaciones mostraron un patrón distinto para cada una de ellas. El perfil de bandas que fue común a un mayor número de poblaciones fue el que presentaron CHE, PIC (subsp. *gallica*), POR (subsp. *atlantica*) y SEG (*C. atlantica*). También fue heterogéneo el conjunto de muestras que compartieron otro de los patrones: LAF, ARE (*C. arborescens* subsp. *gallica*) y PUE (*C. atlantica*). Los otros dos perfiles de bandas se presentaron, dos a dos, entre poblaciones de la subespecie *gallica*: RET - RIO y UÑA - GAR.

#### 4.3.2.1.5. G6PDH.

Este sistema isoenzimático se visualizó como una sola zona de actividad en el tramo superior del gel ( $R_p$  máx.= 0,19). Se visualizaron 16 isoformas, de las que las nº 1, 2, 8, 10 y 13 - 16 fueron comunes a todas las muestras. Las bandas nº 9 y nº 12 sólo faltaron en BAR y ESP, respectivamente. Las únicas muestras que presentaron la isoforma nº 11 fueron UÑA, ARA y BAR (subsp. *gallica*). Esta última muestra, además, fue la única que presentó la nº 7. El electromorfo nº 5 estuvo presente en TEN, RET, RIO, UÑA, ARA, NAV, LAF, PIC y Z (subsp. *gallica*) y PUE (*C. atlantica*). La isoforma nº 6 apareció levemente teñida en RET, UÑA y ARA, estando presente también en TEN, RIO, Z, GRA y ESP. La banda nº 6, en las muestras en que estuvo presente, se tiñó escasamente, excepto en RIO. Las bandas nº 3 y 4 estuvieron presentes sólo en las 10 primeras muestras (Figura 26).

Sólo dos poblaciones presentaron un perfil de bandas único, BAR y Z (subsp. *gallica*). Dentro de la subespecie *gallica* no hubo un patrón de bandas mayoritario. Los perfiles sólo fueron compartidos por un máximo de tres poblaciones (TEN, RET y RIO): UÑA - ARA, NAV - LAF, GAR - FON y ARE - BEN mostraron otros tres patrones comunes. Las demás muestras de este taxón mostraron patrones de bandas conjuntamente con poblaciones de otros taxones: PIC con PUE (*C. atlantica*), CHE con POR (subsp. *atlantica*) y HOR con SEG, CAB y COR (*C. atlantica*). Las

poblaciones GRA y ESP (*C. atlantica*) también presentaron un perfil de bandas común.

#### 4.3.2.1.6. GDH.

Esta oxidorreductasa presentó una zona de actividad catódica ( $R_p$  máx. = 0,14) con 6 isoformas, de las que las nº 1, 3 y 4 fueron comunes a todas las poblaciones. La nº 2 apareció en los perfiles de bandas correspondientes a ARA, NAV, LAF, BAR, FON y PIC, ARE y BEN (*C. arborescens* subsp *gallica*). La isoforma nº 5 se presentó en los perfiles de bandas de UÑA, ARA, GAR, NAV, POR, CHE, Z, CAB, HOR, COR, GRA y ESP; la nº 6 lo hizo en POR, CHE, COR, GRA y ESP. (Figura 27)

Es destacable que PUE y SEG (*C. atlantica*) mostrasen el mismo patrón de bandas que TEN, RET, RIO y GAR (subsp. *gallica*). El resto de poblaciones de *C. atlantica* presentaron también la isoforma nº 5 en todos los casos y la nº 6 en COR, GRA y ESP.

Dentro de la subsp. *gallica*, el patrón de bandas común a un mayor número de poblaciones fue el compartido por LAF, BAR, FON, PIC ARE y BEN. También mostraron un perfil idéntico ARA y NAV. El resto de muestras de este taxón (UÑA, Z y HOR) exhibió el mismo patrón de bandas que CAB (*C. atlantica*).

La mitad de las poblaciones de *C. atlantica* (COR, GRA y ESP) mostró un perfil común.



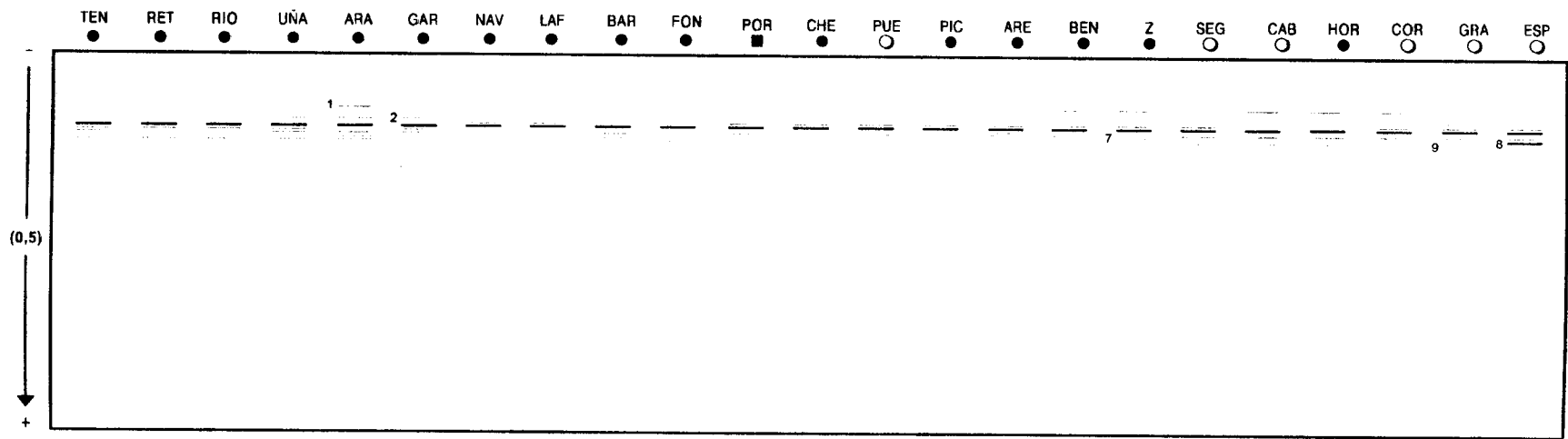
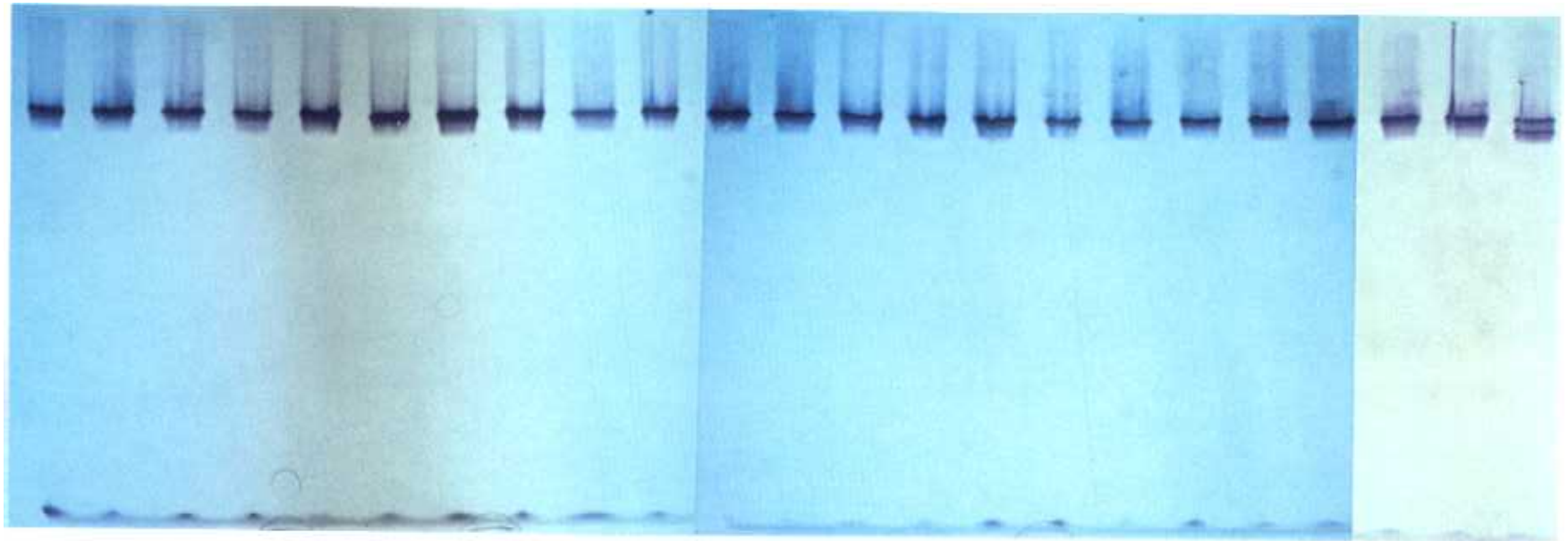


Figura 25. Zimograma correspondiente a PGD. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

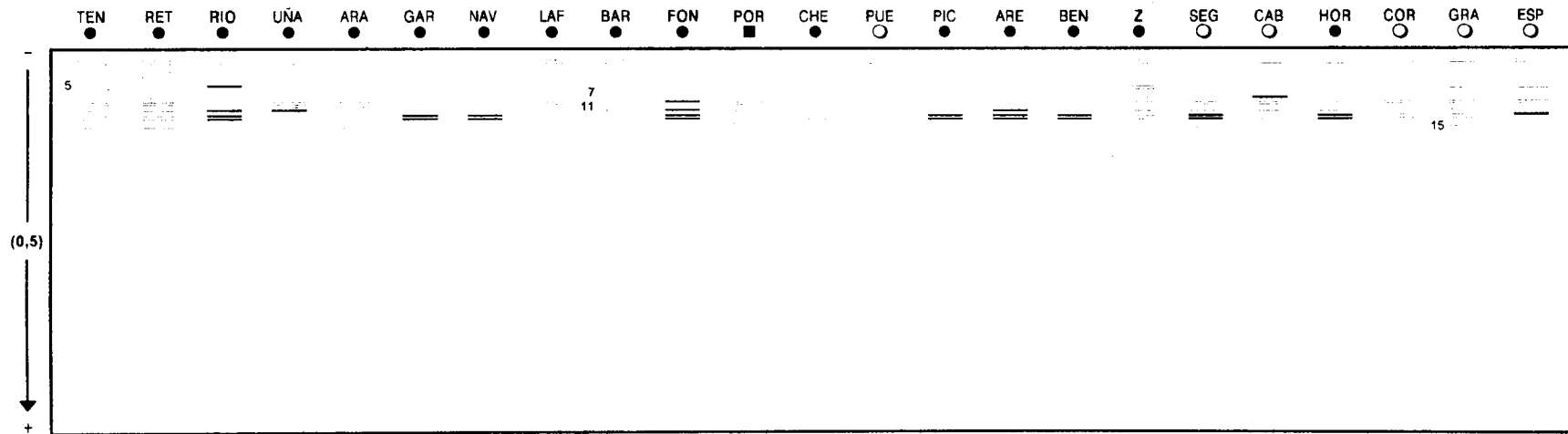
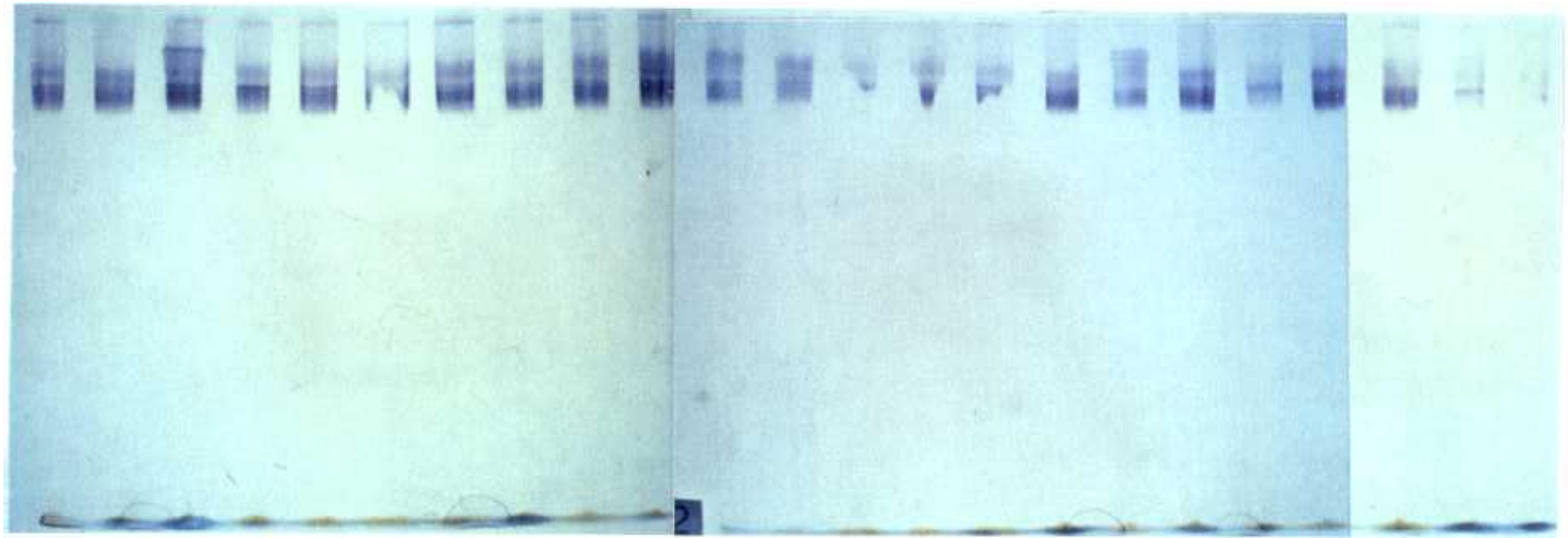


Figura 26. Zimograma correspondiente a G6PDH. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

#### 4.3.2.1.7 SOD.

La tinción específica para la visualización de este sistema isoenzimático reveló la existencia de dos zonas de actividad, una superior que se extendía hasta un  $R_p = 0,39$  (isoformas 1 - 10) y otra inferior que desde un  $R_p = 0,68$ , quedaba limitada por un  $R_p = 0,79$  (isoformas 14 - 19), para un total de 19 bandas de actividad. En la primera zona de actividad, todas las muestras presentaron las isoformas nº 1 - 3 y 6, 7 y 9. La banda nº 4 no apareció en NAV, LAF, BAR; FON, POR, BEN, Z, SEG, CAB y HOR mientras que la nº 5 sólo faltó en POR, Z, CAB y HOR. El electromorfo nº 8 se presentó en los patrones de bandas de CHE, Z y HOR (subsp. *gallica*), POR (subsp. *atlantica*) y CAB, COR, GRA y ESP (*C. atlantica*). La banda nº 10 se integró en los perfiles de POR, CHE, Z, CAB y HOR. De las isoformas de la zona intermedia, 11 y 12 estuvieron presentes en las mismas poblaciones que mostraron la nº 8, mientras que la nº 13 sólo apareció en el patrón de bandas de ESP. En la segunda zona de actividad, el electromorfo nº 14 sólo apareció en HOR (subsp. *gallica*) y CAB, COR y ESP (*C. atlantica*). El resto de isoformas de esta zona se presentó en todas las muestras excepto en ESP que careció de las bandas nº 15 - 19. La banda 19 sólo apareció en BEN (*C. arborescens* subsp. *gallica*) (Figura 28).

Se pudieron distinguir ocho perfiles de bandas de los que tres correspondieron a una sola población: CHE y BEN (*C. arborescens* subsp. *gallica*) y ESP (*C. atlantica*). Si exceptuamos el compartido por COR y GRA (*C. atlantica*), los restantes patrones de bandas fueron mostrados por muestras de distintos taxones:

el perfil mayoritario se presentó, básicamente, entre muestras de la subsp. *gallica* (TEN, RET, RIO, UÑA, ARA, GAR, PIC y ARE) aunque también lo hizo en PUE (*C. atlantica*). También de este taxón, HOR, mostró otro patrón que fue idéntico al de CAB (*C. atlantica*). LAF, NAV, BAR y FON (subsp. *gallica*) y SEG (*C. atlantica*) presentaron otro de los patrones de bandas. POR (subsp. *atlantica*) y Z (subsp. *gallica*) mostraron otro de los patrones comunes.

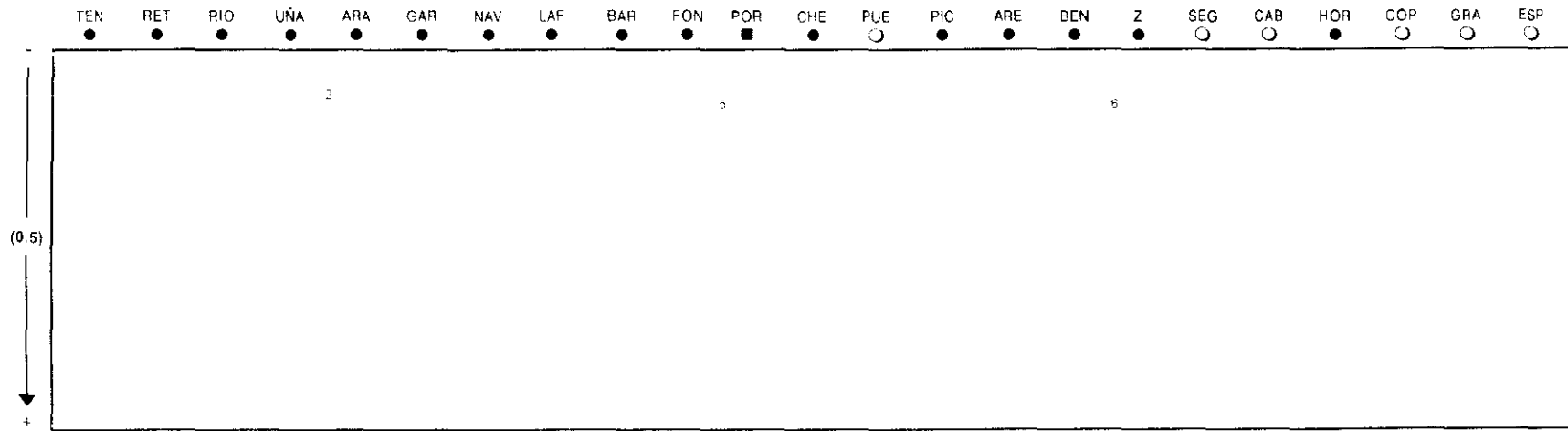


Figura 27. Zimograma correspondiente a GDH. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

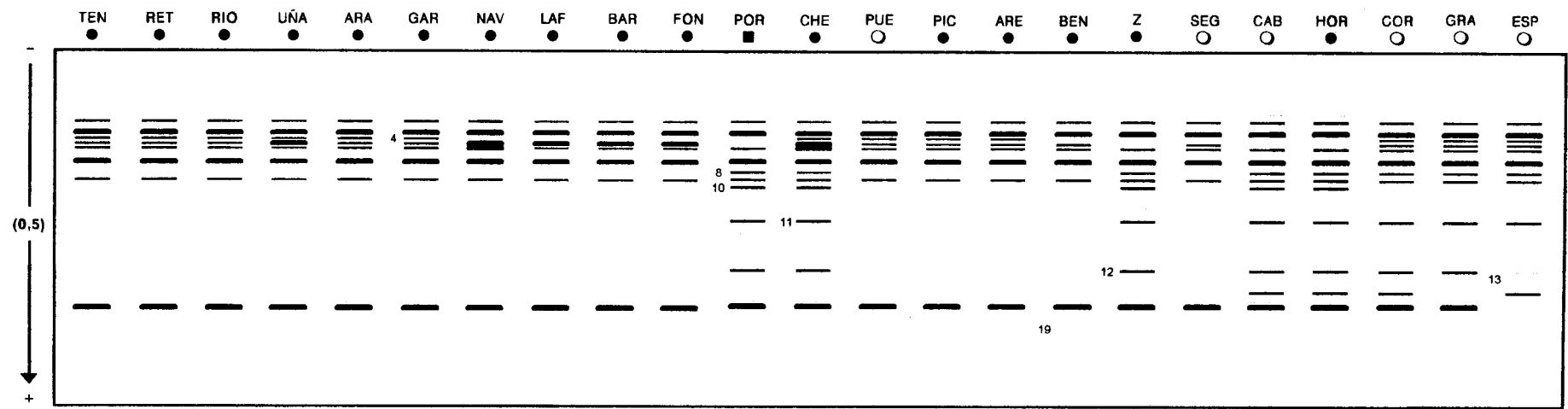


Figura 28. Zimograma correspondiente a SOD. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

### 4.3.2.2. Transferasas.

#### 4.3.2.2.1. GOT.

En este sistema se visualizaron dos zonas de actividad, una superior con un  $R_p$  máx.= 0,19 y otra intermedia ( $R_p$ . máx.= 0,38) para un total de ocho bandas de actividad que se tiñeron muy homogéneamente en cada muestra. Las isoformas nº 3, 4, 7 y 8 fueron comunes a todas las muestras. Las diez primeras muestras mostraron la isoforma nº 1; la nº 2 se presentó en el perfil de bandas de estas mismas poblaciones además de en PUE, PIC, COR, GRA y ESP. Las bandas nº 5 y 6 aparecieron en POR, CAB y HOR, mientras que ESP sólo mostró la primera de estas isoformas (Figura 29).

ESP mostró un patrón de bandas único. De su misma especie, *C. atlantica*, COR y GRA presentaron otro patrón que sólo se diferenció del anterior en la ausencia de la isoforma nº 5, mientras que CAB compartió perfil de bandas con POR (subsp. *atlantica*) y HOR (subsp. *gallica*), PUE con PIC (subsp. *gallica*) y, finalmente, SEG mostró el mismo patrón de bandas que CHE, ARE, BEN y Z (subsp. *gallica*). Las restantes poblaciones (subsp. *gallica*) mostraron un patrón común caracterizado por la ausencia de las isoformas nº 5 y nº 6.

### 4.3.2.3. Hidrolasas.

#### 4.3.2.3.1. AP.

Esta hidrolasa presentó dos zonas de actividad, una superior con un  $R_p$  máx.= 0,19 y otra que desde un  $R_p$  = 0,34 se extendía hasta un  $R_p$  = 0,74. Se visualizaron 23 isoformas. De las ocho presentes en la primera zona, la nº 2 sólo faltó en PIC. La banda nº 7 apareció sólo en tres poblaciones de *C. atlantica* (COR, GRA y ESP) mientras que la nº 8 sólo se presentó en el perfil de bandas de NAV (subsp. *gallica*). En la segunda zona de actividad, los electromorfos nº 9 - 13, 16 y 20 - 22 fueron comunes a todas las muestras. Las únicas poblaciones que mostraron la banda de actividad nº 14 (ARA y GAR) también carecieron de la nº 15, presente en los perfiles de bandas del resto de muestras, con excepción de ESP. La isoforma nº 17 no se presentó en ARA, GAR, LAF, BAR y FON; tampoco apareció la banda nº 18 en RET, ARA y GAR. Menos de la mitad de las muestras presentaron el electromorfo nº 19 (TEN, RET, ARA, GAR, NAV, BAR, FON, POR, CHE y PUE). A su vez, la nº 23 sólo estuvo presente en NAV, LAF, BAR, FON, COR, GRA y ESP (Figura 30).

La tinción específica para este sistema isoenzimático permitió la visualización de quince perfiles de bandas. De éstos, sólo cuatro fueron mostrados por más de una población:

los dos patrones comunes presentados por poblaciones de un mismo taxón fueron los formados por ARA - GAR (subsp. *gallica*) y por COR - GRA (*C. atlantica*). Los otros dos perfiles fueron compartidos por poblaciones de diferente taxón: ARE, BEN, Z, HOR (subsp. *gallica*) y SEG - CAB (*C. atlantica*) y CHE (subsp. *gallica*) y PUE (*C. atlantica*)

#### 4.3.2.3.2. EST.

Este sistema isoenzimático presentó una amplia zona de actividad limitada por un rango de Rp que iba de 0,43 a 0,95. Se visualizaron 24 isoformas. De éstas, sólo las nº 11, 14 y 15 fueron comunes a todas las muestras si bien las nº 2 - 4 sólo faltaron en SEG, la nº 5 en Z, la nº 8 en ARA y SEG y la nº 12 en GRA y ESP. Las isoformas nº 1 y nº 10 aparecieron sólo en poblaciones de *C. atlantica*, CAB y GRA y GRA y ESP, respectivamente. Sólo GAR, PUE, BEN, SEG, COR y GRA carecieron de la banda de actividad nº 6. TEN, PUE, BEN, GRA y ESP tampoco exhibieron la nº 9. Las últimas cinco muestras carecieron del electromorfo nº 13. Las poblaciones TEN, ARA, GAR, NAV, LAF, BAR, POR, CHE, ARE, COR, GRA y ESP no mostraron la banda de actividad nº 17 y lo mismo ocurrió con UÑA, ARA, POR, CHE, BEN, Z, SEG, CAB y HOR respecto de la nº 18. En cambio, sólo en HOR, GRA y ESP la banda nº 19 no estuvo presente. CHE y HOR fueron las únicas poblaciones que no mostraron el electromorfo nº 20. La isoforma nº 21 estuvo ausente en POR, CHE y HOR y la nº 22 en estas mismas muestras además de en Z y SEG. La banda nº 23 faltó en UÑA, CHE, CAB, HOR y ESP. La banda de actividad nº 24 caracterizó tan solo a UÑA (Figura 31).

De los diecisiete patrones de bandas detectados con esta hidrolasa, sólo dos fueron compartidos por más de una población, siempre dentro de la subsp. *gallica*: RET, RIO, FON y PIC mostraron uno y el otro fue compartido por NAV, LAF, BAR y ARE.

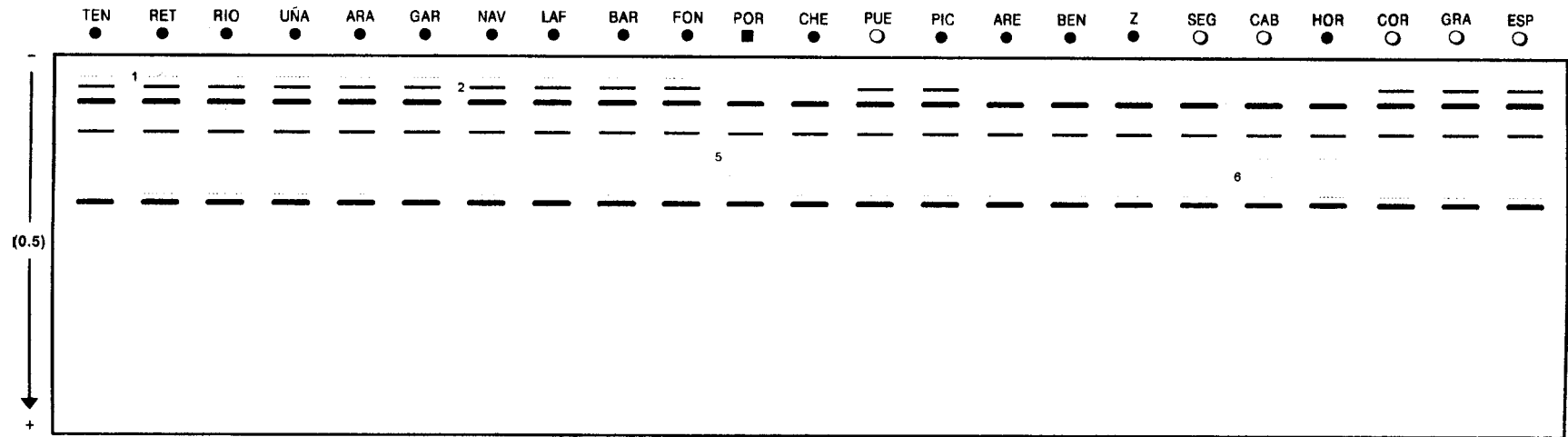
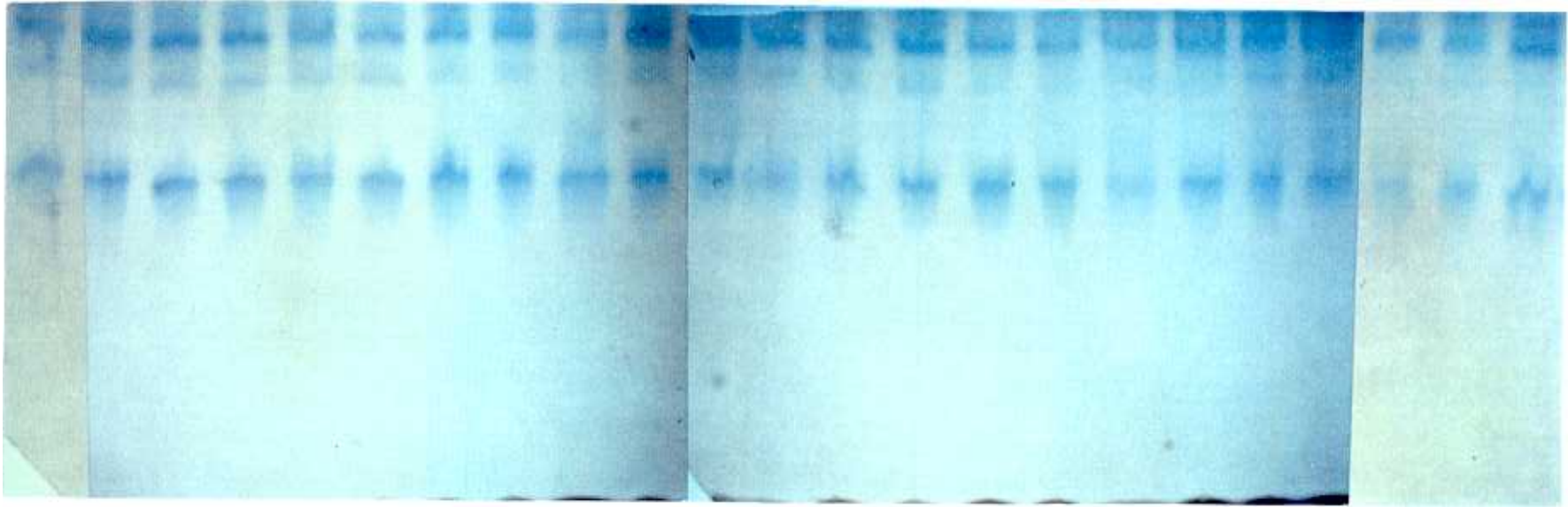


Figura 29. Zimograma correspondiente a GOT. ●: *C. arborescens* subsp. *aallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*



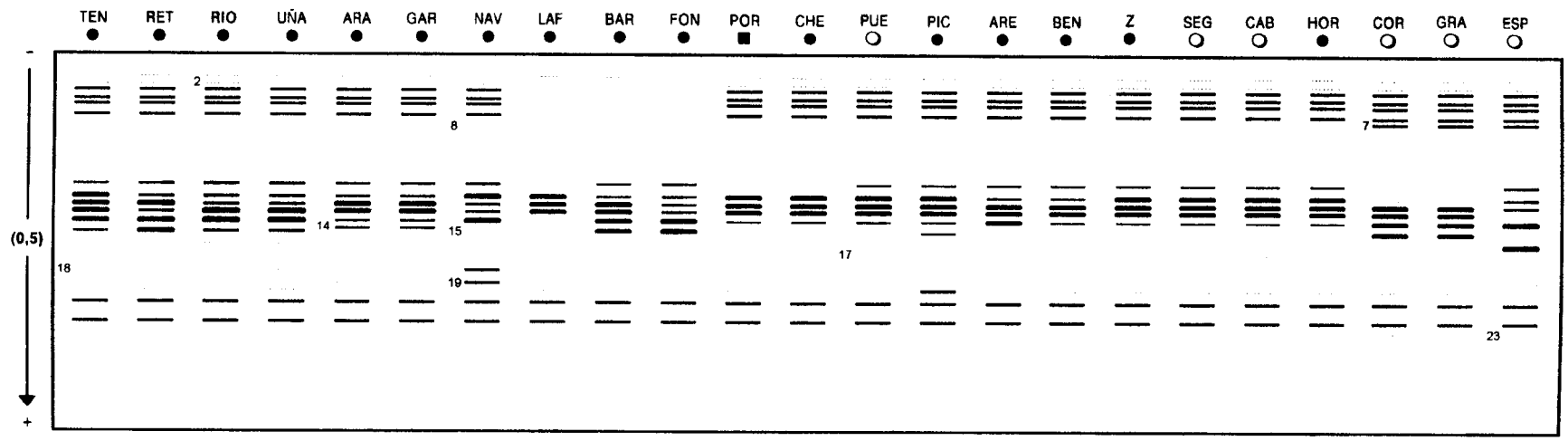
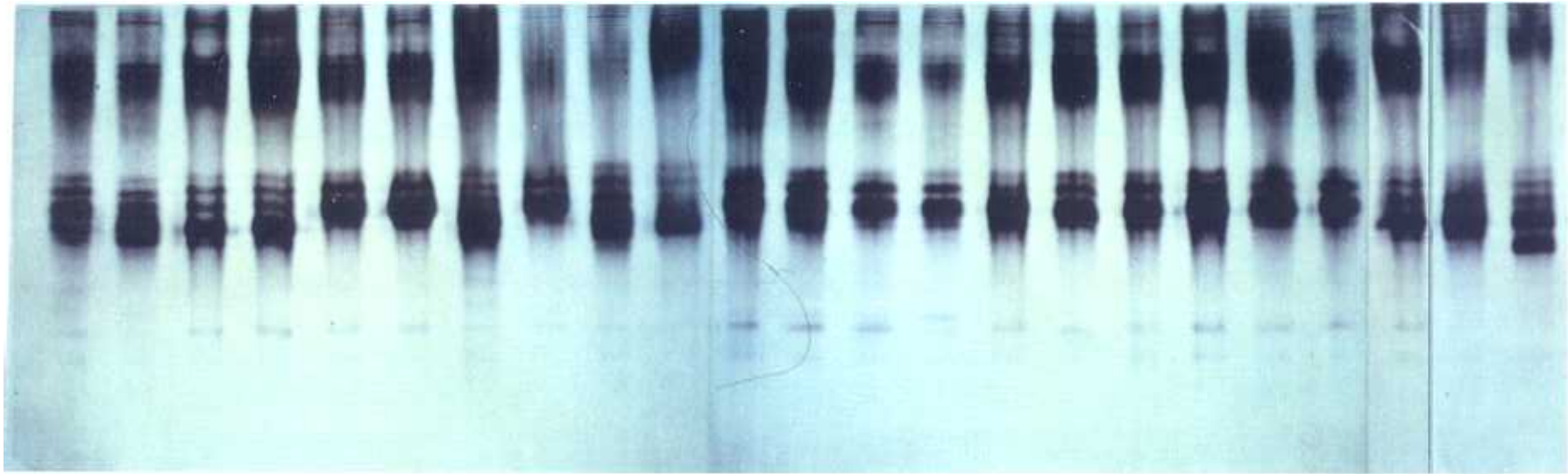


Figura 30. Zimograma correspondiente a AP. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

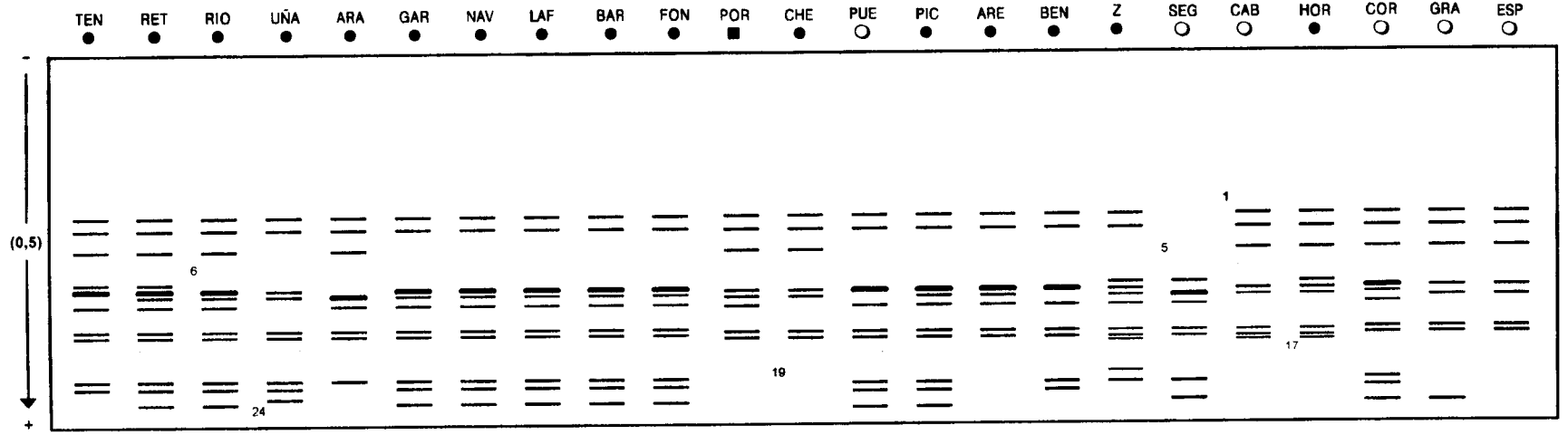
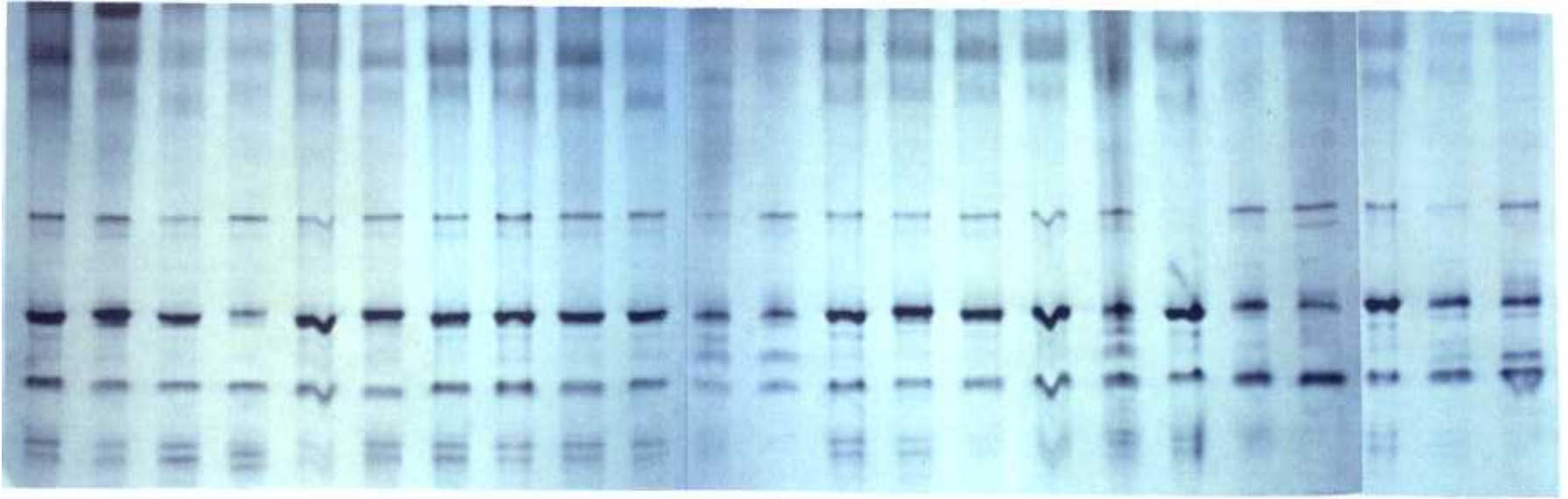


Figura 31. Zimograma correspondiente a EST. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

### 4.3.3. ANALISIS MULTIVARIANTE.

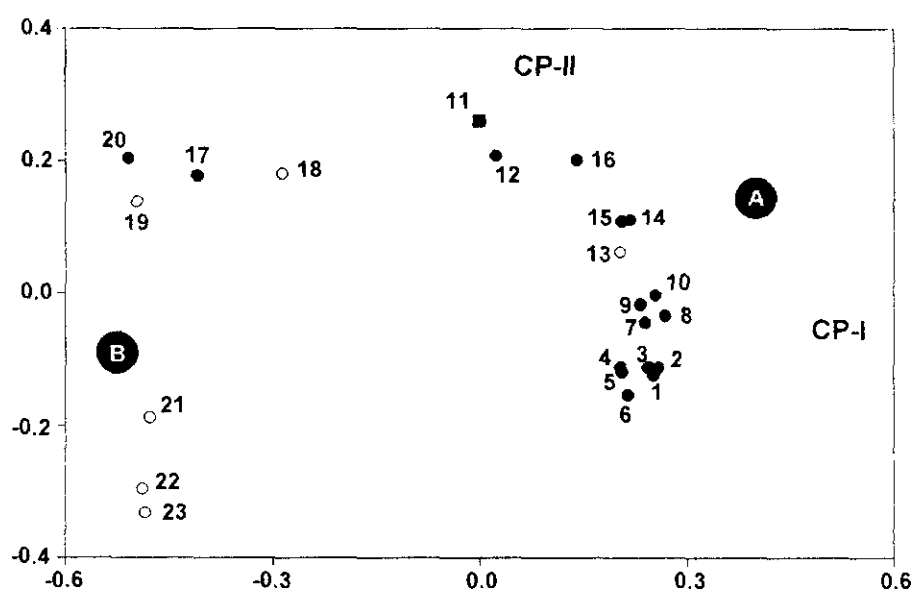
#### 4.3.3.1. Análisis de ordenamiento (PCO).

Con el PCO correspondiente a los valores del coeficiente de similitud **J** se obtuvo una sola coordenada principal con un autovalor  $\geq 1,00$  que explicó el 37,63 % de la variación observada. Fueron necesarias las siete primeras para acumular más del 75 % de la variación (77,53 %). Las tres primeras coordenadas principales expresaron el 37,63 %, 11,45 % y 8,90 % respectivamente, acumulando el 57,97 % de la variación total (Tabla 16). Con los valores de distancia obtenidos por el coeficiente **R**, el PCO no rindió ninguna coordenada principal con un autovalor  $\geq 1,00$ . Las tres primeras acumularon el 91,13 % de la variación observada, expresando el 69,83 %, 13,71 % y 7,60 %, respectivamente (Tabla 16).

**Tabla 16.** Análisis de Coordenadas Principales (Isoenzimas). Coordenadas principales (i) correspondientes a los coeficientes **J** y **R** con indicación de su contribución a la variabilidad observada (% = porcentaje;  $\Sigma\%i$  = porcentaje acumulado).

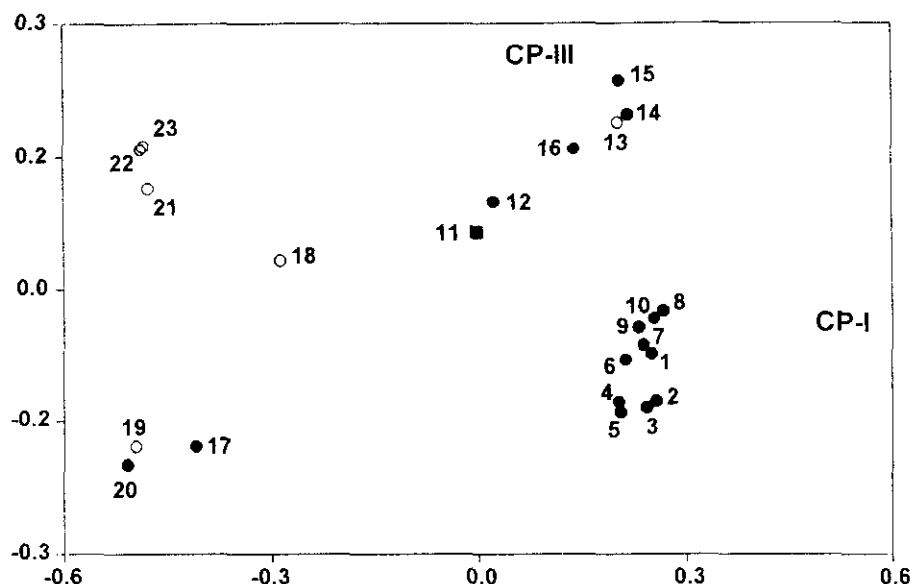
<b>J</b>				<b>R</b>			
<b>i</b>	<b>Autovalor</b>	<b>%</b>	<b><math>\Sigma\%i</math></b>	<b>i</b>	<b>Autovalor</b>	<b>%</b>	<b><math>\Sigma\%i</math></b>
1	2,254	37,63	37,63	1	0,436	69,83	69,83
2	0,686	11,45	49,08	2	0,086	13,71	83,54
3	0,533	8,90	57,97	3	0,047	7,60	91,13
4	0,426	7,12	65,09	4	0,041	6,53	97,66
5	0,271	4,53	69,62	5	0,021	3,40	>100%
6	0,257	4,28	73,90	6	0,021	3,39	>100%
7	0,217	3,63	77,53	7	0,017	2,65	>100%
8	0,204	3,41	80,94	8	0,014	2,28	>100%
9	0,190	3,17	84,11	9	0,013	2,14	>100%
10	0,140	2,34	86,45	10	0,010	1,66	>100%
11	0,133	2,22	88,66	11	0,009	1,52	>100%
12	0,114	1,90	90,56	12	0,008	1,29	>100%
13	0,096	1,61	92,17	13	0,007	1,20	>100%
14	0,088	1,47	93,64	14	0,004	0,61	>100%
15	0,084	1,39	95,03	15	0,004	0,56	>100%
16	0,076	1,28	96,31	16	0,003	0,50	>100%
17	0,064	1,07	97,38	17	0,001	0,28	>100%
18	0,055	0,92	98,30	18	0,001	0,21	>100%
19	0,038	0,63	98,92	19	0,001	0,18	>100%
20	0,033	0,56	99,48	20	0,001	0,13	>100%
21	0,021	0,35	99,83	21	0,001	0,08	>100%
22	0,011	0,17	100,00	22	0,000	0,01	>100%
23	cte.	0,00	>100%	23	cte.	0,01	>100%

En el PCO basado en la matriz de distancias de Jaccard, la primera coordenada (37,63 % de la variación observada) ordenó las muestras en dos grupos muy bien definidos, A y B (Figura 32). En la parte positiva de la coordenada, el grupo A reunió a la mayor parte de las muestras pertenecientes a *C. arborescens* subsp. *gallica*; la única excepción fue la presencia de PUE (nº 13, *C. atlantica*), de procedencia "levante". El grupo B quedó definido en la parte negativa de la coordenada y estuvo compuesto por muestras pertenecientes a *C. atlantica* y HOR y Z (nº 20 y 17, *C. arborescens* subsp. *gallica*). Si exceptuamos esta última población, este grupo resultó muy homogéneo respecto a la procedencia geográfica ("sur") de sus integrantes. Entre estos dos grupos quedaron en una posición intermedia POR (nº 11, *C. arborescens* subsp. *atlantica*), CHE (nº 12, *C. arborescens* subsp. *gallica*) y SEG (nº 18, *C. atlantica*) (Figura 32).



