

Evidencia de introgresión en *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* (Cistaceae) a partir de marcadores moleculares RAPD

Juan F. Jiménez¹, Pedro Sánchez-Gómez¹ & Josep A. Rosselló²

¹ Departamento de Biología Vegetal (Botánica), Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, E-30100, Murcia.

² Jardí Botànic, Universidad de Valencia, c/ Quart 80, E-46008, Valencia.

Resumen

Correspondencia

P. Sánchez-Gómez

E-mail: psgomez@um.es

Tel.: +34 968 364999

Fax: +34 968 363917

Recibido: 2 Octubre 2007

Aceptado: 10 Noviembre 2007

En el presente trabajo se han utilizado 9 cebadores RAPD para estudiar la diferenciación genética entre los individuos de las poblaciones naturales existentes de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis* en Valencia y Murcia. Además, se ha incluido en el muestreo individuos de *C. albidus*, un individuo híbrido entre *C. albidus* y *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* y un individuo de *C. heterophyllus* s. str. del Norte de África. Los resultados obtenidos (cluster UPGMA, PCO) avalan la hipótesis de la introgresión genética de los individuos de la población murciana con *C. albidus*, así como la escasa consistencia taxonómica de la subespecie *carthaginensis*. Los datos obtenidos resultan de interés respecto a las pautas de conservación y gestión de la especie en la Península Ibérica.

Palabras clave: *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*, RAPD, Introgresión, Conservación.

Abstract

Evidence of introgression in Cistus heterophyllus subsp. carthaginensis (Cistaceae) using RAPD markers.

In this work nine RAPD primers were used to assess genetic differentiation among *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* from both Murcia and Valencia populations. In addition, we included a *C. albidus* population, a hybrid sample between *C. albidus* and *C. heterophyllus* subsp. *carthaginensis* and an individual of *C. heterophyllus* s. str. from Northern Africa. Our results (UPGMA cluster, PCO) suggest the existence of introgression processes in Murcian populations caused by inter-specific crosses with *C. albidus*, as well the taxonomic invalidity of subsp. *carthaginensis*. These results could be of interest to future conservation policies of *C. heterophyllus* in the Iberian Peninsula.

Keywords: *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*, RAPD, Introgression, Conservation

Introducción

Cistus heterophyllus Desf. subsp. *carthaginensis* (Pau) Crespo & Mateo es uno de los táxones más raros y amenazados de la flora europea. Fue descrito

a nivel específico (*C. carthaginensis* Pau) a partir de material recolectado en una población en el sureste ibérico, en las proximidades de la Sierra minera de Cartagena (Pau 1904), donde era considerado como localmente abundante (Jiménez 1903). Posteriormente,

diversos autores consideraron los individuos europeos muy similares a los procedentes del norte de África, abogando por asimilar taxonómicamente *C. carthagenensis* a *C. heterophyllus* (Vicioso 1945, Martín Bolaños & Guinea 1949, Warburg 1968). Sin embargo, el hallazgo de una nueva población en Valencia (constituida por un único individuo) llevó a reconsiderar su independencia taxonómica, proponiéndose el material europeo como subespecie (Crespo & Mateo 1988), tratamiento seguido en revisiones regionales (Demoly & Montserrat 1993). Demoly & Montserrat (1993) señalaron diferencias en la morfología seminal entre las dos poblaciones europeas. Recientemente, una exhaustiva revisión basada en un profundo estudio morfológico ha considerado a *C. heterophyllus* y *C. carthagenensis* como sinónimos taxonómicos (Navarro 2002).

La rareza de *C. heterophyllus* subsp. *carthagenensis* es tal que durante muchos años se pensó que se había extinguido en su localidad tipo (Esteve 1973), ya que la zona donde fue descrito ha sufrido una profunda transformación debido a la intensa actividad minera realizada durante el siglo XX. Sin embargo, fue redescubierta con posterioridad una pequeña población cerca de la localidad típica (Robledo et al. 1995). De ella, se recolectaron semillas que han sido utilizadas para realizar repoblaciones en localidades próximas y para su conservación en diferentes bancos de germoplasma, destacando su inclusión dentro del proyecto ARTEMIS (Sánchez-Gómez et al. 2002). Esta población se vio afectada por un incendio en 1998, de manera que los siete individuos que quedaban desaparecieron. Sin embargo se produjo la germinación y posterior establecimiento de varias decenas de ejemplares en la zona donde se quemaron los progenitores. Esta población junto al único individuo existente en Valencia son la única representación europea de *C. heterophyllus*.