**Figura 32.** Ordenación de las muestras respecto a la 1ª y 2ª coordenadas principales (isoenzimas, coeficiente J). Se indican los dos grupos definidos (ver texto). Numeración de las poblaciones según Tabla 3. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

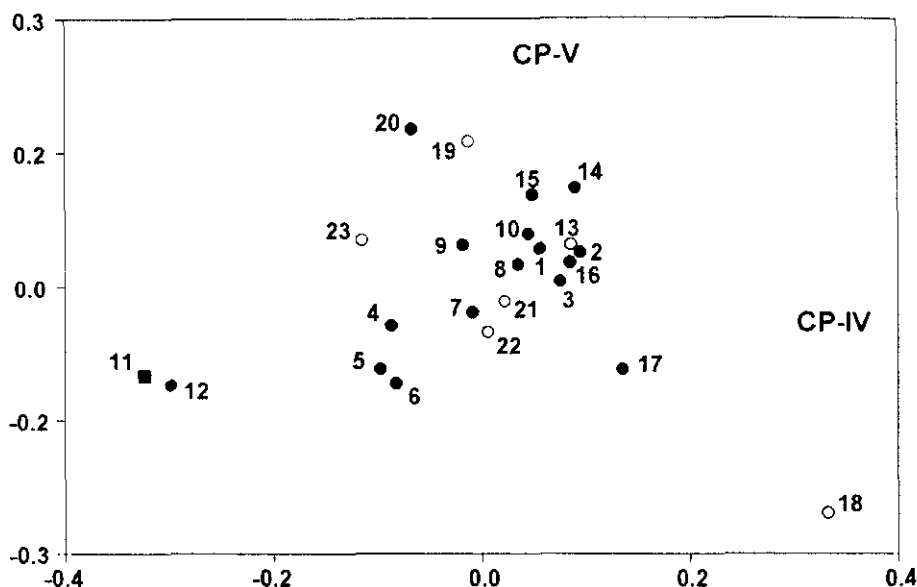
La segunda coordenada principal (explicó el 11,45 % de la variación observada) repartió las muestras casi a partes iguales en su parte negativa y positiva (13 y 10 muestras, respectivamente). Agrupó a la mayor parte de las poblaciones de *C. arborescens* subsp. *gallica* (10 de las 16) en la parte negativa. En su parte positiva incluyó las poblaciones con origen "levante" tanto de la subsp. *gallica* como de *C. atlantica*, además de SEG y CAB (nº 18 y 19) de este mismo taxón. Esta coordenada situó en el extremo de su parte negativa a GRA y ESP (nº 22 y 23, *C. atlantica*), separándolas del resto de poblaciones (Figura 32).



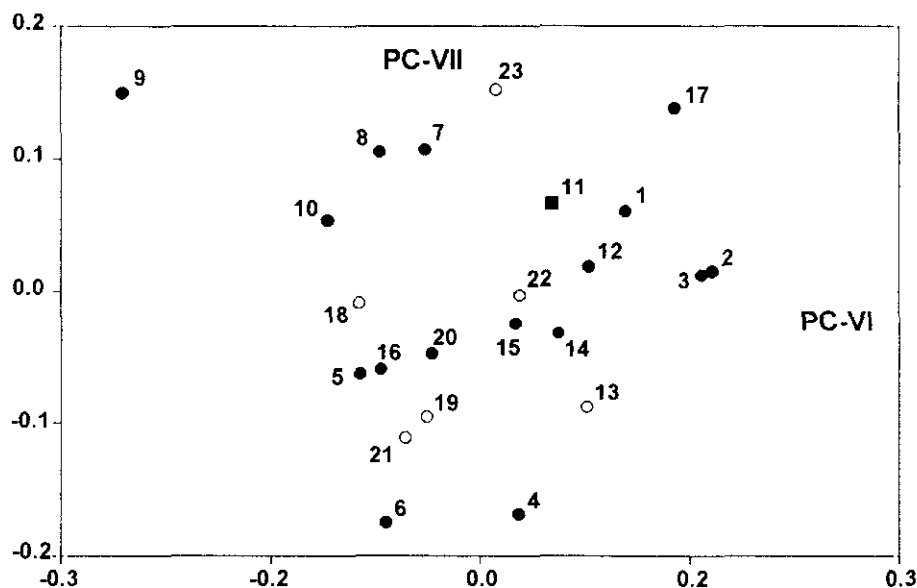
**Figura 33.** Ordenación de las muestras respecto a la 1ª y 3ª coordenadas principales (isoenzimas, coeficiente J). Numeración de las poblaciones según Tabla 3. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

La tercera coordenada principal (8,90 % de la variación) distribuyó las poblaciones a lo largo de toda su extensión, separando del resto en su extremo negativo a CAB (nº 19, *C. atlantica*) y Z y HOR (nº 17 y 20, *C. arborescens* subsp. *gallica*) y en su parte positiva a ARE (*C. arborescens* subsp. *gallica*) (Figura 33). En su parte negativa, esta coordenada ordenó poblaciones de la subsp. *gallica* además de CAB (nº 19, *C. atlantica*). En su parte positiva situó al resto de poblaciones de *C. atlantica*, POR (nº 11, *C. arborescens* subsp. *atlantica*) y las poblaciones de la subsp. *gallica* con origen "levante" excepto FON y Z (nº 10 y 17) (Figura 33).

El resto de coordenadas principales, hasta acumular el 75 % de la variación observada, agrupó las poblaciones siguiendo un esquema común: la mayor parte de ellas quedaron agrupadas de forma más o menos extensa a lo largo de la coordenada y sólo algunas poblaciones se alejaron de este núcleo. Así, la cuarta coordenada principal separó del resto de poblaciones a POR (nº 11, *C. arborescens* subsp. *atlantica*) y CHE (nº 12, *C. arborescens* subsp. *gallica*) en su parte negativa y a SEG (nº 18, *C. atlantica*) en la positiva. Esta población fue la única separada por la quinta coordenada principal, situándose esta vez en la parte negativa de la coordenada (Figura 34). El agrupamiento de las poblaciones fue mucho menos compacto con la sexta y séptima coordenadas. Sólo la primera de éstas separó alguna población del resto: BAR (*C. arborescens* subsp. *gallica*) (Figura 35).



**Figura 34.** Ordenación de las muestras respecto a la 4ª y 5ª coordenadas principales (isoenzimas, coeficiente J). Numeración de las poblaciones según Tabla 3. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.



**Figura 35.** Ordenación de las muestras respecto a la 6ª y 7ª coordenadas principales (isoenzimas, coeficiente J). Numeración de las poblaciones según Tabla 3. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

El ordenamiento de las muestras producido por el análisis de coordenadas principales basado en los valores de distancia obtenidos por el coeficiente J puede observarse en la Figura 36. Se apreciaron al menos cuatro grupos bien definidos (de izquierda a derecha):

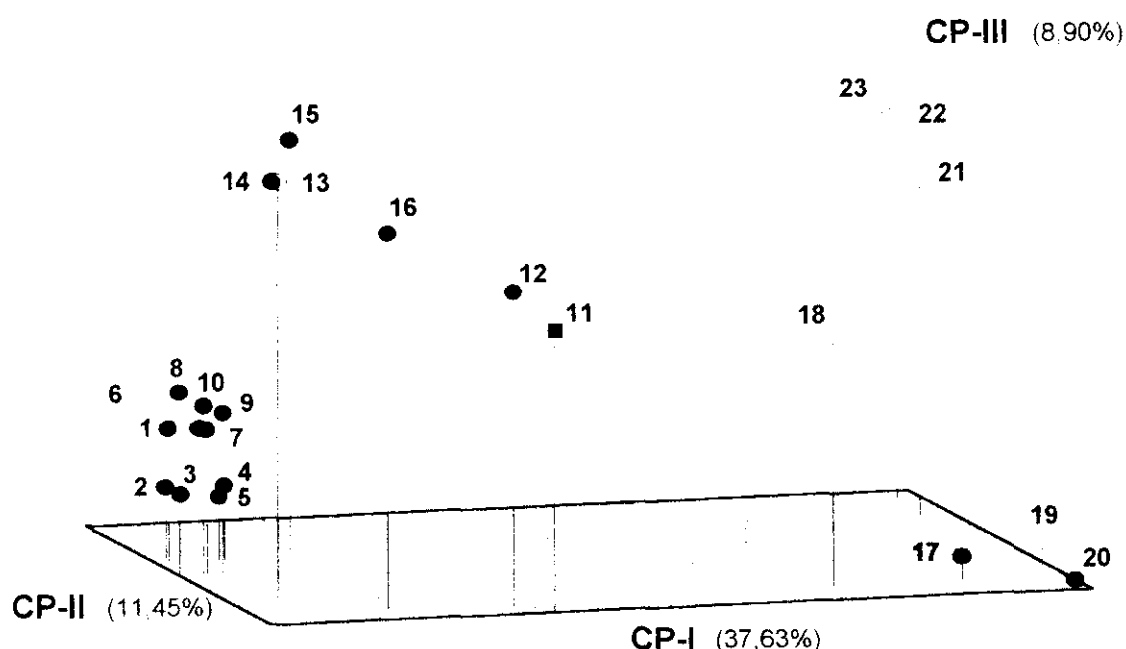
1º compuesto por TEN, RET, RIO, UÑA, ARA, GAR, NAV, LAF, BAR, FON (*C. arborescens* subsp. *gallica*, poblaciones nº 1 - 10).

2º que incluyó PUE (*C. atlantica*, nº 13) y las poblaciones PIC y ARE (nº 14 y 15) de *C. arborescens* subsp. *gallica*. El UTO BEN (nº 16), si bien más próximo a estas tres poblaciones, ocupó una posición intermedia entre éstas y el par formado por POR (nº 11, *C. arborescens* subsp. *atlantica*) y CHE (nº 12, *C. arborescens* subsp. *gallica*).

3º formado por Z y HOR (nº 17 y 20, *C. arborescens* subsp. *gallica*) y CAB (nº 19, *C. atlantica*).

4º que estuvo compuesto por COR, GRA y ESP (nº 21 - 23, *C. atlantica*).

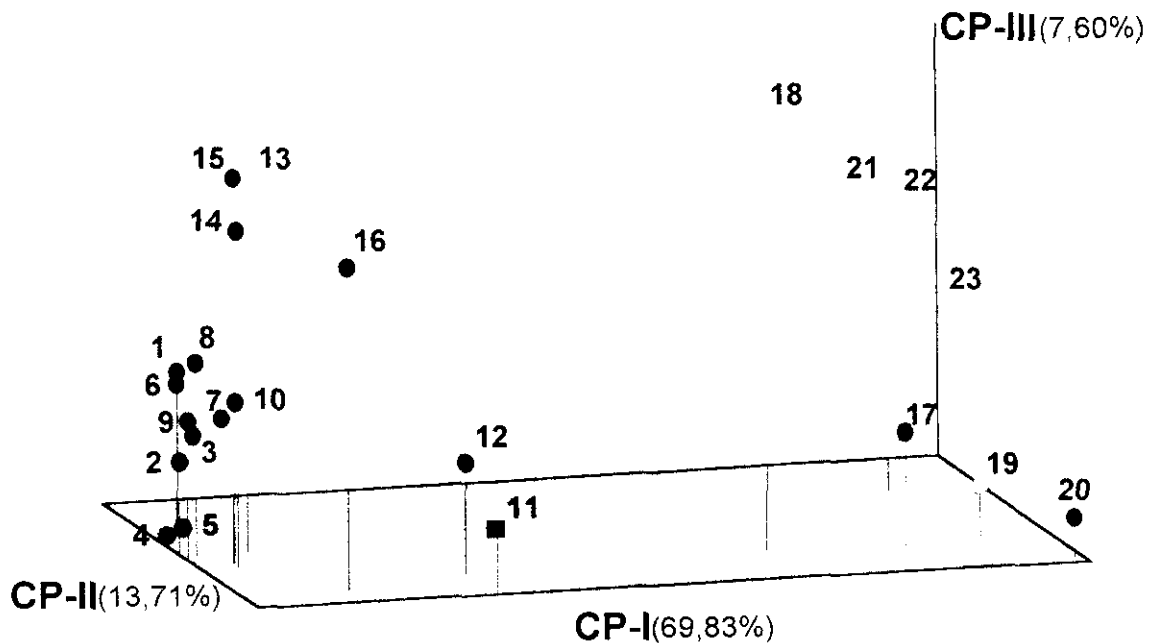
La posición de SEG (nº 18, *C. atlantica*) no se pudo adscribir a ningún grupo.



**Figura 36.** Ordenación de las muestras respecto a las tres primeras coordenadas principales (isoenzimas, coeficiente J). Se indica el % de la variación total que explica cada una de ellas. Numeración de las poblaciones según Tabla 3

●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

Aunque con el PCO basado en el coeficiente **R** la primera coordenada principal expresó variación en un porcentaje superior a la suma de las tres primeras coordenadas producidas por el PCO basado en el índice **J** (Tabla 16), en la práctica, el ordenamiento de las poblaciones resultó muy similar (Figura 37).



**Figura 37.** Ordenación de las muestras respecto a las tres primeras coordenadas principales (isoenzimas, coeficiente **R**). Se indica el % de la variación total que explica cada una de ellas. Numeración de las poblaciones según Tabla 3

●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

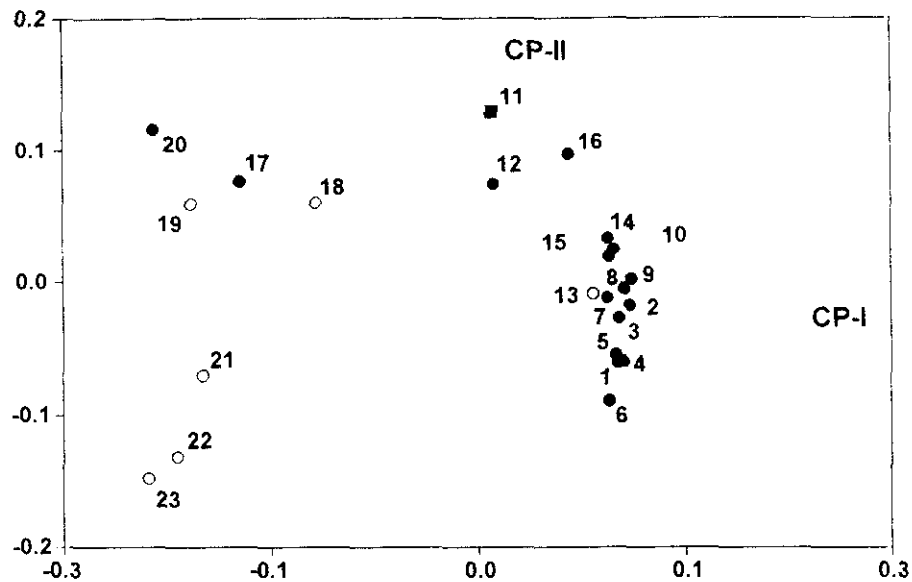
No obstante sí se detectaron algunas diferencias:

a) respecto a la segunda coordenada principal, FON y PUE (nº 10 y 13, *C. atlantica*) intercambian sus posiciones relativas respecto al signo de la coordenada, con lo que esta última población se distanció de PIC y ARE (nº 14 y 15, subsp. *gallica*) con las que compartía la procedencia geográfica, "levante" (Figura 38).

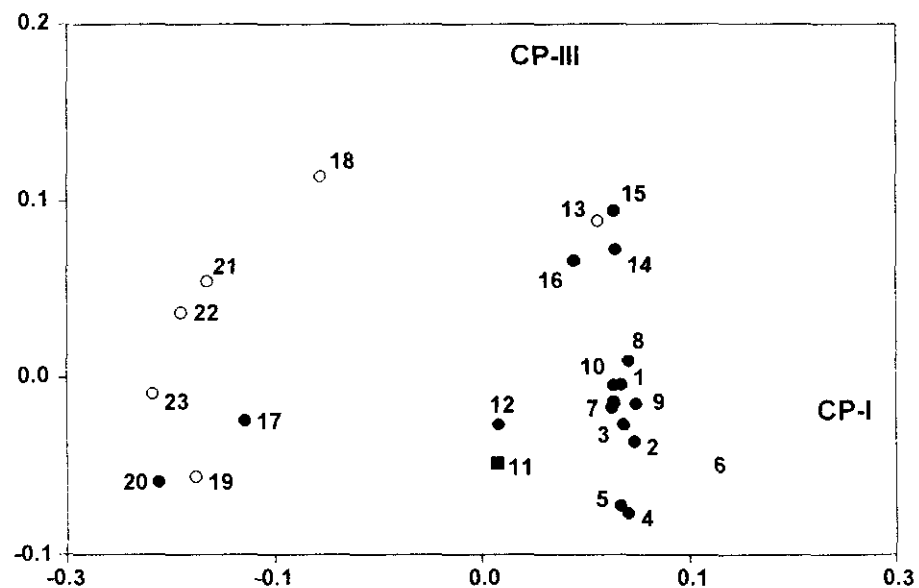
b) respecto a la tercera coordenada, los principales cambios consisten en el traslado de POR (nº 11, *C. arborescens* subsp. *atlantica*) y CHE (nº 12, *C. arborescens* subsp. *gallica*) de la parte positiva de la coordenada a la negativa, alejándose del grupo formado por PUE (nº 13, *C. atlantica*) y PIC, ARE y BEN (nº 14, 15 y 16, subsp. *gallica*), también de procedencia levantina. En la parte negativa se separaron UÑA y ARA (*C. arborescens* subsp. *gallica*) (Figura 39).

Al considerar conjuntamente las tres primeras coordenadas principales, si bien la posición de BEN (nº 16, subsp. *gallica*) sigue sin definirse plenamente, POR (nº 11, subsp. *atlantica*) y CHE (nº 12, subsp. *gallica*) si confirman su agrupamiento, en tanto que SEG (nº 18, *C. atlantica*) parece quedar más próxima al grupo 4º. De este grupo queda ahora un tanto separada ESP (nº 23) (Figura 37).





**Figura 38.** Ordenación de las muestras respecto a la 1ª y 2ª coordenadas principales (isoenzimas, coeficiente R). Numeración de las poblaciones según Tabla 3 ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.



**Figura 39.** Ordenación de las muestras respecto a la 1ª y 3ª coordenadas principales (isoenzimas, coeficiente R). Numeración de las poblaciones según Tabla 3 ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

#### 4.3.3.2. Análisis de ordenamiento intraespecífico.

Los valores medios de similitud  $\bar{X}_R$  resultaron algo superiores a los  $\bar{X}_J$  aunque siguieron un comportamiento idéntico (Tabla 17):

el valor encontrado para el conjunto de poblaciones de *C. atlantica* fue inferior al correspondiente para la subsp. *gallica*. Dentro de esta subespecie, HOR (origen "sur") presentó el valor mínimo mientras que el máximo estuvo en el origen "centro".

Este valor fue superior al encontrado para el conjunto de la subespecie (al incluir RIO dentro de esta procedencia, los valores medios de similitud ascendían hasta 0,916 en el caso de  $\bar{X}_J$  y 0,065 para  $\bar{X}_R$ ). La procedencia "norte" también mostró unos valores medios de similitud superiores a los correspondientes para la subespecie al completo. En el caso de los valores  $\bar{X}_R$ , apenas hubo diferencias respecto al valor encontrado para la procedencia "centro". Las procedencias "levante" y "sur" mostraron unos valores inferiores al correspondiente para el conjunto de poblaciones de esta subespecie (Tabla 17).

El valor medio de similitud respecto a las poblaciones de la subsp. *gallica* fue inferior al correspondiente respecto de las poblaciones de *C. atlantica* en la única población de la procedencia "sur" (HOR). Para la subespecie *atlantica* este comportamiento fue el inverso (Tabla 17).

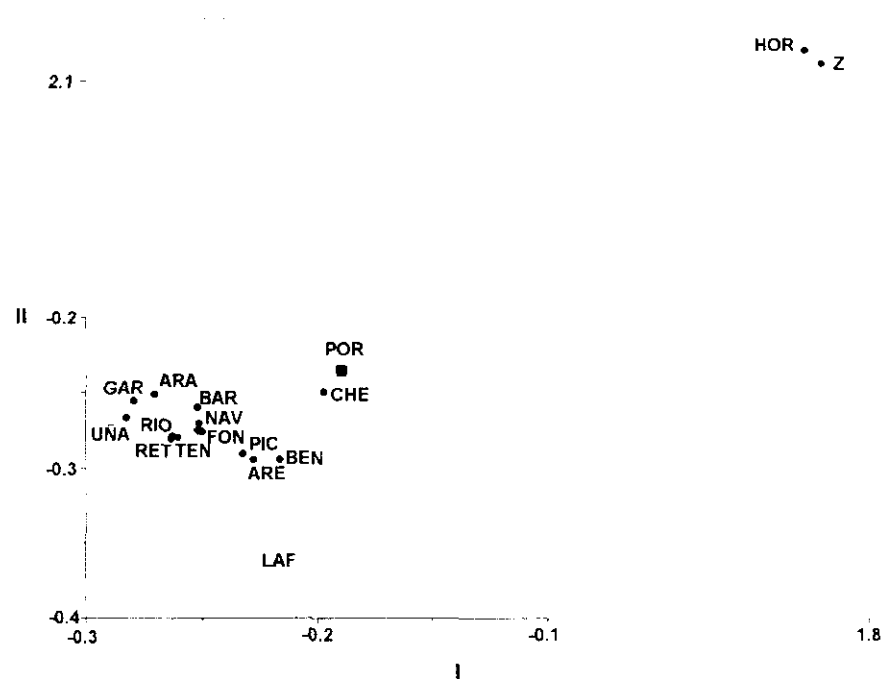
Al contrario de lo indicado para la procedencia "centro" de la subsp. *gallica*, la inclusión de las muestras de *C. atlantica* con origen geográfico heterogéneo (PUE, GRA y ESP) hizo disminuir el valor medio de similitud en el análisis correspondiente a *C. atlantica* sólo en el caso de  $\bar{X}_J$  (Tabla 17).

**Tabla 17.** Ordenación intraespecífica (isoenzimas). Valores medios de similitud ( $\bar{X}_J$  y  $\bar{X}_R$ ) entre poblaciones según especie y procedencia geográfica. \*: comparación respecto a las muestras de *C. arborescens* subsp. *gallica*; \*\*: comparación respecto a las muestras de *C. atlantica*; total: valor de  $\bar{X}_J$  y  $\bar{X}_R$  para el conjunto de poblaciones de cada especie.

TAXON	ORIGEN	MUESTRAS	$\bar{X}_J$	$\bar{X}_R$
<i>C. arborescens</i> subsp. <i>gallica</i>	centro	TEN, RET, UÑA	0,896	0,081
	norte	ARA, GAR, NAV LAF, BAR	0,883	0,083
	levante	FON, CHE, PIC ARE, BEN, Z	0,784	0,165
	sur	HOR	0,583* / 0,711**	0,339* / 0,202**
			total = 0,793	total = 0,161
subsp. <i>atlantica</i>	levante	POR	0,765* / 0,652**	0,188* / 0,276**
<i>C. atlantica</i>	sur	SEG, CAB, COR	0,748	0,160
			total = 0,703	total = 0,210

El ordenamiento de las muestras por MDS permitió observar gráficamente las relaciones entre las poblaciones dentro de cada especie. Para las correspondientes a *C. arborescens* el gráfico presentó una estructura marcadamente bipolar, con Z y HOR muy alejadas del resto de poblaciones que formó un agrupamiento denso (Fig. 40). Este núcleo principal corresponde a los elevados valores de  $\bar{X}_J$  para los

diferentes grupos definidos geográficamente mientras que Z y HOR permanecen alejados debido a que muestran los valores mínimos de  $\bar{X}_J$ . Esta estructura de ordenamiento se ajustó muy bien a las distancias originales (*stress* final = 0,005).



**Fig. 40.** Ordenamiento de las poblaciones de *C. arborescens* (●: subsp. *gallica*; ■: subsp. *atlantica*) respecto a los dos primeros ejes producidos por MDS (isoenzimas,  $\bar{X}_J$ ). El trazo discontinuo de los ejes indica pérdida de proporcionalidad de la escala.

Como era de esperar, a tenor del bajo valor  $\bar{X}_J$  para las muestras incluidas en *C. atlantica*, el gráfico generado por *Multidimensional scaling* presentó una estructura más laxa, con las muestras distribuidas en un rango más amplio que también se ajustó muy bien respecto a las distancias originales (*stress* final = 0,000). Las poblaciones más cercanas entre sí geográficamente también se agruparon más estrechamente (Fig. 41).

El ordenamiento de las poblaciones por MDS basado en los valores de distancia obtenidos mediante el coeficiente *R* (Figuras 42 y 43) fue esencialmente el observado anteriormente para el MDS basado en la matriz de distancias *J*. Sin embargo, los valores de *stress* mostraron una inferior bondad de ajuste en este caso (0,007 en el MDS de *C. arborescens* y 0,0006 en el de *C. atlantica*).

Según la escala de Kruskal (1964) para los niveles de *stress* final alcanzado, la bondad de ajuste de los ordenamientos obtenidos por MDS fue perfecto en todos los casos.

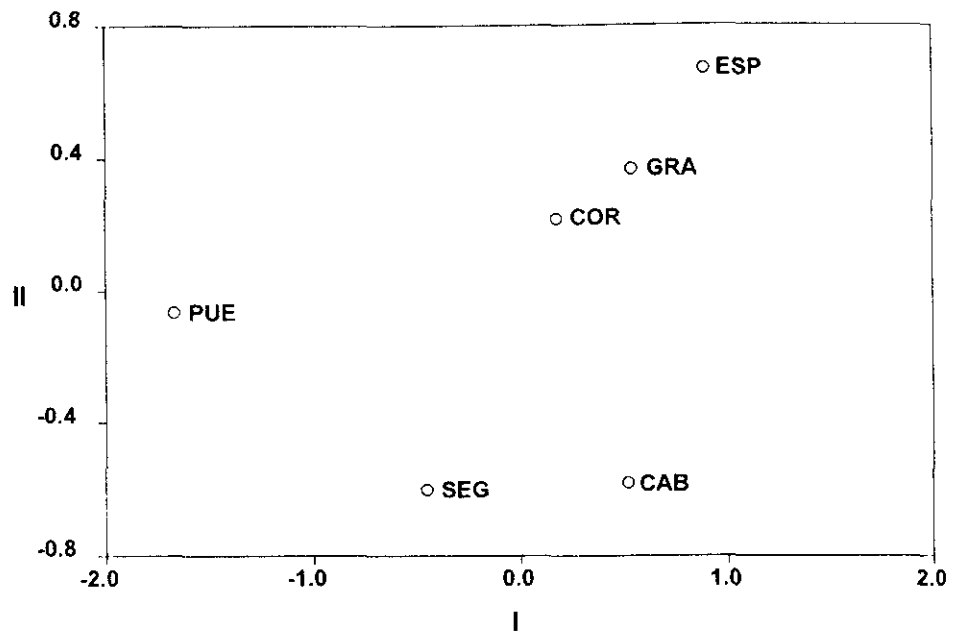


Figura 41. Ordenación de las poblaciones de *C. atlantica* respecto a los dos primeros ejes producidos por MDS (isoenzimas,  $\bar{X}_J$ ).

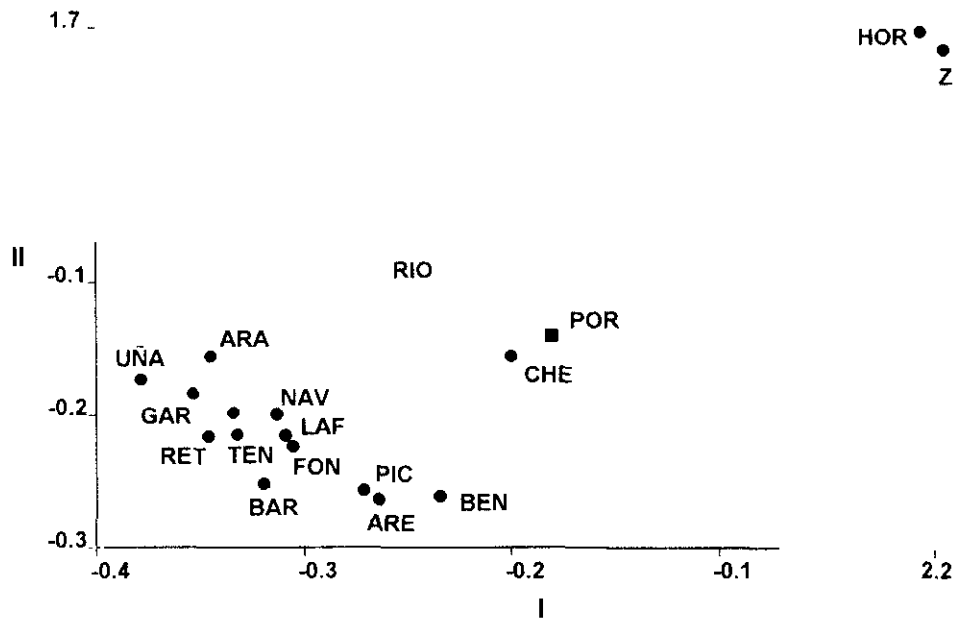
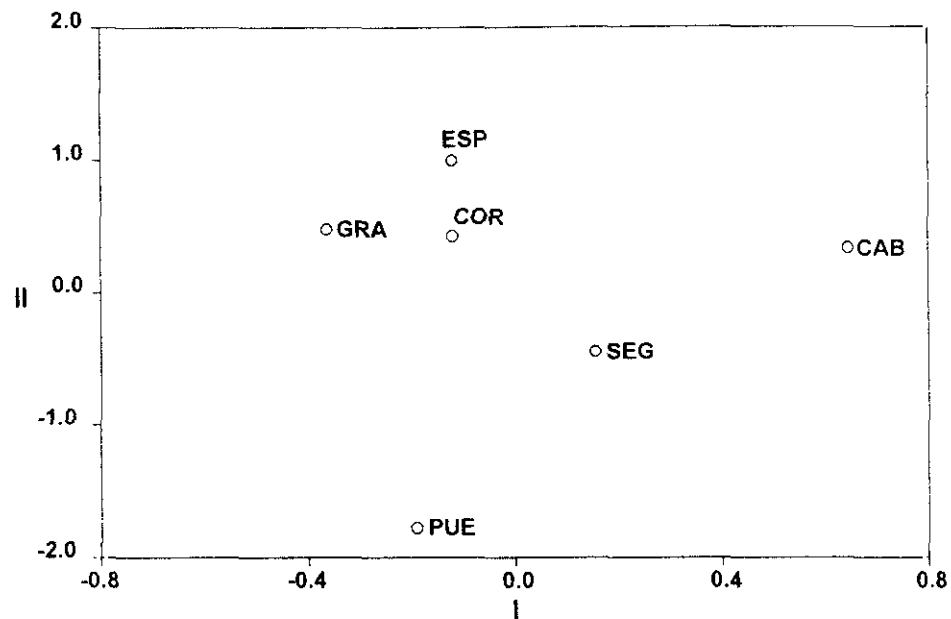


Figura 42. Ordenación de las poblaciones de *C. arborescens* (●: subsp. gallica; ■: subsp. atlantica) respecto a los dos primeros ejes producidos por *Multidimensional scaling* (isoenzimas,  $\bar{X}_R$ ). El trazo discontinuo de los ejes indica pérdida de proporcionalidad de la escala.



**Figura 43.** Ordenación de las poblaciones de *C. atlantica* respecto a los dos primeros ejes producidos por MDS (isoenzimas,  $\bar{X}_R$ ).

#### 4.3.3.3. Análisis de agrupamiento.

Las matrices simétricas obtenidas por la aplicación de los índices **J** y **R** sobre la matriz global correspondiente a los diez sistemas isoenzimáticos ensayados arrojaron, en general, valores de similitud elevados. Con el índice **J** la mayor distancia se dio entre BEN y ESP (0,522) mientras que el máximo valor de similitud lo mostraron RET y RIO (0,981). El intervalo de variación para el conjunto de la matriz fue, no obstante, elevado (0,459). Entre las muestras, este valor se hizo máximo en RET (0,447) mientras que SEG mostró la menor amplitud de variación de similitud (0,161) (Tabla 18). La situación con el coeficiente de similitud **R** fue esencialmente la misma ya que las poblaciones que mostraron el valor máximo (0,393) y mínimo (0,014) de distancia y el intervalo máximo y mínimo (0,379 y 0,171, respectivamente) fueron las mismas que en el caso de **J**. El intervalo para el conjunto de la matriz fue menor (0,379) (Tabla 19).

Los valores de correlación cofenética para los agrupamientos de los valores de similitud **J** y disimilitud **F** fueron muy elevados, 0,963 y 0,950, respectivamente, lo que permitió confiar en la bondad de los agrupamientos obtenidos (Figuras 44 y 45).

El dendrograma correspondiente al UPGMA de los valores **J** (Figura 44) mostró dos grandes agrupamientos (a) y (b). El agrupamiento (a), a su vez, presentó una estructura con tres subagrupamientos:

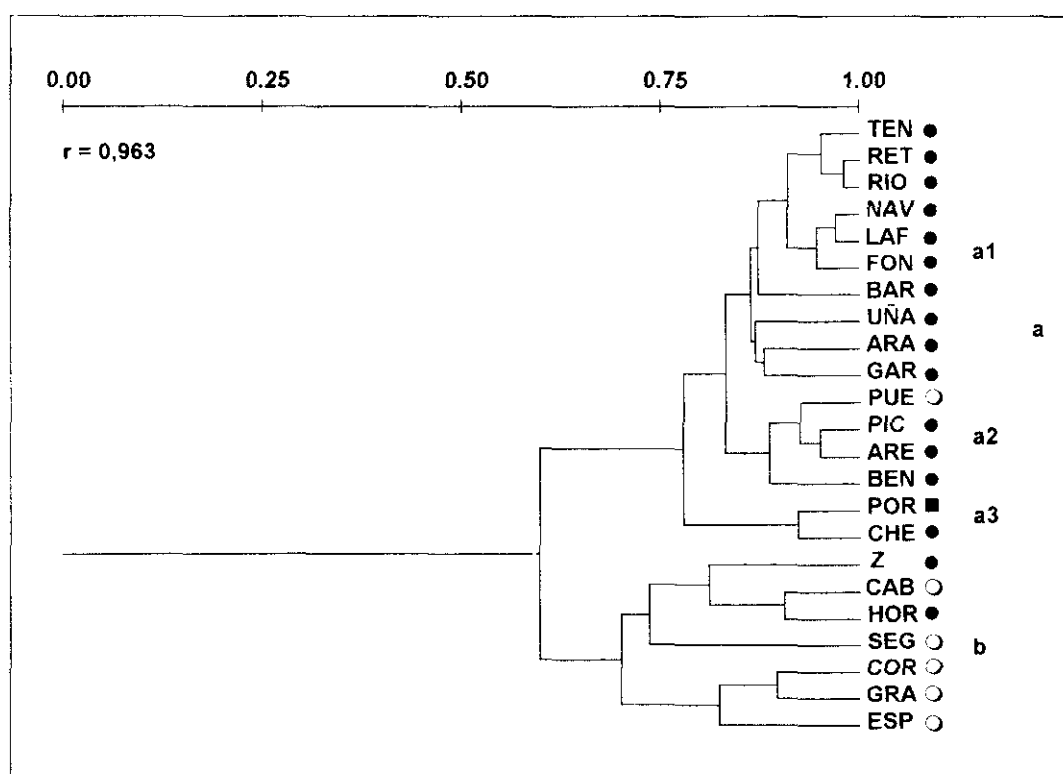
(a1) se formó con poblaciones de *C. arborescens* subsp. *gallica* procedentes del centro y norte peninsular aunque el subagrupamiento no fue homogéneo respecto

de la procedencia: por ejemplo, RET se agrupó más estrechamente con RIO que con TEN y UÑA, poblaciones con un origen geográfico más afín. También es destacable la posición ocupada por FON, población de procedencia levantina, dentro de este subagrupamiento en lugar de en el siguiente.

(a2) agrupó poblaciones de procedencia levantina: tres poblaciones de la subsp. *gallica* (PIC, ARE y BEN) con PUE (*C. atlantica*). Esta se unió más estrechamente a PIC y ARE que BEN

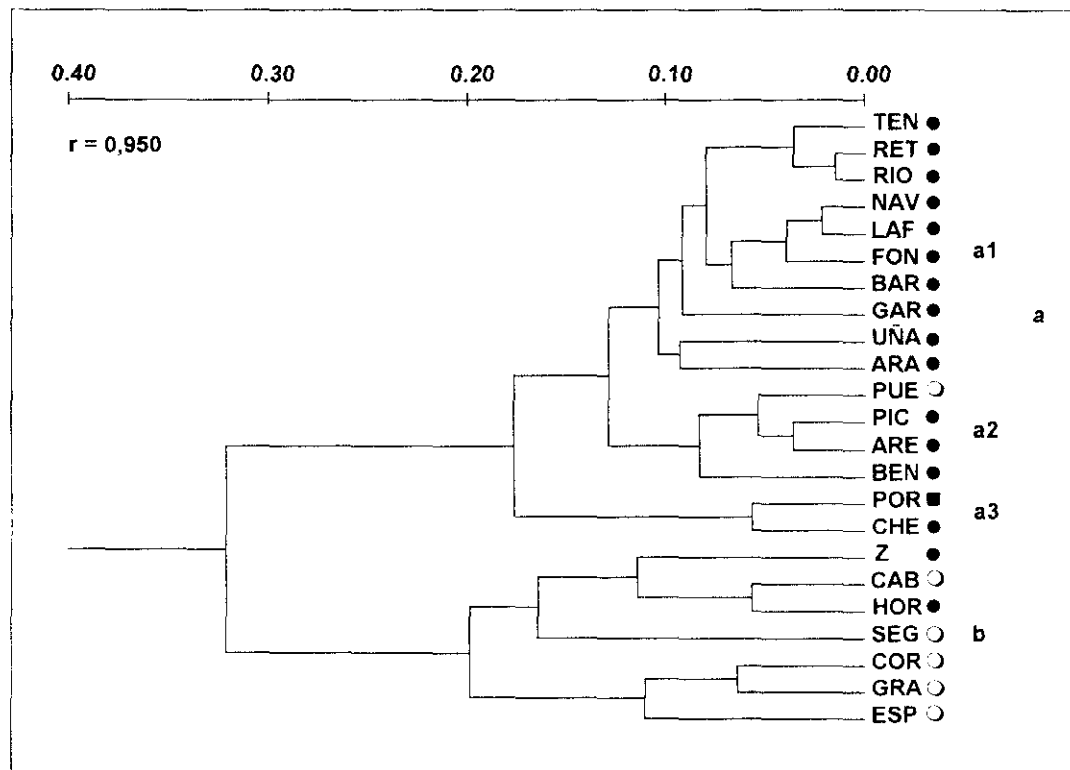
(a3) reunió a CHE (*C. arborescens* subsp. *gallica*) con POR (*C. arborescens* subsp. *atlantica*), ambas con un origen levantino.

El agrupamiento (b) reunió a todas las poblaciones de *C. atlantica* excepto PUE. Este agrupamiento fue heterogéneo, como lo pone de manifiesto el que también incluyese a Z y HOR (*C. arborescens* subsp. *gallica*). Mostró una estructura formada por dos subagrupamientos. COR y GRA, al unirse con ESP constituyeron el subagrupamiento más homogéneo. El otro subagrupamiento quedó integrado por Z que se unió a HOR - CAB mientras que SEG quedaba más separada (Figura 44).



**Figura 44.** Agrupamiento de las poblaciones estudiadas producido por UPGMA (isoenzimas, valores J). r: valor de correlación cofenética. Los códigos alfanuméricos en minúscula hacen referencia a los subgrupos mencionados en el texto.  
 ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

La estructura de agrupamientos correspondiente al UPGMA de los valores de disimilitud **R** fue esencialmente la misma que para los valores de similitud **J**. Sólo se advirtieron ligeros cambios dentro del subagrupamiento (a1): BAR se agrupó más estrechamente a la rama formada por NAV, LAF y FON, mientras que GAR dejó de integrarse en la rama que, con los valores **J**, formaba con UÑA y ARA (Figura 45).



**Figura 45.** Agrupamiento de las poblaciones estudiadas producido por UPGMA (isoenzimas, valores **R**). *r*: valor de correlación cofenética. Los códigos alfanuméricos en minúscula hacen referencia a los subgrupos mencionados en el texto.

●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

La comparación de la topología de los dendrogramas con los ordenamientos producidos por PCO resultó en la coincidencia plena entre los agrupamientos (a1) y (b) con los grupos 1º y 3º y 4º, respectivamente (la posición intermedia de SEG (nº 18) en los ordenamientos por PCO se resolvería mediante los dendrogramas en una posición más cercana al grupo 3º que al 4º). Por otro lado, POR y CHE confirmaron lo estrecho de sus relaciones. (a2) coincidió con el grupo 2º e incluyó a BEN (nº 16), con lo que se confirmó su proximidad con este grupo.

**Tabla 18.** Matriz de similitud entre poblaciones (isoenzimas, coeficiente J). ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

	TEN	RET	RIO	UÑA	ARA	GAR	NAV	LAF	BAR	FON	POR	CHE	PUE	PIC	ARE	BEN	Z	SEG	CAB	HOR	COR	GRA	ESP
TEN	● 1,000	●	●	●	●	●	●	●	●	●	■	●	○	●	●	●	●	○	○	●	○	○	○
RET	● 0,952	● 1,000																					
RIO	● 0,952	● 0,981	● 1,000																				
UÑA	● 0,864	● 0,874	● 0,874	● 1,000																			
ARA	● 0,864	● 0,857	● 0,874	● 0,875	● 1,000																		
GAR	● 0,868	● 0,861	● 0,879	● 0,862	● 0,880	● 1,000																	
NAV	● 0,906	● 0,898	● 0,916	● 0,848	● 0,882	● 0,887	● 1,000																
LAF	● 0,933	● 0,907	● 0,907	● 0,856	● 0,873	● 0,877	● 0,971	● 1,000															
BAR	● 0,860	● 0,836	● 0,836	● 0,821	● 0,855	● 0,824	● 0,879	● 0,905	● 1,000														
FON	● 0,913	● 0,906	● 0,906	● 0,872	● 0,855	● 0,876	● 0,933	● 0,961	● 0,922	● 1,000													
POR	■ 0,748	■ 0,729	■ 0,744	■ 0,746	■ 0,746	■ 0,746	■ 0,796	■ 0,788	■ 0,754	■ 0,786	■ 1,000												
CHE	● 0,775	● 0,754	● 0,770	● 0,772	● 0,772	● 0,773	● 0,809	● 0,800	● 0,766	● 0,798	● 0,922	● 1,000											
PUE	○ 0,857	○ 0,850	○ 0,850	○ 0,818	○ 0,786	○ 0,821	○ 0,858	○ 0,885	○ 0,813	○ 0,883	○ 0,782	○ 0,811	○ 1,000										
PIC	● 0,860	● 0,853	● 0,853	● 0,805	● 0,805	● 0,791	● 0,861	● 0,887	● 0,833	● 0,886	● 0,786	● 0,815	● 0,940	● 1,000									
ARE	● 0,850	● 0,827	● 0,827	● 0,781	● 0,781	● 0,798	● 0,852	● 0,877	● 0,824	● 0,876	● 0,793	● 0,822	● 0,911	● 0,950	● 1,000								
BEN	● 0,807	● 0,802	● 0,802	● 0,772	● 0,788	● 0,773	● 0,826	● 0,850	● 0,815	● 0,867	● 0,800	● 0,813	● 0,864	● 0,903	● 0,893	● 1,000							
Z	● 0,611	● 0,623	● 0,637	● 0,598	● 0,612	● 0,565	● 0,643	● 0,619	● 0,588	● 0,616	● 0,679	● 0,673	● 0,609	● 0,616	● 0,593	● 0,642	● 1,000						
SEG	○ 0,638	○ 0,636	○ 0,651	○ 0,609	○ 0,609	○ 0,619	○ 0,657	○ 0,663	○ 0,629	○ 0,676	○ 0,663	○ 0,673	○ 0,687	○ 0,676	○ 0,667	○ 0,724	○ 0,770	○ 1,000					
CAB	○ 0,583	○ 0,581	○ 0,595	○ 0,598	○ 0,585	○ 0,579	○ 0,600	○ 0,591	○ 0,574	○ 0,616	○ 0,679	○ 0,657	○ 0,580	○ 0,588	○ 0,579	○ 0,627	○ 0,822	○ 0,730	○ 1,000				
HOR	● 0,552	● 0,551	● 0,564	● 0,555	● 0,555	● 0,534	● 0,569	● 0,560	● 0,557	● 0,584	● 0,676	● 0,670	● 0,549	● 0,557	● 0,548	● 0,595	● 0,800	● 0,708	● 0,906	● 1,000			
COR	○ 0,605	○ 0,590	○ 0,603	○ 0,593	○ 0,607	○ 0,631	○ 0,623	○ 0,614	○ 0,583	○ 0,611	○ 0,628	○ 0,651	○ 0,633	○ 0,611	○ 0,616	○ 0,622	○ 0,737	○ 0,722	○ 0,793	○ 0,753	○ 1,000		
GRA	○ 0,596	○ 0,568	○ 0,581	○ 0,571	○ 0,571	○ 0,593	○ 0,586	○ 0,578	○ 0,547	○ 0,574	○ 0,591	○ 0,613	○ 0,595	○ 0,574	○ 0,579	○ 0,570	○ 0,708	○ 0,674	○ 0,726	○ 0,688	○ 0,897	○ 1,000	
ESP	○ 0,561	○ 0,534	○ 0,547	○ 0,551	○ 0,551	○ 0,544	○ 0,552	○ 0,543	○ 0,526	○ 0,539	○ 0,570	○ 0,591	○ 0,545	○ 0,539	○ 0,544	○ 0,522	○ 0,633	○ 0,613	○ 0,702	○ 0,663	○ 0,809	○ 0,839	○ 1,000



**Tabla 19.** Valores de distancia entre (isoenzimas, coeficiente R) ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*

	TEN	RET	RIO	UÑA	ARA	GAR	NAV	LAF	BAR	FON	POR	CHE	PUE	PIC	ARE	BEN	Z	SEG	CAB	HOR	COR	GRA	ESP	
TEN	● 0,000										■	●	○	●	●	●	●	○	○	●	○	○	○	
RET	● 0,036	● 0,000																						
RIO	● 0,036	● 0,014	● 0,000																					
UÑA	● 0,107	● 0,100	● 0,100	● 0,000																				
ARA	● 0,100	● 0,107	● 0,093	● 0,093	● 0,000																			
GAR	● 0,093	● 0,100	● 0,079	● 0,100	● 0,093	● 0,000																		
NAV	● 0,071	● 0,079	● 0,064	● 0,121	● 0,086	● 0,079	● 0,000																	
LAF	● 0,050	● 0,071	● 0,071	● 0,114	● 0,093	● 0,086	● 0,021	● 0,000																
BAR	● 0,100	● 0,121	● 0,121	● 0,136	● 0,100	● 0,121	● 0,086	● 0,064	● 0,000															
FON	● 0,064	● 0,071	● 0,071	● 0,100	● 0,107	● 0,086	● 0,050	● 0,029	● 0,050	● 0,000														
POR	■ 0,207	■ 0,229	■ 0,214	■ 0,214	■ 0,207	■ 0,200	■ 0,164	■ 0,171	■ 0,193	■ 0,171	■ 0,000													
CHE	● 0,179	● 0,200	● 0,186	● 0,186	● 0,179	● 0,171	● 0,150	● 0,157	● 0,179	● 0,157	● 0,057	● 0,000												
PUE	○ 0,107	○ 0,107	○ 0,114	○ 0,143	○ 0,164	○ 0,129	○ 0,107	○ 0,086	○ 0,129	○ 0,086	○ 0,171	○ 0,143	○ 0,000											
PIC	● 0,107	● 0,107	● 0,114	● 0,157	● 0,150	● 0,157	● 0,107	● 0,086	● 0,121	● 0,086	● 0,171	● 0,143	● 0,043	● 0,000										
ARE	● 0,114	● 0,136	● 0,136	● 0,179	● 0,171	● 0,150	● 0,114	● 0,093	● 0,129	● 0,093	● 0,164	● 0,136	● 0,064	● 0,036	● 0,000									
BEN	● 0,150	● 0,157	● 0,157	● 0,186	● 0,164	● 0,164	● 0,136	● 0,114	● 0,136	● 0,100	● 0,157	● 0,143	● 0,100	● 0,071	● 0,079	● 0,000								
Z	● 0,307	● 0,300	● 0,279	● 0,329	● 0,307	● 0,343	● 0,279	● 0,300	● 0,336	● 0,300	● 0,243	● 0,243	● 0,300	● 0,300	● 0,321	● 0,271	● 0,000							
SEG	○ 0,271	○ 0,279	○ 0,264	○ 0,307	○ 0,300	○ 0,279	○ 0,257	○ 0,250	○ 0,271	○ 0,236	○ 0,250	○ 0,236	○ 0,221	○ 0,236	○ 0,243	○ 0,193	○ 0,136	○ 0,000						
CAB	○ 0,343	○ 0,300	○ 0,336	○ 0,336	○ 0,343	○ 0,336	○ 0,329	○ 0,336	○ 0,343	○ 0,307	○ 0,250	○ 0,264	○ 0,336	○ 0,336	○ 0,343	○ 0,286	○ 0,107	○ 0,171	○ 0,000					
HOR	● 0,371	● 0,379	● 0,364	● 0,379	● 0,371	● 0,379	● 0,357	● 0,364	● 0,357	● 0,336	● 0,250	● 0,250	● 0,364	● 0,364	● 0,371	● 0,321	● 0,121	● 0,186	● 0,057	● 0,000				
COR	○ 0,321	○ 0,343	○ 0,329	○ 0,343	○ 0,321	○ 0,286	○ 0,307	○ 0,314	○ 0,336	○ 0,314	○ 0,300	○ 0,271	○ 0,286	○ 0,314	○ 0,307	○ 0,300	○ 0,171	○ 0,179	○ 0,129	○ 0,164	○ 0,000			
GRA	○ 0,329	○ 0,364	○ 0,350	○ 0,343	○ 0,350	○ 0,321	○ 0,343	○ 0,350	○ 0,371	○ 0,350	○ 0,336	○ 0,307	○ 0,321	○ 0,350	○ 0,343	○ 0,350	○ 0,193	○ 0,214	○ 0,186	○ 0,214	○ 0,064	○ 0,000		
ESP	○ 0,357	○ 0,393	○ 0,379	○ 0,379	○ 0,364	○ 0,364	○ 0,364	○ 0,379	○ 0,386	○ 0,379	○ 0,350	○ 0,321	○ 0,364	○ 0,379	○ 0,379	○ 0,393	○ 0,250	○ 0,257	○ 0,200	○ 0,229	○ 0,121	○ 0,100	○ 0,000	

#### 4.4. PCR - RAPDs.

##### 4.4.1. AMPLIFICACIONES.

El protocolo de extracción empleado rindió una cantidad de ADN suficiente para 25 - 30 amplificaciones. Con esta minipreparación el ADN obtenido casi no tuvo impurezas, por lo que se pudo abreviar la etapa de fenolización a un sólo paso en la mayoría de las muestras; también permitió obtener amplificaciones repetitivas.

De los 20 *primers* probados, 9 (45%) produjeron patrones de bandas reproducibles. El resto de los *primers* o bien no produjeron bandas definidas o bien las que se obtenían no se repetían de amplificación en amplificación. De estos 9 *primers*, 8 produjeron polimorfismos (OP #8 rindió 6 fragmentos de amplificación constantes en todas las muestras). El número de polimorfismos obtenidos osciló entre los 2 de OP #5 a los 10 de OP #7 y OP #19, situándose la media en 6 polimorfismos por *primer* (si exceptuamos del cálculo a OP #8) (Tabla 20).

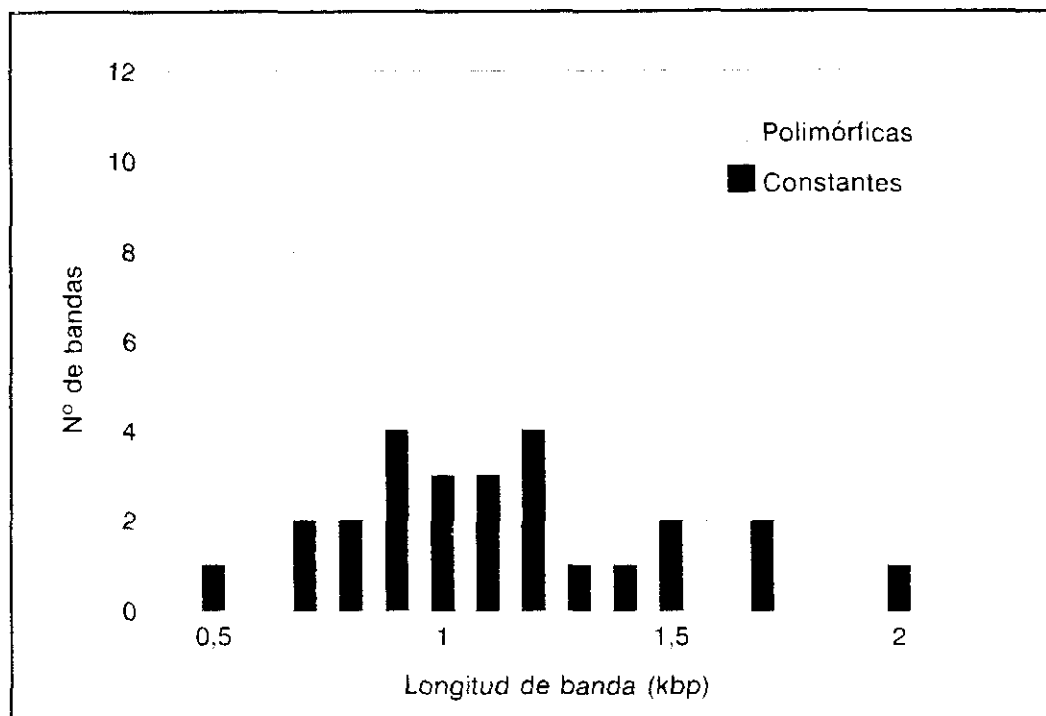
La intensidad de las bandas producidas varió considerablemente de muestra en muestra. Así, hubo veces en que resultaba difícil distinguir del fondo una banda que en las muestras adyacentes se presentaba netamente teñida.

**Tabla 20.** *Primers* efectivos. Se indica de forma individualizada el rango de amplificación (**R.A.**) en pares de bases (bp), el número de fragmentos producidos (**Nº F.A.**), el porcentaje de fragmentos polimórficos (**%P**) y el número de patrones de bandas **p** (entre paréntesis, número de patrones correspondientes a una sola muestra).

PRIMER	R.A. (bp)	Nº F.A.	% P	p
OP #3	800 - 1.200	5 (3)	60	5 (1)
OP #5	730 - 1.200	5 (2)	40	4 (0)
OP #7	570 - 1.450	10 (10)	100	14 (14)
OP #8	930 - 2.000	6 (0)	0	1 (0)
OP #12	790 - 1.600	9 (7)	78	9 (3)
OP #13	700 - 1.700	8 (3)	38	5 (0)
OP #15	800 - 2.100	7 (4)	57	6 (2)
OP #19	650 - 2.000	12 (10)	83	10 (5)
OP #20	450 - 1.500	12 (9)	75	11 (7)
<b>Total</b>	450 - 2.100	74 (48)	65	

Los fragmentos amplificados se distribuyeron en un intervalo de tamaños que fue de los 450 a los 2.100 bp. Con algunos *primers* se pudieron observar bandas fuera de este rango de tamaños, sobre todo por encima del límite superior del intervalo de

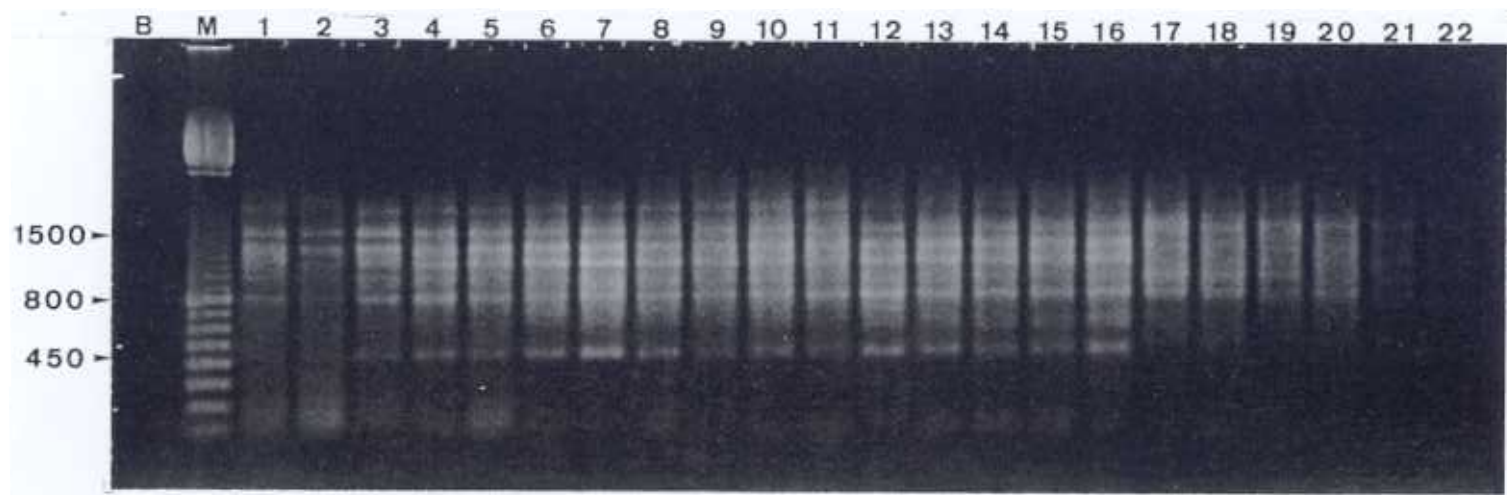
tamaños pero, al no ser repetitivas, no se tomaron en cuenta para el análisis de los geles. La mayoría de los fragmentos de amplificación obtenidos (74%) se situaron en el intervalo de tamaños 700 - 1.300 bp. Dentro de este mismo rango se situó el 75% del total de fragmentos polimórficos (Figura 46).



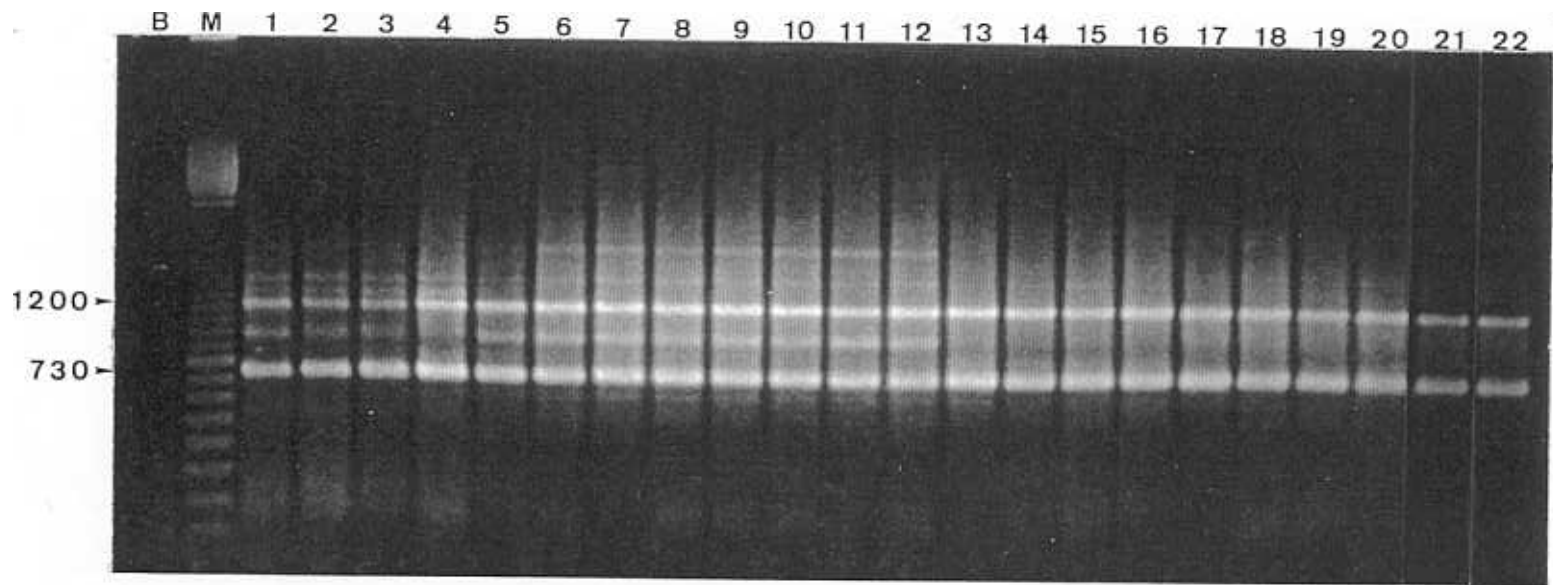
**Figura 46.** Distribución por tamaños de los fragmentos de amplificación generados por el total de *primers* efectivos.

#### 4.4.2. VARIACION INTRAPOBLACIONAL.

Al realizar las amplificaciones correspondientes a los *primers* OP#5, OP#7 y OP#20 sobre cuatro individuos de las poblaciones RET, ARA y FON (*C. arborescens*), BEN (*C. arborescens* subsp. *gallica*), COR (*C. atlantica*) y dos individuos de GRA (*C. atlantica*), no se detectaron polimorfismos entre los diferentes individuos pertenecientes a una misma población, por lo que se registró un único patrón de bandas para todos ellos en cada población. En algunos casos, no obstante, se apreciaron diferencias en intensidad de tinción de algunas bandas (por ejemplo, OP#20<sub>450</sub> y OP#5<sub>820</sub> de FON ) (Fig. 47 y Fig. 48).



**Figura 47.** Variación intrapoblacional. Patrones de bandas obtenidos con el *primer* OP#20. Numeración: 1-4 RET, 5-8 ARA, 9-12 FON, 13-16 BEN (*C. arborescens* subsp. *gallica*), 17-20 COR y 21-22 GRA (*C. atlantica*).



**Figura 48.** Variación intrapoblacional. Patrones de bandas obtenidos con el *primer* OP#5. Numeración: 1-4 RET, 5-8 ARA, 9-12 FON, 13-16 BEN (*C. arborescens* subsp. *gallica*), 17-20 COR y 21-22 GRA (*C. atlantica*).

4.4.3. VARIACION INTERPOBLACIONAL.

En la Tabla 21 se muestra el número de RAPDs encontrados entre pares de poblaciones. En la Tabla 22 se muestran los fragmentos de amplificación generados por los nueve *primers* que resultaron efectivos. La Figura 49 corresponde al mapa de las bandas polimórficas obtenidas por estos oligonucleótidos.

Los marcadores OP #20<sub>600</sub> y OP #19<sub>700</sub> sólo se presentaron en UÑA y COR, respectivamente. UÑA y CHE fueron, también, las únicas muestras en las que apareció OP#13<sub>1300</sub>. Lo mismo puede decirse de HOR y COR respecto de OP#7<sub>950</sub> y OP#19<sub>1000</sub>.

Tabla 21. Número de marcadores RAPD entre poblaciones.

●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
TEN 1 ●	0																								
RET 2 ●	5	0																							
RIO 3 ●	5	8	0																						
UÑA 4 ●	21	16	20	0																					
GUA 5 ●	9	8	5	19	0																				
BOA 6 ●	6	5	5	15	1	0																			
INF 7 ●	6	5	7	17	5	4	0																		
ARA 8 ●	7	6	8	18	4	5	3	0																	
GAR 9 ●	14	17	11	21	13	14	14	13	0																
NAV 10 ●	11	8	14	18	12	11	9	8	9	0															
LAF 11 ●	13	10	12	14	8	9	7	8	7	4	0														
BAR 12 ●	13	12	14	16	8	9	7	6	7	4	2	0													
FON 13 ●	9	6	12	16	12	11	11	10	15	8	10	12	0												
POR 14 ■	22	20	24	16	20	18	19	20	25	22	18	18	20	0											
CHE 15 ●	24	23	25	19	23	21	22	23	24	25	21	21	23	9	0										
PUE 16 ○	21	22	24	18	24	20	23	24	21	22	20	20	22	8	13	0									
PIC 17 ●	15	12	18	14	18	14	15	18	15	10	10	12	11	18	21	16	0								
ARE 18 ●	14	11	17	13	17	13	14	17	14	9	9	11	11	19	22	17	1	0							
BEN 19 ●	16	13	19	15	19	15	16	19	14	11	11	13	13	21	24	19	3	2	0						
Z 20 ●	19	20	24	20	24	20	23	24	23	22	22	22	20	12	19	10	16	17	19	0					
SEG 21 ○	13	10	14	16	8	8	9	8	15	12	8	8	10	14	17	20	14	13	15	18	0				
CAB 22 ○	24	25	23	23	21	22	24	23	18	23	19	19	21	11	14	13	25	24	24	17	17	0			
HOR 23 ●	24	23	23	25	19	20	22	21	22	25	21	21	21	13	14	19	27	26	26	19	15	6	0		
COR 24 ○	25	24	24	22	20	20	23	22	25	24	20	20	18	14	19	20	24	23	25	22	16	13	9	0	
GRA 25 ○	13	16	14	15	15	16	17	16	14	16	15	15	11	12	14	11	14	13	13	12	10	6	4	2	0

La comparación entre pares de poblaciones arrojó un número medio de polimorfismos de 16. El número mínimo de polimorfismos entre dos muestras estuvo entre BOA y GUA, que sólo se diferenciaron en un RAPD (OP #12<sub>930</sub> apareció en GUA (Figura 49, Tabla 21) y entre PIC y ARE, que también se diferenciaron sólo por OP#12<sub>350</sub>. El máximo se presentó entre PIC y HOR ya que se diferenciaron en 27 (56% del total). CHE y COR fueron las poblaciones con un número medio de

diferencias más elevado (20). Las poblaciones con un valor medio más bajo (13) fueron INF, ARA, BAR y GRA, si bien esta última muestra fue la que presentó más polimorfismos dudosos (que no se consideraron para los cálculos). Se pudieron distinguir 3 grupos de muestras por lo elevado de sus valores medios conjuntos respecto al resto de poblaciones: CAB, HOR y COR, POR, CHE y PUE y UÑA, con 20, 19 y 18 RAPDs diferentes, respectivamente.



**Figura 49.** Mapa de bandas polimórficas (código alfanumérico a la izquierda). El color sólido indica la presencia de un determinado RAPD mientras que la trama denota los polimorfismos ambiguos. La primera fila indica el número de población (según Tabla 7) y la columna de la derecha indica el número de poblaciones que presentan el RAPD.

**Tabla 22.** Fragmentos amplificados obtenidos por los oligonucleótidos OP#3, OP#5, OP#7, OP#8, OP#12, OP#13, OP#15, OP#19 y OP#20. Se indica el tamaño aproximado en pares de bases (columna de la izquierda). La 1ª fila corresponde a la numeración de las poblaciones (Tabla 7). La presencia de un determinado fragmento se indica con un 1, la ausencia con 0 y un 9 denota ambigüedad.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
<b>OP#3</b>	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1100	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	890	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	800	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
<b>OP#5</b>	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	980	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	820	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	730	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>OP#7</b>	1450	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
	1350	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	1270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1100	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
	1050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
	950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	820	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
	780	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
	700	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	570	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
<b>OP#8</b>	2000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1180	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	990	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	930	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>OP#12</b>	1600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	1350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	930	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	890	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	820	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
790	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
<b>OP#13</b>	1700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1300	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1070	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	970	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	880	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	800	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>OP#15</b>	2100	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1300	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	
	1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	980	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(Continúa)



<b>OP#19</b>	2000	1	1	0	0	0	9	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	9	
	1600	1	1	0	0	0	9	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	9	
	1500	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	9	
	1400	0	0	0	1	0	9	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	9	
	1250	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	9	
	1150	1	1	1	0	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	9	
	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	9	
	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	9	
	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	
	650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
	<b>OP#20</b>	1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
1300		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	9	
1250		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	9	
1100		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
1000		1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	9	
900		1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	9	
800		1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
730		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	9	
700		1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	
600		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	
580		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
450		1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	9

#### 4.4.4. VISUALIZACION.

El poder discriminante de cada *primer* fue variable. Así, con OP #8 sólo se obtuvo un patrón de bandas mientras que OP #20 logró separar las 25 muestras con 18 patrones distintos. Se obtuvieron de media 7,2 perfiles de bandas por *primer* (Tabla 20).

##### 4.4.4.1. OP #3.

Los fragmentos analizados se distribuyeron en un estrecho rango de tamaños (800 - 1200 bp) y produjeron uno de los patrones más sencillos (Tabla 23, Fig. 50).

Los tres polimorfismos obtenidos con este *primer* permitieron distinguir cinco genotipos diferentes, aunque sólo uno caracterizó una sola población, GAR que exhibió la combinación OP #3<sub>890</sub> + OP #3<sub>800</sub>. La combinación formada por la totalidad de los RAPDs generados por este *primer* apareció en siete poblaciones; en cambio, sólo tres muestras no mostraron ningún polimorfismo. El tipo III se caracterizó por la presencia de un solo RAPD (OP #3<sub>1100</sub>).

**Tabla 23.** Patrones de RAPDs generados por OP #3. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	TIPOS				POBLACIONES
	I	II	III	IV	
1200					I : TEN, RET, UÑA, ARA, FON, POR, CHE
1100					PUE, Z, SEG
1000					II : INF, NAV, LAF, BAR, PIC, ARE, BEN
890					III : CAB, HOR, COR, GRA
800					IV : RIO, GUA, BOA

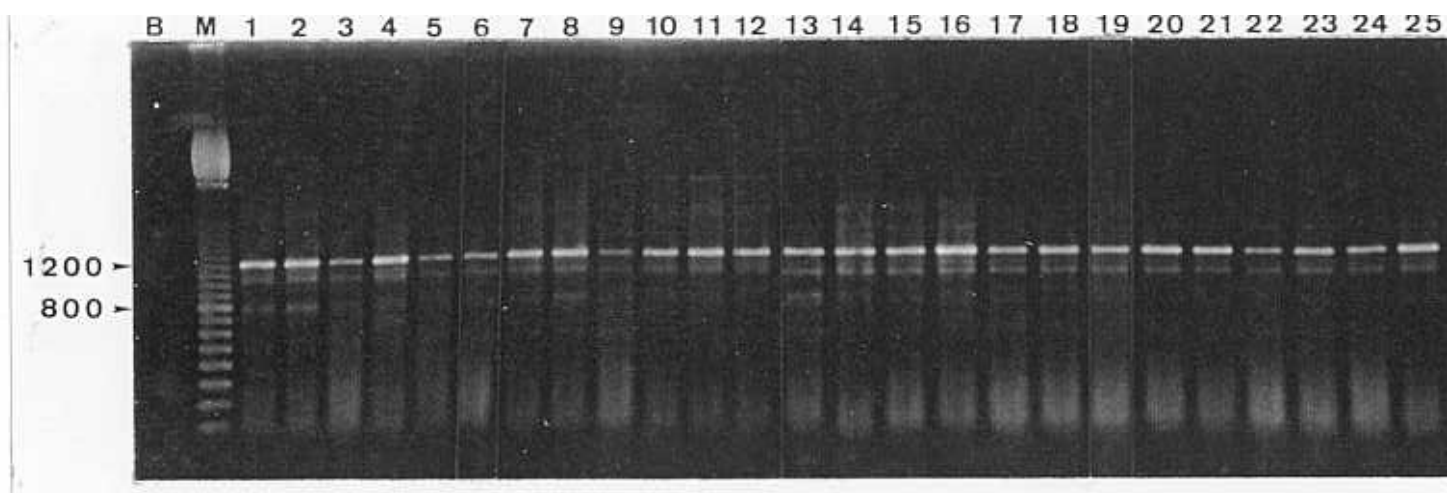
**4.4.4.2. OP #5.**

Se obtuvieron sólo dos polimorfismos que permitieron diferenciar cuatro genotipos que agruparon la totalidad de las muestras (Tabla 24). Los dos fragmentos polimórficos aparecieron simultáneamente sólo en dos poblaciones, mientras que el 40% de las muestras no mostró ninguno de los dos polimorfismos.

En la Fig. 51 se muestra la electroforesis de los fragmentos RAPD obtenidos con OP#5.

**Tabla 24.** Patrones de RAPDs generados por OP #5. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	TIPOS				POBLACIONES
	I	II	III	IV	
1200					I : TEN, GUA, BOA, INF, ARA
1100					II : RET, RIO
980					III : UÑA, GAR, NAV, LAF, FON, PIC, ARE, BEN
820					IV : BAR, POR, CHE, PUE, Z, SEG, CAB, HOR, COR
730					GRA



**Figura 50.** Patrones de bandas obtenidos mediante el *primer* OP#3. Numeración de las poblaciones como en la Tabla 7.

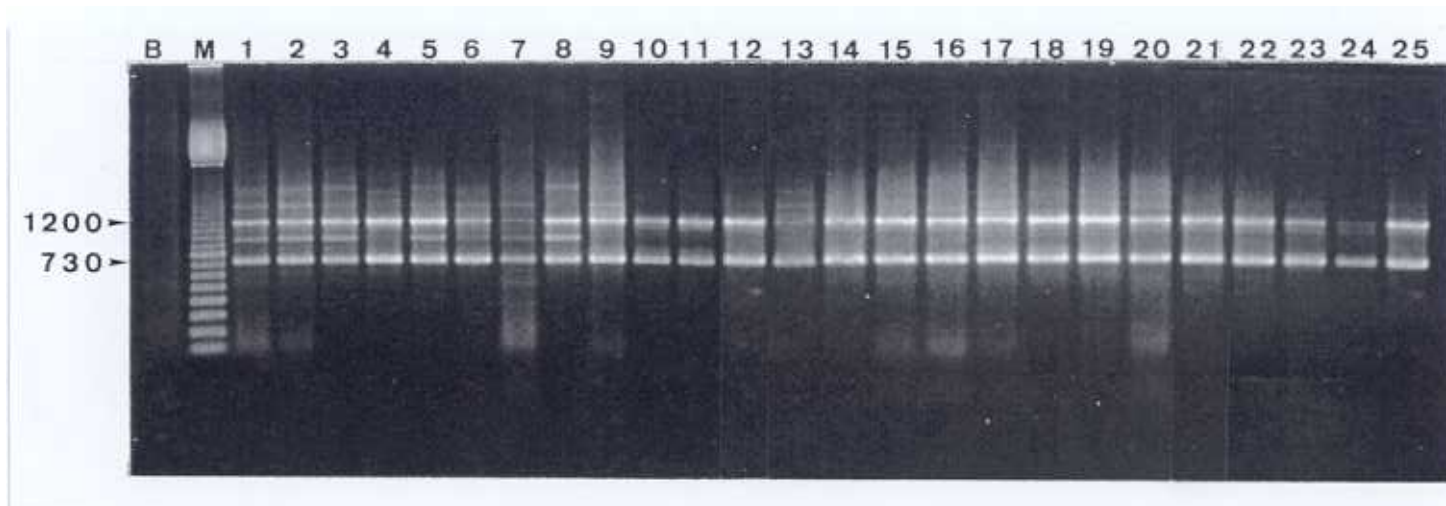


Figura 51. Patrones de bandas obtenidos mediante el *primer* OP#5. Numeración de las poblaciones como en la Tabla 7.

4.4.4.3. OP #7.

Este primer, junto con OP#20, fue el que detectó un mayor número de genotipos. El 100% de las bandas generadas fueron polimórficas, rindiendo 14 genotipos de los que diez correspondieron a una sola población. El número mínimo de RAPDs que permitió caracterizar una población fue 2 (GAR, Tabla 26). La electroforesis de los fragmentos RAPD obtenidos con este oligonucleótido se muestra en la Fig. 52.

**Tabla 25.** Patrones de RAPDs generados por OP #7. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	TIPOS				POBLACIONES
	I	II	III	IV	
1450	■	■	■	■	I : TEN, RIO II : RET, GUA, BOA, INF, ARA, SEG III : UÑA, NAV, LAF, BAR IV : PIC, ARE, BEN
1350	■	■	■	■	
1270	■	■	■	■	
1100	■	■	■	■	
1050	■	■	■	■	
950	■	■	■	■	
820	■	■	■	■	
780	■	■	■	■	
700	■	■	■	■	
570	■	■	■	■	

**Tabla 26.** Patrones únicos de RAPDs generados por OP #7. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	POBLACIONES									
	GAR	FON	POR	CHE	PUE	Z	CAB	HOR	COR	GRA
1450	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1350	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1270	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1100	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1050	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
950	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
820	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
780	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
700	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
570	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

**4.4.4.4. OP#8.**

Los seis fragmentos de amplificación generados por OP#8 formaron un único perfil de bandas común a todas las poblaciones (Tabla 22, Fig. 53).

**4.4.4.5. OP #12.**

Las bandas polimórficas generadas por este primer se situaron a lo largo de todo el intervalo de tamaños dejando las dos bandas constantes (1250 y 1050 bp) en la región central (Fig. 54). Permitieron distinguir nueve genotipos de los que sólo tres correspondieron a una única población : POR (OP #121600 + OP #12820 + OP #12790), Z (OP #121600 + OP #12820) y CHE (OP #12820 + OP #12790).

OP #12890 fue exclusivo de las poblaciones incluidas en el tipo IV.

**Tabla 27.** Patrones de RAPDs generados por OP #12. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	TIPOS						POBLACIONES
	I	II	III	IV	V	VI	
1600							I : TEN, RIO, BOA, INF
1500							II : RET, UÑA, ARE, BEN
1350							III : GUA, LAF
1250							IV : ARA, GAR, NAV, BAR
1050							V : FON, SEG, CAB, HOR, COR, GRA
930							VI : PUE, PIC
890							
820							
790							

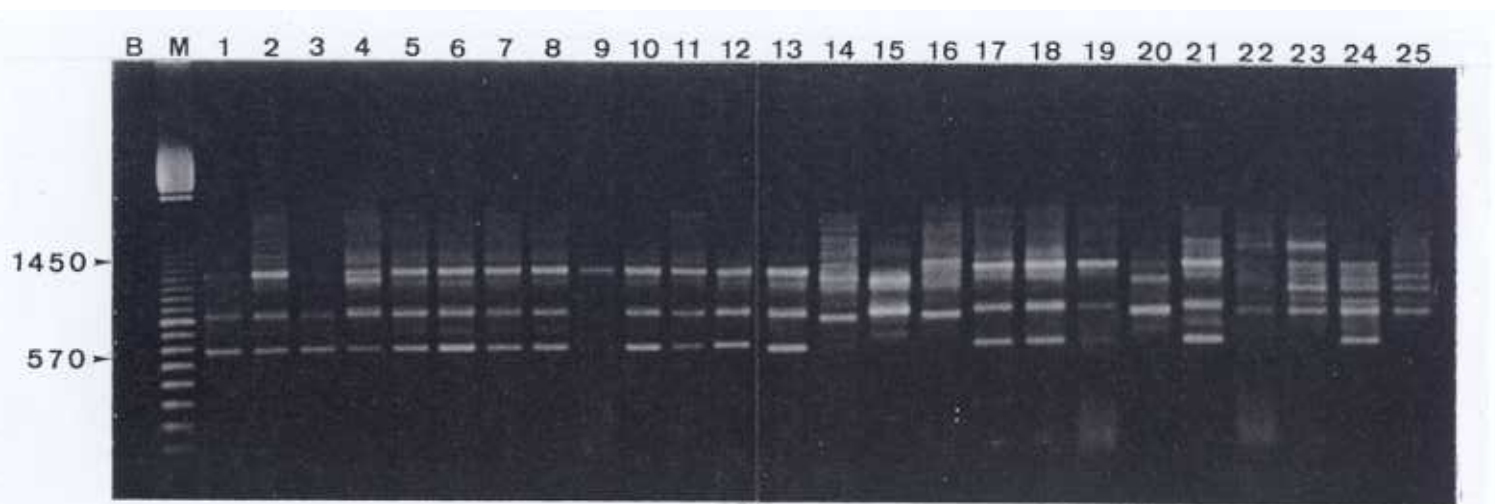


Figura 52. Patrones de bandas obtenidos mediante el *primer* OP#7. Numeración de las poblaciones como en la Tabla 7.

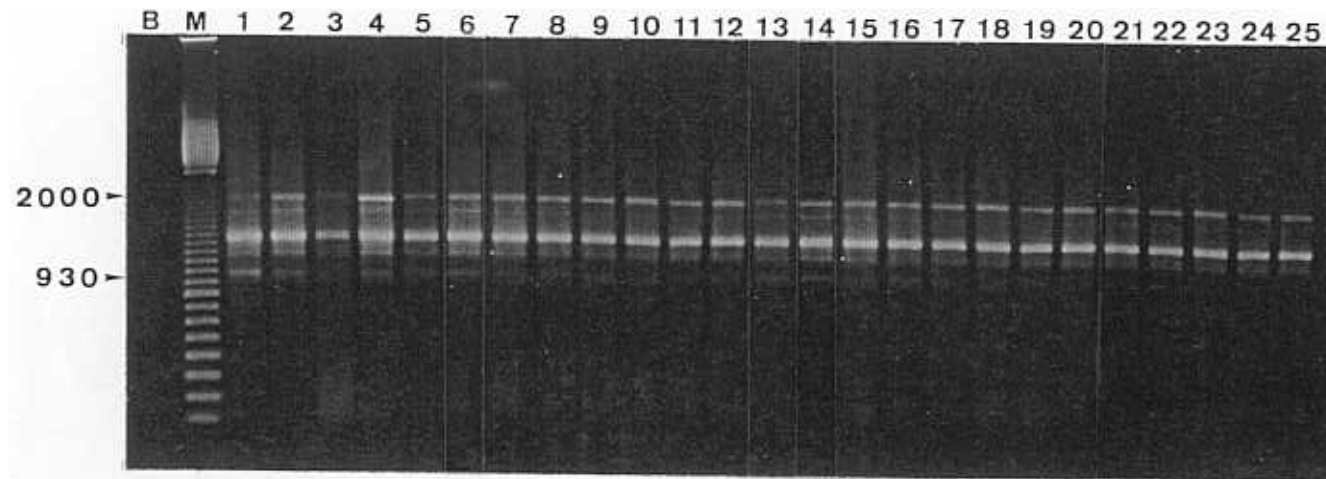


Figura 53. Patrones de bandas obtenidos mediante el *primer* OP#8. Numeración de las poblaciones como en la Tabla 7.



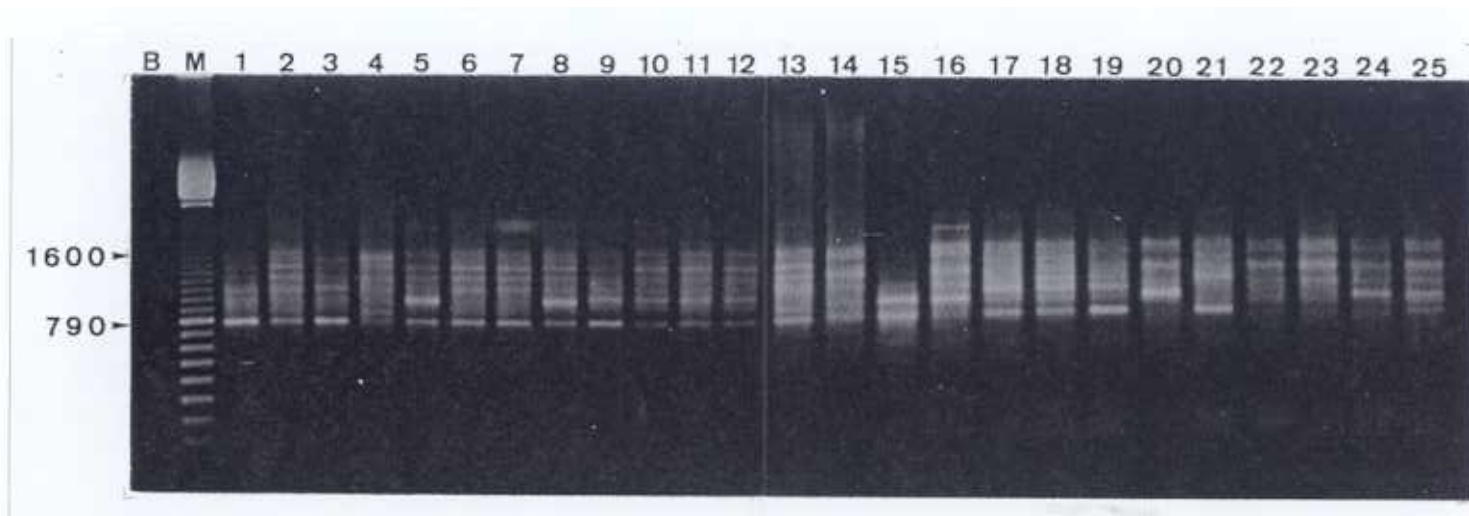


Figura 54. Patrones de bandas obtenidos mediante el *primer* OP#12. Numeración de las poblaciones como en la Tabla 7.

4.4.4.6. OP #13.

Los tres fragmentos polimórficos generados por este *primer* produjeron cinco patrones de bandas que agruparon a la totalidad de las muestras (Tabla 28). Ninguna población mostró simultáneamente las tres bandas polimórficas. OP#13<sub>1300</sub> sólo apareció en el Tipo III (UÑA y CHE), mientras que las siete muestras que presentaron el tipo V no mostraron ninguno de los polimorfismos. La electroforesis de los RAPDs producidos por este oligonucleótido se muestra en la Fig. 55.

**Tabla 28.** Patrones de RAPDs generados por OP #13. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	TIPOS					POBLACIONES
	I	II	III	IV	V	
1700						I: TEN, RET, RIO, GUA, BOA, INF, ARA, FON
1500						II: SEG, GRA, HOR, COR
1300						III: UÑA, CHE
1070						IV: GAR, NAV, LAF, BAR
970						V: POR, PUE, PIC, ARE, BEN,Z, CAB
880						
800						
700						

4.4.4.7. OP #15.

Los polimorfismos producidos por este *primer* (Fig. 56) permitieron agrupar 23 de las 25 poblaciones en cuatro genotipos diferentes. Las dos únicas muestras que se separaron fueron GAR, que se diferenció por OP #15<sub>1100</sub> y OP #15<sub>980</sub> y BEN por OP #15<sub>980</sub>. Las poblaciones agrupadas en el tipo III mostraron OP #15<sub>1100</sub> como único RAPD (Tabla 29).

**Tabla 29.** Patrones de RAPDs generados por OP #15. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	TIPOS				POBLACIONES
	I	II	III	IV	
2100					I: TEN, RET, RIO, UÑA, GUA, BOA, INF, ARA, FON
1450					II: NAV, LAF, BAR, PIC, ARE, Z, SEG
1300					III: CAB, HOR, GRA
1250					IV: POR, CHE, PUE, COR
1100					
980					
800					

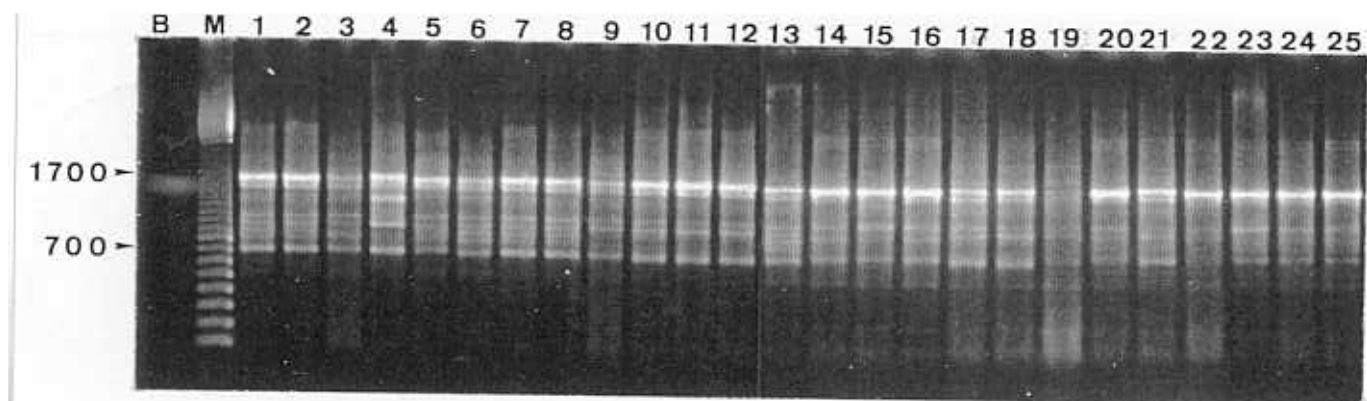


Figura 55. Patrones de bandas obtenidos mediante el *primer* OP#13. Numeración de las poblaciones como en la Tabla 7.