Como consecuencia de su extremada rareza, *Cistus heterophyllus* se encuentra protegido a nivel nacional (Ley 4/89, Decreto 439/1990) dentro de la categoría *En peligro de extinción*. A su vez ha sido considerado dentro la categoría *En peligro crítico* [CR: A2ce; B1ab(v) + 2ab(v); C2a(ii); D] en el Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España (Güemes et al. 2004). Así mismo, a nivel regional se encuentra protegido en la Región de Murcia (Decreto 50/2003), en la categoría *En peligro de extinción* (Sánchez-Gómez et al. 2002). En el ámbito de la Comunidad Valenciana, aunque no existe figura legal de protección sobre la especie, ha sido propuesta como *En peligro crítico* (Laguna et al. 1998), y a su vez ha sido propagada por técnicas de cultivo *in vitro* e introducida en al menos dos microrreservas de flora (E. Laguna, com. pers.).

La supervivencia de las poblaciones europeas de *C. heterophyllus* a corto plazo puede verse comprometida por los riesgos asociados a la estocasticidad demográfica y ambiental. Sin embargo *C. heterophyllus* convive con otros congéneres en Murcia y Valencia (*C. albidus*), por lo que sus poblaciones podrían verse afectadas por procesos de introgresión genética que, dado el escaso número de efectivos, podrían ocasionar una desestructuración genética de las poblaciones ibéricas. Aunque la hibridación es un proceso muy importante en los fenómenos de especiación en plantas (Arnold 1997), también puede resultar una amenaza para la supervivencia de especies raras y amenazadas. Este proceso es más acuciante cuando las poblaciones de las especies raras constan de un número reducido de individuos y conviven en simpatria con otras especies del mismo género mucho más abundantes. En ausencia de barreras de aislamiento, se puede desencadenar la asimilación genética de estos táxones raros (Levin et al. 1996).

Frecuentemente, los fenómenos de introgresión e hibridación no son evidentes a partir del análisis de los caracteres morfológicos. Sin embargo, la utilización de marcadores moleculares puede solventar estas limitaciones, poniendo de manifiesto procesos de diversificación a escalas locales, así como la detección de fenómenos de hibridación e introgresión.

En este trabajo se pretende abordar el estudio preliminar de las relaciones entre las dos poblaciones de *C. heterophyllus* en la Península Ibérica mediante una aproximación molecular. Para ello se ha utilizado la técnica RAPD (Williams et al. 1990) que constituye una técnica adecuada debido a la rapidez de los análisis, sencillez en la metodología, alta relación coste/efectividad y que además necesita cantidades mínimas de material vegetal para su realización.

Las cuestiones que se pretenden responder con este trabajo son i) ¿La diferenciación genética entre las poblaciones ibéricas es suficiente para evitar su cruzamiento con fines conservacionistas? ii) ¿Existen evidencias de introgresión de *C. heterophyllus* con otras especies en las poblaciones ibéricas?

Material y Métodos

Material vegetal

El material silvestre muestreado de *Cistus heterophyllus* viene detallado en la tabla 1 y su localización en la figura 1. Además, se incluyó en el análisis un individuo híbrido artificial de *C. albidus* y *C. heterophyllus* de Cartagena procedente del Jardín Botánico de Valencia, y cinco individuos de *C. albidus* de una población (Moratalla) situada a unos 80 km de la población natural de *C. heterophyllus* de Cartagena.



Figura 1 Localización geográfica de las poblaciones muestreadas. Los códigos de cada población son los reflejados en la tabla 1.
Figure 1. Geographical localization of sampled populations. Populations labels are reported in table 1.

TAXON	PROCEDENCIA	Nº INDIVIDUOS	CÓDIGO
<i>C. heterophyllus</i> subsp. <i>carthaginensis</i>	Peña del Aguila, Cartagena	8	▲
<i>C. heterophyllus</i> subsp. <i>carthaginensis</i>	Clon de Pobla de Vallbona, Valencia	3	◆
<i>C. heterophyllus</i> s.str.	Africa	1	▼
<i>C. heterophyllus</i> subsp. <i>carthaginensis</i> <i>X C. albidus</i>	Híbrido experimental	1	○
<i>C. albidus</i>	Sierra de la Muela, Moratalla	5	△

Tabla 1. Localidades de recolección de las muestras de *Cistus*. Los códigos de cada población son los reflejados en la tabla 1.
Table 1. Sampled populations of *Cistus* sp. pl. Populations labels are reported in table 1.

Se recolectaron dos o tres hojas jóvenes, a efectos de minimizar la perturbación sobre los individuos muestreados, y se introdujeron en bolsas de polipropileno llenas con gel de sílice (Systma et al. 1990). El ADN ha sido aislado con el kit de extracción Qiagen Dnaeasy Plant mini Kit (Qiagen).