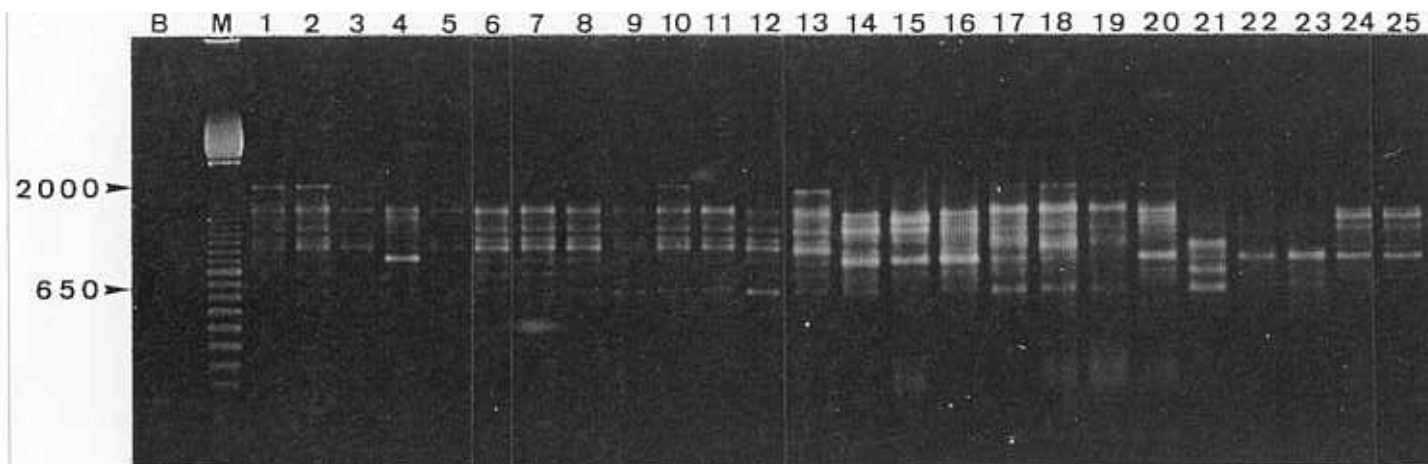


Figura 56. Patrones de bandas obtenidos mediante el *primer* OP#15. Numeración de las poblaciones como en la Tabla 7.

4.4.4.8. OP #19.

Las diez bandas polimórficas generadas por este *primer* separaron las muestras en otros tantos genotipos, de los que cinco correspondieron a una sola muestra. Dentro de las combinaciones de polimorfismos correspondientes a poblaciones únicas, sólo PUE y Z mostraron los RAPDs de mayor tamaño (OP #19<sub>2000</sub>, OP #19<sub>1600</sub>). Estos marcadores también aparecieron en los tipos I y II (Tablas 30 y 31). Con este *primer* el número mínimo que permitió caracterizar una muestra fue 4 (PUE y SEG, Tabla 31). En la Fig. 57 se muestra la electroforesis correspondiente a este *primer*.

**Tabla 30.** Patrones de RAPDs generados por OP #19. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	TIPOS					POBLACIONES
	I	II	III	IV	V	
2000	■	■				I: TEN, RET, BOA, NAV, FON
1600		■				II: PIC, ARE, BEN
1500	■		■			III: RIO, GUA, INF, ARA, GAR, LAF, BAR
1400		■		■		IV: POR, CHE
1250	■	■	■	■		V: CAB, HOR
1150	■	■	■	■		
1050	■		■			
1000					■	
900	■	■	■	■	■	
800	■	■	■	■	■	
700	■	■	■	■	■	
650	■	■	■	■	■	

**Tabla 31.** Patrones únicos de RAPDs generados por OP #19. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	POBLACIONES				
	UNA	PUE	Z	SEG	COR
2000		■	■		
1600		■	■		
1500	■			■	
1400		■		■	
1250	■				
1150	■			■	
1050	■				■
1000					■
900	■	■	■	■	■
800	■	■	■	■	■
700	■	■	■	■	■
650	■	■	■	■	■

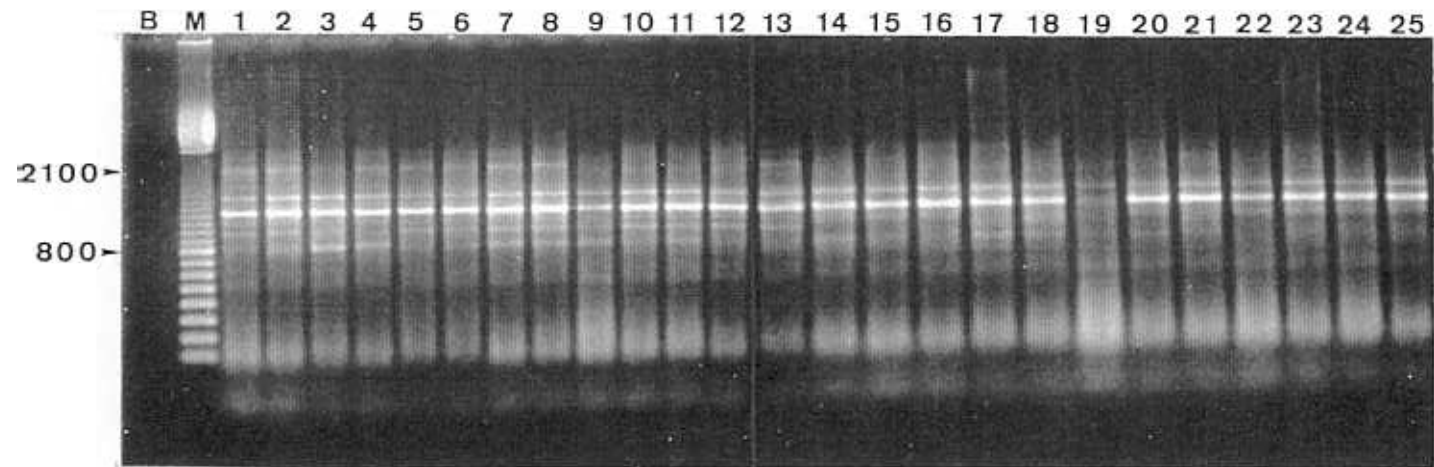


Figura 57. Patrones de bandas obtenidos mediante el *primer* OP#19. Numeración de las poblaciones como en la Tabla 7.

4.4.4.9. OP #20.

Con este *primer* se obtuvieron nueve marcadores RAPD que distinguieron once genotipos, de los que siete correspondieron a poblaciones únicas. El tipo I se caracterizó por la inclusión de OP#20700 que luego sólo se presentó en FON. El tipo III, además de UÑA, mostró sólo 3 polimorfismos, número mínimo que permitió caracterizar una población con este *primer* (Tablas 32 y 33). La electroforesis de las fragmentos amplificados por este oligonucleótido se muestra en la Fig. 58.

**Tabla 32.** Patrones de RAPDs generados por OP #20. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	TIPOS				POBLACIONES
	I	II	III	IV	
1500					I: TEN, RET, RIO, INF, ARA, NAV
1300					II: GUA, BOA, GAR, LAF, BAR, SEG
1250					III: PIC, ARE, BEN
1100					IV: CAB, HOR
1000					
900					
800					
730					
700					
600					
580					
450					

**Tabla 33.** Patrones únicos de RAPDs generados por OP #20. Denominación de las poblaciones como en Tabla 7.

RAPD	POBLACIONES						
	UÑA	FON	POR	CHE	PUE	Z	COR
1500							
1300							
1250							
1100							
1000							
900							
800							
730							
700							
600							
580							
450							

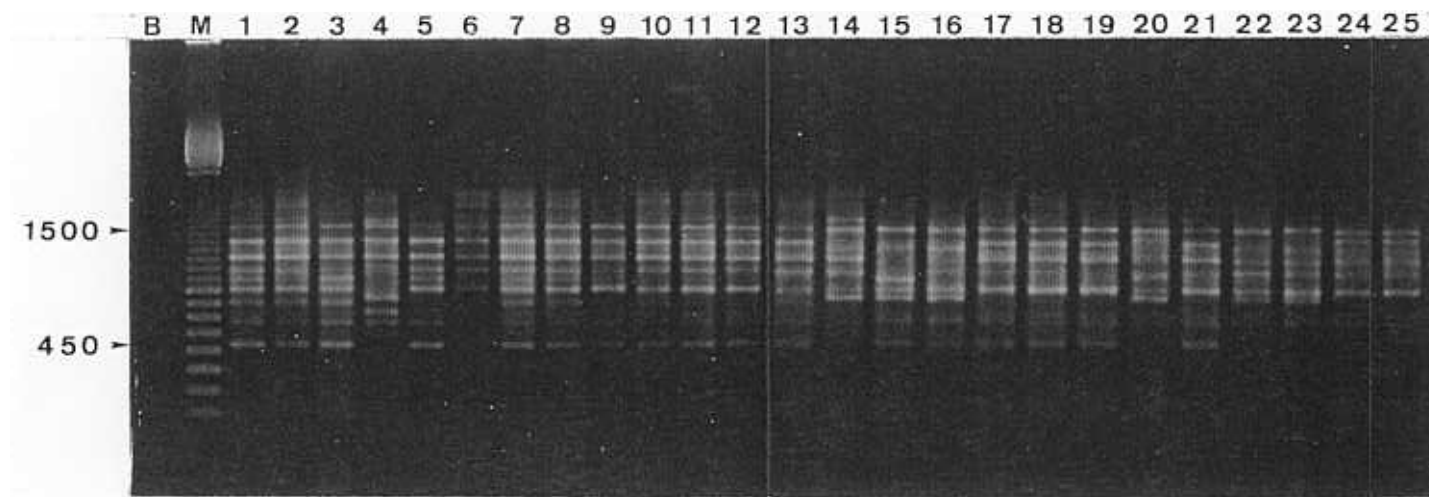


Figura 58. Patrones de bandas obtenidos mediante el *primer* OP#20. Numeración de las poblaciones como en la Tabla 7.



#### 4.4.5. ANALISIS MULTIVARIANTE.

##### 4.4.5.1. Análisis de ordenamiento (PCO).

Con la matriz obtenida con el índice **J**, el PCO rindió sólo una coordenada con un autovalor  $\geq 1$  y se necesitaron hasta las siete primeras para acumular el 75 % de la variación observada. Las primeras tres coordenadas principales acumularon el 53,19% de la variación entre las 25 poblaciones (27,42%, 15,74% y 10,02%, respectivamente) (Tabla 34).

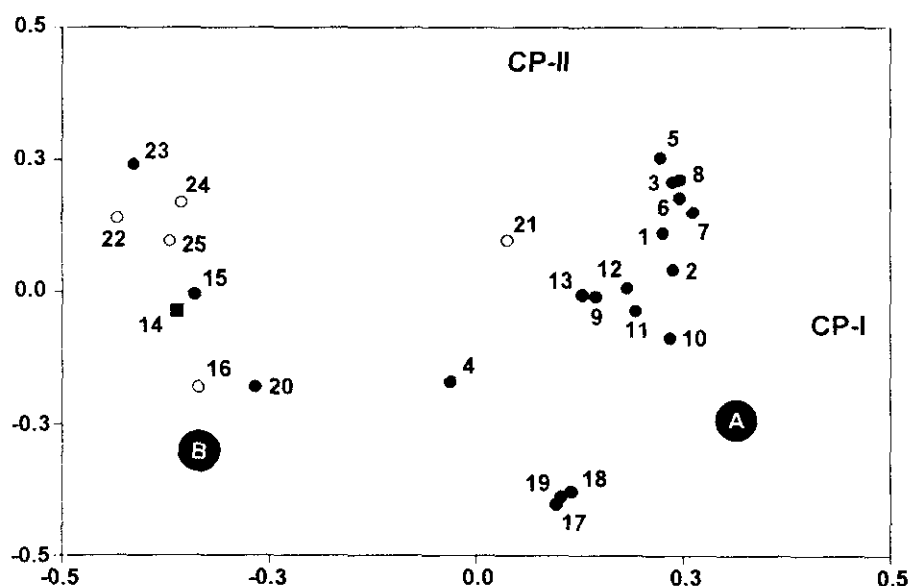
El PCO basado en la matriz de similitudes obtenida a partir del índice **F** también rindió una sola coordenada principal con autovalor  $\geq 1$ . Fue ligeramente superior a la primera coordenada principal del PCO basado en la matriz de las distancias **J**. Las seis primeras coordenadas acumularon el 75 % de la variación entre las poblaciones estudiadas. Las tres primeras acumularon un 54,74% de la variación total (28,67%, 15,90% y 10,17%, respectivamente) (Tabla 34).

**Tabla 34.** Análisis de Coordenadas Principales (PCR-RAPDs). Coordenadas principales (*i*) correspondientes a los coeficientes **J** y **F** con indicación de su contribución a la variabilidad observada (%= absoluta;  $\Sigma\%i$ = acumulada).

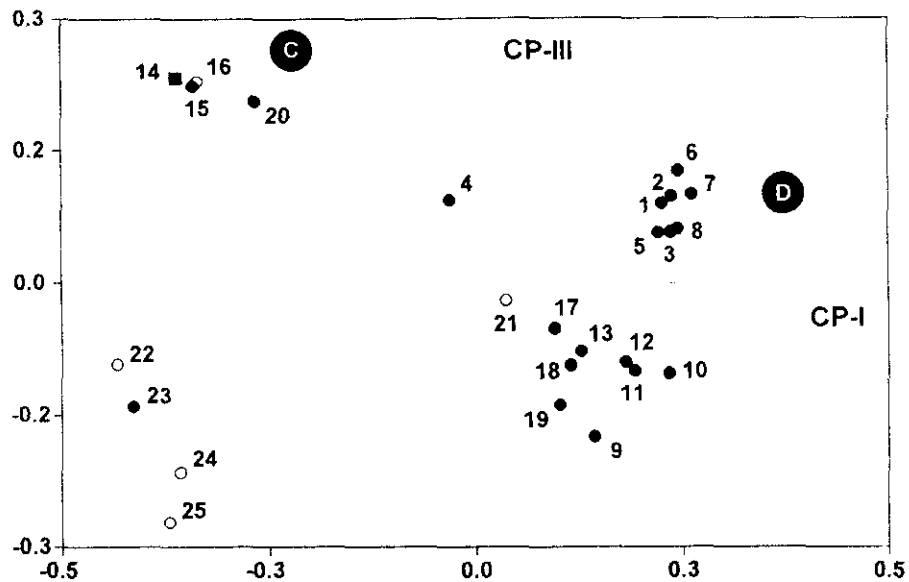
J				F			
<i>i</i>	Autovalor	%	$\Sigma\%i$	<i>i</i>	Autovalor	%	$\Sigma\%i$
1	1,715	27,42	27,42	1	1,107	28,67	28,67
2	0,984	15,74	43,17	2	0,614	15,90	44,57
3	0,627	10,02	53,19	3	0,393	10,17	54,74
4	0,514	8,22	61,41	4	0,317	8,22	62,96
5	0,424	6,78	68,19	5	0,269	6,96	69,91
6	0,301	4,81	73,00	6	0,220	5,69	75,60
7	0,281	4,50	77,50	7	0,171	4,44	80,04
8	0,249	3,98	81,48	8	0,156	4,02	84,06
9	0,205	3,28	84,76	9	0,114	2,95	87,01
10	0,180	2,88	87,64	10	0,097	2,50	89,52
11	0,143	2,29	89,94	11	0,081	2,10	91,62
12	0,126	2,01	91,95	12	0,075	1,94	93,55
13	0,105	1,68	93,63	13	0,069	1,78	95,33
14	0,080	1,28	94,90	14	0,058	1,50	96,83
15	0,069	1,10	96,01	15	0,051	1,32	98,15
16	0,056	0,90	96,90	16	0,037	0,97	99,12
17	0,055	0,88	97,79	17	0,035	0,90	>100%
18	0,047	0,75	98,53	18	0,031	0,81	>100%
19	0,042	0,67	99,20	19	0,030	0,79	>100%
20	0,025	0,40	99,60	20	0,023	0,59	>100%
21	0,017	0,27	99,86	21	0,020	0,51	>100%
22	0,014	0,22	>100%	22	0,011	0,28	>100%
23	0,009	0,14	>100%	23	0,007	0,17	>100%
24	0,004	0,06	>100%	24	0,006	0,16	>100%
25	cte.	0,00	>100%	25	cte.	0,00	>100%

En el análisis de coordenadas principales basado en la matriz de distancias J, la primera (27,42 % de la variación observada) separó las muestras en dos grupos bien definidos, A y B (Figura 59). En la parte positiva de la coordenada el grupo A quedó formado por la mayoría de poblaciones de la subsp. *gallica*. El grupo B fue heterogéneo por cuanto agrupó a Z y HOR (nº 20 y 23, subsp. *gallica*) y POR (nº 14, subsp. *atlantica*) además de todas las poblaciones de *C. atlantica* excepto SEG (nº 21), que se situó junto con UÑA (subsp. *gallica*, nº 4) en una posición intermedia respecto a estos grupos.

La segunda coordenada principal (explicó el 15,74 % de la variación total) definió un amplio grupo que incluyó poblaciones pertenecientes a todos los taxones presentes en el estudio, fundamentalmente distribuido en su parte positiva. Todas las muestras con origen "sur" se localizaron en esta parte de la coordenada. Sólo separó de este núcleo a tres poblaciones levantinas de la subsp. *gallica* : PIC, ARE y BEN (nº 17, 18 y 19) en las proximidades de su extremo negativo (de hecho, todas las poblaciones de procedencia levantina se situaron en la parte negativa de esta coordenada). UÑA y Z (subsp. *gallica*, nº 4 y 20) y PUE (*C. atlantica*, nº 16) se situaron de forma un tanto intermedia, también en la parte negativa de esta coordenada (Figura 59).



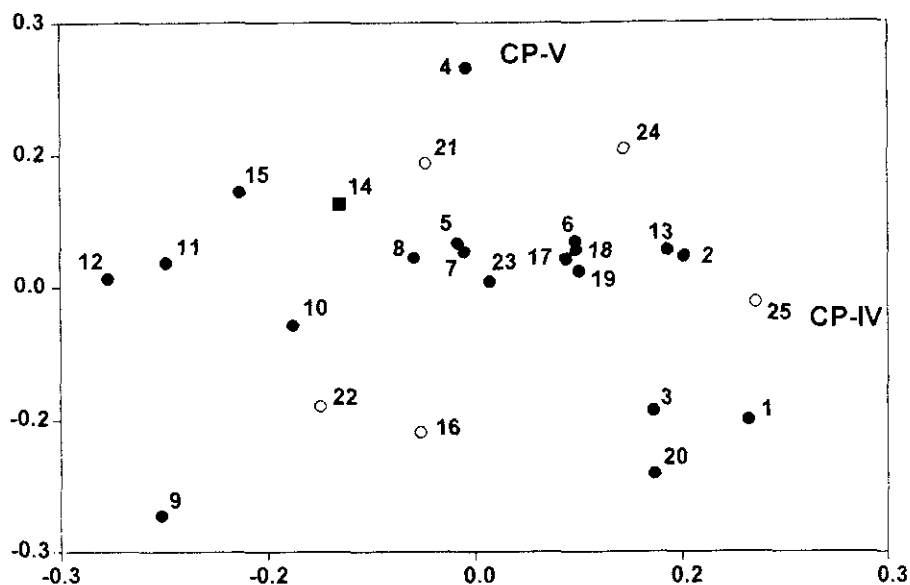
**Figura 59.** Análisis de Coordenadas Principales (PCR-RAPDs, distancias J). Proyección de las poblaciones sobre la 1ª y 2ª coordenadas principales. Las poblaciones se numeran como en la Tabla 7. Se indican los dos grupos definidos por la 1ª coordenada principal (A y B). ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.



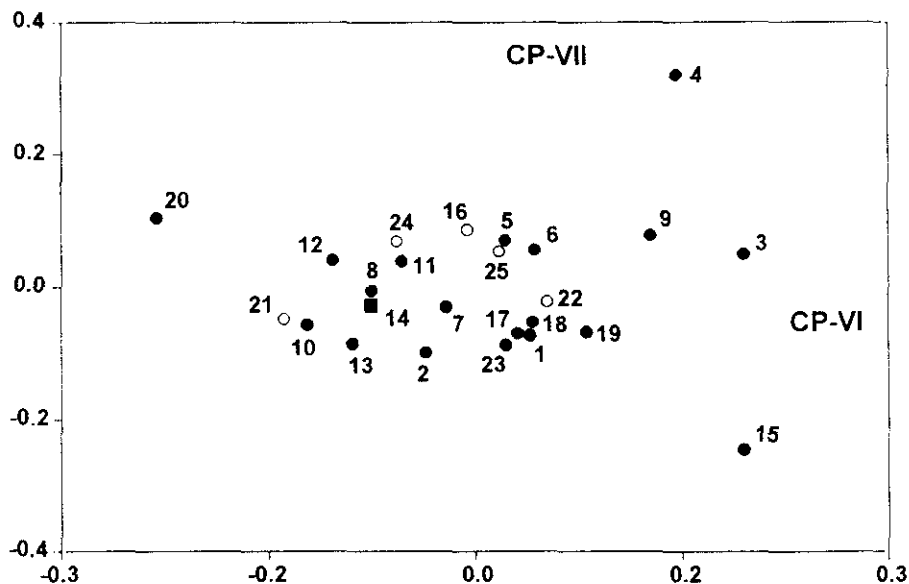
**Figura 60.** Análisis de Coordenadas Principales (PCR-RAPDs, distancias J). Proyección de las poblaciones sobre la 1ª y 3ª coordenadas principales. Las poblaciones se numeran como en la Tabla 7. Se indican los dos grupos definidos por la 3ª coordenada principal comentados en el texto (C y D). ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

La tercera coordenada principal (10,02 % de la variación) en su parte positiva definió dos grupos compactos, C y D: el más cercano al extremo de la coordenada (C) resultó heterogéneo respecto de las poblaciones que agrupaba ya que quedó formado por CHE y Z (subsp. *gallica*, nº 15 y 20), POR (subsp. *atlantica*, nº 14) y por PUE (*C. atlantica*, nº 16) pero muy homogéneo respecto de la procedencia geográfica (levante). El segundo grupo (D) quedó constituido por poblaciones de la subsp. *gallica* procedentes del centro y norte. Ocupando la casi totalidad de la amplitud de la parte negativa de la coordenada quedó el resto de las poblaciones: todas las de *C. atlantica* excepto PUE y casi la mitad de las correspondientes a la subespecie *gallica* (Figura 60).

Las demás coordenadas, hasta acumular el 75 % de la variación observada, no produjeron ningún grupo bien definido, limitándose a separar algunas poblaciones del resto de muestras. No obstante, sí fue destacable que UÑA (subsp. *gallica*, nº 4) quedase netamente alejada del resto de poblaciones en la parte positiva de las coordenadas 5ª y 7ª. Respecto a esta última coordenada CHE (subsp. *gallica*, nº 15) también quedó muy separada pero en la parte negativa de la coordenada (Figuras 61 y 62).



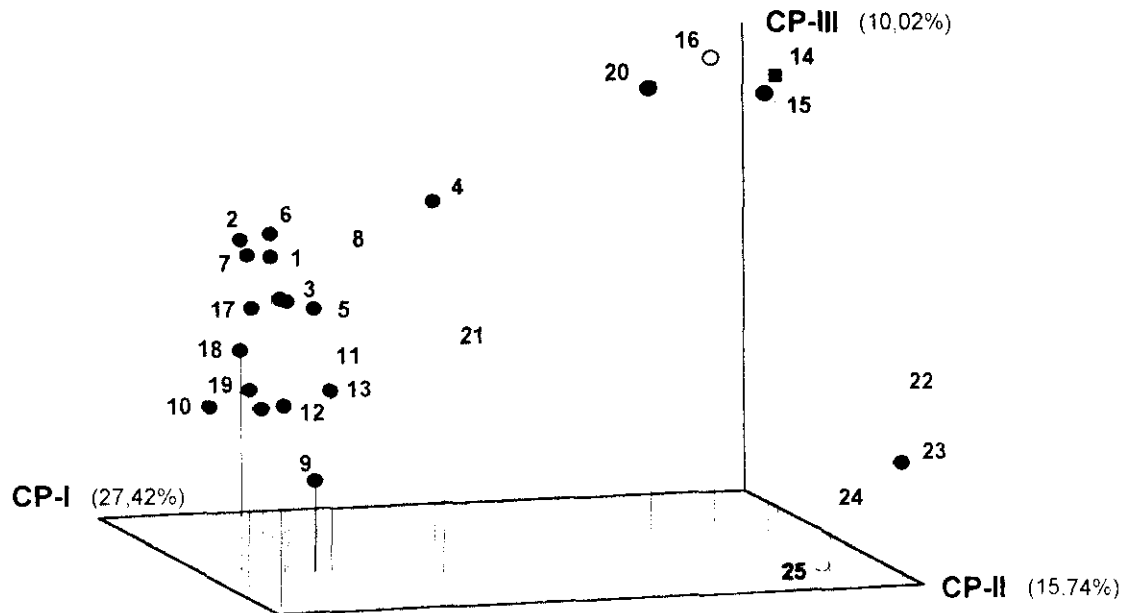
**Figura 61.** Análisis de Coordenadas Principales (PCR-RAPDs, distancias J). Proyección de las poblaciones sobre la 4ª y 5ª coordenadas principales. Las poblaciones se numeran como en la Tabla 7. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.



**Figura 62.** Análisis de Coordenadas Principales (PCR-RAPDs, distancias J). Proyección de las poblaciones sobre la 4ª y 5ª coordenadas principales. Las poblaciones se numeran como en la Tabla 7. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

La proyección de las poblaciones sobre las tres primeras coordenadas principales permitió detectar tres claros agrupamientos (Figura 63). El más numeroso coincidió con el grupo A definido por la 1ª coordenada principal (Figura 59). Estuvo integrado exclusivamente por poblaciones de la subsp. *gallica* de las procedencias

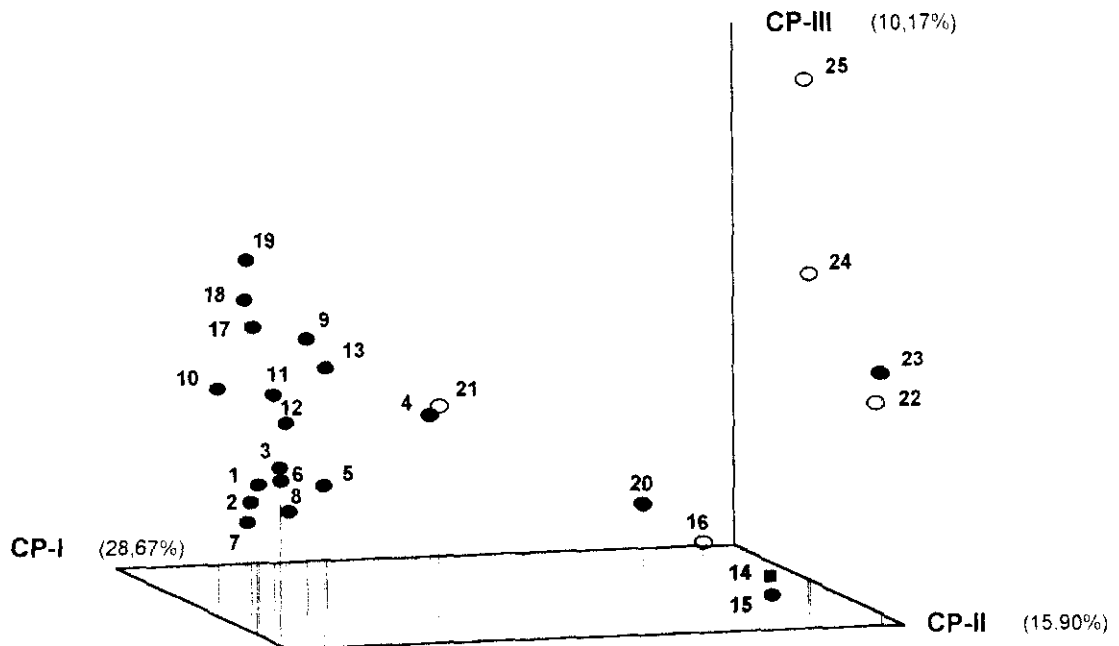
geográficas "centro", "norte" y "levante". Los otros dos grupos quedaron claramente separados por la tercera coordenada principal y resultaron heterogéneos: en la parte positiva se situó un grupo coincidente con el grupo C, de procedencia levantina (Figura 60) y en la negativa se situaron CAB, COR y GRA (*C. atlantica*, nº 22, 24 y 25) junto con HOR (subsp. *gallica*, nº 23). En posición intermedia siguieron quedando UÑA (subsp. *gallica*, nº 4) y SEG (*C. atlantica*, nº 21).



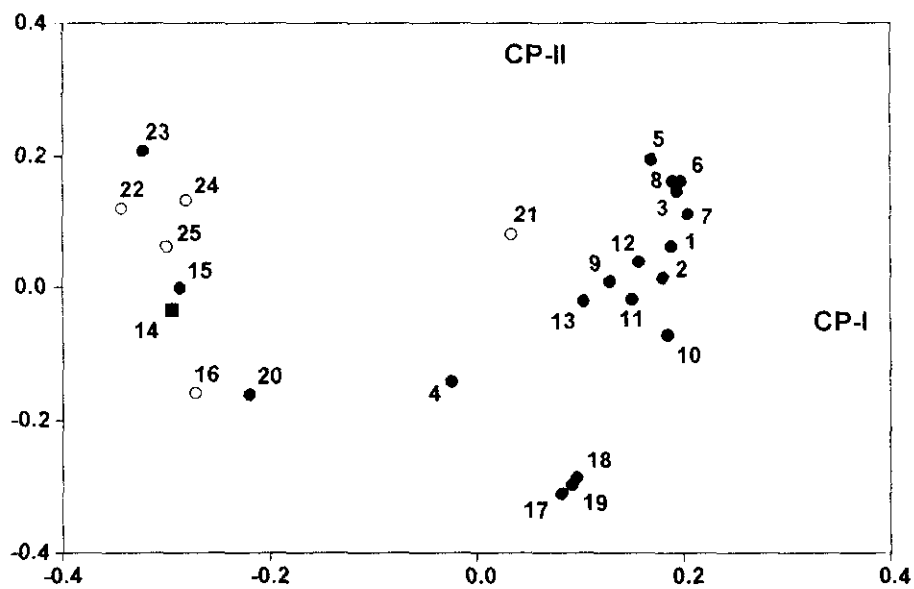
**Figura 63.** Análisis de Coordenadas Principales (PCR-RAPDs, distancias J). Proyección de las poblaciones sobre las tres primeras coordenadas principales. Entre paréntesis se aporta el % de variación explicada por cada una de ellas. Las poblaciones se numeran como en la Tabla 7.

●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*

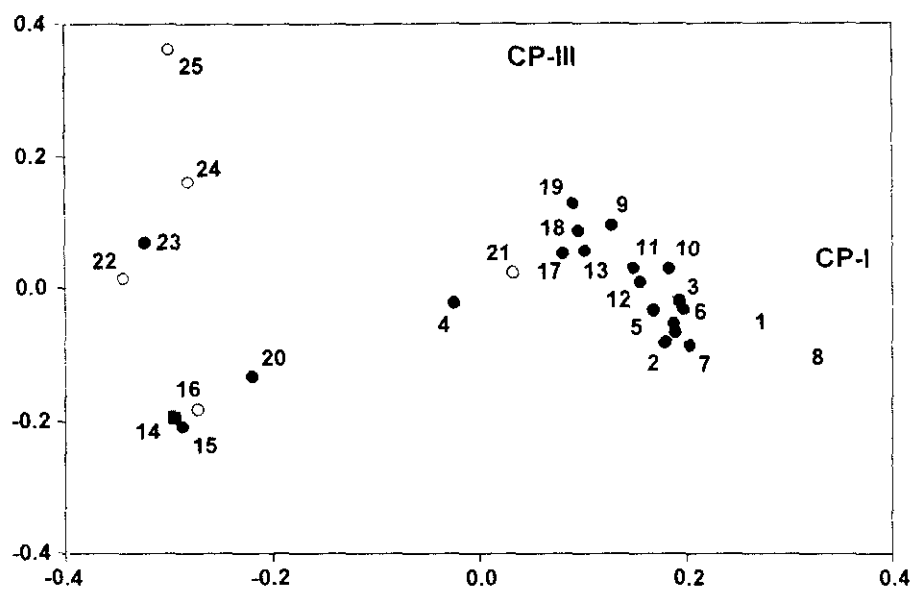
El ordenamiento de las poblaciones producido por el PCO basado en la matriz de distancias F fue, en la práctica, el previamente descrito. No obstante, sí hubo una diferencia notable: se invirtieron las posiciones relativas de las poblaciones dentro de los grupos definidos respecto a la 3ª coordenada principal (Figura 64). De hecho, esta coordenada sólo definió bien un grupo que coincidió con el C descrito para la PC-III del PCO basado en la matriz de distancias J (Figura 66), mientras que el grupo D previamente definido quedó más cercano al resto de poblaciones, resultando en una estructura más compacta. Los grupos definidos por la 1ª y 2ª coordenadas fueron los ya descritos para el análisis de coordenadas principales basado en la matriz de distancias J (Figura 65).



**Figura 64.** Análisis de Coordenadas Principales (PCR-RAPDs, distancias F). Proyección de las poblaciones sobre las tres primeras coordenadas principales. Entre paréntesis se aporta el % de variación explicada por cada una de ellas. Las poblaciones se numeran como en la Tabla 7  
 ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.



**Figura 65.** Análisis de Coordenadas Principales (PCR-RAPDs, distancias F). Proyección de las poblaciones sobre la 1ª y 2ª coordenadas principales. Las poblaciones se numeran como en la Tabla 7. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.



**Figura 66.** Análisis de Coordenadas Principales (PCR-RAPDs, distancias F). Proyección de las poblaciones sobre la 1ª y 3ª coordenadas principales. Las poblaciones se numeran como en la Tabla 7. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

#### 4.4.5.2. Análisis de ordenamiento intraespecífico.

No se observaron grandes diferencias de la comparación de los análisis intraespecíficos de las matrices de similitud obtenidas por los índices **J** y **F**. Eso sí, los valores medios fueron más elevados en el correspondiente al basado en la matriz de los valores **F**; también con esta matriz, fue destacable la disminución del valor medio para *C. atlantica* respecto al subgrupo formado por las poblaciones de origen geográfico más homogéneo (Tabla 35).

**Tabla 35.** Valores medios de similitud entre poblaciones según taxón, procedencia geográfica y matriz de similitud empleada ( $\bar{X}_J$  y  $\bar{X}_F$ ). \*: comparación respecto a las muestras de *C. arborescens* subsp. *gallica*; \*\*: comparación respecto a las muestras de *C. atlantica*, total. valor medio de similitud para el conjunto de poblaciones de cada taxón.

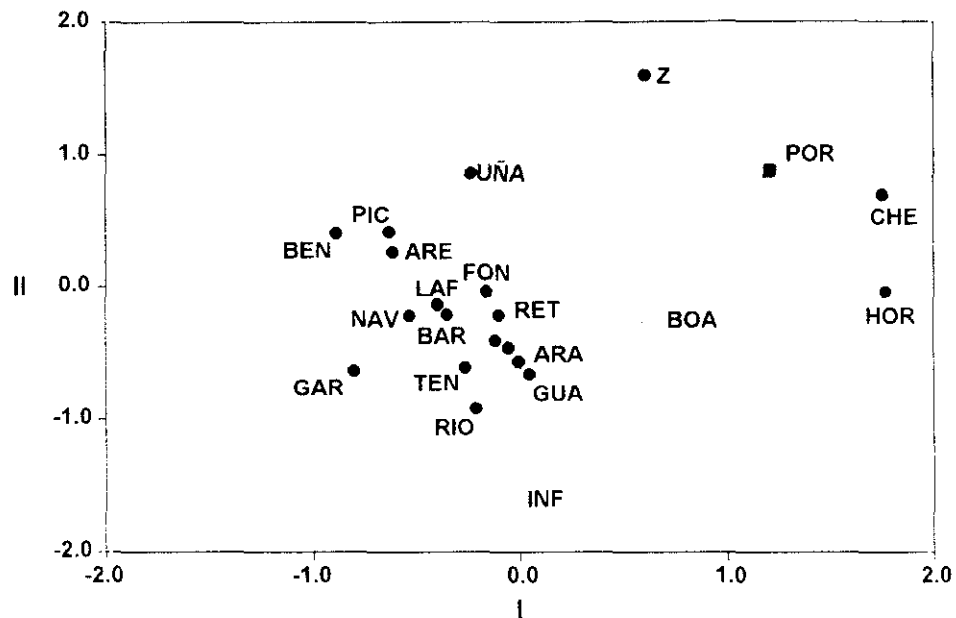
TAXON	ORIGEN	MUESTRAS	$\bar{X}_J$	$\bar{X}_F$
<i>C. arborescens</i> subsp. <i>gallica</i>	centro	TEN, RET, UÑA	0,783	0,873
	norte	GUA, BOA, INF, ARA, GAR, NAV, LAF, BAR	0,872	0,929
	levante	FON, CHE, PIC, ARE, BEN, Z	0,751	0,852
	sur	HOR	0,654* / 0,810**	0,789* / 0,873**
			total = 0,767	total = 0,862
subsp. <i>atlantica</i>	levante	POR	0,694* / 0,773**	0,817* / 0,858**
<i>C. atlantica</i>	sur	SEG, CAB, COR	0,738	0,836
			total = 0,754	total = 0,824

Dentro de la subespecie *gallica*, el valor medio de similitud más elevado correspondió a las poblaciones procedentes del Pirineo. Este valor se hizo aún más elevado (0,929 y 0,918 para **J** y **F**, respectivamente) para el subgrupo formado por BOA, INF y ARA, poblaciones situadas a mayor altitud y con un entorno más submediterráneo. Las poblaciones del origen "centro" también mostraron un valor medio más elevado que el total para la subespecie; al incluir RIO, este valor ascendía hasta 0,802 y 0,886 para **J** y **F**, respectivamente. Las poblaciones englobadas en la procedencia "levante" y HOR, la única del origen "sur", tuvieron unos valores medios de similitud inferiores al total para este taxón. Al comparar esta población con las incluidas en *C. atlantica*, el valor obtenido resultó mucho más elevado (Tabla 35). El menor valor de similitud de esta población respecto a las incluidas en *C. atlantica* siempre fue respecto a PUE, la única población no procedente del sur (Tablas 36 y 37).



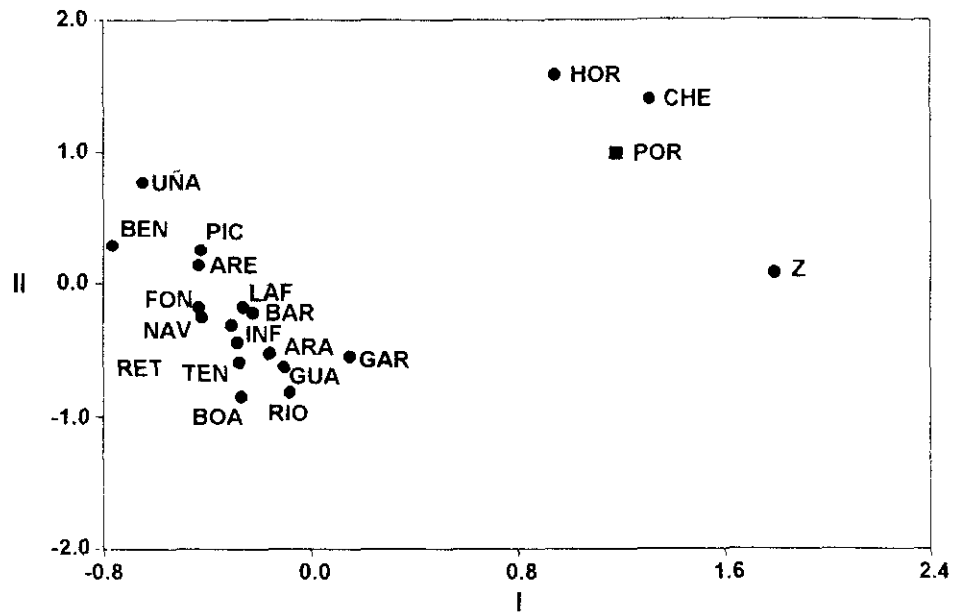
POR, la única población de la subespecie *atlantica*, mostró un  $\bar{x}_J$  respecto de las poblaciones de la subsp. *gallica* netamente inferior al que tuvo respecto a las de *C. atlantica* (Tabla 35).

Al igual de lo observado en el origen "centro" de la subespecie *gallica*, la inclusión de las poblaciones con un origen geográfico más diverso hizo que se elevase el valor medio para *C. atlantica* (Tabla 35).

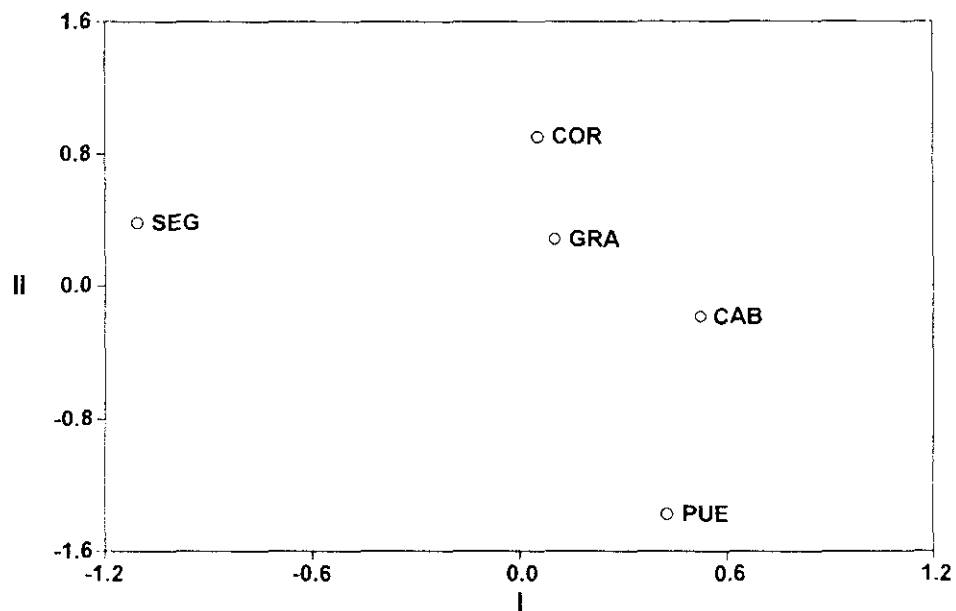


**Figura 67.** Ordenamiento de las poblaciones de *C. arborescens* (●: subsp. *gallica*; ■: subsp. *atlantica*) respecto a los dos primeros ejes producidos por MDS (PCR-RAPDs, J).

Las poblaciones de *C. arborescens* se distribuyeron ampliamente entre los límites de las variables de la función de distancia computada mediante el MDS basado en los valores J, lo que se corresponde con un valor medio de similitud relativamente bajo (Tabla ). Las poblaciones quedaron agrupadas en la parte negativa de la primera dimensión en su mayor parte: sólo POR (subsp. *atlantica*) y CHE, Z y HOR estuvieron, a bastante distancia, en la parte positiva de esta dimensión (Figura 67). La bondad de ajuste sólo fue "regular" (*stress* final = 0,214). La ordenación debida al MDS basado en los valores F presentó un esquema muy similar pero dentro de un intervalo más estrecho, correspondiente a un valor medio de similitud más elevado (Figura 68). En este caso, la bondad de ajuste del ordenamiento producido, aún siendo también "regular", fue peor (*stress* final = 0,316).