Marcadores RAPD

Se han utilizado nueve cebadores RAPD elegidos de entre 40 cebadores probados, por presentar mayores niveles de polimorfismo, así como una mayor calidad de los productos de amplificación y reprodución.

bilidad. Las reacciones han sido llevadas a cabo en un termociclador Eppendorf utilizando el siguiente programa: un ciclo inicial a 94°C durante 2 min; 39 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 36°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, y un paso final de 72°C durante 10 minutos para la terminación de la polimerización de los productos de amplificación. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25 µl, que contenían 2.5 µl de tampón (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 15 ng de cebador, aproximadamente 25 ng de ADN, y una unidad de Taq Polimerasa (Appligene, Oncor). Un control negativo, que incluía todos los componentes de la mezcla de reacción excepto el ADN, fue incluido para descartar contaminaciones. Además se realizaron amplificaciones duplicadas de todos los individuos para asegurar que los resultados eran reproducibles y minimizar errores. Las bandas que no aparecían en los dos ensayos se descartaron y no fueron incluidas en los análisis. Los productos de amplificación fueron separados electroforéticamente en geles verticales de poliacrimida al 9%, y visualizados utilizando el método rápido de tinción de plata de Milligan (1992).

Análisis de los datos

Los geles fueron escaneados y el tamaño de los productos de amplificación fue determinado por comparación con marcadores de peso molecular (Roche), utilizando el programa SIGMAGEL (Jardel Scientific). Las bandas que presentaban idéntica movilidad electroforética fueron tratadas como fragmentos homólogos, independientemente de su intensidad, como suele ser habitual en estudios de conservación. La presencia o ausencia de cada banda de RAPD fue utilizada para construir

una matriz binaria (1 = presencia, 0 = ausencia), que identificara a cada individuo muestreado.

A partir de la matriz binaria se hizo una matriz de similitud con el coeficiente de Dice (Dice 1945) calculada con el programa SPSS 10.0. A partir de esta matriz se obtuvieron los valores medios de similitud entre grupos de individuos según su procedencia. También se construyó una matriz de distancias (1-Dice) que fue utilizada para realizar un análisis de Coordenadas Principales y un agrupamiento *cluster* mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method). Estos análisis fueron realizados con el programa MVSP 3.12d (<http://www.kovcomp.com/mvsp>).

Resultados

A partir de los nueve cebadores RAPD se consideraron un total de 72 bandas amplificadas para su posterior análisis (tabla 2). De éstas 46 (63,89%) fueron polimórficas y permitieron identificar por sus fenotipos múltiples a prácticamente todos los individuos analizados, con la excepción de dos individuos de la población natural de Cartagena, y de los tres clones originados a partir del individuo de Valencia. Algunas de las bandas RAPD presentaban cierta concordancia con determinados patrones taxonómicos y geográficos. Así, cinco bandas fueron exclusivas de *C. albidus*, y 11 caracterizaron a todos los individuos de *C. heterophyllus*, incluyendo al híbrido experimental entre ambas especies. Además, los clones de *C. heterophyllus* de Valencia presentaban una banda exclusiva, y dos compartidas con *C. heterophyllus* del norte de África. Los ejemplares de *C. heterophyllus* de la población de Cartagena presentaban dos bandas exclusivas, pero no compartían ninguna banda exclusiva de la población con *C. heterophyllus* del norte de África. También se

Cebador	Secuencia	Rango de Tamaño	Nº bandas (%polimórficas)
CEB-1	5'-AGACGTACTC-3'	220-1980	7 (42.86)
CEB-2	5'-GAATGGTGAG-3'	350-2340	8 (62.50)
CEB-5	5'-GCCCCTCGTC-3'	198-1560	8 (87,50)
CEB-10	5'-CTGTTGCTAC-3'	240-2240	5 (40.00)
CEB-12	5'-ACACACGGTG-3'	260-1880	9 (55.56)
AB09-3	5'-TGGCGCACAC-3'	220-2100	7 (57.14)
AB09-5	5'-CCCGAAGCGA-3'	340-1980	6 (66.67)
AB09-6	5'-GTGGCTTGGA-3'	300-1250	7 (42.86)
AB09-7	5'-GTAAACCGCC-3'	235-2560	15 (86.67)

Tabla 2. Cebadores RAPD utilizados. Se indica la secuencia, tamaño de las bandas y el número de bandas generadas con los nueve cebadores.

Table 2. Number of RAPD loci, primer sequence, fragment sizes and amplified polymorphic fragments generated by nine arbitrary primers

Cartagena	1				
Africa	0.882	1			
Valencia	0.873	0.946	1		
Híbrido	0.913	0.828	0.8	1	
<i>C. albidus</i>	0.731	0.619	0.613	0.788	1
	Cartagena	Africa	Valencia	Híbrido	<i>C. albidus</i>

Tabla 3. Valores de similitud genética entre grupos de individuos a partir del índice de Dice (Dice 1945).
 Table 3. Pairwise similarity values among grouped *Cistus* samples using Dice index (Dice 1945).