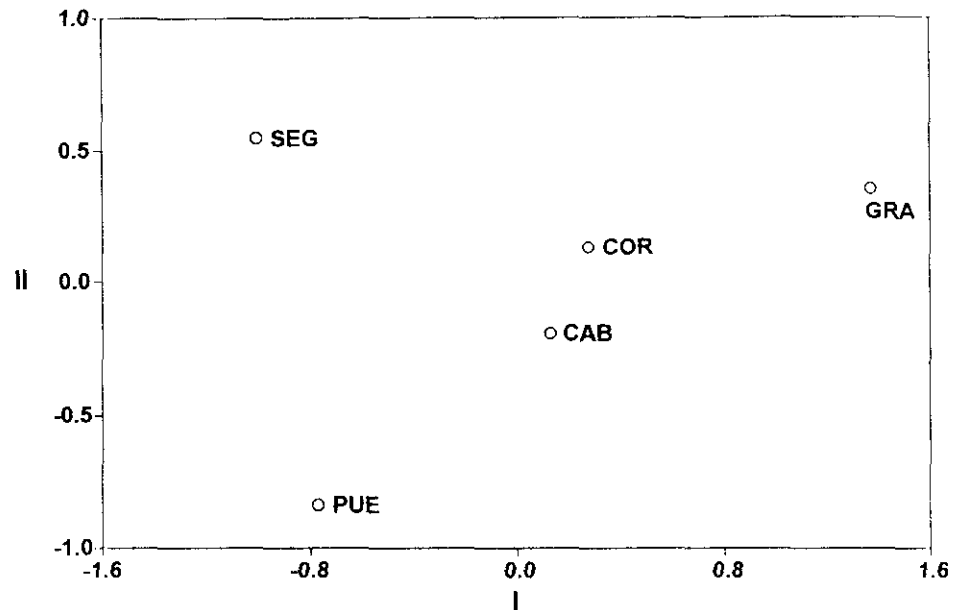
**Figura 68.** Ordenamiento de las poblaciones de *C. arborescens* (●: subsp. *gallica*; ■: subsp. *atlantica*) respecto a los dos primeros ejes producidos por MDS (PCR-RAPDs, F).



**Figura 69.** Ordenamiento de las poblaciones de *C. atlantica* respecto a los dos primeros ejes producidos por MDS (PCR-RAPDs, J).

El ordenamiento de las poblaciones de *C. atlantica* correspondiente al MDS de los valores J también mostró a las poblaciones muy repartidas entre los límites de las variables de la función de distancia. Excepto SEG, las poblaciones quedaron agrupadas en la parte positiva de la 1ª dimensión formando los pares COR - GRA y PUE - CAB (Figura 69). Con los valores F PUE pasó a la parte negativa de la 1ª dimensión aproximándose a SEG, mientras que GRA se distanció de CAB - COR hacia el extremo positivo de la dimensión (Figura 70). El ajuste entre las distancias

originales y las computadas por esta técnica fue "perfecto" (*stress* final = 0,000) en ambos casos.



**Figura 70.** Ordenamiento de las poblaciones de *C. atlantica* respecto a los dos primeros ejes producidos por MDS (PCR-RAPDs, F).

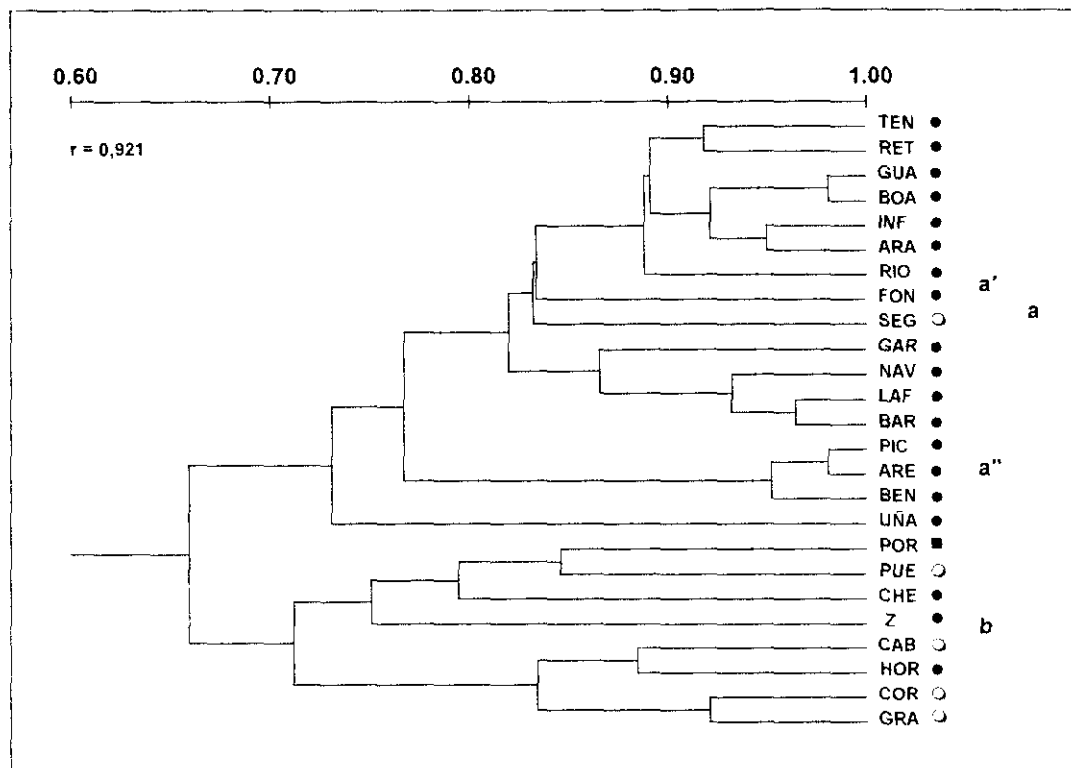
#### 4.4.5.3. Análisis de agrupamiento.

Aunque no se muestra, en la fase exploratoria del análisis multivariante por UPGMA también se realizó el análisis de agrupamiento sobre una matriz computada mediante **SM**, obteniéndose el mismo dendrograma que se puede ver en la Figura 71. Además, el valor de *r* en este caso (0,90) fue intermedio al obtenido con **J** y con **F**.

Las matrices de distancia obtenidas mediante la aplicación de los índices **J** y **F** (Tablas 36 y 37) mostraron en ambos casos valores de similitud elevados. En el caso de **J**, el valor mínimo de similitud fue 0,585, mostrado entre las poblaciones PIC y HOR mientras que GUA - BOA y PIC - ARE apenas pudieron distinguirse ya que mostraron el valor máximo de (0,981). PIC fue la muestra que mostró una mayor amplitud de variación de similitud (0,396) y SEG, la que presentó la menor (0,055). Los valores correspondientes a **F** fueron más elevados; el valor máximo de similitud (0,991) se presentó entre LAF y BAR, mientras que la máxima distancia (disimilitud) apareció entre NAV y GRA, con un valor de 0,707. La máxima amplitud de variación de similitud se presentó en NAV (0,267) y la mínima en Z y SEG (0,139).

Los dendrogramas obtenidos con este método mostraron unos valores elevados de correlación cofenética que fueron similares, aunque en el caso de F fue ligeramente inferior.

Los agrupamientos, con el coeficiente de Jaccard, se realizaron desde un valor máximo de distancia de 0,981 a otro mínimo de 0,659 (una amplitud equivalente a 0,32). Con el índice de Nei & Li los valores de similitud se situaron entre un máximo de 0,991 y un mínimo de 0,784, equivalente a una amplitud de 0,21. Este valor, inferior al obtenido con J produjo unos agrupamientos más compactos.



**Figura 71.** Análisis de agrupamiento (PCR-RAPDs, valores J).  $r$  = correlación cofenética. Las letras minúsculas se refieren a los subgrupos mencionados en el texto. ●: *C. arborescens* subsp. gallica; ■: *C. arborescens* subsp. atlantica; ○: *C. atlantica*.

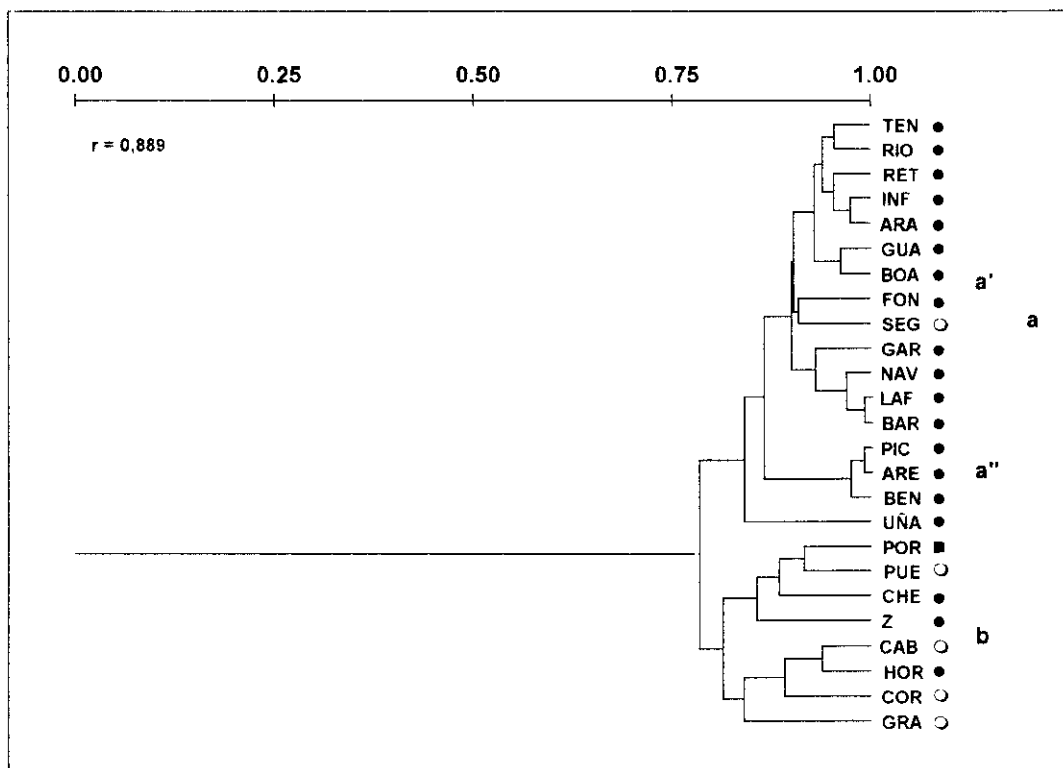
El agrupamiento de las poblaciones a partir de la matriz de distancias obtenida con el índice J se resolvió en dos agrupamientos principales, a y b (Figura 71). Dentro del agrupamiento a se definieron dos ramas principales; la primera (a') fue homogénea ya que incluyó poblaciones de la subespecie *gallica* y un solo representante de *C. atlantica* (SEG). TEN Y RET por un lado e INF y ARA por otro (poblaciones geográficamente muy cercanas) quedaron muy estrechamente agrupadas. También cabe destacar el subagrupamiento formado por las poblaciones pirenaicas más termófilas (GAR, NAV, LAF y BAR) del que sólo quedó excluida GUA que quedó

agrupada con BOA mostrando el valor más alto de similitud. RIO y FON junto con SEG se unieron separadamente a esta estructura. La segunda rama (a'') mostró un agrupamiento bien definido (exhibieron la menor distancia dentro del dendrograma) que estuvo integrado por PIC, ARE y BEN (*C. arborescens* subsp. *gallica*). Dentro de este agrupamiento, la población que más se separó fue UÑA.

El agrupamiento **b** presentó otras dos ramas principales: una que agrupó a CHE y Z (subsp. *gallica*), POR (subsp. *atlantica*) y PUE (*C. atlantica*), poblaciones de procedencia levantina y otra que incluyó poblaciones de *C. atlantica* y HOR (subsp. *gallica*), procedentes del sur peninsular (Figura 71).

Con el índice F la topología del dendrograma fue muy similar (Figura 72). No obstante, se pudieron apreciar algunos cambios. Así, dentro del agrupamiento a, RIO se agrupó directamente con TEN, la población más septentrional del las procedentes del centro de la Península. El otro cambio observado fue la agrupación de FON y SEG (subsp. *gallica* y *C. atlantica*, respectivamente) en una rama que se unió a (a'). El resto de muestras mostró un patrón de agrupamiento idéntico al presentado en el dendrograma correspondiente a J. El subagrupamiento (b) mostró la misma estructura general de agrupamiento. La única variación observada fue que GRA quedó separada de COR que ahora estaba unida a CAB - HOR (Figura 72).

Las topologías de los dendrogramas obtenidos por UPGMA coincidieron con los grupos obtenidos por PCO. No obstante, el subagrupamiento (a'') no quedó netamente definido dentro del grupo A. Así mismo, la posición intermedia que SEG (nº 21, *C. atlantica*) exhibió en la estructura tridimensional del PCO no se mantuvo, integrándose en el subagrupamiento (a'), justo al contrario que UÑA (nº 4, subsp. *gallica*), que sí permaneció en una posición alejada dentro de este subagrupamiento. Por su parte, los otros dos grupos detectados por PCO se correspondieron con las ramas definidas en el subagrupamiento b; esta correspondencia fue tal que el alejamiento observado entre COR y GRA (nº 24 y 25, *C. atlantica*) en la representaciones tridimensionales de los PCO se reflejó en la rama definida para las poblaciones de origen geográfico "sur" en los dendrogramas.



**Figura 72.** Análisis de agrupamiento (PCR-RAPDs, valores **F**).  $r$  = correlación cofenética. Las letras minúsculas se refieren a los subgrupos mencionados en el texto. ●: *C. arborescens* subsp. gallica; ■: *C. arborescens* subsp. atlantica; ○: *C. atlantica*.

**Tabla 36.** Matriz de similitud entre poblaciones (RAPDs, índice J). ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

	TEN	RET	RIO	UÑA	GUA	BOA	INF	ARA	GAR	NAV	LAF	BAR	FON	POR	CHE	PUE	PIC	ARE	BEN	ZII	SEG	CAB	HOR	COR	GRA	
TEN	● 1.000																									
RET	● 0.918	● 1.000																								
RIO	● 0.912	● 0.869	● 1.000																							
UÑA	● 0.677	● 0.754	● 0.683	● 1.000																						
GUA	● 0.850	● 0.871	● 0.895	● 0.714	● 1.000																					
BOA	● 0.889	● 0.911	● 0.906	● 0.741	● 0.981	● 1.000																				
INF	● 0.900	● 0.919	● 0.881	● 0.734	● 0.915	● 0.927	● 1.000																			
ARA	● 0.885	● 0.905	● 0.867	● 0.723	● 0.932	● 0.911	● 0.950	● 1.000																		
GAR	● 0.767	● 0.734	● 0.807	● 0.661	● 0.780	● 0.750	● 0.770	● 0.787	● 1.000																	
NAV	● 0.825	● 0.875	● 0.778	● 0.723	● 0.810	● 0.810	● 0.857	● 0.873	● 0.847	● 1.000																
LAF	● 0.790	● 0.841	● 0.800	● 0.770	● 0.864	● 0.839	● 0.883	● 0.869	● 0.875	● 0.932	● 1.000															
BAR	● 0.790	● 0.813	● 0.770	● 0.742	● 0.864	● 0.839	● 0.883	● 0.900	● 0.875	● 0.932	● 0.964	● 1.000														
FON	● 0.852	● 0.903	● 0.803	● 0.746	● 0.806	● 0.807	● 0.825	● 0.841	● 0.754	● 0.871	● 0.836	● 0.806	● 1.000													
POR	■ 0.641	● 0.692	● 0.619	● 0.729	● 0.677	● 0.684	● 0.698	● 0.688	● 0.597	● 0.662	● 0.705	● 0.705	● 0.683	● 1.000												
CHE	● 0.625	● 0.652	● 0.603	● 0.683	● 0.635	● 0.638	● 0.656	● 0.646	● 0.607	● 0.621	● 0.661	● 0.661	● 0.641	● 0.830	● 1.000											
PUE	○ 0.661	● 0.662	● 0.613	● 0.695	● 0.619	● 0.649	● 0.641	● 0.631	● 0.644	● 0.656	● 0.672	● 0.672	● 0.651	● 0.846	● 0.759	● 1.000										
PIC	● 0.754	● 0.806	● 0.705	● 0.763	● 0.710	● 0.750	● 0.758	● 0.719	● 0.741	● 0.833	● 0.828	● 0.797	● 0.800	● 0.695	● 0.650	● 0.719	● 1.000									
ARE	● 0.770	● 0.823	● 0.721	● 0.780	● 0.726	● 0.768	● 0.774	● 0.734	● 0.759	● 0.850	● 0.845	● 0.814	● 0.817	● 0.683	● 0.639	● 0.707	● 0.981	● 1.000								
BEN	● 0.738	● 0.790	● 0.689	● 0.746	● 0.694	● 0.732	● 0.742	● 0.703	● 0.754	● 0.817	● 0.810	● 0.780	● 0.783	● 0.650	● 0.607	● 0.672	● 0.942	● 0.962	● 1.000							
Z	● 0.689	● 0.688	● 0.613	● 0.667	● 0.619	● 0.649	● 0.641	● 0.631	● 0.617	● 0.656	● 0.645	● 0.645	● 0.677	● 0.778	● 0.667	● 0.808	● 0.719	● 0.707	● 0.672	● 1.000						
SEG	○ 0.787	● 0.839	● 0.767	● 0.738	● 0.862	● 0.855	● 0.850	● 0.867	● 0.746	● 0.806	● 0.862	● 0.862	● 0.833	● 0.759	● 0.712	● 0.667	● 0.763	● 0.780	● 0.746	● 0.695	● 1.000					
CAB	○ 0.619	● 0.621	● 0.623	● 0.623	● 0.656	● 0.621	● 0.625	● 0.641	● 0.684	● 0.641	● 0.683	● 0.683	● 0.661	● 0.792	● 0.741	● 0.755	● 0.590	● 0.607	● 0.600	● 0.691	● 0.707	● 1.000				
HOR	● 0.636	● 0.662	● 0.641	● 0.615	● 0.698	● 0.667	● 0.667	● 0.682	● 0.645	● 0.632	● 0.672	● 0.672	● 0.677	● 0.772	● 0.754	● 0.678	● 0.585	● 0.600	● 0.594	● 0.678	● 0.750	● 0.885	● 1.000			
COR	○ 0.627	● 0.652	● 0.631	● 0.656	● 0.688	● 0.667	● 0.657	● 0.672	● 0.609	● 0.647	● 0.688	● 0.688	● 0.719	● 0.759	● 0.683	● 0.667	● 0.625	● 0.641	● 0.609	● 0.639	● 0.738	● 0.768	● 0.842	● 1.000		
GRA	○ 0.698	● 0.660	● 0.674	● 0.667	● 0.667	● 0.644	● 0.638	● 0.660	● 0.667	● 0.652	● 0.667	● 0.667	● 0.744	● 0.707	● 0.659	● 0.718	● 0.674	● 0.698	● 0.690	● 0.700	● 0.762	● 0.833	● 0.895	● 0.921	● 1.000	

**Tabla 37.** Valores de similitud entre poblaciones (RAPDs, índice F). ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

	TEN	RET	RIO	UÑA	GUA	BOA	INF	ARA	GAR	NAV	LAF	BAR	FON	POR	CHE	PUE	PIC	ARE	BEN	ZII	SEG	CAB	HOR	COR	GRA	
	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	■	●	○	●	●	●	●	○	○	●	○	○	
TEN	● 1,000																									
RET	● 0,953	● 1,000																								
RIO	● 0,954	● 0,930	● 1,000																							
UÑA	● 0,807	● 0,860	● 0,811	● 1,000																						
GUA	● 0,919	● 0,931	● 0,926	● 0,833	● 1,000																					
BOA	● 0,897	● 0,911	● 0,923	● 0,827	● 0,962	● 1,000																				
INF	● 0,947	● 0,958	● 0,937	● 0,829	● 0,956	● 0,936	● 1,000																			
ARA	● 0,939	● 0,950	● 0,929	● 0,839	● 0,965	● 0,927	● 0,974	● 1,000																		
GAR	● 0,868	● 0,847	● 0,893	● 0,777	● 0,876	● 0,832	● 0,870	● 0,881	● 1,000																	
NAV	● 0,895	● 0,900	● 0,875	● 0,839	● 0,895	● 0,855	● 0,923	● 0,932	● 0,917	● 1,000																
LAF	● 0,883	● 0,914	● 0,889	● 0,870	● 0,927	● 0,887	● 0,938	● 0,930	● 0,933	● 0,965	● 1,000															
BAR	● 0,891	● 0,904	● 0,878	● 0,860	● 0,936	● 0,985	● 0,946	● 0,956	● 0,942	● 0,974	● 0,991	● 1,000														
FON	● 0,920	● 0,949	● 0,891	● 0,855	● 0,893	● 0,852	● 0,904	● 0,897	● 0,860	● 0,931	● 0,911	● 0,901	● 1,000													
POR	■ 0,781	● 0,818	● 0,765	● 0,843	● 0,808	● 0,780	● 0,822	● 0,815	● 0,748	● 0,796	● 0,827	● 0,835	● 0,811	● 1,000												
CHE	● 0,750	● 0,789	● 0,752	● 0,792	● 0,777	● 0,748	● 0,792	● 0,785	● 0,755	● 0,766	● 0,796	● 0,804	● 0,781	● 0,907	● 1,000											
PUE	○ 0,796	● 0,796	● 0,760	● 0,820	● 0,765	● 0,755	● 0,781	● 0,774	● 0,783	● 0,792	● 0,804	● 0,812	● 0,788	● 0,917	● 0,863	● 1,000										
PIC	● 0,860	● 0,893	● 0,827	● 0,865	● 0,830	● 0,824	● 0,862	● 0,836	● 0,852	● 0,909	● 0,906	● 0,895	● 0,889	● 0,820	● 0,788	● 0,837	● 1,000									
ARE	● 0,870	● 0,903	● 0,838	● 0,876	● 0,841	● 0,835	● 0,873	● 0,847	● 0,863	● 0,919	● 0,916	● 0,906	● 0,899	● 0,812	● 0,780	● 0,828	● 0,990	● 1,000								
BEN	● 0,849	● 0,883	● 0,816	● 0,854	● 0,819	● 0,812	● 0,852	● 0,826	● 0,860	● 0,899	● 0,895	● 0,885	● 0,878	● 0,788	● 0,755	● 0,804	● 0,970	● 0,980	● 1,000							
Z	● 0,816	● 0,815	● 0,760	● 0,800	● 0,765	● 0,755	● 0,781	● 0,774	● 0,763	● 0,792	● 0,784	● 0,792	● 0,808	● 0,875	● 0,800	● 0,894	● 0,837	● 0,828	● 0,804	● 1,000						
SEG	○ 0,881	● 0,912	● 0,868	● 0,849	● 0,926	● 0,904	● 0,919	● 0,929	● 0,854	● 0,893	● 0,926	● 0,935	● 0,909	● 0,863	● 0,812	● 0,800	● 0,865	● 0,876	● 0,854	● 0,820	● 1,000					
CAB	○ 0,765	● 0,766	● 0,768	● 0,768	● 0,792	● 0,742	● 0,769	● 0,781	● 0,813	● 0,781	● 0,812	● 0,820	● 0,796	● 0,884	● 0,851	● 0,860	● 0,742	● 0,755	● 0,750	● 0,817	● 0,828	● 1,000				
HOR	● 0,778	● 0,796	● 0,781	● 0,762	● 0,822	● 0,777	● 0,800	● 0,811	● 0,784	● 0,775	● 0,804	● 0,811	● 0,807	● 0,871	● 0,860	● 0,808	● 0,738	● 0,750	● 0,745	● 0,808	● 0,857	● 0,939	● 1,000			
COR	○ 0,771	● 0,789	● 0,774	● 0,792	● 0,815	● 0,750	● 0,793	● 0,804	● 0,757	● 0,786	● 0,815	● 0,822	● 0,836	● 0,863	● 0,812	● 0,800	● 0,769	● 0,781	● 0,757	● 0,780	● 0,849	● 0,869	● 0,914	● 1,000		
GRA	○ 0,729	● 0,713	● 0,731	● 0,753	● 0,737	● 0,747	● 0,714	● 0,727	● 0,733	● 0,707	● 0,737	● 0,745	● 0,763	● 0,764	● 0,727	● 0,759	● 0,747	● 0,761	● 0,756	● 0,759	● 0,796	● 0,814	● 0,848	● 0,860	● 1,000	



## 4.5. COMPARACION DE METODOS.

### 4.5.1. PCO. SUBCONJUNTO DE POBLACIONES COMUNES.

En el análisis de ordenamiento (PCO) de las poblaciones comunes a ambos tipos de datos, con los de tipo RAPD, las tres primeras coordenadas principales acumularon un porcentaje algo mayor que con los datos de naturaleza isozímica (Figuras 73 y 74).

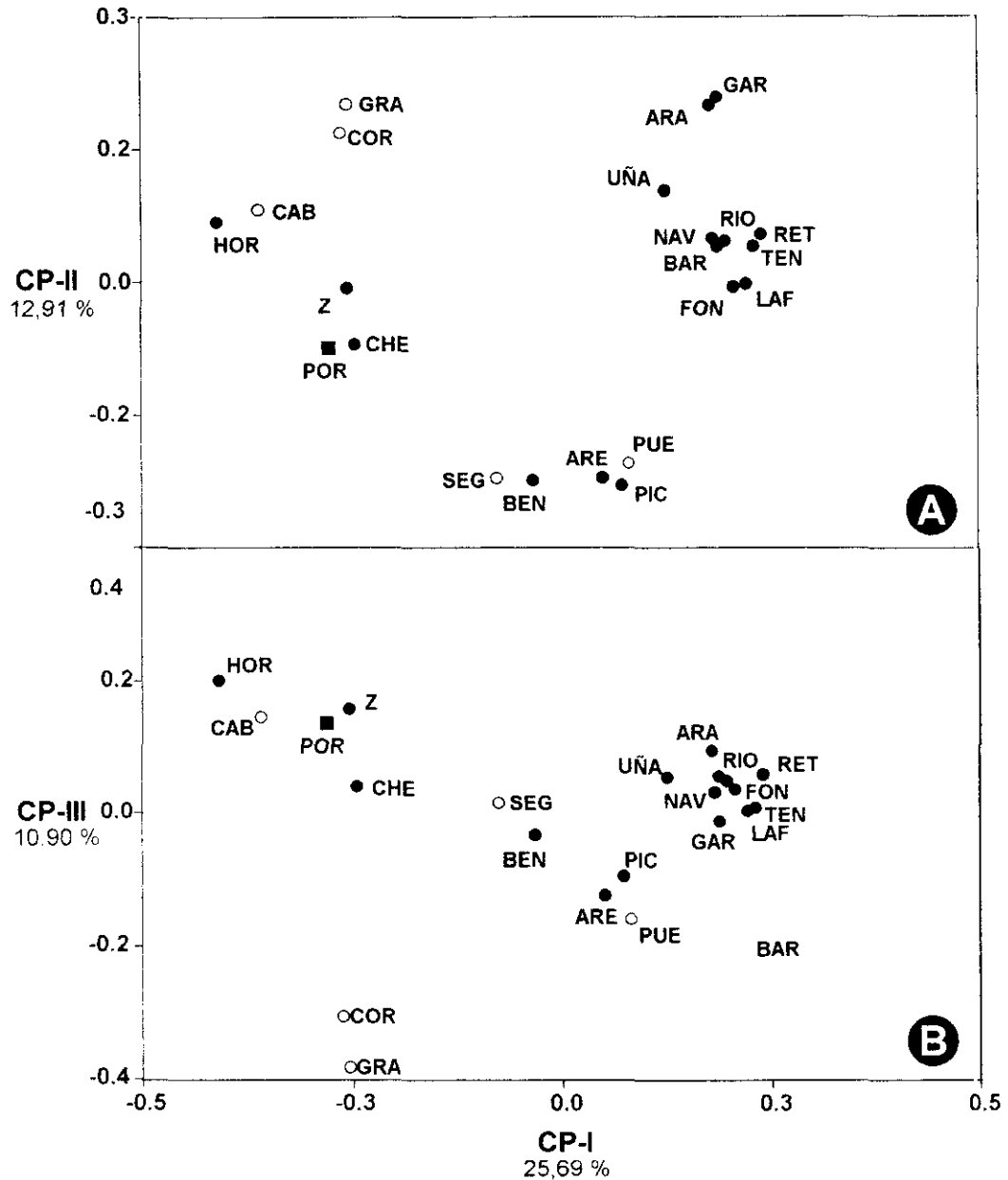
El ordenamiento producido por ambos tipos de datos difirió en varios subagrupamientos notables:

respecto a la primera coordenada principal, con los datos tipo RAPD, PUE (*C. atlantica*) se situó en uno de los dos subgrupos integrados por poblaciones de origen levantino (CHE, Z -subsp. *gallica*- y POR -subsp. *atlantica*-, Figura 74A), mientras que con los datos de naturaleza isozímica, esta población quedó dentro del otro subgrupo levantino, el formado por PIC, ARE y BEN (subsp. *gallica*), además de SEG (*C. atlantica*). Este último subgrupo, además, resultó menos compacto y homogéneo ya que se distribuyó en un intervalo centrado en el origen de la coordenada (Figura 73A). Respecto a la segunda coordenada, estos dos grupos quedaron netamente separados en el gráfico originado por los datos isoenzimáticos (Figura 73A) a diferencia de lo observado en el gráfico correspondiente al PCA basado en los RAPDs (Figura 74A). También respecto a esta coordenada principal, otro de los cambios detectados fue la nítida separación (Figura 73A) entre COR - GRA (*C. atlantica*) y HOR - COR (subsp. *gallica* y *C. atlantica*, respectivamente) que no se observó en el análisis de agrupamiento basado en los RAPDs (Figura 74A).

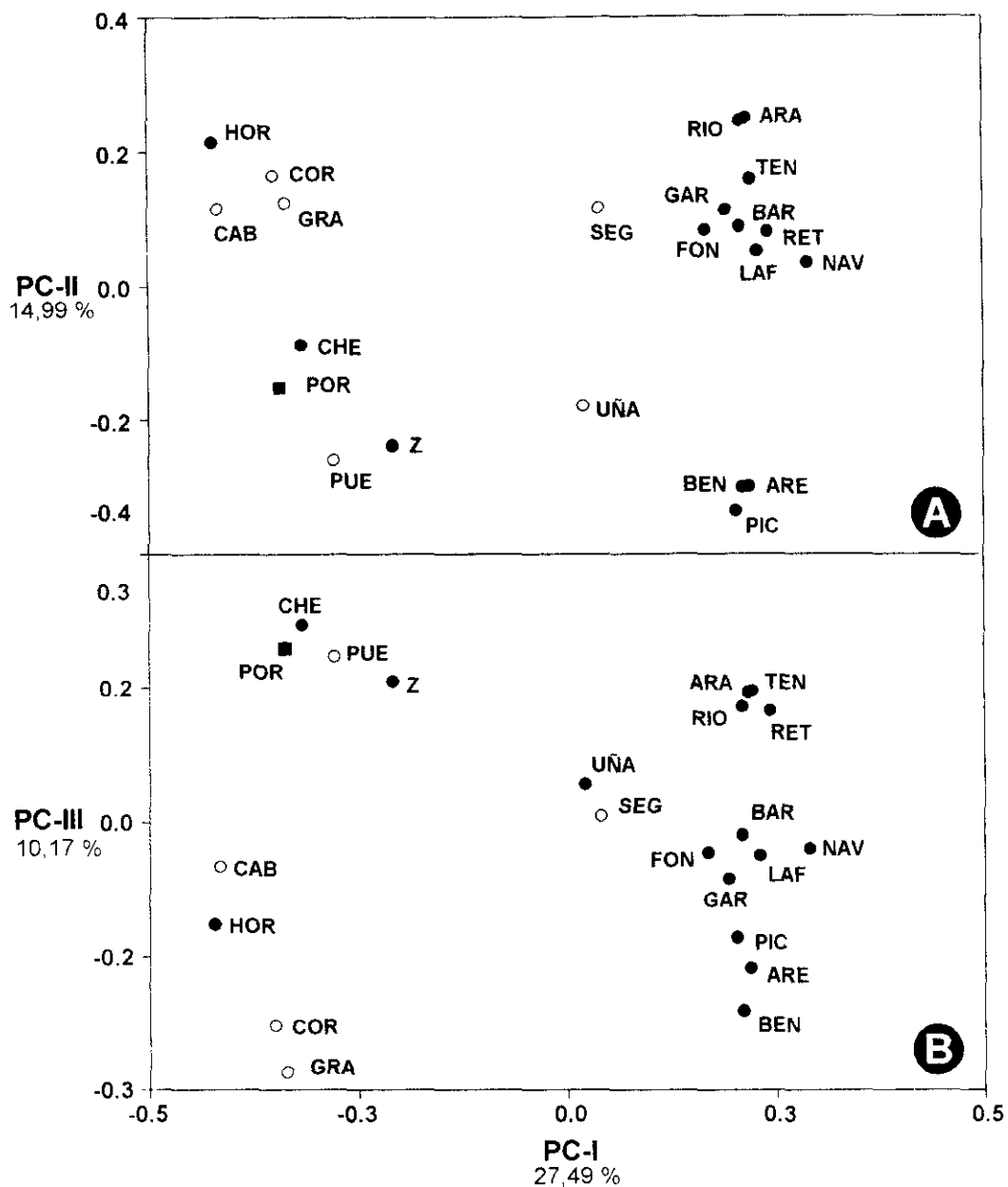
Otras diferencias detectadas fueron el intercambio de posiciones relativas de UÑA (*C. arborescens* subsp. *gallica*) y SEG (*C. atlantica*): UÑA pasó de situarse en las proximidades del grupo formado por las poblaciones procedentes del norte y centro peninsular (incluida FON) en la parte positiva de las dos primeras coordenadas principales del PCO basado en datos isozímicos (Figura 73A) a situarse en el intervalo negativo de la 2ª coordenada del PCO basado en los RAPDs (Figura 74A), muy alejada del grupo anteriormente citado. Por su parte, SEG recorrió el camino inverso (también en lo que respecta a la primera coordenada principal).

Respecto a la tercera coordenada principal, si bien hubo múltiples cambios de posiciones relativas de las poblaciones, en general éstas se distribuyeron a lo largo de toda la coordenada con ambos tipos de datos (Figuras 73B y 74B). No obstante, en el PCO basado en los sistemas isoenzimáticos, el esquema de agrupamientos resultó

más compacto y COR y GRA quedaron en el extremo negativo de la coordenada en una posición un tanto alejada del resto de las poblaciones (Figura 73A).



**Figura 73.** Ordenación por PCO de las poblaciones comunes al estudio realizado con RAPDs (isoenzimas, coeficiente J). **A:** respecto a la 1ª y 2ª coordenadas principales. **B:** respecto a la 1ª y 3ª coordenadas principales. Se indica el porcentaje de varianza explicado por cada coordenada. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.



**Figura 74.** Ordenación por PCO de las poblaciones comunes al estudio realizado con isoenzimas (RAPDs, coeficiente J). **A:** respecto a la 1ª y 2ª coordenadas principales. **B:** respecto a la 1ª y 3ª coordenadas principales. Se indica el porcentaje de varianza explicado por cada coordenada. ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

#### 4.5.2. ANALISIS DE AGRUPAMIENTO. SUBCONJUNTO DE POBLACIONES COMUNES.

En el análisis de agrupamiento realizado con el grupo de poblaciones comunes a ambos tipos de datos (isoenzimas y RAPDs), uno de los cambios más notables observados entre ambos dendrogramas fue el desplazamiento de PUE (*C. atlantica*) hacia el subagrupamiento formado por las poblaciones levantinas POR (subsp. *atlantica*) y CHE y Z (subsp. *gallica*) dentro de la rama **b** en el dendrograma basado en

los tipo RAPD (Figura 75B). También con este dendrograma, si exceptuamos a SEG (*C. atlantica*), las demás poblaciones de procedencia meridional (HOR - subsp. *gallica*- y CAB, COR, GRA -*C. atlantica*-) quedaron agrupadas en un solo subagrupamiento (COR y GRA formaron un subagrupamiento aislado en el dendrograma de los datos isoenzimáticos, Figura 75A).

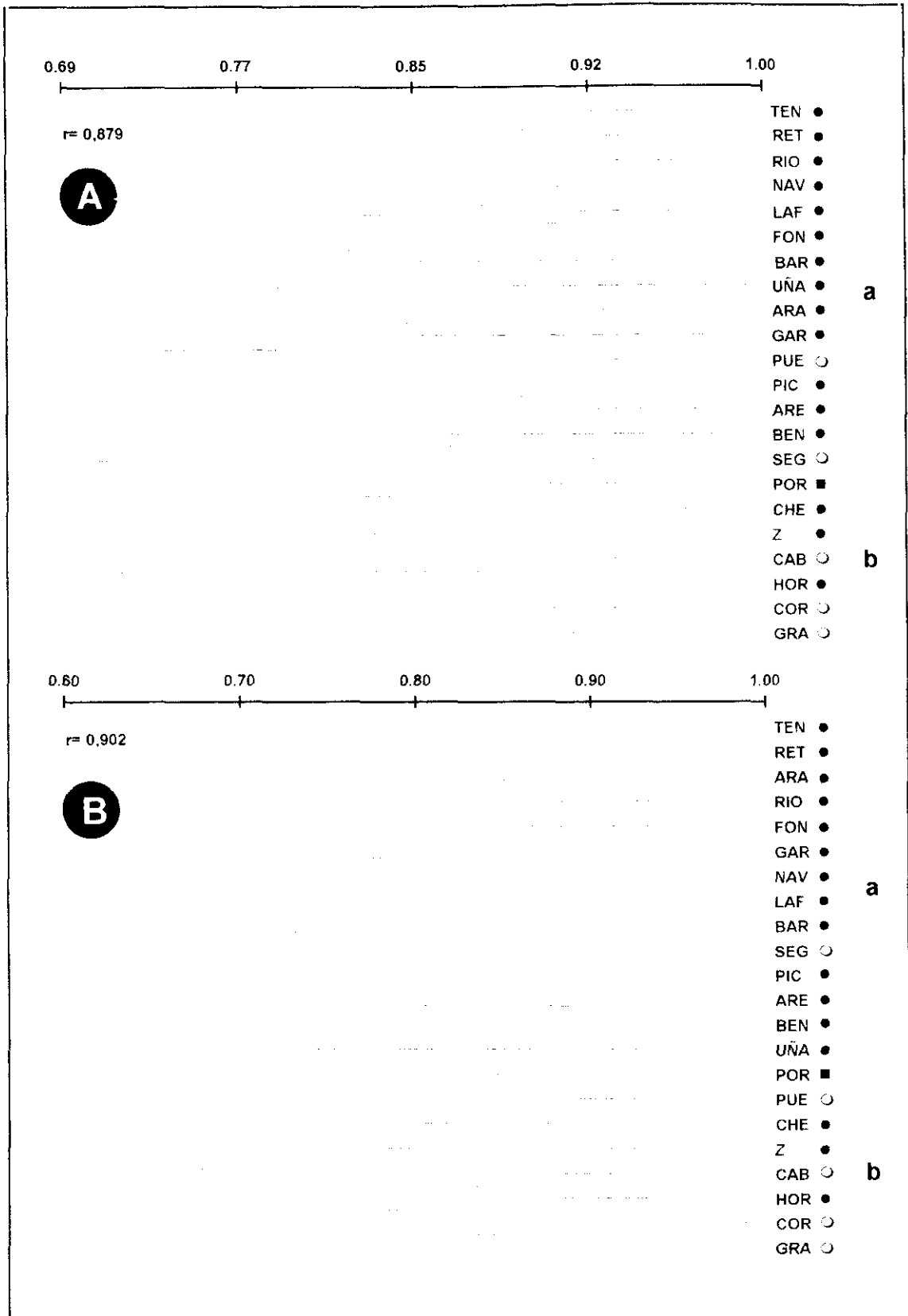
Otro de los cambios detectados fue que SEG (*C. atlantica*), unida a BEN y otro subagrupamiento formado por poblaciones de procedencia levantina (incluida PUE, otra población de *C. atlantica*), dejó de ser la población más disímil en la rama a (Figura 75A) para agruparse con poblaciones de procedencia pirenaica y, al mismo tiempo, UÑA pasó a ser la población más disímil dentro de esta rama (Figura 75B).

Con la excepción de un subagrupamiento muy homogéneo que incluyó a tres de las cuatro poblaciones procedentes del centro (TEN, RET y RIO -subsp. *gallica*- en la rama a, Figura 75A), el resto de alteraciones en las posiciones de las poblaciones hicieron que los subagrupamientos en el dendrograma basado en los RAPDs (Figura 75B) fueran incluso más homogéneos respecto de su origen geográfico:

las poblaciones procedentes del centro además de ARA y FON por un lado y, por el otro, GAR, NAV, LAF y BAR, todas procedentes del norte, además de los dos subagrupamientos, "levantino" y "meridional", de la rama b.

**Tabla 38.** Subconjunto de poblaciones comunes. Valores medios interpoblacionales de similitud de Jaccard (*J*) según taxón, procedencia geográfica y matriz de similitud empleada (isoenzimas, RAPDs y conjunta).\*: intervalo de variación (mínimo-máximo). \*: comparación respecto a las muestras de *C. arborescens* subsp. *gallica*; \*\*: comparación respecto a las muestras de *C. atlantica*; total: valor medio de similitud para el conjunto de poblaciones de cada taxón.

TAXON	ORIGEN	MUESTRAS	ISOENZIMAS 0,658 - 0,962 <sup>z</sup>	RAPDs 0,585 - 0,981 <sup>z</sup>	CONJUNTA 0,654 - 0,954 <sup>z</sup>
<i>C. arborescens</i> subsp. <i>gallica</i>	centro	TEN, RET, UÑA	0,902	0,783	0,858
	norte	ARA, GAR, NAV, LAF, BAR	0,857	0,885	0,867
	levante	FON, CHE, PIC, ARE, BEN, Z	0,830	0,751	0,802
	sur	HOR	0,722* / 0,773**	0,650* / 0,810**	0,696* / 0,783**
			total = 0,820	total = 0,754	total = 0,796
<i>C. atlantica</i>	levante	POR	0,781* / 0,785**	0,696* / 0,773**	0,751* / 0,781**
	sur	SEG, CAB, COR	0,775	0,738	0,762
		total = 0,778	total = 0,754	total = 0,768	



**Figura 75.** Análisis de agrupamiento (coeficiente J). Poblaciones comunes. **A:** isoenzimas (reescalado); **B:** RAPDs.  $r =$  correlación cofenética. Las letras minúsculas nombran los subgrupos mencionados en el texto.  
 ●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

### 4.5.3. COMPONENTES PRINCIPALES. SUBCONJUNTO DE POBLACIONES COMUNES.

El PCA relativo al subconjunto de poblaciones comunes permitió detectar 45 isoformas (Tabla 39) que resultaron discriminantes según el criterio de Heun *et al.* (1994). Todos los sistemas isoenzimáticos empleados contaron con al menos una banda discriminante. El rango fue desde la única banda de SKD hasta las 10 de EST (Tabla 41). El porcentaje de isoformas discriminantes también fue amplio, pero nunca sobrepasó el 50 % respecto al total de bandas visualizadas para cada sistema isoenzimático. EST fue el sistema con un mayor número de isoformas discriminantes (al igual que en lo concerniente a bandas polimórficas). Tanto GDH como GOT tuvieron tantas bandas discriminantes como polimórficas. También fue destacable el bajo porcentaje de bandas discriminantes (respecto a las correspondientes polimórficas) en el caso de SKD y ME (Tabla 39). En resumen, las isoformas discriminantes fueron el 32,14 % y 55,56 % de las bandas totales y de las polimórficas, respectivamente.

**Tabla 39.** Comparación de métodos (isoenzimas y RAPDs). **n**: número total de bandas detectadas; **P**: número de bandas polimórficas; **D**: número de bandas discriminantes; **p**: número de perfiles de bandas (entre paréntesis se indica el número de los compartidos por más de una población). Para los valores de %, se indica entre paréntesis el parámetro sobre el que se calcula.

Sistema	ISOENZIMAS					RAPDs				
	n	P	D	p	primer	n	P	D	p	
ADH	9	4	3	7(5)	OP#3	5	3	2	5(4)	
SKD	8	4	1	5(3)	OP#5	5	2	2	4(4)	
ME	18	11	4	12(3)	OP#7	10	10	6	14(4)	
PGD	9	8	4	16(4)	OP#8	6	-	-	1(1)	
G6PDH	16	7	5	11(9)	OP#12	9	7	4	9(6)	
GDH	6	3	3	5(5)	OP#13	8	3	1	5(5)	
SOD	18	8	7	8(5)	OP#15	7	4	3	6(4)	
GOT	8	4	4	6(4)	OP#19	12	10	5	10(5)	
AP	23	9	4	15(4)	OP#20	12	9	6	11(4)	
EST	24	21	10	17(2)						
<b>Total</b>	140	79	45	102(44)		74	48	29	65(37)	
%P(n)			56,4					65		
%D(n)			32					39		
%D((P)			57					60		
<b>Correlación producto-momento de Pearson = 0,63</b>										

Con los RAPDs, el PCA reveló 29 bandas discriminantes que fueron generadas por todos los *primers* empleados a excepción de OP#8 (que resultó monomórfico para todas las poblaciones), desde la única de OP#13 a las seis de

OP#7 y OP#20 (Tabla 40). En este caso, el porcentaje de bandas discriminantes sí sobrepasó el 50 % del total de RAPDs generados por cada *primer* en algún caso (OP#7). Los *primers* que más contribuyeron al ordenamiento (> 50 % de los RAPDs discriminantes) fueron OP#7, OP#19 y OP#20, aquellos que más bandas polimórficas y perfiles generaron. No obstante, fue destacable que tanto OP#3 como OP#5 mostrasen unos porcentaje elevados de bandas discriminantes respecto al número de polimórficas por ellas generadas (el 66 % y el 100 %, respectivamente) (Tabla 39). En conjunto, los RAPDs discriminantes fueron el 39,19 % y 60,42 % de las bandas totales y de las polimórficas, respectivamente.

El porcentaje de varianza explicada por el primer componente principal con los datos isoenzimáticos fue un poco inferior al obtenido con los RAPDs (28,03 % y 30,19 %, respectivamente).

**Tabla 40.** Coeficientes al primer autovector (PC-1) de los RAPDs generados por los primers empleados. Se nombran como el *primer* (en negrita) seguido del tamaño del fragmento (en bp).

	PC-1		PC-1		PC-1
<b>OP#3</b> 1200	0,000	<b>OP#12</b> 1600	-0,064	<b>OP#19</b> 2000	-0,174
<b>OP#3</b> 1100	0,071	<b>OP#12</b> 1500	-0,379	<b>OP#19</b> 1600	-0,232
<b>OP#3</b> 1000	0,000	<b>OP#12</b> 1350	-0,192	<b>OP#19</b> 1500	0,101
<b>OP#3</b> 890	-0,262	<b>OP#12</b> 1250	0,000	<b>OP#19</b> 1400	0,260
<b>OP#3</b> 800	-0,210	<b>OP#12</b> 1050	0,000	<b>OP#19</b> 1250	0,005
<b>OP#5</b> 1200	0,000	<b>OP#12</b> 930	0,009	<b>OP#19</b> 1150	-0,102
<b>OP#5</b> 1100	0,000	<b>OP#12</b> 890	-0,162	<b>OP#19</b> 1050	-0,462
<b>OP#5</b> 980	-0,171	<b>OP#12</b> 820	0,282	<b>OP#19</b> 1000	0,224
<b>OP#5</b> 820	-0,348	<b>OP#12</b> 790	-0,041	<b>OP#19</b> 900	0,000
<b>OP#5</b> 730	0,000	<b>OP#13</b> 1700	0,000	<b>OP#19</b> 800	0,000
<b>OP#7</b> 1450	0,086	<b>OP#13</b> 1500	0,000	<b>OP#19</b> 700	0,066
<b>OP#7</b> 1350	-0,166	<b>OP#13</b> 1300	0,063	<b>OP#19</b> 650	-0,066
<b>OP#7</b> 1270	-0,064	<b>OP#13</b> 1070	0,000	<b>OP#20</b> 1500	0,000
<b>OP#7</b> 1100	-0,092	<b>OP#13</b> 970	0,000	<b>OP#20</b> 1300	-0,352
<b>OP#7</b> 1050	0,215	<b>OP#13</b> 880	-0,362	<b>OP#20</b> 1250	0,417
<b>OP#7</b> 950	0,174	<b>OP#13</b> 800	-0,036	<b>OP#20</b> 1100	0,000
<b>OP#7</b> 820	-0,235	<b>OP#13</b> 700	0,000	<b>OP#20</b> 1000	0,033
<b>OP#7</b> 780	0,473	<b>OP#15</b> 2100	-0,204	<b>OP#20</b> 900	-0,104
<b>OP#7</b> 700	0,069	<b>OP#15</b> 1450	0,000	<b>OP#20</b> 800	-0,001
<b>OP#7</b> 570	-0,278	<b>OP#15</b> 1300	-0,120	<b>OP#20</b> 730	0,397
<b>OP#8</b> 2000	0,000	<b>OP#15</b> 1250	0,000	<b>OP#20</b> 700	-0,254
<b>OP#8</b> 1700	0,000	<b>OP#15</b> 1100	0,035	<b>OP#20</b> 600	0,001
<b>OP#8</b> 1350	0,000	<b>OP#15</b> 980	-0,432	<b>OP#20</b> 580	0,000
<b>OP#8</b> 1180	0,000	<b>OP#15</b> 800	0,000	<b>OP#20</b> 450	-0,338
<b>OP#8</b> 990	0,000				
<b>OP#8</b> 930	0,000				

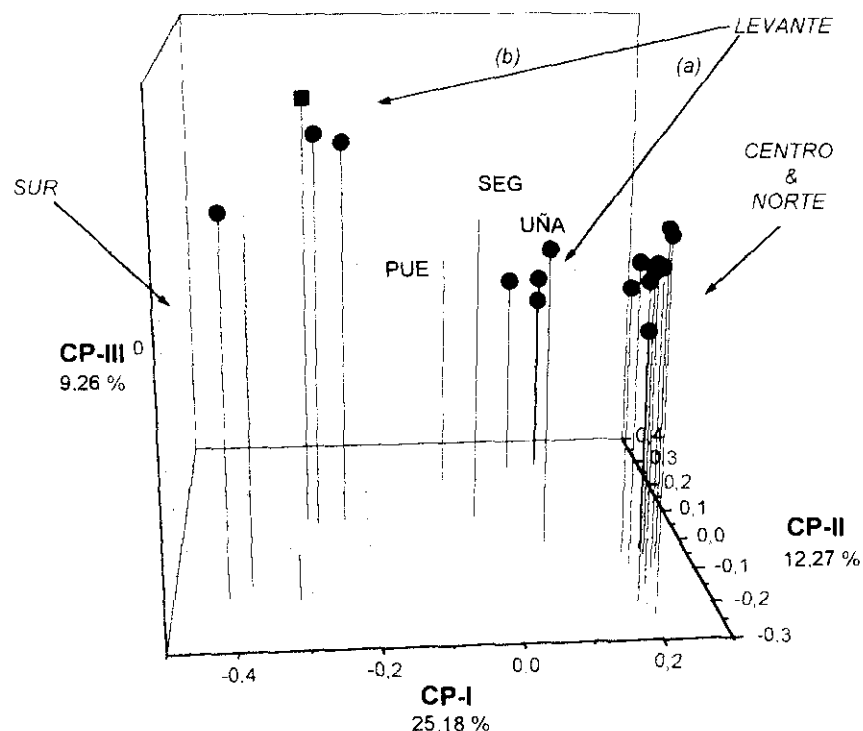
**Tabla 41.** Coeficientes al primer autovector de las isoformas visualizadas (se numeran de acuerdo a su movilidad relativa respecto del cátodo).

	PC-1		PC-1		PC-1
ADH1	0.103	G6PDH1	0.000	AP1	0.000
ADH2	0.029	G6PDH2	0.000	AP2	0.014
ADH3	-0.309	G6PDH3	-0.422	AP3	0.000
ADH4	0.000	G6PDH4	-0.422	AP4	0.000
ADH5	0.000	G6PDH5	-0.274	AP5	0.000
ADH6	0.000	G6PDH6	-0.101	AP6	0.000
ADH7	0.000	G6PDH7	-0.041	AP7	0.113
ADH8	0.000	G6PDH8	0.000	AP8	-0.039
ADH9	0.291	G6PDH9	0.041	AP9	0.000
SKD1	0.058	G6PDH10	0.000	AP10	0.000
SKD2	0.040	G6PDH11	-0.112	AP11	0.000
SKD3	0.040	G6PDH12	0.000	AP12	0.000
SKD4	0.000	G6PDH13	0.000	AP13	0.000
SKD5	-0.148	G6PDH14	0.000	AP14	-0.083
SKD6	0.000	G6PDH15	0.000	AP15	0.083
SKD7	0.000	G6PDH16	0.000	AP16	0.000
SKD8	0.000	GDH1	0.000	AP17	0.213
ME1	0.000	GDH2	-0.228	AP18	0.134
ME2	0.000	GDH3	0.000	AP19	-0.213
ME3	0.046	GDH4	0.000	AP20	0.000
ME4	0.000	GDH5	0.288	AP21	0.000
ME5	0.000	GDH6	0.222	AP22	0.000
ME6	0.083	SOD1	0.000	AP23	-0.057
ME7	0.092	SOD2	0.000	EST1	0.132
ME8	0.041	SOD3	0.000	EST2	-0.016
ME9	0.041	SOD4	-0.128	EST3	-0.016
ME10	-0.051	SOD5	-0.275	EST4	-0.016
ME11	-0.029	SOD6	0.000	EST5	-0.054
ME12	0.330	SOD7	0.000	EST6	-0.079
ME13	0.200	SOD8	0.439	EST7	-0.120
ME14	0.000	SOD9	0.000	EST8	0.026
ME15	-0.277	SOD10	0.326	EST9	0.001
ME16	-0.113	SOD11	0.439	EST10	0.056
ME17	0.000	SOD12	0.439	EST11	0.000
ME18	0.000	SOD13	0.000	EST12	-0.056
PGD1	0.240	SOD14	0.221	EST13	-0.277
PGD2	0.002	SOD15	0.000	EST14	0.000
PGD3	0.172	SOD16	0.000	EST15	0.000
PGD4	0.000	SOD17	0.000	EST16	0.217
PGD5	-0.364	SOD18	0.000	EST17	0.046
PGD6	0.078	SOD19	0.007	EST18	-0.278
PGD7	0.110	GOT1	-0.422	EST19	-0.143
PGD8	-0.083	GOT2	-0.339	EST20	-0.138
PGD9	-0.012	GOT3	0.000	EST21	-0.265
		GOT4	0.000	EST22	-0.196
		GOT5	0.221	EST23	-0.186
		GOT6	0.221	EST24	-0.029
		GOT7	0.000		
		GOT8	0.000		



#### 4.6. ANALISIS MULTIVARIANTE CONJUNTO.

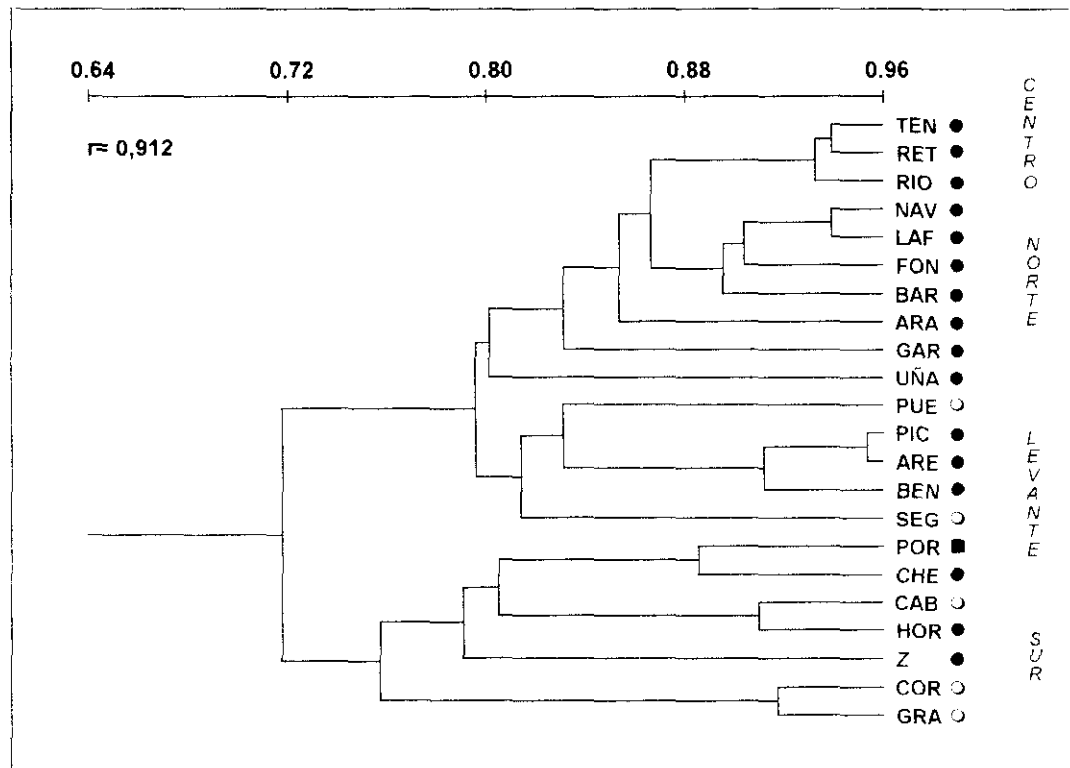
El PCO basado en la matriz conjunta de los caracteres moleculares correspondiente a las 22 poblaciones comunes a ambos tipos de técnicas (isoenzimas y RAPD) reflejó la misma topología general vista en el apartado anterior (Figuras 73 y 74). Así, el PCO separó las poblaciones en cuatro grupos bien definidos y bastante homogéneos en lo que respecta a la procedencia geográfica de sus integrantes (Figura 76). Respecto a la primera coordenada principal, las poblaciones del Centro y norte junto con el subgrupo levantino (a) se situaron en la parte positiva de la coordenada mientras que el subgrupo levantino (b) y las poblaciones procedentes del Sur quedaban en la negativa (Figura 76). Por su parte, la segunda coordenada principal incluyó en su parte positiva a las poblaciones procedentes de Levante y en la negativa a las procedentes del norte, Centro y Sur (Figura 76). La tercera coordenada principal sólo separó a COR y GRA, dos poblaciones de *C. atlantica* del grupo Sur, del resto de poblaciones; ésto motivó una merma en la consistencia de dicho grupo (Figura 76).



**Figura 76.** Análisis de Coordenadas Principales (matriz conjunta, poblaciones comunes a isoenzimas y RAPDs). Se indica el % de la varianza explicada por cada coordenada. CENTRO & NORTE: TEN, RET, RIO, ARA, GAR, NAV, LAF, BAR y FON; LEVANTE (a): BEN, ARE y PIC; LEVANTE (b): POR, CHE y Z; SUR: CAB, HOR, COR y GRA.

●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

La topología del dendrograma correspondiente al análisis de agrupamiento basado en la matriz conjunta tampoco difirió en lo substancial de lo mostrado en las Figuras 75A y 75B. De la misma forma que con el PCO, se observaron dos subagrupamientos principales que incluyeron uno a las poblaciones procedentes del centro y norte además de un subconjunto de poblaciones levantinas y el otro, al resto de poblaciones originarias de Levante y a aquellas procedentes del Sur (Figura 77).



**Figura 77.** Análisis de Agrupamiento (matriz conjunta, poblaciones comunes a isoenzimas y RAPDs).  $r$  = correlación cofenética.

●: *C. arborescens* subsp. *gallica*; ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*; ○: *C. atlantica*.

**Tabla 42.** Valores de similitud interpoblacional (subset de poblaciones comunes, matriz de isoenzimas, coeficiente J). En los recuadros se agrupan las poblaciones por procedencia. ■: *C. arborescens* subsp. *atlantica*.

	C. arborescens subsp. gallica													■	C. atlantica								
	centro				norte					levante						sur							
	TEN	RET	UÑA	RIO	ARA	GAR	NAV	LAF	BAR	FON	CHE	PIC	ARE	BEN	ZAN	HOR	POR	SEG	CAB	COR	GRA	PUE	
TEN	1,000																						
RET	0,952	1,000																					
UÑA	0,881	0,873	1,000																				
RIO	0,952	0,962	0,890	1,000																			
ARA	0,855	0,847	0,832	0,847	1,000																		
GAR	0,858	0,850	0,818	0,850	0,877	1,000																	
NAV	0,907	0,899	0,833	0,917	0,841	0,844	1,000																
LAF	0,924	0,897	0,847	0,915	0,838	0,841	0,943	1,000															
BAR	0,861	0,836	0,805	0,836	0,829	0,798	0,864	0,896	1,000														
FON	0,914	0,906	0,855	0,906	0,829	0,849	0,916	0,951	0,923	1,000													
CHE	0,784	0,761	0,763	0,777	0,739	0,739	0,788	0,768	0,743	0,775	1,000												
PIC	0,858	0,850	0,818	0,868	0,777	0,761	0,844	0,876	0,815	0,867	0,804	1,000											
ARE	0,858	0,833	0,802	0,850	0,761	0,778	0,844	0,876	0,815	0,867	0,821	0,939	1,000										
BEN	0,832	0,807	0,793	0,824	0,768	0,752	0,818	0,849	0,806	0,857	0,811	0,891	0,891	1,000									
Z	0,763	0,772	0,759	0,804	0,735	0,690	0,783	0,763	0,724	0,754	0,824	0,782	0,766	0,806	1,000								
HOR	0,701	0,695	0,712	0,724	0,675	0,658	0,706	0,701	0,692	0,722	0,822	0,717	0,717	0,755	0,833	1,000							
POR	0,765	0,744	0,746	0,759	0,723	0,722	0,784	0,765	0,741	0,772	0,913	0,784	0,800	0,807	0,836	0,835	1,000						
SEG	0,792	0,785	0,771	0,819	0,745	0,745	0,796	0,810	0,766	0,817	0,824	0,850	0,850	0,897	0,800	0,748	0,819	1,000					
CAB	0,733	0,726	0,759	0,757	0,706	0,704	0,737	0,733	0,709	0,754	0,807	0,750	0,750	0,789	0,852	0,922	0,836	0,766	1,000				
COR	0,744	0,723	0,739	0,752	0,717	0,746	0,763	0,759	0,720	0,750	0,802	0,761	0,777	0,768	0,765	0,779	0,767	0,745	0,813	1,000			
GRA	0,735	0,700	0,717	0,729	0,680	0,707	0,725	0,720	0,683	0,712	0,761	0,722	0,737	0,728	0,741	0,724	0,729	0,705	0,757	0,916	1,000		

**Tabla 43.** Valores de similitud interpoblacional (subconjunto de poblaciones comunes, matriz de RAPDs, coeficiente J). En los recuadros se agrupan las poblaciones por procedencia. ■ *C. arborescens* subsp. *atlantica*.

	<i>C. arborescens</i> subsp. <i>gallica</i>										■ <i>C. arborescens</i> subsp. <i>atlantica</i>											
	centro			RIO	norte				levante				sur	POR	sur			GRA	PUE			
TEN	RET	UÑA	ARA		GAR	NAV	LAF	BAR	FON	CHE	PIC	ARE	BEN		ZAN	HOR	SEG			CAB	COR	
TEN	1,000																					
RET	0,918	1,000																				
UÑA	0,677	0,754	1,000																			
RIO	0,912	0,869	0,683	1,000																		
ARA	0,885	0,905	0,723	0,867	1,000																	
GAR	0,767	0,734	0,661	0,807	0,787	1,000																
NAV	0,825	0,875	0,723	0,778	0,873	0,847	1,000															
LAF	0,790	0,841	0,770	0,800	0,869	0,875	0,932	1,000														
BAR	0,790	0,813	0,742	0,770	0,900	0,875	0,932	0,964	1,000													
FON	0,852	0,903	0,746	0,803	0,841	0,754	0,871	0,836	0,806	1,000												
CHE	0,625	0,652	0,683	0,603	0,646	0,607	0,621	0,661	0,641	1,000												
PIC	0,754	0,806	0,763	0,705	0,719	0,741	0,833	0,828	0,797	0,800	0,650	1,000										
ARE	0,770	0,823	0,780	0,721	0,734	0,759	0,850	0,845	0,814	0,817	0,639	0,981	1,000									
BEN	0,738	0,790	0,746	0,689	0,703	0,754	0,817	0,810	0,780	0,783	0,607	0,942	0,962	1,000								
Z	0,689	0,688	0,667	0,613	0,631	0,617	0,656	0,645	0,645	0,677	0,667	0,719	0,707	0,672	1,000							
HOR	0,636	0,662	0,615	0,641	0,682	0,645	0,632	0,672	0,672	0,677	0,754	0,585	0,600	0,594	0,678	1,000						
POR	0,641	0,692	0,729	0,619	0,688	0,597	0,662	0,705	0,705	0,683	0,830	0,695	0,683	0,650	0,778	0,772	1,000					
SEG	0,787	0,839	0,738	0,767	0,867	0,746	0,806	0,862	0,862	0,833	0,712	0,763	0,780	0,746	0,695	0,750	0,759	1,000				
CAB	0,619	0,621	0,623	0,623	0,641	0,684	0,641	0,683	0,683	0,661	0,741	0,590	0,607	0,600	0,691	0,885	0,792	0,707	1,000			
COR	0,627	0,652	0,656	0,631	0,672	0,609	0,647	0,688	0,688	0,719	0,683	0,625	0,641	0,609	0,639	0,842	0,759	0,738	0,768	1,000		
GRA	0,698	0,660	0,667	0,674	0,660	0,667	0,652	0,667	0,667	0,744	0,659	0,674	0,698	0,690	0,700	0,895	0,707	0,762	0,833	0,921	1,000	
PUE	0,661	0,662	0,695	0,613	0,631	0,644	0,656	0,672	0,672	0,651	0,759	0,719	0,707	0,672	0,808	0,678	0,846	0,667	0,755	0,667	0,718	1,000



## ***DISCUSSION***

## 5. DISCUSION.

### 5.1. DISTRIBUCION.

El monografista ya advirtió que contó con escasos materiales procedentes de la Península. El desarrollo de los diferentes departamentos e instituciones botánicas peninsulares, un tanto posteriores a la fecha de publicación de la monografía, junto con la intensificación de los trabajos de colecta de pliegos ha permitido establecer más precisamente el área de distribución de *Colutea* L. en la Península.

Aunque en su revisión del género Browicz (1963) no cita *C. arborescens* L. subsp. *arborescens* de la Península Ibérica, se encontró un puñado de referencias, trece en total de las que siete fueron bibliográficas. Se distribuyeron de forma dispersa sin llegar nunca a tierras andaluzas (Figura 5). Aún dudando de su adscripción a este taxón, optamos por mantener la determinación de los seis pliegos vistos. Varios autores (Bolòs & Vigo, 1984 y Nebot *et al.*, 1990) han expresado sus dudas a cerca de la determinación de las poblaciones del sur valenciano, Alicante y territorios limítrofes como algo distinto a *C. arborescens* L. subsp. *atlantica* (Browicz) O.Bolòs et Vigo, por lo que nuestras dudas se reafirmaron, sobre todo para las citas encontradas para las provincias de Alicante y Murcia.

Según Browicz (1963) *C. arborescens* L. subsp. *gallica* Browicz quedaría circunscrita al cuadrante NE de la Península, especialmente a lo largo de las cordilleras costero - catalanas y alrededor de la depresión del Ebro; también indicó una cita de la S<sup>a</sup> de Cuenca. Tras la revisión, la localización de este taxón en el antedicho cuadrante fue mucho más numerosa, destacando el número de localidades pirenaicas y prepirenaicas además de las procedentes del centro y levante. También resultó destacable el número de localidades procedentes del Sistema Ibérico turolense, tan en contacto con las sierras interiores levantinas. El areal se expandió hacia el sur con las localidades procedentes de las sierras cordobesas y jiennenses, además de las originarias de la sierras gaditanas (Figura 7).

Una gran cantidad de pliegos sólo estaban determinados a nivel de especie, situación que se repitió para un gran número de citas bibliográficas. La gran mayoría de éstas se refirieron a las provincias de Barcelona, Huesca, Tarragona y Valencia (Figura 8). Por lo observado en los pliegos revisados procedentes de estas provincias sospechamos que estas citas bibliográficas se refieren en realidad a *C. arborescens* L. subsp. *gallica* Browicz, al menos en las tres primeras provincias mencionadas. A pesar de ésto, el área de distribución de este taxón sólo se ampliaría a una mayor ocupación de los territorios catalanes, fundamentalmente en lo que se refiere a Barcelona y

Tarragona. Por otro lado, hay que poner en duda las citas bibliográficas procedentes de las sierras salmantinas ya que Fernández Díez (1974) que las cita de otro autor (Hoyos de Onís) no consiguió confirmarlas.

El relativamente reciente cambio del status taxonómico de *C. atlantica* Browicz como subespecie de *C. arborescens* L. propuesto por Bolòs & Vigo (1974) y la aún más reciente publicación de la *Flora dels Països Catalans* (1984) a cargo de estos mismos autores resultaron en un número relativamente bajo de referencias de *C. arborescens* subsp. *atlantica*. Fue destacable el número de citas referidas al centro peninsular (Madrid y Toledo), fruto de la revisión de los pliegos depositados en el herbario MAF (Figura 6). Por otro lado, las citas segovianas son consideradas como "una introgresión en la cuenca del Duero de esta planta, extendida fundamentalmente por el este de la Península" por Romero & Rico (1989).

Para *C. atlantica* Browicz indicó una distribución eminentemente meridional (S<sup>a</sup> Nevada, Ronda - Grazalema y sendas citas de Jaén y Almería) de la que sólo se mantuvieron al margen algunas localidades del centro (Alcalá de Henares y Aranjuez) y levante (Segorbe). Después de la revisión tanto de testimonios de herbario como de la bibliografía, el núcleo más numeroso de localidades siguió estando en el sur, centrado en las sierras béticas y subbéticas (las referencias gaditanas fueron de naturaleza bibliográfica) con un límite occidental situado al sur de Badajoz. El límite nororiental de este núcleo quedó en la sierras interiores de Murcia. Las citas previas en el centro y levante aumentaron su número, especialmente en las sierras valencianas y las turolenses colindantes. El límite septentrional apareció en la depresión del Ebro ya que no se encontraron citas al sur de este río. Las localidades palentinas y vallisoletanas ampliaron el área de distribución hacia occidente (Figura 9). En Andalucía, el límite oriental se ampliaría más allá de la sierra de Gádor si las referencias bibliográficas sub *C. arborescens* L. de Sagredo (1987) correspondiesen a este taxón.

Después de la revisión bibliográfica y de los pliegos de herbario, comprobamos que el área levantina se destacó por un número elevado de citas pertenecientes a los taxones estudiados. Esta alta diversidad puede relacionarse con las vías migratorias propuestas por Browicz (1963) para el género *Colutea* L. El área levantina tendría un carácter de encrucijada en la expansión de *Colutea* por la Península, entre los tercios norte y sur a través del Sistema Ibérico, que sería la vía de migración hacia la meseta (recordar aquí las introgresiones en cuenca del Duero) y hacia las sierras prebéticas y subbéticas).



En los textos se habla del carácter submediterráneo (Costa Tenorio, 1978) o latesubmediterráneo (Bolòs & Vigo, 1984, Ninot *et al.*, 1993) de *Colutea* y, si bien ésto se ha verificado para algunas poblaciones, en otras, en cambio, este carácter no se comprueba: bajo hayedos en el Pirineo, a elevadas altitudes, carrascales claramente mesomediterráneos, etc. Pareciera que sólo el factor edáfico jugase el papel primordial en la distribución de la planta: a excepción de muy pocas localidades como los riberos arenosos del Tajo mencionados por Egido Pérez (1984) o los rodénos de Villafamés y del Desierto de las Palmas (Castellón) citados en sendos pliegos de Mateo (VAB820812 y VAB841802, respectivamente) tanto los pliegos como las referencias bibliográficas siempre localizaron *Colutea* sobre suelos básicos o, al menos, basificados. Este carácter basófilo del género en la Península ya fue apuntado por el monografista.

Abundando en la escasez de la planta, apuntada por numerosos autores (ocasional para Romero & Rico, 1989; ni rara ni abundante para Mateo, 1990; escasa para Alcaraz, 1984; otra vez escasa para Ninot *et al.*, 1993; rara para Molero-Mesa & Pérez-Raya, 1987; etc.), durante los viajes de recolección, salvo en la Font Rotja (Alicante), Aragüés del Puerto (Huesca) y Espejo (Córdoba), las poblaciones de *Colutea* se presentaron con escasos y muy dispersos ejemplares. Esto dificultó en muchas ocasiones las labores de recolección de las semillas requeridas para el análisis de isoenzimas y RAPDs.

## 5.2. CARACTERES MORFOLOGICOS.

Para el establecimiento de las relaciones o afinidades entre entidades a clasificar (individuos, poblaciones), sería deseable contar con material vivo cultivado en condiciones estándar con objeto de asegurar que la variabilidad no está siendo influida por el ambiente. Cuando se trabaja con pliegos de herbario es claro que este material presenta un fenotipo que ha sido, de alguna forma, modelado por el entorno particular en el que vivía la planta. El que en nuestro trabajo no se plantease el establecimiento de una colección viva que representase el rango de poblaciones empleado por los estudios moleculares (isoenzimas y RAPDs) y que sirviera también para el análisis morfológico se debió, fundamentalmente, a lo temporalmente extenso (2-3 años) del periodo de desarrollo de las coluteas (son arbustos) y a lo limitado del tiempo disponible para realizar el estudio.

Como ya apuntamos al comentar la distribución de los taxones en la Península Ibérica, Browicz (1963) no dispuso de un elevado número de testimonios de herbario procedentes de la Península. Sólo tuvo a su disposición media docena de pliegos para la descripción de la subsp. *gallica* mientras que para describir *C. atlantica* revisó una quincena de pliegos. En el presente trabajo, a pesar de no haber podido disponer de las, sin duda, importantes colecciones de los herbarios COI y MA, creemos que el número de pliegos empleados (no muy extenso) y la amplitud geográfica examinada si han resultado suficientes.

En la Tabla 2 se exponen, de forma resumida, las descripciones de ambos taxones (la descripción de *C. arborescens* subsp. *gallica* es, básicamente, la correspondiente a la subespecie típica, con lo que sólo se indican aquellos caracteres que le son propios, tal y como fue descrita por el monografista). Esta es la Tabla que en este apartado se cita mayoritariamente. Las descripciones de estos taxones adolecen, a nuestro juicio, de una excesiva ambigüedad que, en la práctica, conducen en numerosas ocasiones a determinaciones difíciles cuando no dudosas, al menos para los individuos peninsulares. A continuación pasaremos a confrontar las descripciones aportadas por Browicz y a compararlas con nuestros resultados <sup>5</sup>.

- **Tallos.** El único carácter diferenciador entre *C. atlantica* y *C. arborescens* subsp. *gallica* sería el que el primero de los taxones porta indumento en tallos de 2º año mientras que el segundo presentaría estos tallos descortezados y glabros. Este fue uno de los caracteres que Browicz destacó como diferenciador entre ambos taxones en la síntesis del género *Colutea* L. en *Flora Europæa* (Tutin et al., 1969 -

<sup>5</sup> Siempre que citemos a Browicz, estaremos haciendo referencia a lo expuesto en la Tabla 2.

1980) de la que también fue autor. Lo que comprobamos en ocasiones, si bien en menor grado, es que los tallos de 2º año de *C. atlantica* también mostraban un descortezamiento en finas tiras (lo que se traduce en la pérdida de la práctica totalidad del indumento); por otro lado, la situación era la inversa para *C. arborescens subsp. gallica*: a veces la corteza de los tallos de 2º año permanecía íntegra. También se pudo comprobar la existencia de algunos pelos portados por las zonas expuestas de la corteza. Tanto en uno como otro taxón el color de los tallos (de 1º ó 2º año) sería muy variable y no habría diferencias netas en este carácter que permitiese la separación de los dos taxones.

- **Estípulas.** Browicz indicó la forma triangular-ovada como la característica de *C. atlantica* y la ovada u ovado-lanceolada para la subsp. *gallica*. En el material estudiado, no obstante, se observó que en ambos taxones la forma predominante fue la triangular y decimos la predominante porque en ambos taxones tampoco comprobamos la uniformidad morfológica que se colige de las descripciones del monografista; es más, para la subsp. *gallica* las formas indicadas por Browicz se dieron en mucha menor proporción que la mayoritaria. Los otros dos caracteres mencionados por el monografista también pueden conducir a dificultades a la hora de determinar el material peninsular ya que si bien fijó la longitud de las estípulas de *C. atlantica* entre 1,5 y 2 mm, en lo concerniente a la subsp. *gallica* dice "unos 3 mm de largo", lo que resulta un tanto ambiguo. Y también cuando describió el indumento de las estípulas afirmó el carácter pubescente para *C. atlantica* y "especialmente en el margen" para la subsp. *gallica* (debemos hacer notar que esta última descripción del indumento estipular no excluye la primera).

Según nuestros resultados la longitud de las estípulas de *C. atlantica* sería algo inferior a la de la subsp. *atlantica* y ambos taxones presentaron unos intervalos de longitud superiores a los indicados en la monografía. Respecto al indumento, encontramos que en ambos taxones predominaron las estípulas pubescentes que, además, mostraron los márgenes indumentados también la mayor parte de las ocasiones.

- **Hojas.** Uno de los caracteres empleados por Browicz en la descripción de *C. atlantica* como era el número de hojas es, en cambio, ignorado en la descripción de la subsp. *gallica*, suponemos que por su alta variabilidad. En la discusión de sus descripciones en la monografía, Browicz hizo constante alusión a la escasez de material ibérico y el pobre estado en que éste se encontraba, por lo que también debemos suponer que este carácter se definió básicamente a partir de material

africano. No incluimos este carácter en nuestro estudio por las razones antedichas: alta variabilidad y mal estado (en general) de los pliegos observados.

Respecto a la longitud de las hojas el monografista encontró las de *C. atlantica* netamente más pequeñas que las de la subsp. *gallica*, en concreto, el límite superior para *C. atlantica* fue el inferior para *C. arborescens subsp. gallica*. Del material observado por nosotros, no obstante, el intervalo de longitud de hoja para *C. atlantica* resultó más amplio y a la inversa para la subsp. *gallica*, solapándose claramente. El número de pares de folíolos fue prácticamente el mismo para los taxones descritos por el monografista, si bien *C. atlantica* presentaría una mayor variabilidad; ésto concordó plenamente con los resultados que obtuvimos. Este carácter, FOL#1, resultó ser, junto con las relaciones longitud / anchura del folíolo terminal y de los laterales, FOL#10 y FOL#11, respectivamente, los únicos caracteres no florales claramente discriminantes según el PCA realizado (Tabla 13). Los valores de longitud y anchura de los folíolos que encontramos se aproximaron a los indicados por Browicz aunque observamos estas longitudes algo más pequeñas en la subsp. *gallica* y, en general, los intervalos de variación fueron bastante más grandes en ambos taxones.

Durante el periodo de crecimiento de las plántulas a partir de las que se obtuvo el ADN para el estudio de RAPDs (crecidas en condiciones controladas y estándar, apartado 3.4.1.) se comprobó sólo un incremento generalizado del tamaño de algunos órganos (folíolos y entrenudos) respecto a lo observado en los pliegos y en poblaciones naturales. Esta tendencia coincide con lo encontrado por Small (1981) trabajando con especies de *Medicago*.

En lo concerniente a la forma de los folíolos el monografista apuntó una diferencia clara entre ambos taxones: en el caso de *C. atlantica* éstos eran siempre elípticos, mostrando así una regularidad de la que la subsp. *gallica* carecía ("anchamente elípticos, más raramente obovados u ovados"). Respecto a este carácter también se comprobó que el material estudiado no se ajustó a las descripciones browiczianas pues no se pudo comprobar la regularidad de forma de los folíolos de *C. atlantica*. Bien es cierto que la forma elíptica fue predominante pero también lo fue el que las hojas de este taxón presentaron en igual número folíolos elípticos y obovados simultáneamente además de hojas con folíolos obovados en dos de los catorce pliegos examinados para este taxón. Esto hizo pensar en que este grado de variabilidad sea más amplio. Este carácter, uno de los que Browicz apuntó como de claro valor taxonómico en la separación de la subsp. *gallica* frente a *C. atlantica*, fue, sin embargo, ignorado en el cambio de *status* efectuado por Bolòs & Vigo (1974).

Browicz, al igual que con el número de hojas, también omitió para la subsp. *gallica* la descripción de la forma de la base de los foliolos mientras que sí la aportó para *C. atlantica*: redondeada o ligeramente cuneada. Otra vez debemos pensar en lo variable de este carácter en la subsp. *gallica*. En el material que revisamos, también obviamos este carácter por la alta variabilidad mostrada ya que aunque encontramos la forma redondeada como predominante, también encontramos en ambos taxones foliolos con la base ligeramente cuneada o cuneada sin más. Lo apuntado por el monografista respecto de la forma del ápice foliolar coincidió con lo encontrado por nosotros; hay que indicar, no obstante, que el botánico polaco habla en el caso de la subsp. *gallica* de ápices retusos y nosotros encontramos ápices ligeramente obcordados. Esto es considerado como un mero problema de terminología. Además de estas formas, pudimos comprobar la existencia de foliolos con ápices truncados en ambos taxones.

La existencia de un pequeño mucrón y la nerviación visible fueron dados por Browicz como caracteres invariantes en los foliolos de ambos taxones, especificando que la nerviación lateral era marcada en el caso de *C. atlantica*, cosa que también hemos observado en la subsp. *gallica* (en este taxón la nerviación también mostró una gran variabilidad en lo que respecta a su grado de visibilidad).

- **Inflorescencia.** Con el bajo número de pliegos revisados, la determinación del número de flores en la inflorescencia resultó bastante difícil debido al estado que presentaban la mayor parte de los pliegos. Encontramos que el número medio de flores fue tres en ambos taxones, si bien el intervalo de variación para este carácter fue mayor en la subsp. *gallica* que en *C. atlantica*. Esto último coincidió con lo encontrado por el monografista, si bien éste apuntó un número más elevado (5) de flores en la subsp. *gallica*.

El intervalo de la longitud de los pedicelos florales para *C. atlantica*, según la descripción del monografista, queda incluido en el correspondiente para *C. arborescens subsp. gallica* (6 - 10 y 5 - 15 mm, respectivamente) y fue ésto lo que pudimos observar a partir de los pliegos que revisamos; el valor medio para ambos taxones fue, en la práctica, el mismo.

En cuanto al indumento de raquis y pedicelos, Browicz lo correlacionó con el que mostrase el cáliz (indicando, no obstante, que el raquis de la subsp. *gallica* era glabrescente); el color de los pelos también fue bastante variable, reflejando generalmente la misma mezcla de colores que la presente en el cáliz (predominó la mezcla de pelos negros con alguno blanco en ambos taxones).

- **Brácteas.** El tratamiento del monografista del indumento de las brácteas resultó del todo similar a lo anteriormente expuesto ("pubescentes como los pedicelos"). Tras nuestra revisión, sin embargo, constatamos algunas diferencias respecto a las descripción aportadas: la variabilidad del color de los pelos fue extrema, dándose pelos blancos, pardos y negros; mientras que el color predominante en la subsp. *gallica* fue el negro, en *C. atlantica* fue el color blanco. A lo largo de la estructura de la inflorescencia sólo las brácteas se alejaron del esquema general ya apuntado. Frente a la uniformidad morfológica de las brácteas apuntada por Browicz, encontramos además de brácteas ovado-lanceoladas (las predominantes en ambos taxones) brácteas triangulares, lanceoladas y ovadas (estas últimas, en menor número que las otras dos formas mencionadas).

En cuanto al tamaño, según el monografista el límite superior para las brácteas de *C. atlantica* sería el inferior para la subsp. *gallica*; nosotros, en cambio, encontramos que esta longitud era muy similar en ambos taxones y que para la subsp. *gallica* era claramente inferior a la expuesta por Browicz (tampoco respecto de la anchura se diferenciaron ambos taxones).

- **Flores.** Pensamos que tal y como definimos el carácter a FLO#25 (longitud de la quilla) y teniendo en cuenta la posición natural de las piezas florales en *Colutea*, dicho carácter es equiparable al del monografista "longitud de la flor". También los intervalos de variación de la longitud de las flores se solapaban en las descripciones del monografista; con el material que revisamos llegamos a la mismos resultados: idéntico solapamiento de los intervalos de variación y flores más pequeñas para la subsp. *gallica*.

El cáliz de ambos taxones fue descrito como campanulado (o "anchamente campanulado" en la subsp. *gallica*) dentro de unos intervalos de longitudes que se solapaban perfectamente (5 - 7 mm para *C. atlantica* y 6 - 7(8) mm para *C. arborescens subsp. gallica*). De nuestra revisión se obtuvieron intervalos más amplios para ambos taxones de tal forma que los valores más bajos de la subsp. *gallica* estaban excluidos del intervalo de variación de *C. atlantica* para este carácter (con los valores medios, la longitud del cáliz en *C. arborescens subsp. gallica* fue inferior a la de *C. atlantica*).

También en el indumento la separación de los dos taxones fue dudosa: coincidencia en el color de los pelos del indumento; sin embargo Browicz afirmó que los cálices de *C. atlantica* son tomentosos (frente a los pubescentes de la subsp. *gallica*). No conocemos exactamente la naturaleza de esta diferenciación, es decir, si Browicz se refería a la abundancia de pelos o al aspecto de éstos y su disposición

entre ellos. Respecto a la primera posibilidad, no encontramos en ninguno de los taxones ningún cáliz densamente cubierto de pelos y respecto a la segunda, tampoco encontramos diferencias entre la disposición entre los pelos que cubrían las paredes del cáliz: los pelos pardos o negros no eran rectos pero tampoco se entrecruzaban y los que eran blancos solían ser rectos. Todos tenían una longitud similar que, mayoritariamente, no sobrepasaba los 0,3 mm. Lo que si observamos es que dentro de la subsp. *gallica* había una fracción importante de pliegos con cálices indumentados predominantemente en los dientes.

De los dientes del cáliz tampoco se puede decir que sean un carácter que diferencie ambos taxones ya que, según Browicz, su longitud es de 2 mm en *C. atlantica* (nosotros encontramos una cifra inferior que, además, era muy similar a la encontrada para *C. arborescens subsp. gallica* en valor medio) y sólo afirma que son más estrechos y tres veces menores que el tubo del cáliz en la subespecie *gallica* (ver las cifras antes mencionadas para el tubo del cáliz en este taxón). Esta relación (lo que definimos como FLO#12) resultó, a tenor de los pliegos que revisamos, similar en ambos taxones (ca. 5). Es este precisamente uno de los caracteres que más significativamente contribuyó al ordenamiento producido por PCA.

En la descripción general que Browicz (1963) aportó en la introducción de su monografía, mencionó el carácter subigual, o a lo sumo, los dos dientes superiores más pequeños del cáliz. Esta característica también fue mencionada por Willkomm & Lange (1870) y Hutchinson (1964). A la hora de comprobar esta cualidad en el material ibérico, si bien del análisis estadístico del material que revisamos no se pudo concluir la existencia de este patrón de longitud de diente, sí obtuvimos los suficientes indicios como para sospechar que exista.

Continuando con las descripciones de Browicz, las alas fueron definidas en ambos taxones como, a lo sumo, de igual tamaño que la quilla; frente el "a veces portan un espolón diminuto" de las alas de *C. atlantica* y el "generalmente sin espolón" de la subsp. *gallica*, todos los pliegos que tuvimos ocasión de examinar para este carácter portaban alas con un espolón más o menos desarrollado. El ángulo de apertura de las alas (según Browicz 120 - 130 ° para *C. atlantica* y 130 - 150 ° para *C. arborescens subsp. gallica*) quedó excluido de nuestro análisis por dos motivos: por su constancia y por no divergir respecto a los intervalos propuestos por el monografista.

Dentro de los caracteres referidos a la flor, hemos querido dejar para el final el indumento del ovario. Tanto Browicz (1963) como Bolòs & Vigo (1974) han insistido en la importancia de este carácter para la separación de *C. atlantica* y *C. arborescens subsp. atlantica*, respectivamente, de *C. arborescens*. Mientras que el monografista

separó aquellos individuos con "ovario tomentoso" (*C. atlantica*) de aquellos con un ovario "total o parcialmente pubescente" (*C. arborescens subsp. gallica*), Bolòs & Vigo relegaron *C. atlantica* a un *status* de subespecie de *C. arborescens* L. usando el mismo argumento, especificando que *C. arborescens subsp. gallica* podía tener un ovario  $\pm$  pubescente pero siempre sin ocultar totalmente las paredes del ovario mientras que *C. atlantica* tenía las paredes del ovario completamente cubiertas por un denso tomento. Esta diferencia ya fue mencionada por Browicz (1968) en la clave para el género *Colutea* L. en *Flora Europæa*. En la discusión de la descripción de *C. arborescens subsp. gallica*, Browicz (1963) especificó que los individuos que tienen un ovario que porta el indumento sólo en la sutura ventral no pertenecen a este taxón (a este particular, tenemos que recordar que la definición del estado 0 de FLO#14 es "indumento predominantemente en la sutura").

Por un lado, los pliegos revisados y confirmados como *C. atlantica* sí presentaron, en general, ovarios con una mayor densidad de indumento que aquellos pertenecientes a *C. arborescens subsp. gallica*; no obstante, al revisar la matriz de datos empleados en el análisis morfológico y morfométrico, podemos observar que también este carácter muestra un alto grado de variabilidad (bien es cierto que sólo dentro de la subespecie *gallica* encontramos ovarios glabros). Los pelos que componían el indumento del ovario siempre fueron rectos, sin diferencias en el tamaño respecto a los pelos del indumento de otros órganos en la planta y con una distribución que, aunque en algunos casos resultó densa, no ocultaba de modo alguno las paredes del ovario de forma completa. En los casos en que el indumento se distribuía predominantemente por la sutura ventral, también se daban pelos sobre el ovario, de forma más o menos abundante. Con todo, el carácter que empleamos para describir el indumento del ovario (FLO#14), aún resultando el carácter con la máxima contribución positiva a la segunda componente principal (Figura 13, Tabla 13) ésta no superó el valor considerado discriminante y ni siquiera se consideró en la primera componente principal (Tabla 13).