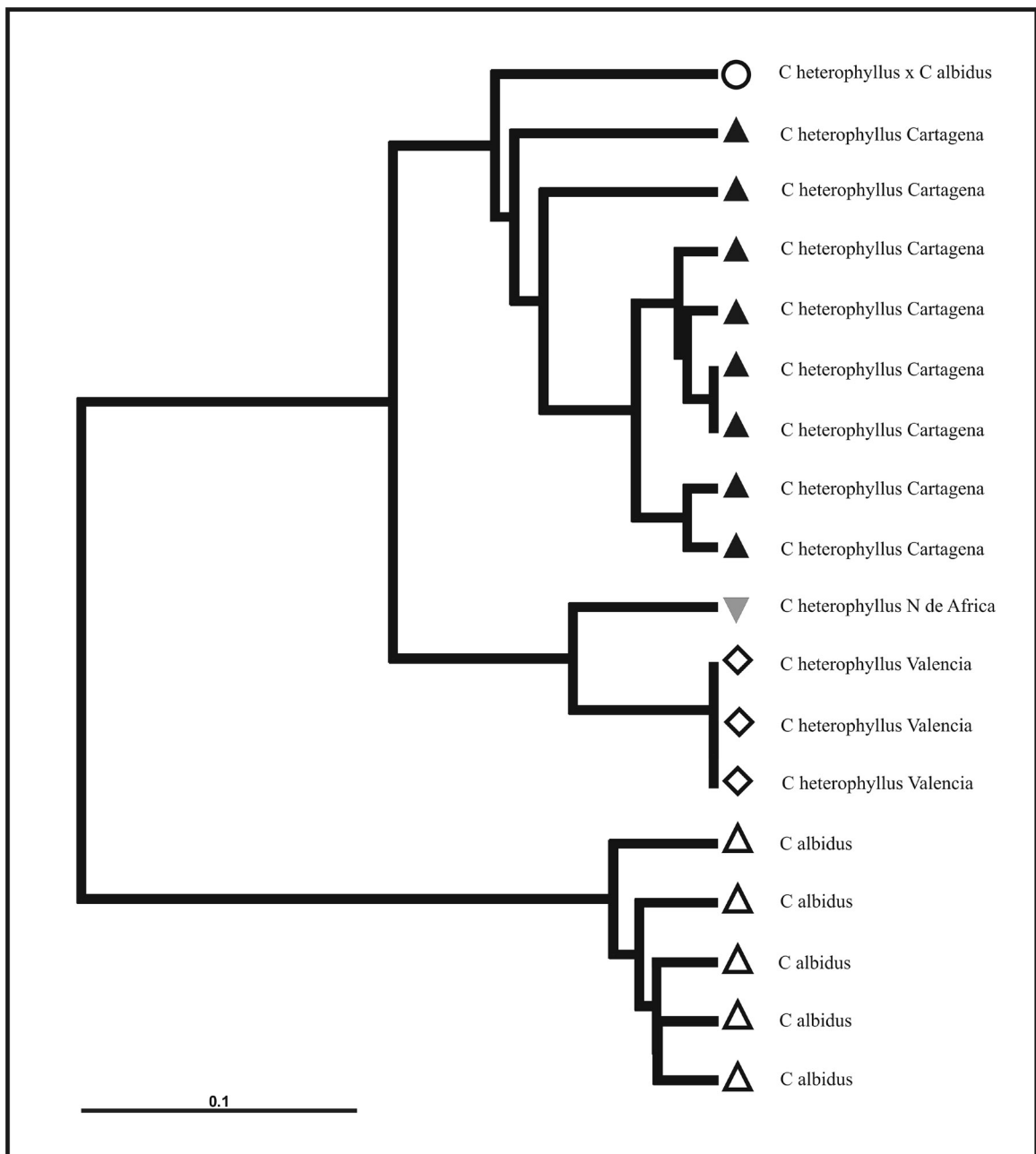


Figura 2 Dendrograma UPGMA de las relaciones entre las muestras de *Cistus* a partir de RAPD. Los códigos de cada población son los reflejados en la tabla 1.
 Figure 2. UPGMA dendrogram showing genetic relationships among *Cistus* samples based on RAPD data. Populations labels are reported in table 1.

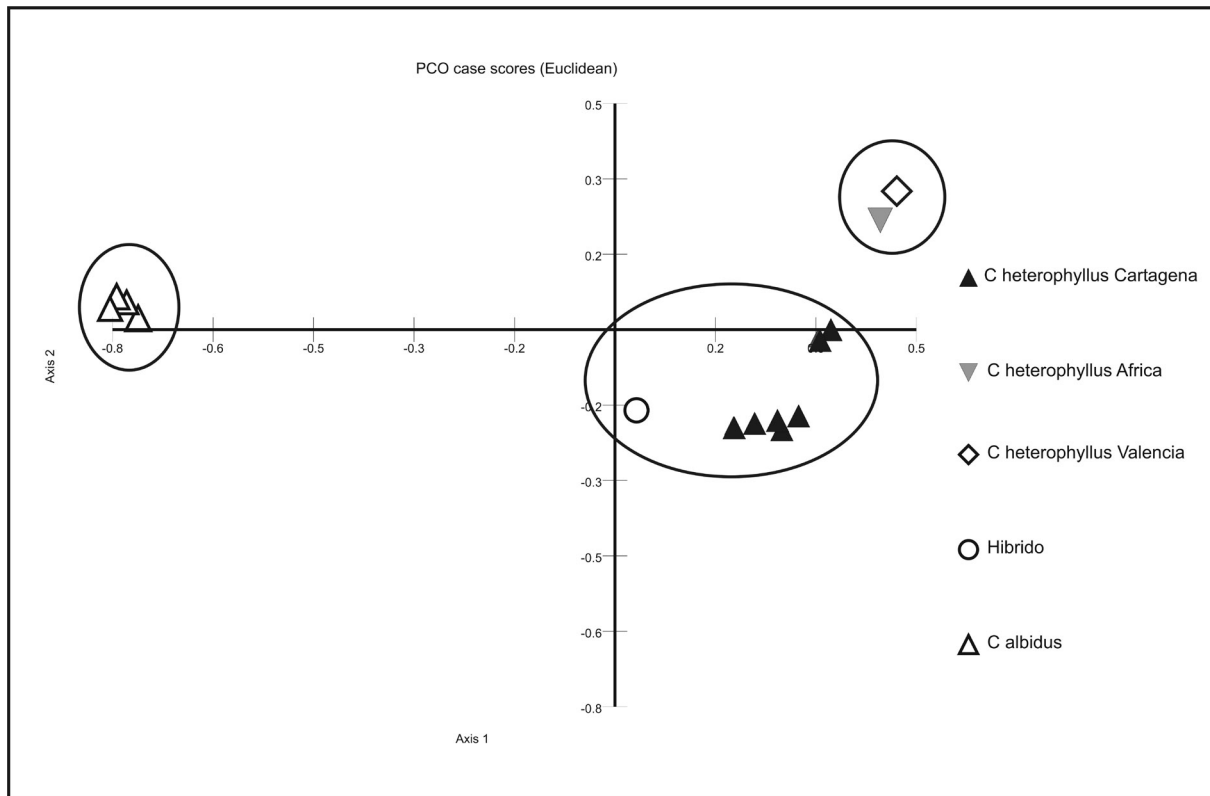


Figura 3. Representación gráfica de la disposición de las muestras de *C. heterophyllus* para los dos primeros ejes del PCO. Los códigos de cada población son los reflejados en la tabla 1.

Figure 3. Differentiation of samples of *Cistus heterophyllus* along first two PCO axes. Populations labels are reported in table 1.

observó la presencia de dos bandas fijadas exclusivas de los individuos de *C. heterophyllus* procedentes de Cartagena y *C. albidus*. Así mismo, el individuo híbrido presentaba dos bandas fijadas compartidas con *C. heterophyllus* de Cartagena y cuatro compartidas con *C. albidus*.

Los valores de semejanza genética entre grupos de individuos obtenidos a partir del coeficiente de Dice (tabla 3) indicaron que la mayor similitud era entre *C. heterophyllus* del norte de África y *C. heterophyllus* de Valencia (0.946 ± 0.001), mientras que los valores menores se correspondían están entre *C. albidus* y el ejemplar de *C. heterophyllus* procedente de Valencia (0.613 ± 0.006).