Pensamos de que se trata, de nuevo, de un carácter altamente variable, especialmente en respuesta al ambiente. A este respecto, Johnson (1975) apuntó que un posible significado adaptativo de este tipo de variación podría ser el "fisiológico" ante el hecho de que "muchas especies son polimórficas respecto al indumento, algunos individuos son glabros mientras que otros son obviamente pubescentes". Que ésto es así ya era reconocido por de Candolle (1841) que afirmaba que "la cubierta de tricomas de plantas individuales varía comúnmente en cantidad (tamaño y densidad de pelos) y calidad (tipo de pelos) de órgano en órgano y de tejido en tejido". También, como prueba de la diferencia de cobertura de pelos, Johnson (1975) aportó que



generalmente los órganos jóvenes desarrollan un recubrimiento denso y conforme éstos se expanden, los tricomas originales quedan espaciados y si no se producen nuevos, en la madurez estos órganos presentan un indumento ralo. Clausen *et al.* (1940), en sus trabajos con clones de *Potentilla* y Warning (1909), entre otros trabajos, apuntaron la posible relación entre régimen hídrico y pubescencia, dejando como impresión general que, en general, en condiciones xéricas se desarrolla una pubescencia más densa. En cambio, Levin (1973), en su revisión sobre este tipo de trabajos, fue incapaz de encontrar un patrón que apoyase la simplicidad de este comúnmente aceptado axioma. Más bien fue partidario de la implicación de gradientes de factores bióticos así como factores físicos en este hecho; Johnson (1975), en cambio, afirmó que tras numerosos estudios cuantitativos se podía establecer que los factores físicos y, en especial, las relaciones hídricas predominan sobre los factores bióticos en este problema.

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente y los resultados del análisis de agrupamiento mostrados, por ejemplo, en la Figura 20, se puede observar una coincidencia entre los integrantes de los dos subagrupamientos principales respecto a su origen y gradiente climático Norte-Sur / Húmedo-Seco peninsular, a salvo de condiciones climáticas locales: excepto el UTO nº 14, todos aquellos cuyo origen se situó en el Sur quedaron agrupados en el subgrupo (b) y todos aquellos procedentes del norte y Centro menos el pliego nº 28 en el (a).

En la discusión de su descripción de la subespecie *gallica*, Browicz (1963) apuntó una gradación longitudinal del grado de pubescencia para el conjunto de poblaciones de *C. arborescens* L.: la densidad de la pubescencia disminuiría conforme las poblaciones se situaran más al Este, variando desde los ovarios glabros en su límite oriental (*C. cilicica*, Turquía) hasta los ovarios tomentosos en su borde suroccidental (*C. atlantica*, norte de Africa y sur peninsular). Si tenemos en cuenta lo anteriormente dicho respecto a este carácter y las dificultades expresadas para el material peninsular por el propio Browicz, podemos especular con:

1º) la existencia de toda una gradación (con más o menos excepciones debido a especiales condiciones climáticas locales) en la pubescencia del ovario siguiendo una dirección Norte - Sur.

2º) que los individuos intermedios entre los taxones propuestos por el monografista son, en realidad, reflejo del rango de variación poblacional frente a condiciones físicas (hídricas) del medio.

• **Fruto.** Browicz (1963) tampoco expuso los caracteres referidos al fruto de forma concluyente cuando describió los taxones que proponía. Así, los intervalos métricos se solapaban (si bien admitía que los frutos de *C. arborescens* subsp. *gallica* podían ser mayores que los de *C. atlantica*) y existía cierto grado de ambigüedad a la hora de describir el indumento (esparcidamente pubescente o glabro o pubescente en la base y ápice, respectivamente) y en la relación longitud del estípite / longitud del tubo del cáliz. Los datos obtenidos de la revisión que efectuamos coincidieron con lo expuesto por Browicz (si bien los intervalos de longitud para ambos taxones tuvieron valores mínimos menores).

Por otra parte, resulta curioso que el monografista asignase el carácter indehisciente para los frutos de *C. arborescens* cuando él mismo en la monografía afirmó que la primera ilustración de *C. arborescens*, la ya comentada en el apartado 1.1.1. (el original de Fuchs, 1543), representaba claramente a *C. arborescens* ya que "...la forma de los frutos, uno de los cuales está anchamente abierto, con las semillas visibles,...". El monografista afirmó que los frutos de la subsp. *gallica* eran indehiscientes mientras que los de *C. atlantica* serían "probablemente dehiscentes"; en cambio, posteriormente, al redactar la descripción del género en *Flora Europæa* (Browicz, 1968), dejó de lado esta diferenciación y se decantó por indicar la variabilidad de este carácter. Nosotros optamos por obviar este carácter ya que sistemáticamente observamos que los frutos de ambas especies eran dehiscentes: en mayor o menor grado, las valvas se abrían cerca del ápice de la legumbre. Si recordamos el tamaño de los frutos, veremos que la apertura de las valvas a lo largo de la sutura ventral en una fracción insignificante permite la salida al exterior de las semillas, dado el tamaño de las semillas según la monografía (4 x 3 mm para *C. atlantica* y 4 x 3,5 mm para la subsp. *gallica*). Además, la posición normalmente péndula y a merced del viento de los frutos contribuiría a la dispersión de las semillas por gravedad. El nombre vulgar de "sonajas" de los frutos se debe precisamente al ruido provocado por las semillas sueltas dentro de la vaina al ser ésta movida por el viento. Es posible, una vez más, que los escasos pliegos disponibles para Browicz no contasen con frutos perfectamente maduros.

#### 5.2.1. *C. arborescens* L. subsp. *atlantica* (Browicz) Bolòs & Vigo vs. *C. atlantica* Browicz

De los dieciséis caracteres que resultaron discriminantes según el análisis de componentes principales sobre los pliegos revisados, tan sólo cuatro permitieron separar *C. arborescens* subsp. *atlantica* (Browicz) Bolòs & Vigo de *C. arborescens* subsp. *gallica* Browicz (al mismo tiempo que la hacían indistinguible de *C. atlantica* (Browicz): mayor número de folíolos (FOL#1), mayor anchura del cáliz (FLO#3) y

mayor anchura de las alas y longitud del espolón de las alas (FLO#16 y FLO#17, respectivamente). Respecto a la longitud del cáliz (FLO#2) y la relación longitud del cáliz / longitud media de los dientes del cáliz (FLO#12), este taxón resultó indistinguible de la subsp. *gallica*. Los otros diez caracteres situaron a *C. arborescens* subsp. *atlantica* (Browicz) Bolòs & Vigo en posición intermedia respecto a *C. arborescens* subsp. *gallica* Browicz y *C. atlantica* Browicz.

Si tenemos en cuenta lo anteriormente comentado respecto a los dos caracteres (indumento del ovario y de las ramas) que permitirían seguir el criterio de Bolòs & Vigo (1974), parecería apoyar la observación en la dirección de un amplio rango de variación más que de una separación taxonómica clara. Hay que tener en cuenta, no obstante, el bajo número de pliegos revisados con la determinación según los criterios de Bolòs & Vigo.

### 5.3. CARACTERES MOLECULARES.

#### 5.3.1. ISOENZIMAS.

El método empleado para analizar los resultados de la electroforesis de isoenzimas fue el de presencia / ausencia de bandas y la observación de los patrones de bandas generados. Se optó por este método ante la imposibilidad temporal (ver lo discutido anteriormente a este respecto) de obtener los cruzamientos imprescindibles para la determinación de las bases genéticas de los patrones de bandas observados. No se pudo emplear la información obtenida anteriormente por otros autores debido a que la bibliografía relevante revisada por Gottlieb (1982) y Weeden & Wendel (1990b), por ejemplo, muestra que tanto la localización subcelular como la composición en subunidades varían para alguno de los sistemas isoenzimáticos empleados en el presente estudio. Además, no hay datos de esta naturaleza para *Colutea*. La elección del método de análisis también estuvo apoyada por la afirmación de Boulter (1981) de que, especialmente para leguminosas, "los estudios taxonómicos no siempre requieren un nivel genético en los datos y la demostración de la consistencia en los patrones isoenzimáticos puede ser adecuado para sugerir posibles relaciones taxonómicas". También son numerosos los trabajos que han demostrado la utilidad del método escogido: Ashton *et al.* (1984), Bassiri & Adams (1978), Broué *et al.* (1977), Chung *et al.* (1991), Fernández *et al.* (1987), Jain & Singh (1979), Mäkinen & MacDonald (1968), Meerow (1987, 1989), Stalker *et al.* (1994), Poverene & Curvetto (1989), Sánchez-Yélamo (1992), Sánchez-Yélamo & Martínez-Laborde (1991), Schlegel *et al.* (1989), etc.

La elección de las poblaciones empleadas se hizo atendiendo a la distribución geográfica de los taxones, intentando que el conjunto reflejase las proporciones relativas de ambos taxones (la subsp. *gallica* es más frecuente que *C. atlantica*). Consideramos que el número relativamente bajo de poblaciones de *C. atlantica* fue, sin embargo, suficiente: la evidencia electroforética de una o unas pocas poblaciones muy frecuentemente constituye una muestra adecuada del conjunto de la especie pues ha sido reiteradamente demostrado que las poblaciones conespecíficas son extremadamente similares genéticamente (Gottlieb, 1977).

Debido a su naturaleza, dependiente del estado fisiológico, fenológico y de expresión, para una correcta interpretación de los patrones de bandas, los marcadores isoenzimáticos deberían obtenerse a partir de un material vegetal uniforme. Nos decidimos por las semillas porque representan el estado más estable y comparativo posible de una planta (Boulter & Thurman, 1968). No obstante, ha sido demostrado por Grange (1976) y Scandalios (1974), entre otros, que la alteración en

la uniformidad del grado de madurez y las condiciones de almacenamiento, incluso en leguminosas, pueden modificar los patrones isoenzimáticos. Teniendo en cuenta esto, las recolecciones de las semillas se realizaron en el menor tiempo posible dentro de la segunda mitad del periodo de fructificación de las coluteas (en verano). Sin embargo, las muestras correspondientes a FON fueron recogidas al principio de dicho periodo, por lo que se podría argüir que su grado de madurez habría sido menor que el del resto de las muestras y explicar así la posición un tanto anómala de esta población (Figuras 36y 44).

Por otro lado, la repetición de las electroforesis de cada sistema isoenzimático con el conjunto de las poblaciones mostró que los perfiles eran constantes, lo que además de permitir la realización de comparaciones objetivas entre las poblaciones también nos hizo deducir la homogeneidad isoenzimática de los individuos que componían cada población.

Los sistemas isoenzimáticos empleados difirieron en su capacidad de diferenciar cada población, es decir, en el número de bandas y de patrones que generaron (Tabla 39). Los sistemas más resolutivos (por calidad y complejidad de sus perfiles de bandas, así como por el número de bandas polimórficas) fueron AP y EST. Estos sistemas pertenecen a un grupo de enzimas no específicos con múltiples substratos fisiológicos, en los que la variación se considera como un reflejo de diversidad ambiental (Gillespie & Langley, 1974). De hecho, el sistema esterasas es considerado como uno de los sistemas isoenzimáticos vegetales más variables (Gottlieb, 1981).

Los demás sistemas isoenzimáticos empleados en el estudio rindieron una menor cantidad de bandas por perfil y menos bandas polimórficas, lo que no es extraño si tenemos en cuenta que son enzimas solubles integrantes de vías metabólicas primarias (principalmente glicolisis) muy conservadas en la evolución vegetal. No obstante PGD, con un bajo número total de bandas, mostró la mayor proporción de bandas polimórficas (88,8 %) que originó un gran número de patrones (Tabla 39). Se pondría así de manifiesto el gran valor resolutivo de este sistema isoenzimático en el establecimiento de las relaciones interpoblacionales en *Colutea*.

Muchos de los variantes isoenzimáticos detectados (por ejemplo, los de PGD, G6PDH y GDH) implican sólo pequeños desplazamientos migracionales que pueden ser explicados en su mayoría por sustituciones simples de aminoácidos en la molécula enzimática (Marshall & Brown, 1975).

Las matrices de valores de similitud y distancia demostraron un grado bajo de divergencia entre las poblaciones. Con el coeficiente **J** el valor máximo de similitud fue 0,980 y el mínimo, 0,522 (Tabla 18) mientras que la máxima distancia observada el índice **R** fue 0,393 y la mínima 0,014 (Tabla 19). La población ESP (*C. atlantica*) fue la que mostró el mayor grado de divergencia (número medio de similitud = 0,592, valor medio de distancia = 0,322, Tablas 18 y 19, respectivamente). Intraespecíficamente, los niveles de divergencia también fueron pequeños y aún menos elevados entre poblaciones con un mismo origen geográfico (Tabla 17). No obstante, cabe destacar que tanto las poblaciones de la subsp. *gallica* de procedencia levantina como POR (subsp. *atlantica*) mostraron unos valores medios de similitud y distancia inferiores al correspondiente a su especie (*C. arborescens* L.) (Tabla 17). Estos datos apoyaron la hipótesis de que las poblaciones más cercanas geográficamente serían genética o fenotípicamente más homogéneas por el flujo genético que las poblaciones más distanciadas. El valor medio de similitud entre los taxones también resultó elevado (0,738 con el coeficiente **J**, Tabla 17) mientras que el valor medio de distancia fue bajo (0,166 con el índice **R**, Tabla 17).

### 5.3.2. RAPDs.

Aunque la polimerasa empleada no ha sido ampliamente usada en otros estudios, decidimos emplearla debido a que se obtuvieron resultados repetitivos y a su bajo coste comparado con el de otras polimerasas (aproximadamente, un 50% menor). De la comparación de las amplificaciones obtenidas con esta polimerasa y con AmpliTaq® de Perkin Elmer Cetus (sería el enzima "clásico", procedente de *Thermus aquaticus*) que se realizó en la fase inicial del trabajo, se pudo observar que con la ADN polimerasa Replitherm® se generaba un mayor número de fragmentos de amplificación que, en general, eran de longitud pequeña y se teñían muy débilmente. No se observaron diferencias en lo que respecta a las bandas mayoritarias (intensamente teñidas). En el único estudio comparativo de los patrones de amplificación al que se tuvo acceso correspondiente a 13 ADN polimerasas disponibles comercialmente y en el que se incluyó la ADN polimerasa Replitherm® (Schierwater & Ender, 1993), después de ponderar positivamente las polimerasas procedentes de *Thermus aquaticus*, curiosamente no se mostraron los resultados correspondientes al enzima Replitherm® ni se hizo mención alguna en la discusión.

Con frecuencia se pudo observar una tinción "residual" de fondo o *smear* en la parte final de los geles, la correspondiente a los menores tamaños de amplificación. Esto sería lo que Innis & Gelfand (1990) consideran una de las más importantes consecuencias del efecto *plateau* (consiste en la atenuación de la tasa exponencial de

acumulación de producto amplificado que ocurre durante los primeros ciclos, concomitantemente con la acumulación de 0,3-1 pmol del producto de amplificación deseado). Sin embargo, el hecho de que el *smear* no se presentase ni en todas las muestras ni con la totalidad de los *primers* hizo pensar más bien en un efecto producido por la interacción específica del *primer* empleado con ADN alterado, muy probablemente por rotura de las hebras.

La variación en intensidad de tinción de dos bandas comunes a dos poblaciones diferentes pueden ser resultado de polimorfismo de número de copia o, alternativamente, de diferencias en la eficiencia de la amplificación (Vierling & Nguyen, 1992; Wilkie *et al.*, 1993). Puesto que ésta se controló mediante repeticiones, se pudo concluir que las bandas que mostraron diferente intensidad de tinción muestra a muestra (por ejemplo, OP#5<sub>1200</sub>) son polimorfismos de número de copia. No obstante, al realizar el análisis como presencia / ausencia de banda, se desistió de registrar estas diferencias ya que la reproducibilidad de las diferencias cuantitativas de intensidad de tinción podrían no ser consistentes (Heun & Helentjaris, 1993), haciendo subjetivo un análisis basado en desiguales intensidades de tinción de banda. Por otro lado, la presencia de bandas con una intensidad de tinción variable apoyaría el argumento de que la competición entre lugares de iniciación 100% complementarios y otros no perfectamente complementarios es la que determina, más que el tamaño del genoma (número total de lugares de iniciación) la complejidad de los patrones RAPD (Rafalski *et al.* (1991). Así, la complejidad de los patrones obtenidos con nuestras muestras no fue distinta de la encontrada en especies con genomas muy grandes, como en cebolla y coníferas (Wilkie *et al.*, 1993 y Carlson *et al.*, 1991, respectivamente), con genomas de tamaño intermedio como el tomate (Martin *et al.*, 1991) o como en *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*), que cuenta con un genoma bastante pequeño (Reiter *et al.*, 1992),

El número de RAPDs por *primer* que se obtuvo se situó dentro del rango indicado por Waugh & Powell (1992), con número medio de seis RAPDs por *primer*, coincidiendo con lo encontrado en *Stylosanthes* spp. (*Fabaceae*) por Kazan *et al.* (1993) y muy próximo a los siete encontrados por Chalmers *et al.* (1992) en *Gliricidia* spp (*Fabaceae*).

La potencia de la técnica PCR-RAPD es tal que permite la detección de variación en secuencia dentro de genomas muy estrechamente emparentados (ver apartado 1.3. de la Introducción). Se podría argumentar entonces que el muestreo de diferentes poblaciones de una especie podría revelar una extensa variabilidad intraespecífica, pero ésto no ocurre siempre. Al igual que en el presente trabajo con el

*primer* OP#8, con el que sólo se obtuvo un patrón de bandas para la totalidad de las poblaciones, Böhm *et al.* (1993) tampoco encontraron variabilidad interpoblacional dentro de *Clusia minor* (*Clusiaceae*) usando 23-27-meros y, de igual forma, Heun *et al.* (1994) también encontraron un *primer* que resultó monomórfico para un conjunto de accesiones de *Avena sterilis* L. Sin embargo, tanto en esos trabajos como en este, si fue detectada esta variabilidad con el concurso de otros *primers*, por lo que debería enfatizarse que el grado de variabilidad detectado infraespecíficamente depende fuertemente de los *primers* empleados.

Intrapoblacionalmente, los *primers* OP#5, OP#7 y OP#20 generaron un patrón de bandas monomórfico para los distintos individuos de cada población ensayada. Esto mismo fue encontrado por Chalmers *et al.* (1992) en varias poblaciones de *Glinicidia* spp., una leguminosa arbórea. Este hecho podría explicarse admitiendo que la secuencia de los *primers* empleados encuentra siempre alguna región homóloga en el ADN de cada individuo, lo que implicaría, dado el carácter presumiblemente alógamo de *C. arborescens* y *C. atlantica*, que esta región genómica es constante en el genoma de estas especies, no sujeta a variación.

Así pues, la variabilidad se detectó principalmente entre las poblaciones, lo que está en desacuerdo con los resultados aportados por Hamrick (1990) en los que se indica que para plantas leñosas, perennes y alógamas la mayor variación se encuentra intrapoblacionalmente. Sin embargo, esta conclusión está basada en análisis isoenzimáticos y, por tanto, representan sólo regiones codificadoras del genoma, por lo que esos resultados no pueden ser directamente comparables con los datos tipo RAPD de *Colutea*.

Al igual que lo ya comentado para los isoenzimas, los valores de similitud computados con los coeficientes J y F mostraron que las poblaciones estudiadas mantenían un bajo grado de divergencia entre sí. Con estos marcadores dicho grado de divergencia fue, incluso, menor. El rango de los valores medios de similitud se situó entre 0,675 (Z) y 0,792 (LAF) para el índice J y entre 0,755 (GRA) y 0,884 (BAR) con el coeficiente F (Tablas 36 y 37, respectivamente). La no coincidencia en la determinación de la población más divergentes (Z con el índice J y GRA con el F) con los dos coeficientes se debió a las diferencias de en la definición entre ambos. A nivel intraespecífico, sólo los grupos de poblaciones con una procedencia centro y norte mostraron un valor medio de similitud superior al correspondiente para el conjunto del taxón, quedando las poblaciones levantinas (igual que lo que ocurría para los isoenzimas) y las de procedencia sur de *C. atlantica* por debajo de este valor; también con los datos tipo RAPD, la población HOR mostró un mayor grado de variación



respecto a sus conespecíficas que respecto a las poblaciones de *C. atlantica* (Tabla 35). También a diferencia de lo observado para las isoenzimas, POR (subsp. *atlantica*) fue más similar a las poblaciones de *C. atlantica* que a las de la subsp. *gallica* (Tabla 35). El valor medio de similitud entre los taxones también resultó elevado (0,738 y 0,834, Tabla 35, con los coeficientes J y F, respectivamente).

#### 5.4. ANALISIS MULTIVARIANTE.

El análisis multivariante se realizó mediante análisis de agrupamiento (UPGMA) y por análisis de ordenamiento (PCA y PCO), siguiendo la estrategia *deseable* formulada por Sneath & Sokal (1973). A este respecto, los autores anteriormente citados y, por ejemplo, Thorpe (1976) ya advirtieron que, en caso de existir divergencia de naturaleza clinal entre las poblaciones, el análisis de agrupamiento podría ser inefectivo, por lo que adoptamos esta doble aproximación para intentar dilucidar las relaciones entre las poblaciones estudiadas:

basamos los agrupamientos taxonómicos formales en el dendrograma que incluye todo el espacio dimensional y empleamos el análisis de ordenamiento para analizar el patrón general de variación.

Por otro lado, las técnicas de agrupamiento tienden a resolver mucho mejor las relaciones más estrechas entre los objetos más que la totalidad de éstas, lo que quiere decir que los agrupamientos mayores se representan peor (Rohlf, 1970). En cambio, las técnicas de ordenamiento se comportan a la inversa, representando peor las relaciones más cercanas y mucho mejor las tendencias más generales. Debido a ésto, se aceptaron las relaciones representadas por análisis de agrupamiento, teniendo en cuenta los agrupamientos mayores resultado de los análisis de ordenamiento (PCA para los caracteres morfológicos y PCO para los caracteres moleculares). Adoptamos el análisis de coordenadas principales (PCO) para los caracteres moleculares ya que estos fueron expresados como presencia (1) / ausencia (0) y como ya apuntó Gower (1966), hay algunas dudas en la utilización del análisis de componentes principales (PCA) con este tipo de datos, por ejemplo, Glaszmann *et al.* (1989), Høiland & Laane (1989) y Jensen *et al.* (1979).

Los valores de *r* encontrados para los distintos fenogramas que obtuvimos del análisis numérico de los datos morfológico-morfométricos, electroforesis de isoenzimas y RAPDs no bajaron en ningún caso de 0,850, lo que hizo que confiásemos en las estructuras jerárquicas detectadas por UPGMA, sobre todo si tenemos en cuenta que la correlación cofenética prácticamente nunca es perfecta ( $r=1,00$ ) y que frecuentemente es 0,75 ó menos (Gilmartin & Harvey, 1976).

Stiles *et al.* (1993) justificaron el uso del coeficiente **SM** en el análisis numérico de RAPDs aduciendo que se deben tomar en cuenta las ausencias negativas cuando la base genética es estrecha ya que entonces, una misma variación de secuencia podría ser responsable de la ausencia de productos de amplificación. Nuestra decisión al adoptar **J** como índice para computar la matriz de similitudes se basó en que las distancias computadas con el coeficiente **J** (Tabla 36) cayeron dentro de un rango relativamente amplio, 0,585 - 0,981, lo que sugeriría una diversidad genética moderada en las poblaciones estudiadas, por lo que no se podría establecer *a priori* la correlación significativa asumida en el trabajo anteriormente citado. Además, consideramos impropio basar la similitud en la ausencia de un carácter, máxime cuando se conoce toda una variedad de mecanismos por la que un genoma puede no presentar un determinado producto de amplificación (ver apartado 1.4.).

La elección del índice **F** se realizó pensando en ponderar el análisis de agrupamiento de tal forma que se preponderasen las coincidencias positivas en detrimento de las coincidencias negativas (Kresovich *et al.*, 1992; Kazan *et al.*, 1993, entre otros). Un examen de las definiciones de **J** y **F** permite apreciar que son básicamente el mismo coeficiente, sólo que este último prima las coincidencias positivas mediante un factor de 2 (ver Material y Métodos, apartado 3.4.6.). Esto se reflejó en un rango de distancias entre las muestras (0,71 - 0,99) más estrecho (Tabla 37).

Con los caracteres de naturaleza isoenzimática las relaciones entre las poblaciones se establecieron, además de con el coeficiente **J**, mediante el índice **R**. A diferencia del primero, éste es un coeficiente de disimilitud (distancia) y pensamos que podría detectar una estructura de agrupamientos diferente al basarse en la proporción de diferencias existente entre dos poblaciones. En realidad, se mostró menos estricto, lo que se reflejó en un intervalo de variación más pequeño (0,39 - 0,01, Tabla 19).

Con ambos tipos de datos (morfológicos y moleculares), en líneas generales, se comprobó:

*a/ una clara analogía entre la estructura de grupos obtenida mediante análisis de ordenamiento (PCA o PCO) y la topología de los dendrogramas resultado del análisis de agrupamiento (con cualquiera de los coeficientes empleados).*

*b/ una razonable homogeneidad respecto al origen geográfico de los componentes de cada grupo (Figuras 18 vs. 20, 36 vs. 44 y 63 vs. 71).*

Siempre se detectaron dos grandes grupos (con análisis de ordenamiento) que siempre se reflejaron en dos subagrupamientos (con el análisis de agrupamiento), de tal forma que el que agrupó un mayor número de poblaciones incluyó siempre subgrupos bien definidos que reunían a las poblaciones de origen norte y centro y parte de las levantinas. El otro presentó, también con un nivel aceptable de astringencia, al resto de poblaciones levantinas y a aquellas procedentes del sur.

Ambos agrupamientos principales presentaron una cierta heterogeneidad respecto a su composición en taxones. Por ejemplo, en el análisis morfológico sólo los UTOs 24 (subsp. *atlantica*) y 27 (*C. atlantica*) no correspondían a la subsp. *gallica* en el subgrupo compuesto por pliegos principalmente de procedencia centro y norte (Figura 18). Una situación similar se puede observar en la Figura 36 con los UTOs 17 y 20 (subsp. *gallica*) y en la Figura 63 en el subgrupo formado por parte de las poblaciones levantinas y aquellas procedentes del sur.

Fuera de este esquema general, cabe destacar las posiciones de las poblaciones UÑA, FON, (*C. arborescens* subsp. *gallica*) y SEG (*C. atlantica*). La primera población se posicionó en una posición intermedia respecto a los subgrupos definidos norte y centro (Figura 44) o bien como la población más divergente dentro de esta subestructura (Figura 72); el hecho de que se trate de una población muy próxima a un medio antropógena y que a su alrededor se encuentren ejemplares dentro de jardines nos hace pensar en que más que una población natural se trate de ejemplares naturalizados, posiblemente de origen híbrido <sup>6</sup>.

La posición de FON también fue singular ya que se incrustó en la estructura conformada por los agrupamientos basados en isoenzimas de poblaciones procedentes del norte y centro cuando su origen geográfico es levantino (Figuras 44 y 72, ver apartado 5.3.1.). Sin embargo, la localización de esta población fue muy similar con los análisis basados en los RAPDs (Figuras 71 y 72), marcadores no afectados por el ambiente, por lo que no cabe pensar en que las semillas recolectadas tuvieran un menor grado de madurez.

La población SEG se situó en el subagrupamiento mayoritario y fundamentalmente compuesto por poblaciones de la subsp. *gallica* en el análisis de los datos tipo RAPD (Figuras 71 y 72) mientras que con los isoenzimas se colocaba junto al resto de poblaciones de su mismo taxón, *C. atlantica*, y procedencia

<sup>6</sup> *C. arborescens* x *orientalis* (*C. x media* Willd.) se cita en la bibliografía como la colutea de uso ornamental mas extendida (por ejemplo, van der Meijden, 1990). Probablemente forme híbridos de retrocruzamiento que son fácil y erróneamente determinados, entre otros, como *C. arborescens* (Browicz, 1963).

geográfica (Figura 44). Esto hecho parece estar relacionado con la forma diferente que tienen ambas técnicas de muestrear la variabilidad genética.

### 5.5. COMPARACION DE METODOS.

La comparación de los métodos empleados para investigar las relaciones existentes en un conjunto de entidades (bien individuos, bien poblaciones) implica el cotejo de las relaciones entre dichas entidades obtenidas por cada método. También hay que tener en cuenta la naturaleza de los datos aportados y su compatibilidad a nivel de la información que ofrecen:

los caracteres de naturaleza isozímica sólo reflejan una pequeña parte del genoma que, además, es codificante mientras que los RAPDs son capaces de muestrear la totalidad del genoma, codificante o no y, a diferencia de los isoenzimas, independientemente del estado fisiológico del órgano vegetal empleado y libre de influencias ambientales.

A este respecto, nuestros resultados mostraron una fuerte asociación de diversas poblaciones ya que compartieron perfiles de bandas tanto en el análisis de isoenzimas como en la técnica RAPD. Es decir, las mismas poblaciones que compartían un determinado patrón isoenzimático diferente del resto también compartían patrones RAPD diferentes de los demás: por ejemplo, RET y RIO con el sistema PGD y OP#5 (Figura 25 / Tabla 24), PIC, ARE y BEN con ME y OP#20 (Figura 24 / Tabla 32), NAV, LAF, BAR y ARE con EST y OP#3 (Figura 31 / Tabla 23), etc. En otras palabras, que la información ofrecida por ambos métodos fue compatible. Esto mismo fue observado por van Heusden & Bachmann (1992a) al comparar los perfiles tipo RAPD, isoenzimáticos y de VNTR con una compuesta (*Microseris elegans*, Asteraceae).

Los estudios de comparación entre técnicas de obtención de marcadores están comenzando a aparecer en la literatura. Son, principalmente, trabajos que comparan isoenzimas con RFLPs y RAPDs con RFLPs. La relativa novedad de la técnica RAPD junto con el hecho de que en la actualidad primen los trabajos que emplean marcadores genéticos directos ha resultado en un número escaso de estudios comparativos entre RAPDs e isoenzimas.

Así, por ejemplo, encontramos el estudio de Landry *et al.* (1987) en el que se apuntó solamente correlaciones aproximadas entre las relaciones de isoenzimas y RFLPs en un número limitado de líneas de *Lactuca sativa*. De la misma clase fue el trabajo de Havey & Muehlbauer (1989) con diferentes especies de lentejas (*Lens*

spp.), aunque esta vez los autores sí encontraron una mayor coincidencia entre las relaciones detectadas por isoenzimas y RFLPs. La concordancia entre la diferenciación de varias ecoespecies de arroz (*Oryza sativa*) por RAPDs y las previamente puestas de manifiesto por isoenzimas y RFLPs también fue observada por Fukuoka *et al.* (1992). En otro de los trabajos comparativos encontrados, Heun *et al.* (1994), encontraron un valor de correlación producto-momento de Pearson, significativo, de 0,36 entre los datos tipo RAPD e isoenzimáticos de 24 accesiones de *Avena sterilis*; comparando este resultado con el obtenido por Prince *et al.* (1992) con 25 accesiones de *Capsicum* (0,44) y por Beer *et al.* (1993) con 177 accesiones de *Avena sterilis* mediante isoenzimas y RFLPs (0,27), los autores concluyeron que las correlaciones encontradas entre estos diferentes tipos de datos sólo han sido de bajas a moderadas en general. Al igual que estos autores, encontramos una considerable coincidencia en la representación general de las relaciones entre las poblaciones por análisis de ordenamiento y agrupamiento (Figuras 73, 74 y 75). Sin embargo, el valor de correlación que obtuvimos entre los datos isoenzimáticos y RAPDS fue muy superior a los hallados en los trabajos anteriormente citados (0,63). Con respecto al trabajo de Heun *et al.* (1994), nuestros resultados también difirieron en el grado de polimorfismo encontrado:

estos autores encontraron un mayor polimorfismo en isoenzimas que en RAPDs y, a su vez, un mayor número de bandas RAPD que de isoformas con una contribución significativa al primer componente principal (lo que llamamos bandas discriminantes en el PCA del subconjunto de poblaciones comunes) frente a un idéntico porcentaje de la varianza explicado por el primer componente principal tanto en el caso de isoenzimas como de RAPDs. De estas cifras y de las ligeras variaciones encontradas a la hora de ver cómo las accesiones se integraban en los agrupamientos respecto de las representaciones obtenidas por análisis de ordenamiento, dedujeron que aquellas accesiones cuyas relaciones no estaban bien representadas por el análisis de isoenzimas (accesiones muy similares entre sí) sí lo estaban mediante los RAPDs, otorgándole de esta manera un mayor poder resolutivo a esta última técnica. En nuestro caso, sin embargo, fueron los RAPDs los que mostraron el mayor grado de polimorfismo y un mayor número relativo de bandas con una contribución significativa al primer componente principal, además de que dicho componente principal expresó un porcentaje de la varianza ligeramente superior (Tabla 39), con lo que el superior poder resolutivo de la técnica RAPD se puso de manifiesto desde el principio, ya en el momento de separar los grupos.

La ya aludida diferente capacidad de muestrear la variabilidad interpoblacional que muestran los datos de tipo isoenzimático y los RAPDs quedó de nuevo de

manifiesto en la mayor amplitud del intervalo de los valores de similitud de Jaccard con los RAPDs, lo que apuntó a que estos marcadores detectaron un mayor grado de variabilidad. En cuanto a variabilidad detectada entre los taxones, el valor medio de similitud fue desde 0,735 con los RAPDs hasta 0,793 con los marcadores isoenzimáticos, en claro acuerdo con lo anteriormente comentado. Para los datos moleculares combinados este valor resultó ser notablemente intermedio, 0,772 (Tabla 38). Con todo, los análisis multivariantes de los datos referidos al subconjunto de poblaciones comunes no mostraron ninguna novedad respecto a lo dicho en el apartado anterior, confirmándose el patrón de agrupamientos allí comentado (Figuras 73, 74, 75, 76 y 77).

Son abundantes los trabajos que comparan las clasificaciones resultantes de emplear caracteres morfológicos e isoenzimas. A modo de ejemplo se pueden citar los trabajos de Ashton *et al.* (1984), Glazner *et al.* (1988) y Pasquet (1993). Dadas las características del presente trabajo, la comparación de los resultados obtenidos con caracteres morfológicos y moleculares no puede realizarse directamente pues los primeros se definieron sobre individuos y los segundos sobre poblaciones. Sin embargo, la gran homogeneidad mostrada por éstas sí hacen posible una aproximación comparativa. Tanto los diagramas de ordenamiento como los dendrogramas de agrupamiento obtenidos en el análisis morfológico (apartado 4.2.2) son comparables con los obtenidos en los análisis moleculares (apartado 4.3.3 para el análisis de isoenzimas y apartado 4.4.5. para el análisis de RAPD) en las dos tendencias ya comentadas anteriormente (ver apartado anterior). El que los UTOs empleados en el análisis morfológico no sean los mismos que los usados con los análisis moleculares hace que la comparación sólo sea aproximativa.

La comparación de las clasificaciones en *Arachis* obtenidas mediante el uso de caracteres morfológicos (Stalker, 1990) y RAPDs (Halward *et al.*, 1992), respectivamente, permitió a estos últimos autores apuntar la validez del uso de RAPDs para el estudio sistemático en ese género ya que, en general, los agrupamientos resultantes de RAPDs y datos morfológicos fueron similares. Algunas pequeñas diferencias encontradas entre ambos tipos de estudio pudieron deberse al número relativo de especies evaluadas en cada tipo de análisis: el mayor número de especies empleadas en el estudio morfológico permite el acercamiento de "huecos" en el patrón de ramificación que resultarían en ligeras diferencias de relación entre especies y algunas alteraciones en los agrupamientos generados. Encontraron una situación similar cuando compararon RFLPs e isoenzimas.

## **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES.

Si bien *C. arborescens* subsp. *gallica* tiene una distribución más frecuente en el cuadrante NE y *C. atlantica* en el S de la Península Ibérica, no se detecta ninguna discontinuidad geográfica entre las áreas de distribución de ambos taxones.

Los caracteres morfológicos en los que se basan los taxones propuestos por Browicz (1963) y Bolòs & Vigo (1973) no han probado separar claramente los UTOs estudiados de dichos taxones.

Los caracteres Número de foliolos, Relación longitud / anchura del foliolo terminal, Relación longitud / anchura de los foliolos laterales, Longitud del cáliz, Anchura del cáliz, Relación longitud del cáliz / longitud media de los dientes del cáliz, Longitud de las alas, Anchura de las alas, Longitud del espolón de las alas, Relación longitud / anchura de las alas, Anchura del estandarte, Longitud de la uña del estandarte, Longitud del espolón de la quilla, Longitud del ginóforo, Longitud del ovario y Relación longitud del ginóforo + longitud del ovario / anchura del ovario probaron tener valor discriminante entre los UTOs empleados por Análisis de Componentes Principales.

Los coeficientes de distancia empleados en el Análisis de Agrupamiento, Distancia Taxonómica Media y Distancia Media Manhattan, produjeron dendrogramas similares.

Los sistemas isoenzimáticos empleados detectaron polimorfismo interpoblacionalmente y no intrapoblacionalmente en las poblaciones estudiadas de *Colutea*. Los sistemas isoenzimáticos Enzima Máfico y Esterasas produjeron el mayor número de bandas polimórficas. Los sistemas 6-P-gluconato deshidrogenasa, Fosfatasas Ácidas y Esterasas probaron ser los que mejor diferencian las poblaciones estudiadas.

Los coeficientes de similitud (**J** de Jaccard) y de distancia (**R** de Rogers) produjeron topologías similares en el análisis de ordenamiento (por Análisis de Coordenadas Principales) y en el de agrupamiento (por UPGMA).

Tanto el rango de amplificación como el grado de polimorfismo detectado en *Colutea* mediante la técnica PCR-RAPD con los *primers* empleados no se desviaron de lo que es considerado usual para esta técnica con otras plantas.



Con los *primers* y poblaciones de *Colutea* empleadas se detectan polimorfismos interpoblacionalmente y no intrapoblacionalmente. Los *primers* más efectivos a la hora de diferenciar las poblaciones estudiadas fueron OP#7, OP#19 y OP#20.

Los coeficientes de similitud **J** (de Jaccard) y **F** (de Nei & Li) produjeron topologías similares en el análisis de ordenamiento (por Análisis de Coordenadas Principales) y en el de agrupamiento (por UPGMA).

La técnica PCR-RAPD diferencia mejor que la electroforesis de isoenzimas las poblaciones estudiadas. Detecta mayores grados de polimorfismo y discriminación.

Los altos valores medios de similitud interpoblacionales en los grupos geográficos definidos en las poblaciones de *Colutea* estudiadas indican que dichos grupos experimentan un elevados niveles de flujo génico.

La existencia de una fuerte asociación entre determinadas poblaciones, detectada por la exhibición en éstas de patrones comunes de bandas tanto con la electroforesis de isoenzimas como con la técnica PCR-RAPD, demuestra la compatibilidad de la información obtenida por las técnicas moleculares empleadas.

Se detecta una inusualmente elevada correspondencia ( $r= 0,63$ ) entre las matrices de distancia originadas por los marcadores de naturaleza isoenzimática y RAPDs, lo que se refleja en que las relaciones de afinidad detectadas entre las poblaciones estudiadas sean muy semejantes, como lo ponen de manifiesto tanto el análisis de ordenamiento como el de agrupamiento.

El conjunto de métodos de análisis numéricos empleados en el presente estudio detecta (a) la existencia de grupos de poblaciones no homogéneos desde el punto de vista taxonómico tradicional y (b) una variación de carácter morfológico y molecular que sigue una tendencia geográfica norte / sur, de forma que los UTOs de procedencia centro y norte quedan separados de los UTOs procedentes del sur. Los UTOs de procedencia levantina quedan separados en dos subgrupos que son afines, respectivamente, a los dos grupos principales antes mencionados.

## ***BIBLIOGRAFIA***

## 7. BIBLIOGRAFIA.

Abutalybov, M.G. *et al.* (1978). Physochlaine. *Otkrytiya, Izobret., Prom. Obratzsy, Tovarnye Znaki*, **55**: 90.

Adams, R. P., Demeke, T. & Abulfatih, H. A. (1993). RAPD DNA fingerprints and terpenoids: clues to past migrations of *Juniperus* in Arabia and east Africa. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 22-26.

Adanson, M. (1763). *Familles des Plantes*. Paris.

Aguinagaide, I., Pérez-García, F. & González, A.E. (1990). Flavonoids in seed coats of two *Colutea* species: ecophysiological aspects. *Journal of Basic Microbiology*, **30** :547-553.

Agulló, M.A., Tortosa, M.E., Ceresuela, J.L. & Ortiz, J.M. (1991). Seed morphology in several taxa of the subfamily *Papilionoideae* (*Fabaceae*). *BotaniKa ChroniKa*, **10**: 651-660.

Al-Ani, H.A.M. & Dewick, P.M. (1985). Biosynthesis of the isoflavan isomucronulatol: origin of the 2',3',4'-oxygenation pattern. *Phytochemistry*, **24**: 55-61.

Alcaraz, F. (1984). *Flora y vegetación del NE de Murcia*. Secretaría de Publicaciones de la Universidad de Murcia, Murcia.

Allué, J.L. (1981). (a) Aspectos ecológicos, fenológicos y biométricos de *Colutea arborescens* L. (b) Dificultades y estimulación en semillas de *Colutea arborescens* L. XXI Reunión Científica S.E.E.P.

Allué, J.L. (1983). Morfología, clases, atributos, dificultades y tratamientos en la producción y germinación de semillas de *Colutea arborescens* L. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Forestal*, **7**: 129-154.

Andersen, W. R. & Fairbanks, D. J. (1990). Molecular markers: important tools for plant genetic resource characterization. *Diversity*, **6**: 51-53.

Aparicio, A. & Silvestre, S. (1987). *Flora del Parque Natural de la Sierra de Grazalema*. Agencia de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.

Arnheim, N. & Erlich, H. (1992). Polymerase chain reaction strategy. *Annual Review of Biochemistry*, **61**: 131-156.

Arnold, M. L., Buckner, C. M. & Robinson, J. J. (1991). Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**: 1398-1402.

Arulsekhar, S., Parfitt, D. E. & McGranahan, G. H. (1985). Isozyme gene markers in *Juglans* species. *Journal of Heredity*, **76**: 103-106.

Asequinolaza, C., Gómez, D., Lizauru, X., Montserrat, G., Morante, G., Salaverría, M. R., Uribe-Echevarría, P. M. & Alejandro, J. A. (1985). *Catálogo florístico de Alava, Vizcaya y Guipúzcoa*. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, Vitoria.

- Ashton, P.S., Gan, Y.-Y. & Robertson, F.W. (1984). Electrophoretic and morphological comparisons in ten rain forest species of *Shorea* (Dipterocarpaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **89**: 293-304.
- Aynechni, Y. *et al.* (1982). Survey of Iranian plants for saponins, alkaloids, flavonoids and tannins. II. *International Journal of Crude Drug Research*, **20**: 61-70.
- Bachmann, K. (1992). Nuclear DNA markers in angiosperm taxonomy. *Acta Botanica Neerlandica*, **39**: 369-384.
- Baird, E., Cooper-Bland, S., Waugh, R., DeMaine, M. & Powell, W. (1992). Molecular characterisation of inter- and intra-specific hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Gen and Genetics*, **233**: 469-475.
- Barnola, J. M. (1916). Excursió a Collsuspina. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*, **16**: 69-70.
- Bassiri, A. & Adams, M.W. (1978). Evaluation of common bean cultivar relationships by means of isozyme electrophoretic patterns. *Euphytica*, **27**: 707-720.
- Batalla, E. & Masclans, F. (1950). Catálogo de las plantas observadas en la cuenca del Gaiá (Tarragona). *Collectanea Botanica*, **2**: 343-429.
- Bauhinus (1650). *Historia Plantarum Universalis*.
- Baum, B.R. (1976). Weighting character-states. *Taxon*, **25**: 257-260.
- Beer, S.C., Goffreda, J., Phillips, T.D., Murphy, J.P. & Sorrells, M.E. (1993). Assessment og genetic variation in *Avena sterilis* using morphological traits, isozymes and RFLPs. *Crop Science* (en prensa)
- Bellot, F., Ron, M. E. & Carballal, R. (1979). Mapa de la vegetación de la Alcarria Occidental. *Trabajos del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal. Universidad de Madrid*, **10**: 3-32.
- Blacklith, R. 81971). *Multivariate morphometrics*. Academic Press, New York.
- Blanca, G. & Morales, C. (1991). *Flora del Parque Natural de la Sierra de Baza*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada, Granada.
- Böhm, M., Löw, R., Haag-Kerwer, A., Lüttge, U. & Rausch, T. (1993). Evaluation of comparative DNA amplification fingerprinting for rapid species identification within the genus *Clusia*. *Botanica Acta*, **106**: 448-453.
- Boissier, P.E. (1872). *Flora Orientalis*, 2. Basilea, Ginebra, Lyon.
- Bolòs, A. & Bolòs, O. (1950). *La vegetación de las comarcas barcelonesas*. Barcelona.
- Bolòs, O. (1960). La transición entre la Depresión del Ebro y los Pirineos en el aspecto geobotánico. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **18**: 199-254.
- Bolòs, O. & Masclans (1990). *Plantas vasculares del quadrat UTM 31TCF79. La Llacuna*. ORCA: Catàlegs florístic locals, 3. Institut D'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques, Barcelona.