El dendrograma obtenido con el método UPGMA (figura 2) presenta dos ramas principales asociadas a una marcada distinción taxonómica; una, agrupa a los individuos de *C. albidus*, y otra incluye a todos los individuos de *C. heterophyllus*, incluyendo el híbrido interespecífico. Dentro de ésta aparece una agrupación de los clones de *C. heterophyllus* de Valencia y el individuo del norte de África, y otra en la que se agrupan los individuos de la población de Cartagena junto al híbrido de *C. albidus* y *C. heterophyllus*. El

análisis de coordenadas principales (PCO) mostró resultados similares a los obtenidos con el agrupamiento cluster. Los tres primeros ejes del PCO explican un alto nivel de la varianza (99,24% acumulado; primer eje: 87,08%, segundo eje: 11,83%, tercer eje: 0,33%). En la representación gráfica de los dos primeros ejes del PCO (figura 3), se observa la ordenación de tres grupos de individuos: uno formado por los individuos de *C. albidus*, otro que agrupa a los individuos de *C. heterophyllus* de Cartagena y el híbrido interespecífico, y un tercero que engloba a los individuos clónicos de *C. heterophyllus* de Valencia y *C. heterophyllus* del norte de África.

Discusión

Los marcadores moleculares basados en la determinación de la huella genética (DNA fingerprinting), y en concreto los RAPD, son una herramienta útil y ampliamente utilizada en la distinción de límites interespecíficos (Dunemann et al. 1994, Bartish et al. 2000, Rosselló et al. 2002, Jorgensen et al. 2003, Jiménez et al. 2005), y para la detección de procesos de hibridación e introgresión (Durham &

Korban 1994, Caraway et al. 2001, Raudnitschka et al. 2007).

La población de *C. heterophyllus* de Murcia es de origen híbrido

El análisis RAPD de los individuos de *C. heterophyllus* peninsulares ha puesto de manifiesto un cierto grado de divergencia molecular entre los individuos de Murcia y los de Valencia. El análisis conjunto de un híbrido artificial (*C. albidus* x *C. heterophyllus*), cuyas características genéticas coinciden con el patrón observado en los individuos de Murcia, pone de manifiesto que esta divergencia dentro de *C. heterophyllus* no debe atribuirse a un caso de divergencia primaria por aislamiento geográfico. La posición donde se sitúan los ejemplares murcianos, tanto en el agrupamiento cluster como en la agrupación de los individuos en el espacio multivariante (PCO), donde están muy próximos al híbrido experimental, así como la existencia de bandas exclusivas compartidas con *C. albidus*, sugieren la existencia de procesos introgresivos en *C. heterophyllus* procedentes de Cartagena con *C. albidus*. Nuestros resultados apoyan la hipótesis del carácter híbrido de las actuales poblaciones de *C. heterophyllus* del SE español, ya apuntada por Navarro (2002) en base al análisis morfológico. Por contra, nuestros datos apuntan a que tales procesos híbridos no han actuado en el único individuo conocido de Valencia.

La drástica disminución en el número de individuos de *C. heterophyllus* de las poblaciones conocidas de las sierras de Cartagena (Jiménez 1903) puede haber favorecido los procesos introgresivos con *C. albidus*, que es muy abundante en la zona. El hecho de que la práctica totalidad de especies de *Cistus* presenta mecanismos de autoincompatibilidad (Boscaiu & Güemes 2001, y referencias asociadas) debe haber favorecido el flujo génico entre ambas especies. Y este hecho ha podido ser más acuciante cuando los cuellos de botella poblacionales recientes han hecho que únicamente se conociesen en los últimos años sólo siete ejemplares de *C. heterophyllus*. Estos fenómenos de hibridación no son raros en el género (Martín & Guinea 1949, Demoly & Monserrat 1993), y de hecho se conocen incluso híbridos del norte de África entre *C. heterophyllus* y *C. albidus* (*C. xclausonis* Font Quer & Maire).

Cistus heterophyllus bien podría representar un notable caso de estudio de los efectos de la disminución drástica de la población de una especie amenazada, en la que los efectos concomitantes de existencia de cuellos de botella poblacionales unidos a procesos de hibridación interespecífica ponen en peligro la pervivencia de esta especie a nivel europeo.

La supuesta singularidad taxonómica de *C. carthaginensis*

Navarro (2002) consideró en base a datos morfológicos que *C. carthaginensis* es indistinguible de *C. heterophyllus* y debería incluirse en su sinonimia por cuanto los caracteres supuestamente diagnósticos apuntados por Crespo & Mateo (1988) o bien son variables o no se corresponden con la realidad. Los resultados obtenidos en este estudio, aunque basados en un tamaño muestral mínimo de accesiones africanas de *C. heterophyllus*, apoyan las conclusiones de Navarro (2002) y sugieren que la población valenciana está constituido por un individuo relicto de la especie, aparentemente no hibridado o introgregado y, por tanto, similar a los norteafricanos. De hecho, el ejemplar valenciano constituye el único representante europeo de la especie que no ha sido afectado por flujo génico interespecífico.

Tales conclusiones taxonómicas no son totalmente inesperadas y hay evidencias indirectas fitogeográficas que no las contradicen. En su conjunto, las poblaciones ibéricas, especialmente la de Cartagena, se encuentran en enclaves donde abundan los iberoafricanismos en un contexto de una abundante flora mediterránea, donde el género *Cistus* está bien representado con especies de amplia distribución latemediterránea. De hecho, la consideración de una raza geográfica en *C. heterophyllus* restringida a Europa no se ajusta al patrón típico de diversificación y creación de endemismos de otras especies mediterráneas (Thompson et al. 2005), a pesar de que su sistema reproductivo y de dispersión favorecen este tipo de especiación. Por el contrario, los resultados son congruentes con el modelo de especiación típico del género *Cistus*, en el que la diversificación de las especies fue anterior a la dispersión y colonización del mediterráneo (Guzmán & Vargas 2005).

Implicaciones para la conservación de *C. heterophyllus* en la Península Ibérica

Los resultados moleculares obtenidos apoyan fuertemente el hecho de considerar a *C. heterophyllus* como un endemismo ibero-africano y descatalogar a las poblaciones europeas como un endemismo ibérico estenócoro. Sin embargo, estas consideraciones taxonómicas no afectan al hecho de que las poblaciones europeas de *C. heterophyllus* se encuentran en peligro de extinción por cuellos de botella poblacionales que se han producido en el pasado y por la asimilación genética con especies abundantes y no amenazadas como *C. albidus*. Previamente se ha sugerido que la polinización del único ejemplar de *C. heterophyllus* de Valencia (autoincompatible) con polen proceden-

te de los ejemplares de Murcia puede representar la única vía necesaria para crear nuevos individuos y poblaciones que puedan perpetuarse mediante reproducción sexual (Boscaiu & Güemes 2001). Nuestros datos, por el contrario, descartan absolutamente tal posibilidad como herramienta para abordar la recuperación de la especie en la Península Ibérica y sugieren otras actuaciones. La primera de ellas implica el aporte de material genético norteafricano a la hora de efectuar cruzamientos con el individuo de Valencia, aparentemente el único ejemplar puro de la especie en Europa. Dada la relativa extensión de *C. heterophyllus* en el norte de África sería imperativo el establecer qué poblaciones africanas son las menos divergentes genéticamente a fin de no introducir genotipos extremos. Tal aproximación debería tener presente la semejanza de ambos genomas, nucleares y cloroplásticos, a la hora de seleccionar el material externo. La segunda medida afectaría a las poblaciones murcianas, sobre las que debería establecerse un programa de hibridación artificial mediante el cual los ejemplares murcianos serían hibridados, y posteriormente retrocruzados, con polen procedente del individuo de Valencia. Después de numerosas generaciones de retrocruzamiento podrían obtenerse ejemplares de *C. heterophyllus* con un menor número significativo de alelos procedentes de *C. albidus*. El hecho de que los ejemplares murcianos no constituyen aparentemente generaciones híbridas F1, sino que se encuentran más próximos a *C. heterophyllus* (figura 3) hace muy viable esta aproximación. Sólo en el caso de que fuese inviable por cuestiones de incompatibilidad inicial la hibridación entre los genotipos murcianos y valencianos se recomendaría la aportación de material africano para llevar adelante tal programa de hibridación. Estas dos aproximaciones constituyen, con los datos moleculares conocidos actualmente, las únicas soluciones viables para evitar los fenómenos de introgresión genética progresiva de la población de Cartagena y la autoincompatibilidad del material valenciano y proceder a la recuperación de las poblaciones europeas de *C. heterophyllus*.

Agradecimientos

Este trabajo se ha desarrollado en el marco de una beca postdoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia (Resolución de 17 de septiembre de 2004). Se ha financiado en base a un convenio de colaboración entre la Universidad de Murcia y la Dirección General del Medio Natural de la Región de Murcia. Agradecemos a Jaime Güemes Heras el habernos facilitado material vegetal procedente del Jardín Botánico de la Universidad de Valencia y del IVIA.