- Bolòs, O., Nuet i Badia, J. & Panareda, J. M. (1986). *El patrimoni biològic del Montseny*. Diputació de Barcelona, Barcelona.
- Bolòs, O & Vigo, J. (1974). Notes sobre taxonomia i nomenclatura de plantes, I. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural*, 38, Secció de Botànica, 1: 61-89.
- Bolòs, O. & Vigo, J. (1984-1990). *Flora dels Països Catalans*. vols. I - II +. Editorial Barcino, Barcelona.
- Borja, J. (1950). Estudio fitogeogràfic de la sierra de Corbera (Valencia). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 9: 360-483.
- Bou i Tomás, J. (1985). Flora de los macizos de les Salines i del Castell de Bac Grillera. *Collectanea Botanica*, 16: 167.
- Boulter, D. (1981). Proteins of legumes, págs. 501-512. En *Advances in legume systematics*. R.M. Polhill & P.H. Raven (Eds.). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Boulter, D. & Thurman, D. (1968). Acrylamide gel electrophoresis of proteins in plant systematics, págs. 39-48. En *Chemotaxonomy and serotaxonomy*, vol. 2. Hawkes, J.G. (Ed.). Academic Press, London.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brewer, G. J. & Sing, C. F. (1970). *An introduction to isozyme techniques*. Academic Press, New York.
- Broué, P., Marshall, D.R. & Müller, W.J. (1977). Biosystematics of subgenus *Glycine* (Verdc.): isoenzymatic data. *Australian Journal of Botany*, 25: 555-566.
- Browicz, K. (1963). The genus *Colutea* L. A monograph. *Monographiae Botanicae*, XIV: 1-133.
- Browicz, K. (1968). *Colutea* L. En: *Flora Europæa*, vol 2. T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters & D.A. Webb (Eds.), pág. 107. Cambridge University Press, Cambridge.
- Brown, A. H. D. (1989). Genetic characterization of plant mating systems. En: *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler & B. S. Weir (Eds.), págs. 145-162. Sinauer Associates, Sunderland.
- Brown, A. H. D. (1990). The role of isozyme studies in molecular systematics. *Australian Systematic Botany*, 3: 21-38.
- Brown, A. H. D. & Weir, B. S. (1983). Measuring genetic variability in plant populations. En: *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A*. S. D. Tanksley & T. H. Orton (Eds.), págs. 219-239. Elsevier, Amsterdam.
- Buades, A. (1987). *Contribució al estudio de la flora vascular del noroeste de la provincia de Soria*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Bubani, P. (1897-1901). *Flora pyrenæa*. Milán.

- Buth, D. G. (1981). Cladistic treatment of isozyme (rather than allozyme) data. En: *Second Annual Meeting of the Willi Henning Society*, Ann Arbor.
- Buth, D. G. (1984). The application of electrophoretic data in systematic studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**: 501-522.
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B. J. & Grasshoff, P. M. (1991). DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, **9**: 294-307.
- Cain, A.J. & Harrison, G.A. (1960). Phyletic weighting. *Proceedings of the Zoological Society (London)*, **135**: 1-31.
- Carlson, J. E., Tulsieram, L. K., Glaubitz, J. C., Luk, V. W. K., Kauffeldt, C. & Rutledge, R. (1991). Segregation of random amplified DNA markers in F<sub>1</sub> progeny of conifers. *Theoretical and Applied Genetics*, **83**: 194-200.
- Carreras i Raurell, J. (1985). *Estudis sobre la flora i la vegetació de St. Joan de l'Erm i de la vall de Sta. Magdalena (Pirineus catalans)*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Carreras i Raurell, J., Carrillo Ortuño, E., Masalles Saumell, R. M., Ninot Sugrañes, J. M. & Vigo Bonada, J. (1993). El poblament vegetal de les valls de Barravés i de Castanesa. I - Flora i vegetació. *Acta Botanica Barcinonensia*, **42**: 3-392.
- Carrillo, J. & Ninot, J. M. (1992). Flora i vegetació de les valls d'Espot i de Boí. *Arxius de la Secció de Ciències. Institut D'Estudis Catalans*, **XCIXI**.
- Casas, I., Díaz, R., Echevarría, J. E. & Gavilán, R. (1989). Datos sobre la vegetación de Morata de Tajuña (Madrid, España). *Lazaroa*, **11**: 61-76.
- Castiglione, S., Wang, G., Damiani, G., Bandi, C., Bisoffi, S. & Sala, F. (1993). RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 54-59.
- Cebolla, C., Rivas, M. A. & Soriano, C. (1983). Catálogo florístico del cañón del río Duratón (Segovia, España), II. *Rosaceae a Umbelliferae*. *Lazaroa*, **4**: 227-240.
- Centre Excursionista de Terrassa. (1986). Itineraris botànics de Sant Llorenç del Munt i Serra de l'Obac. *Arxius del Centre Excursionista de Terrassa*, **45-46**: 1092-1098.
- Centre Excursionista de Terrassa. (1987). Itinerari botànic: Canal del Pi Tort. *Arxius del Centre Excursionista de Terrassa*, **51-52**: 67-74.
- Centre Excursionista de Terrassa. (1988). Itinerari botànic: Camí de la Font Soleia. *Arxius del Centre Excursionista de Terrassa*, **54-55**: 241-246.
- Ceresuela, J.L. (1984). Algunas técnicas de propagación de *Colutea*. *Pastos*, **14**: 339-347.
- Chalmers, K. J., Waugh, R., Sprent, J. I., Simons, A. J. & Powell, W. (1992). Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*, **69**: 465-472.

- Cherry, J. P., Katterman, F. R. M. & Endrizzi, J. E. (1972). Seed esterases, leucine aminopeptidases and catalases of species of the genus *Gossypium*. *Theoretical and Applied Genetics*, **42**: 218-226.
- Chung, M.G., Hamrick, J.L., Jones, S.B. & Derda, G.S. (1991). Isozyme variation within and among populations of *Hosta* (Liliaceae) in Korea. *Systematic Botany*, **16**: 667-684.
- Clausen, J., Keck, D.D. & Hiesey, W.M. (1940). *Experimental studies on the nature of species. I. The effect of varied environments on Western North American plants*. Carnegie Institution of Washington Publication N° 520, Washington.
- Clifford, H. T. & Stephenson, W. (1975). *An introduction to numerical classification*. Academic Press, New York.
- Conca Ferrús, A. & García Alonso, F. (1994). *Estudi botànic de la Vall d'Albaida (zona occidental)*. Ajuntament d'Ontinyent, Ontinyent.
- Conejero, V. & Semancik, J. S. (1977). Analysis of the proteins in crude plant extracts by polyacrylamide slab gel electrophoresis. *Phytopathology*, **67**: 1424-1426.
- Costa, M. (1974). Estudio fitosociológico de los matorrales de la provincia de Madrid. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **31**: 225-315.
- Costa Tenorio, M. (1978). *Flora y vegetación de la Alcarria de Cuenca*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Crawford, D. J. (1983). Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. En: *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A*. S. D. Tanksley & T. H. Orton (Eds.), págs. 257-287. Elsevier, Amsterdam.
- Crawford, D. J. (1989). Enzyme electrophoresis and plant systematics. En: *Isozymes in plant biology*. D. E. Soltis & P. S. Soltis (Eds.), págs. 146-164. Chapman and Hall, London.
- Crawford, D. J. & Bayer, R. J. (1981). Allozyme divergence in *Coreopsis cyclocarpa* (Compositae). *Systematic Botany*, **6**: 373-379.
- Crawford, D. J. & Wilson, H. D. (1979). Allozyme variation in several closely related diploid species of *Chenopodium* of the western United States. *American Journal of Botany*, **66**: 237-244.
- Crespo Villalba, M. B. (1989). *Contribución al estudio florístico, fitosociológico y fitogeográfico de la Serra Calderona*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Valencia.
- Crewther, W. G. & Lennox, F. G. (1953). Enzymes of *Aspergillus oryzae*. III. The sequence of appearance and some properties of the enzymes liberated during growth. *Australian Journal of Biological Sciences*, **6**: 410-427.
- Crisci, J. & López, M. (1983). *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Organización de Estados Americanos, Washington D.C.
- Crovello, T.J. (1968a). A numerical taxonomic study of the genus *Salix*, section *Sitchenses*. *University of California Publications in Botany*, **44**: 1-61.

- Crovello, T.J. (1968b). The effect of change of number of OTU's in a numerical taxonomic study. *Brittonia*, **20**: 346-367.
- Czeczott, H. (1939). *A contribution to the knowledge of the flora and vegetation of Turkey*.
- de Candolle, A.P. (1841). *Vegetable organography; or an analytical description of the organs of plants*, vol. 1. Houlston & Stoneman, London.
- de la Torre, A. (1989). *Flora, vegetación y suelos de la Sierra del Maigmo (Alicante)*. Publicaciones de la Caja Provincial 149, Alicante.
- Demeke, T., Adams, R. P. & Chibbar, R. (1992). Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, **84**: 990-994.
- Doyle, J. J. (1993). DNA, phylogeny, and the flowering of plant systematics. *BioScience*, **43**: 380-389.
- Duncan, T. & Baum, B.R. (1981). Numerical phenetics: its uses in botanical systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **12**: 387-404.
- Dunn, G. & Everitt, B. S. (1982). *An introduction to mathematical taxonomy*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dweikat, I., Mackenzie, S., Levy, M. & Ohm, H. (1993). Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**: 497-505.
- Egido Pérez, P. (1984). *Contribución al conocimiento de la flórua toledana (Toledo, Polán y La Puebla de Montalbán)*. Tesis de licenciatura. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Ellstrand, N. C. (1984). Multiple paternity within the fruits of the wild *Raphanus sativus*. *American Naturalist*, **123**: 819-828.
- Endler, J. A. (1979). Gene flow and life history patterns. *Genetics*, **93**: 263-284.
- Erviti, J. (1991). Estudio florístico de la Navarra media oriental. *Fontqueria*, **31**: 1-134.
- Fearon, W.R. & Bell, E.A. (1955). Canavanine: detection and occurrence in *Colutea arborescens*. *Biochemical Journal*, **59**: 221-224.
- Fernández Alonso, J. L. (1986). Fragmenta Chorologica Occidentalia 494-521. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **43**: 162.
- Fernández Corrales, P. (1984). *Catálogo florístico de la cuenca hidrográfica del río Bembézar*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, Córdoba.
- Fernández Díez, F. J. (1974). *Estudio de la flora y vegetación de la Sierra de Tamames y Peña de Francia*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, Salamanca.
- Fernández, J.A., Sanz, J. & Jouve, N. (1987). Biochemical variation to determine phylogenetic relationships between *Hordeum chilense* and other american species of the genus *Hordeum* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **157**: 105-119.



- Ferrer, J. J. (1986). *Estudio florístico y aspectos geobotánicos de las sierras de Herrera, Cucalón y Fonfría*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Zaragoza.
- Font Quer, P. (1988). *Plantas medicinales. El Dioscórides renovado*. 11ª edición, Labor, Barcelona.
- Foolad, M. R., Jones, R. A. & Rodriguez, R. L. (1993). RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. *Plant Cell Reports*, **12**: 293-297.
- Francisco-Ortega, J., Newbury, H. J. & Ford-Lloyd, B. V. (1993). Numerical analyses of RAPD data highlight the origin of cultivated tagasaste (*Chamaecytisus proliferus* ssp. *palmensis*) in the Canary Islands. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 264-270.
- Fransz, P. F., De Ruijter, N. C. A. & Schel, J. H. N. (1989). Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*, **8**: 67-70.
- Fritsch, P., Hanson, M. A., Spore, C. D., Pack, P. E. & Rieseberg, L. H. (1993). Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, **11**: 10-20.
- Fuchs, L. (1543). *New Kreuterbuch*.
- Fuente, V. (1982). *Estudio de la flora y vegetación del territorio occidental serrano de la provincia de Guadalajara (Comarcas de Tamajón y Valdepeñas de la Sierra)*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Fukuoka, S., Hosaka, K. & Kamijima, O. (1992). Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Japanese Journal of Genetics*, **67**: 243-252.
- Galán Mera, A. (1985). Datos florísticos sobre la comarca de Torrelaguna (Madrid, España). *Lazaroa*, **8**: 383-385.
- García Fayos, P., Aguilera, A., Mansanet, J. & Mateo, G. (1984). Datos florísticos sobre la Serra Calderona (Valencia). *Collectanea Botanica*, **15**: 241-247.
- García Martínez, M. & Fernández López, C. (1986). Corología de plantas giennenses. Leguminosas II. *Blancoana*, **4**: 21-40.
- García Montoya, F. (1989). *Catálogo florístico de la campiña alta de la provincia de Córdoba*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, Córdoba.
- Gastony, G. J. (1986). Electrophoretic evidence for the origin of fern species by unreduced spores. *American Journal of Botany*, **73**: 1563-1569.
- Gelfand, D. H. & White, T. J. (1990). Thermostable DNA polymerases. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. White (Eds.), págs. 129-141. Academic Press, San Diego.
- Gil, J. & Cubero, J.I. (1993). Multivariate analysis of the *Vicia sativa* L. aggregate. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **113**: 389-400.

- Gillespie, J.H. & Langley, C.H. (1974). A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics*, **76**: 837-852.
- Gillespie, J. M., Jermyn, M. A. & Woods, E. F. (1952). Multiple nature of the enzymes of *Aspergillus oryzae* and of horse-radish. *Nature*, **169**: 487-488.
- Gillespie, J. M. & Woods, E. F. (1953). Enzymes of *Aspergillus oryzae*. V. Ethanal fractionation at low ionic strengths. *Australian Journal of Biological Sciences*, **6**: 447-462.
- Gilmartin, A.J. & Harvey, M.J. (1976). Numerical phenetics in routine taxonomic work. *Systematic Botany*, **1**: 35-45.
- Glaszmann, J.C., Fautret, A., Noyer, J.L., Feldmann, P. & Lanaud, C. (1989). Biochemical genetic markers in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, **78**: 537-543
- Glazner, J.T., Devlin, B. & Ellstrand, N.C. (1988). Biochemical and morphological evidence for host race evolution in desert mistletoe, *Phoradendron californicum* (Viscaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **161**: 13-21.
- Gnanadesikan, R. (1977). *Methods for statistical data analysis of multivariate observations*. Wiley, New York.
- Gottlieb, L. D. (1973). Genetic control of glutamate oxaloacetate transaminase isozymes in the diploid plant *Stephanomeria exigua* and its allotetraploid derivative. *Biochemical Genetic*, **9**: 97-107.
- Gottlieb, L. D. (1977). Electrophoretic evidence and plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **64**: 161-180.
- Gottlieb, L.D. (1981). Electrophoretic evidence and plant populations. *Progress in Phytochemistry*, **7**: 1-46.
- Gottlieb, L.D. (1982). Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science*, **216**: 373-380.
- Gottlieb, L. D. (1984). Electrophoretic analysis of the phylogeny of the self-pollinating populations of *Clarkia xantiana*. *Plant Systematic and Evolution*, **147**: 91-102.
- Gottlieb, L. D. & Pilz, G. (1976). Genetic similarity between *Gaura longifolia* and its obligately outcrossing derivative *G. demareei*. *Systematic Botany*, **1**: 181-187.
- Gower, J. C. (1966). Some distances properties of latent root and vectors methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, **53**: 315-328.
- Grange, A. (1976). *Effect de conditions de conservation sur la structure et l'activité des protéines de graines de Phaseolus vulgaris var. Contender. Applications taxonomiques*. Tesis Doctoral. Universidad de Ginebra.
- Halward, T., Stalker, T., LaRue, E. & Kochert, G. (1992). Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Molecular Biology*, **18**: 315-325.

- Hamrick, J. L. & Godt, M. J. (1989). Allozyme diversity in plant species. En: *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler & B. S. Weir (Eds.), págs. 43-63. Sinauer Associates, Sunderland.
- Hattori, J. & Johnson, D.A. (1985). The detection of leghemoglobin-line sequences in legumes and non-legumes. *Plant Molecular Biology*, **4**: 285-292.
- Havey, M.J. & Muehlbauer, F.J. (1989). Variability for restriction fragment lengths and phylogenies in lentil. *Theoretical and Applied Genetics*, **77**: 839-843.
- Hernández i Cardona, A. M. (1993). *Estudi florístic de Sant Llorenç del Munt i L'Obac*. Barcelona.
- Herranz Sanz, J. M. & Gómez Campo, C. (1986). *Contribución al conocimiento de la flora y vegetación de la comarca de Alcaraz (Albacete)*. Caja de Ahorros de Albacete, Murcia.
- Heum, M., Murphy, J. P. & Phillips, T. D. (1994). A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 689-696.
- Heywood, J. S. (1986). Clinal variation associated with edaphic ecotones in hybrid populations of *Gaillardia pulchella*. *Evolution*, **40**: 1132-1140.
- Høiland, K. & Laane, M.M. (1989). Flower substances in the extremely disjunct species *Oxytrpis deflexa* and their phytogeographical implications. *Canadian Journal of Botany*, **67**: 218-224.
- Holsinger, K. E. & Gottlieb, L. D. (1988). Isozyme variability in the tetraploid *Clarkia gracilis* (*Onagraceae*) and its diploids relatives. *Systematic Botany*, **13**: 1-6.
- Hu, J. & Quirós, C. F. (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reports*, **10**: 505-511.
- Huff, D. R., Peakall, R. & Smouse, P. E. (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 927-934.
- Hunter, R. L. & Markert, C. L. (1957). Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, **125**: 1294-1295.
- Hutchinson, J. (1964). *The genera of flowering plants, Vol. 1*. Oxford University Press, Oxford.
- Innis, M. A. & Gelfand, D. H. (1990). Optimization of PCRs. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Eds.), págs. 3-12. Academic Press, San Diego.
- International Union of Biochemistry Nomenclature Committee (1984). *Enzyme nomenclature 1984*. Academic Press, New York.
- Izco, J. (1972). Coscojales, romerales y tomillares de la provincia de Madrid. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **29**: 69-108.

- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Societe Vaudoise de Sciences Naturelles*, **44**: 223-270.
- Jain, S.K. & Singh, R.S. (1979). Population biology of *Avena*. VII. Allozyme variation in relation to the genome analysis. *Botanical Gazette (Crawfordsville)*, **140**: 356-362.
- James, F. C. & McCulloch, C. E. (1990). Multivariate analysis in ecology and systematics: Panacea or Pandora's box?. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**: 129-166.
- Jardine, N. & Sibson, R. (1971). *Mathematical taxonomy*. Wiley, London.
- Jefferies, R. L. & Gottlieb, L. D. (1982). Genetic differentiation of the microspecies *Salicornia europaea* L. (*sensu stricto*) and *S. ramosissima* J. Woods. *New Phytologist*, **92**: 123-129.
- Jensen, R.J., McLeod, M.J., Eshbaugh, W.H. & Guttman, S.I. (1979). Numerical taxonomic analyses of allozymic variation in *Capsicum* (*Solanaceae*). *Taxon*, **28**: 315-327.
- Johnson, H.B. (1975). Plant pubescence: an ecological perspective. *Botanical Review*, **41**: 233-258.
- Kaemmer, D., Afza, R., Weising, K., Kahl, G. & Novak, F. J. (1992). Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). *Bio/Technology*, **10**: 1030-1035.
- Kazan, K., Manners, J. M. & Cameron, D. F. (1993). Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**: 882-888.
- Keohavong, P. & Thilly, W. G. (1989). Fidelity of DNA polymerase in DNA amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **86**: 9253-9257.
- Klein-Lankhorst, R. M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T. & Zabel, P. (1991). Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theoretical and Applied Genetics*, **83**: 108-114.
- Koch, K. 1884. *Die Bäume und Sträucher des Alten Griechenlandes*.
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J. M. & Gessler, C. (1993). Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**: 901-904.
- Kresovich, S., Williams, J. G. K., McFerson, J. R., Routman, E. J. & Schaal, B. A. (1992). Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**: 190-196.
- Kruskal, J. B. (1964). Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika*, **29**: 28-42.
- Lamarck, J.-B.A.P. (1783-1817). *Encyclopédie méthodique. Botanique...* Paris, Lieja.

- Landry, B.S., Kesseli, R., Leung, H. & Michelmore, R.W. (1987). Comparison of restriction endonucleases and sources of probes for their efficiency in detecting restriction fragment length polymorphisms in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **74**: 646-653.
- Lapraz, G. (1954). Contribution à l'étude de la flora de Catalogne (II. Apetales et Diapetales). *Collectanea Botanica*, **4**: 41-52.
- Laza Palacios, M. (1945). Estudios sobre la flora y la vegetación de las sierras Tejada y Almijara. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **6**: 217-371.
- Levin, D.A. (1973). The role of trichomes in plant defense. *Quarterly Review of Biology*, **48**: 3-15.
- Linnaeus, C. (1737). *Genera Plantarum*.
- Lobelius (1576). *Plantarum seu stirpium historia*.
- López, G. (1976). *Contribución al estudio florístico y fitosociológico de la Serranía de Cuenca*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Losa, J. M. (1975). Aspectos de la vegetación del Coll de Burriac (Cabrera de Mataró, Barcelona). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **32**: 503-519.
- Lourenco, E. J. & Neves, V. A. (1984). Partial purification and some properties of shikimate dehydrogenase from tomatoes. *Phytochemistry*, **23**: 497-499.
- Mailer, R. J., Scarth, R. & Fristensky, B. (1994). Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 697-704.
- Malagarriga, R. (1971). *Flora de la provincia de Tarragona*. Diputación de Tarragona, Tarragona.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Markert, C. L. & Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **45**: 753-763.
- Marshall, D.R. & Brown, A.H.D. (1975). The charge-state model of protein polymorphism in natural populations. *Journal of Molecular Evolution*, **6**: 149-163.
- Martín, M. C. & Pérez, C. (1993). The use of RAPD to determine the genetic variability of micropropagated plants from endangered species. Application to the Spanish endemism, *Limonium estevei*. *Phyton*, **56**: 65-72.
- Martin, G. B., Williams, J. G. K. & Tanksley, S. D. (1991). Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**: 2336-2340.

- Martínez Parras, J. M. (1978). *Estudio florístico y fitosociológico de las Sierras de Guájares, de Cázulas y del Chaparral*. Tesis Doctorales de la Universidad de Granada 217, Granada.
- Masalles i Saumell, R. M. (1983). Flora i vegetació de la conca de Barberá. *Arxius de la Secció de Ciències. Institut D'Estudis Catalans*, **LXVIII**.
- Masalles i Saumell, R. M. & Pujadas, J. (1977). Notes florístiques. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural, Secció Botànica*, **41**: 5-16.
- Masclans i Girves, F. (1966). Flora del Segrià i l'Urgell, a la plana occidental catalana. *Arxius de la Secció de Ciències. Institut D'Estudis Catalans*. **XXX**.
- Mateo, G. (1984). *Estudio sobre la flora y vegetación de las sierras de Mira y Talayuelas*. Monografías 31. ICONA, Madrid.
- Mateo, G. (1990). *Catálogo florístico de la provincia de Teruel*. Instituto de Estudios Turolenses. Diputación Provincial de Teruel, Teruel.
- Mateo, G. & Figuerola, R. (1987). *Flora analítica de la provincia de Valencia*. Eds. Alfons el Magnànim, Valencia.
- Matson, R.H. (1984). Applications of electrophoretic data in avian systematics. *Auk*, **101**: 717-729.
- May, T. (1987). Algunas especies notables en las sierras costeras de la provincia de Granada. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **44**: 113-118.
- Mayor López, M. (1965). *Estudio de la flora y vegetación de las sierras de Pela, Ayllón y Somosierra*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Mayr, E. (1965). Numerical phenetics and taxonomic theory. *Systematic Zoology*, **14**: 73-97.
- Mayr, E. (1978). Origin and history of some terms in systematic and evolutionary biology. *Systematic Zoology*, **27**: 83-88.
- Mazimpaka, V. (1982). *Contribución al estudio de la flora y vegetación de la cuenca del Alto Tajo. Tránsito Alcarria-Sistema Ibérico (provincia de Guadalajara)*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- McNeill, J. (1979). Purposeful phenetics. *Systematic Zoology*, **28**: 465-482.
- Meerow, A.W. (1987). Biosystematics of tetraploid *Eucharis* (Amaryllidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **74**: 291-309.
- Meerow, A.W. (1989). Biosystematics of two sympatric species of *Eucharis* (Amaryllidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **166**: 11-30.
- Menten, M. L., Junge, J. & Green, M. (1944). A coupling histochemical azo dye test for alkaline phosphatase in the kidney. *Journal of Biology and Chemistry*, **153**: 471-477.
- Michelmore, R. W., Paran, I. & Kesseli, R. V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect

- markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**: 9828-9832.
- Michener, C.D. & Sokal, R.R. (1957). A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution*, **11**: 130-162.
- Microcal Software Inc. (1993). Microcal Origin v. 2,94. Northampton, USA.
- Microsoft (1985-1991). Excel v. 3. Seattle, USA.
- Molero, J. (1976). *Estudio florístico y fitogeográfico de la Sierra de Montsant y su área de influencia*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Molero-Mesa, J. & Pérez-Raya, F. (1987). *La flora de Sierra Nevada*. Universidad de Granada, Diputación de Granada, Granada.
- Montserrat i Martí, G. (1987). *Catálogo florístico del Macizo de Cotiella y la Sierra de Chia (Prepirineo aragonés)*. Colección de Estudios Altoaragoneses, 19. Instituto de Estudios Altoaragoneses, CSIC.
- Montserrat i Martí, G. & Gómez García, J. D. (1981). Aportación a la flora del Pirineo central. *Collectanea Botanica*, **12**: 121-132.
- Montserrat i Martí, J. M. (1987). *Flora y vegetación de la Sierra de Guara (Prepirineo aragonés)*. Serie Naturaleza en Aragón, 1. Diputación General de Aragón.
- Montserrat, P. (1968). *Flora de la cordillera litoral catalana (porción comprendida entre los ríos Besós y Tordera)*. Caixa d'Estalvis de Mataró, Barcelona.
- Moreno, N.P. (1984). *Glosario botánico ilustrado*. CECSA, México.
- Moreno Sáiz, J.C. & Sáinz Ollero, H. (1989). Aproximación a la bibliografía florística básica de la Península Ibérica e islas Baleares. *Botánica Complutensis*, **15**: 175-202.
- Moreno Sáiz, J.C. & Sáinz Ollero, H. (1992). *Atlas corológico de las monocotiledóneas endémicas de la Península Ibérica y Baleares*. Colección técnica. I.C.O.N.A., Madrid.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**: 335-350.
- Muñoz Alvarez, J. M. & Domínguez Vilches (1985). *Catálogo florístico del Sur de la provincia de Córdoba*. Depto. Botánica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba, Córdoba.
- Murphy, R. W., Sites, J. W., Buth, D. G. & Haufler, C. H. (1990). Proteins I: isozyme electrophoresis. En: *Molecular systematics*. D. M. Hillis & C. Moritz (Eds.), págs 45-126. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Nebot, J.R., Torre, A. de la, Mateo, G. & Alcaraz, F. (1990). Materiales para la actualización del catálogo florístico de la provincia de Alicante. *Anales de Biología (Murcia)*, **16**: 99-129.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583.

- Nei, M. & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **76**: 5269-5273.
- Newbury, H. J. & Ford-Lloyd, B. V. (1993). The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regulation*, **12**: 43-51.
- Nieto, J. M. & Cabezudo, B. (1988). Series de vegetación climatófilas de las sierras Tejada y Almijara (Málaga-Granada, España). *Acta Botanica Malacitana*, **13**: 229-260.
- Ninot, J. M., Romo, A. & Sesé, J. A. (1993). *Macizo del Turbón y Sierra de Sis. Flora, paisaje vegetal e itinerarios. Naturaleza en Aragón*, 6. Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes. Gobierno de Aragón, Zaragoza.
- Norusis, M.J. (1986). *SPSS/PC+ Advanced Statistics*. SPSS Inc., Chicago.
- Nuet i Badia, J. (1987). *Flòrula vascular de la muntanya dels Mollons (La Pobla de Claramunt, Anoia)*. Fundació Salvador Vives Casajuana, Barcelona.
- Nuet, J. & Panareda, J. M. (1991). *Flora de Montserrat*. Publicacions de L'Abadia de Montserrat, Barcelona.
- Olmo, P. & Alcaraz, F. (1985). Catálogo de la flora cormofítica de la Sierra de Ricote (Murcia, SE de España). *Anales de Biología de la Universidad de Murcia*, **6**: 61-78.
- Olszewska, M.J. & Osiecka, R. (1984). The relationship between 2 cDNA content, systematic position, and the level of nuclear endoreplication during differentiation of root parenchyma in some dicotyledonous shrubs and trees. Comparison with herbaceous species. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **179**: 641-657.
- Orozco-Castillo, C., Chalmers, K. J., Waugh, R. & Powell, W. (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 934-940.
- Oxnard, C.E. (1978). One biologist's view of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **9**: 219-241.
- Pajarón, S. (1988). *Estudio fitográfico del Barranco del río Madera*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Pasquet, R.S. (1993). Variation at isozyme loci in wild *Vigna unguiculata* (Fabaceae, Phaseolae). *Plant Systematics and Evolution*, **186**: 157-173.
- Pearse, A. G. E. (1972). *Histochemistry. Theoretical and applied. Volume 2*. Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Pérez Díaz, M., Pintó, J. & Troya, F. (1989). Vegetació de la Canal de Santa Agnès. *Axius del centre Excursionista de Terrassa*, **58**: 366-378.
- Peris, J. B. (1983). *Contribución al estudio florístico y fitosociológico de las sierras del Boquerón y Palomera*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Valencia.
- Poverene, M.M. & Curvetto, N.R. (1989). Esterase isozyme variation in the *Eragrostis curvula* complex (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **166**: 173-181.



- Powell, W., Phillips, M. S., McNicol, J. W. & Waugh, R. (1991). The use of DNA markers to estimate the extent and nature of genetic variability in *Solanum tuberosum* cultivars. *Annals of Applied Biology*, **118**: 423-432.
- Prakash, S., Lewontin, R. C. & Hubby, J. L. (1969). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **61**: 841-858.
- Prince, J.P., Loaiza-Figueroa, F. & Tanksley, S.D. (1992). Restriction fragment length polymorphism and genetic distance among Mexican accessions of *Capsicum*. *Genome*, **35**: 726-732.
- Quirós, C. F., Hu, J., This, P., Chevre, A. M. & Delseny, M. (1991). Development and chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, **82**: 627-632.
- Raymond, R. (1958). Coluteoside, a flavonoid of leaves and flowers of *Colutea arborescens*. *Compt. rend.*, **257**: 236-238.
- Reiter, R. S., Williams, J. G. K., Feldmann, K. A., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. & Scolnik, P. A. (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and RAPDs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **89**: 1477-1481.
- Rigual Magallón, A. (1972). *Estudio de la flora y vegetación de la provincia de Alicante*. Instituto de Estudios Alicantinos, Alicante.
- Rivas Goday, S. & Borja, J. (1961). Estudio de vegetación y flórua del Macizo de Gúdar y Jabalambre. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **19**: 1-550.
- Rivas Goday, S. & Fernández Galiano, E. (1951). Preclímax y postclímax de origen edáfico. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **10**: 455-506.
- Rivas Martínez, S. & Costa, M. (1969-70). Comunidades gipsícolas del centro de España. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **27**: 193-223.
- Roberts, D. W. A. (1956). Wheat leaf phosphatase. I. A survey of the inhibitors at pH 5.7. *Journal of Biology and Chemistry*, **219**: 711-718.
- Roberts, M. L. (1983). Allozyme variation in *Bidens discoidea* (Compositae). *Brittonia*, **35**: 239-247.
- Rogers, J. S. (1972). Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics VII, University of Texas*, **7213**: 145-153.
- Rohlf, F. J. (1970). Adaptive hierarchical clustering schemes. *Systematic Zoology*, **19**: 58-82.
- Rohlf, F. J. (1990). NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 1.60. Applied Biostatistics, New York.
- Rohlf, F. J. & Sokal, R. R. (1981). Comparing numerical taxonomic studies. *Systematic Zoology*, **30**: 459-490.

- Romero, T & Rico, E. (1989). Flora de la cuenca del río Duratón. *Ruizia*, **8**: 1-440.
- Romo i Díez, A. M. (1989a). *Plantas vasculares del cuadrat UTM 31TCG46. Abella de la Conca*. ORCA: Catàlegs florístic locals, 2. Institut D'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques, Barcelona.
- Romo i Díez, A. M. (1989b). Flora i vegetació del Montsec (Prepirineus catalans). *Arxius de la Secció de Ciències. Institut D'Estudis Catalans*, **XC**.
- Roose, M. L. & Gottlieb, L. D. (1976). Genetic and biochemical consequences of polyploidy in *Tragopogon*. *Evolution*, **30**: 818-830.
- Rosell, A. (1978). *Flora i vegetació de la conca de la Clusa-Alt Berguedà*. Tesis de licenciatura. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Roselló, R. (1992). *Catálogo florístico y vegetación de la comarca del Alto Mijares (Castellón)*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Valencia.
- Rosenthal, G.A. (1977). Nitrogen allocation of L- canavanine synthesis and its relationship to chemical defense of the seed. *Biochemical Systematics and Ecology*, **5**: 219-220.
- Rowland, L. J. & Levi, A. (1994). RAPD-based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species (*Vaccinium darrowi* and *V. elliottii*). *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 863-868.
- Ruellius (1537). *De natura stirpium libri tres*.
- Ruiz de Clavijo, E., Cabezudo, B. & Domínguez, E. (1984). Contribución al estudio florístico de las serranías subbéticas de la provincia de Sevilla. *Acta Botanica Malacitana*, **9**: 169-232.
- Ruiz de la Torre, J., Abajo, A., Carmona, E., Escribano, R., Ortega, C., Rodríguez, A. & Ruiz del Castillo, J. (1982). *Aproximación al catálogo de plantas vasculares de la provincia de Madrid*. Consejería de Agricultura y Ganadería, Monografías 4. Comunidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Sagredo, R. (1987). *Flora de Almería*. Instituto de Estudios Almerienses, Almería.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
- Sánchez García, M. E. (1974). *Estudio florístico y fitosociológico de Sierra Elvira y vega de Granada*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Granada.
- Sánchez-Yélamo, M. D. (1990). Relaciones quimiotaxonómicas y evolutivas en el complejo *Diplotaxis - Erucastrum - Brassica* (*Cruciferae - Brassiceae*) mediante análisis cromatográficos y electroforéticos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Sánchez-Yélamo, M. D. (1992). Isoenzyme electrophoretic studies among some species of the genus *Erucastrum* and *Hirschfeldia incana* (*Cruciferae: Brassiceae*) with

- reference to their chemotaxonomic relationships. *Biochemical Systematics and Ecology*, **20**: 631-637.
- Sánchez-Yélamo, M. D. & Martínez-Laborde, J.B. (1991). Chemotaxonomic approach to *Diplotaxis muralis* (Cruciferae: Brassiceae) and related species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **19**: 477-482.
- Scandalios, J.G. (1974). Isozymes in development and differentiation. *Annual Review of Plant Physiology*, **25**: 225-258.
- Schierwater, B. & Ender, A. (1993). Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Research*, **21**: 4647-4648.
- Schlegel, M., Steinbrück, G., Hahn, K. & Röttger, B. (1989). Interspecific relationship of ten european orchid species as revealed by enzyme electrophoresis. *Plant Systematics and Evolution*, **163**: 107-119.
- Schneider, C.K. (1907). *Illustriertes Handbuch der Laubgehölzkunde*.
- Schwennesen, J., Mielke, E. A. & Wolfe, W. H. (1982). Identification of seedless table grape cultivars and bud sport with berry isozymes. *HortScience*, **17**: 366-368.
- Seligman, A. M. & Rutenburg, A. M. (1951). The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science*, **113**: 317-320.
- Shannon, L. (1983). Structural relationships and properties of legume lectins. *Lectins: Biol., Biochem., Clin. Biochem.*, **3**: 573-581.
- Shaw, C. R. (1970). How many genes evolve ?. *Biochemical Genetics*, **4**: 275-283.
- Shaparenko, K.K. (1940). Fossil Leguminosae and some questions concerning the classification of paleobotanical findings. *Botanical Journal of URSS*, **25**: 102-121.
- Shaparenko, K.K. (1956). Istorija Salwinij. *Paleobotanika*, **2**: 13.
- Singer, T. P., Kearney, E. B. & Massey, V. (1957). Newer knowledge of succinic dehydrogenase. *Advances in Enzymology*, **18**: 65-111.
- Small, E. (1981). A numerical analysis of major groupings in *Medicago* employing traditionally used characters. *Canadian Journal of Botany*, **59**: 1553-1577.
- Smithies, O. (1955). Zone electrophoresis in starch gels. *Biochemical Journal*, **61**: 629.
- Smouse, P.E., Long, J.C. & Sokal, R.R. (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*, **35**: 627-632.
- Smythies, B. E. (1976). Contribution to the flora of Málaga. *Acta Botanica Malacitana*, **2**: 65-114.
- Sneath, P.H.A. (1957). The application of computers to taxonomy. *Journal Gen. Microbiology*, **17**: 201-226.
- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco.

- Sobral, B. W. S. & Honeycutt, R. J. (1993). High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 105-112.
- Software Publishing Corporation (1991). Harvard Graphics v. 3.0.
- Sokal, R. R. (1986). Phenetics taxonomy: theory and methods. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **17**: 423-442.
- Sokal, R.R., Fiala, K.L. & Hart, G. (1984). OTU stability and factors determining taxonomic stability: examples from the Caminalcules and the Leptopodomorpha. *Systematic Zoology*, **33**: 387-407.
- Sokal, R.R. & Sneath, P.H.A. (1963). *Principles of numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Soltis, D. E. & Rieseberg, L. J. (1986). Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (*Saxifragaceae*): genetic insights from enzyme electrophoresis. *American Journal of Botany*, **73**: 310-318.
- Stalker, H.T. (1990). A morphological appraisal of wild species in section *Arachis* of peanuts. *Peanut Sciences*, **17**: 117 - 122.
- Stalker, H.T., Phillips, T.D., Murphy, J.P. & Jones, T.M. (1994). Variation of isozyme patterns among *Arachis* species. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 746-755.
- Stiles, J. I., Lemme, C., Sondur, S., Morshidi, M. B. & Manshardt, R. (1993). Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**: 697-701.
- Stuessy, T.F. (1990). *Plant taxonomy*. Columbia University Press, New York.
- Tanksley, S. D. (1979). Linkage, chromosomal association and expression of Adh-1 and Pgm-2 in tomato. *Biochemical Genetics*, **17**: 1159-1167.
- Tanksley, S. D. & Rick, C. M. (1980). Isozymic gene linkage map of the tomato: applications in genetics and breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, **57**: 161-170.
- Tao, Y., Manners, J. M., Ludlow, M. M. & Henzell, R. G. (1993). DNA polymorphisms in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.). *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 679-688.
- Thorpe, R.S. (1976). Biometric analysis of geographic variation and racial varieties. *Biological Reviews*, **51**: 407 - 452.
- Thunberg, C.P. (1794). *Prodromus plantarum Capensium*.
- Tinker, N.A., Fortin, M.G. & Mather, D.E. (1993). Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**: 976-984.
- Torres Espuny, L. (1989). *Flora del Massís del Port*. Diputació de Tarragona, Tarragona.

- Torres, A. M., Weeden, N. F. & Martin, A. (1993). Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**: 937-945.
- Tournefort, J.P. (1700). *Institutiones rei herbariae*.
- Tukey, J.W. (1977). *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley Publishing, Reading (USA).
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. & Webb, D.A. (1964-1980). *Flora Europæa*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Valdés, B., Talavera, S. & Fernández-Galiano, E. (1987). *Flora vascular de Andalucía occidental*. vols. I - III. Editorial Ketres, Barcelona.
- Valle, F. (1987). Los "retamales" béticos desarrollados sobre sustratos ricos en bases. *Lazaroa*, **7**: 37-37.
- Vallejos, C. E. (1983). Enzyme activity staining. En: *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A*. S. D. Tanksley & T. H. Orton (Eds.), págs. 469-516. Elsevier, Amsterdam.
- van de Ven, W. T. G., Duncan, N., Ramsay, G., Phillips, M., Powell, W. & Waugh, R. (1993). Taxonomic relationships between *V. faba* and its relatives based on nuclear and mitochondrial RFLPs and PCR analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 71-80.
- van der Meijden, R. (1990). *Flora van Nederland*. Wolter-Noordhoff, Groningen.
- van Heusden, A. W. & Bachmann, K. (1992a). Genotype relationships in *Microseris elegans* (Asteraceae, Lactuceae) revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). *Plant Systematics and Evolution*, **179**: 221-233.
- van Heusden, A. W. & Bachmann, K. (1992b). Nuclear DNA polymorphisms among strains of *Microseris bigelovii* (Asteraceae: Lactuceae) amplified from arbitrary primers. *Botanica Acta*, **105**: 331-336.
- Velasco, A., Marcos, N. & Cerezo, J. (1989). Ensayo fitotopográfico sobre la vegetación de los montes de Toledo. *Boletim da Sociedade Broteriana, série 2*, **62**: 31-54.
- Velayos, M., Castilla, F. & Gamarra, R. (1991). *Corología ibérica, I*. Archivos de *Flora Iberica* nº 2. Real Jardín Botánico-I.C.Y.T / C.S.I.C., Madrid.
- Vigo, J. (1968). La vegetació del Massís de Penyagolosa. *Arxius de la Secció de Ciències. Institut D'Estudis Catalans*, **XXXVII**.
- Vigo, J. (1983). El poblament vegetal de la vall de Ribes. I. Generalitats. Catàleg floristic. *Acta Botanica Barcinonensia*, **35**: 3-793.
- Villar, L. (1980). Catálogo florístico del Pirineo Occidental español. *Publicaciones del Centro Pirenaico de Biología Experimental*, **11**: 7-422.
- Vives Codina, J. (1964). Vegetación de la alta cuenca del Cardener. *Acta Geobotanica Barcinonensia*, **1**: 1-218.

- Von der Dunk, K. (1979). Poisonous plants in our environment. XXIII. Laburnum (*Laburnum anagyroides* Med.), pea tree (*Caragana arborescens*) and bladder senna (*Colutea arborescens* Lam.). *PTA Prakt. Pharm.*, **8**: 172-175.
- Wake, D. B. (1981). The application of allozyme evidence to problems in the evolution of morphology. En: *Evolution today*. G. G. E. Scudder & J. L. Reveal (Eds.), págs. 257-270. Carnegie-Mellon University Press, Pittsburgh.
- Warming, E. (1909). *Oecology of plants: an introduction to the study of plant communities*. Oxford University Press, London.
- Waugh, R. & Powell, W. (1992). Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology*, **10**: 186-191.
- Weining, S. & Langridge, P. (1991). Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theoretical and Applied Genetics*, **82**: 209-216.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**(24): 7213-7218.
- Welsh, J., Honeycutt, R. J., McClelland, M. & Sobral, B. W. S. (1991). Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theoretical and Applied Genetics*, **82**: 473-476.
- Wendel, J. F. & Weeden, N. F. (1990a). Visualization and interpretation of plant isozymes. En: *Isozymes in plant biology*. D. E. Soltis & P. S. Soltis (Eds.), págs. 5-45. Chapman and Hall, London.
- Weeden, N.F. & Wendel, J.F. (1990b). Genetics of plant isozymes. En *Isozymes in plant biology* D.E. Soltis & P. S. Soltis (Eds.), págs. 46-72. Chapman and Hall, London.
- Werth, C. R., Guttman, S. I. & Eshbaugh, W. H. (1985). Recurring origins of allopolyploid species in *Asplenium*. *Science*, **228**: 731-733.
- Whalen, M. D. (1979). Allozyme variation and evolution in *Solanum* section *Androceras*. *Systematic Botany*, **4**: 203-222.
- Wilde, J., Waugh, R. & Powell, W. (1992). Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **83**: 871-877.
- Wilkie, S. E., Isaac, P. G. & Slater, R. J. (1993). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 497-504.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**(22): 6531-6535.
- Williams, J. G. K., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1993). Genetic analysis using RAPD markers. *Methods in Enzymology*, **218**: 704-740.

- Williams, W.T. (1971). Principles of clustering. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **2**: 303-326.
- Willkomm, M. & Lange, J. (1870). *Prodromus Floræ hispanicæ*. Stuttgart.
- Wolff, K. & Peters-van Rijn, J. (1993). Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity*, **71**: 335-341.
- Xu, Y.-S., Clark, M. S. & Pehu, E. (1993). Use of RAPD markers to screen somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Plant Cell Reports*, **12**: 107-109.
- Yang, X. & Quirós, C. (1993). Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 205-212.
- Yu, K. & Pauls, K. P. (1993). Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by amplification of bulked genomic DNA samples. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 788-794.