Referencias

- Arnold ML. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford: Oxford University Press.
- Bartish IV, Jeppsson N, Bartish GI, Lu R & Nybom H. 2000. Inter- and intraspecific genetic variation in Hippophae (Elaeagnaceae) investigated by RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution*, 225: 85–101.
- Boscaiu M & Güemes J. 2001. Breeding system and conservation strategy of the extremely endangered *Cistus carthaginensis* Pau (Cistaceae) of Spain. *Israel Journal of Plant Sciences* 49: 213–220.
- Caraway V, Carr GD & Morden CW. 2001. Assessment of hybridization and introgression in lava-colonizing hawaiian *Dubautia* (Asteraceae: Madiinae) using RAPD markers. *American Journal of Botany* 88 (9): 1688–1694.
- Crespo MB & Mateo G. 1988. Consideraciones acerca de la presencia de *Cistus heterophyllus* Desf. en la Península Ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 45 (1): 165–171.
- Demoly, JP & Montserrat, P. 1993. *Cistus*. In: *Flora Iberica* (Castroviejo S, Aedo C, Cirujano S, Lainz M, Montserrat P, Morales R, Muñoz Garmendia F, Navarro C, Paiva J & Soriano C, eds.). Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC, pp. 318–337.
- Dice LR. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297–302.
- Dunemann F, Kahnau R & Schmidt H. 1994. Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD 'Fingerprinting' of cultivars and wild species. *Plant Breeding* 113: 150–159.
- Durham RE & Korban SS. 1994. Evidence of introgression in apple using RAPD markers. *Euphytica* 79: 109–114.
- Esteve F. 1973. Vegetación y flora de las regiones central y meridional de la provincia de Murcia. Murcia: Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura.
- Güemes J, Jiménez JF & Sánchez-Gómez P. 2004. *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*. In: *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España* (Bañares A, Blanca G, Güemes J, Moreno JC & Ortiz S, eds.). Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, pp. 192–193.
- Guzmán B & Vargas P. 2005. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Molecular phylogenetics and evolution* 37: 644–660.
- Jiménez F. 1903. Las plantas de Cartagena. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural* 2: 63–118.
- Jiménez JF, Güemes J, Sánchez-Gómez P & Rosselló JA. 2005. Isolated populations or isolated taxa? A case study in narrowly-distributed snapdragons (*Antirrhinum* sect. *sempervirentia*) using RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution* 252: 139–152.

- Jorgensen JL, Stehlik I, Brochmann C & Conti E. 2003. Implications of ITS sequences and RAPD markers for the taxonomy and biogeography of the *Oxytropis campestris* and *O. arctica* (Fabaceae) complexes in Alaska. *American Journal of Botany* 90: 1470-1480.
- Laguna E, Crespo MB, Mateo G, López S, Fabregat C, Serra L, Herrero-Borgoñon JJ, Aguilera A & Figuerola R. 1998. Flora endémica, rara o amenazada de la Comunidad Valenciana. Valencia: Generalitat Valenciana. Conselleria de Medio Ambiente.
- Levin DA, Francisco-Ortega J & Jansen RK. 1996. Hybridization and the extinction of rare plants. *Conservation Biology* 10 (1): 10-16.
- Martín Bolaños M & Guinea E. 1949. Jarales y jaras (Cistografía hispánica). Madrid: Instituto Forestal de Investigaciones Experimentales 49.
- Milligan BG. 1992. Plant DNA isolation. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations: a practical approach* (Hoelzel AR, ed.). Oxford: IRL Press, pp. 59-88.
- Navarro JA. 2002. Taxonomía, propagación y conservación de *Cistus heterophyllus*: una planta en peligro de extinción en España. Murcia: Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia.
- Pau C. 1904. A. Engler. *Das Pflanzenreich*. Cistaceae von W. Grosser. *Boletín de la Sociedad Aragonesa de Ciencias Naturales* 3: 259-266.
- Raudnitschka D, Hensen I & Oberprieler C. 2007. Introgressive hybridization of *Senecio hercynius* and *S. ovatus* (Compositae, Senecioneae) along an altitudinal gradient in Harz National Park (Germany). *Systematics and Biodiversity* 5: 333-344.
- Robledo A, Navarro JA, Rivera D & Alcaraz F. 1995. Los últimos ejemplares de la jara Cartagenera. *Quercus* 110: 12-14.
- Rosselló JA, Cebrián MC & Mayol M. 2002. Testing taxonomic and biogeographical relationships in a narrow Mediterranean endemic complex (*Hippocrepis balearica*) using RAPD markers. *Annals of Botany* 89: 321-327.
- Sánchez-Gómez P, Carrión MA, Hernández A & Guerra J. 2002. Libro Rojo de la flora silvestre protegida de la Región de Murcia. Murcia: Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, Universidad de Murcia.
- Sytsma KJ, Givnish TJ, Smith JF & Hahn WJ. 1993. Collection and storage of land plant samples for macromolecular comparisons. *Methods in Enzymology* 224: 23-37.
- Thompson JD, Lavergne S, Affre L, Gaudeul M & Debussche M. 2005. Ecological differentiation of Mediterranean endemic plants. *Taxon* 54: 967-976.
- Vicioso C. 1945. Notas sobre la flora española. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 6(2): 5-92.
- Warburg EF. 1968. *Cistus* L. In: *Flora Europaea* vol. 2 (Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM & Webb DA, eds.). Cambridge: Cambridge University Press, pp. 282-284.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ & Rafalski JA. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

