

**SILENE SECT. SIPHONOMORPHA OTTH. EN EL ENTORNO
DEL ESTRECHO DE GIBRALTAR**

**R. Morales Alonso, J. A. Vicente Orellana, C. Garma López,
N. Henriques-Gil & A. Galán de Mera**

Departamento de Biología, Laboratorio de Botánica, Universidad San Pablo-CEU, Apdo.
67, 28660 Boadilla del Monte, Madrid (España)

Morales Alonso, R., Vicente Orellana, J. A., Garma López, C., Henriques-Gil, N. & Galán de Mera, A. (2000). *Silene* sect. *Siphonomorpha* Otth. en el entorno del estrecho de Gibraltar. *Portugaliae Acta Biol.* 19: 283-293.

El entorno del estrecho de Gibraltar se presenta como una de las áreas con mayor endemividad de la Cuenca Mediterránea puesto que los sucesivos avances y retrocesos del mar (Mioceno-Plioceno) produjeron un aislamiento geográfico en los territorios interiores de los continentes europeo y africano. En base a perfiles proteicos de semillas y a secuencias de ADN nuclear ribosómico (regiones espaciadoras internas) se hace un estudio de las especies de *Silene* sect. *Siphonomorpha* Otth. del Sur de la Península Ibérica. Como resultado se establece un paralelismo entre las diferencias génicas y morfológicas de *Silene tomentosa* Otth., *S. andryalifolia* Pomel y *S. gazulensis* Galán de Mera *et al.*

Palabras clave: *Silene*, perfil proteico, fragmento espaciador de ADN.

Morales Alonso, R., Vicente Orellana, J. A., Garma López, C., Henriques-Gil, N. & Galán de Mera, A. (2000). *Silene* sect. *Siphonomorpha* Otth. in the area around the Strait of Gibraltar. *Portugaliae Acta Biol.* 19: 283-293.

The area around the Strait of Gibraltar has one of the highest endemivity rates in the Mediterranean Basin, because of the sea level variations in the Miocene-Pliocene, responsible for the geographical isolation of the inside territories of the European and the African continents.

We studied the internal transcribed sequences (ITS) in nuclear ribosomal DNA and the seed protein profiles in *Silene* sect. *Siphonomorpha* Otth. species in southern Iberian Peninsula. As a result, a parallelism between the genetic and morphological differences of *Silene tomentosa* Otth., *S.*

andryalifolia Pomel and *S. gazulensis* Galán de Mera *et al.* was established.

Key words: *Silene*, protein profile, internal transcribed sequence (ITS).

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Silene* sect. *Siphonomorpha* Otth. se encuentran repartidas en la Cuenca Mediterránea. Según diferentes autores (BOCQUET *et al.* 1978, JEANMONOD 1984) su origen y distribución está ligada a la desecación (Mioceno) y la reinvasión (Plioceno) de la Cuenca Mediterránea por el mar (HSÜ *et al.* 1973).

Varios autores del siglo XIX (KELAART 1846, WILLKOMM & LANGE 1880, DEBEAUX & DAUTEZ 1888) pusieron de manifiesto la existencia de *S. tomentosa* Otth. (= *S. gibraltaria* Boiss.) en el peñón de Gibraltar. Esta especie fue dada por extinta posteriormente (TALAVERA 1990, CORTÉS & LINARES 1993) aunque poco después se encontraron algunos ejemplares (LINARES *et al.* 1996).

En un estudio sobre flora y vegetación realizado en la provincia de Cádiz se encontraron plantas muy parecidas a *S. tomentosa* por lo que fueron identificadas como tales (GALÁN DE MERA 1993a); hecho que suscitó opiniones sobre una determinación errónea (GARCÍA MURILLO 1993) causada por el parecido morfológico entre *S. andryalifolia* y *S. tomentosa*. La proximidad entre las especies de la sección *Siphonomorpha* ya había sido indicada anteriormente (PINTO DA SILVA 1956, JEANMONOD 1984) y ha dado lugar a la descripción reciente de nuevas especies, como *S. oenotriae* Brullo (BRULLO 1997) y *S. gazulensis* Galán de Mera *et al.* (GALÁN DE MERA *et al.* 1999), que nos pueden llegar a explicar las migraciones, cambios geológicos y dinámicas de la vegetación en el oeste de la Cuenca Mediterránea, mostrando un paralelismo entre observaciones morfológicas y citogenéticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

• Material recolectado

Para la realización de las observaciones morfológicas y citogenéticas se han utilizado diferentes poblaciones de *S. andryalifolia*, *S. gazulensis* y *S. tomentosa* cultivadas en el laboratorio de Botánica de la Universidad San Pablo-CEU y en el Jardín Botánico de Gibraltar.

Los ejemplares de *S. andryalifolia* proceden de Córdoba (Sierra de Rute, Pico Gallinera, USP209099), los de *S. gazulensis* de Cádiz (Alcalá de los Gazules, Peña Arpada, USP209199) y los de *S. tomentosa* de Gibraltar (USP 208598).

También se emplearon poblaciones madrileñas de *S. colorata* Poirlet (Boadilla del Monte, USP 213699). Esta especie pertenece a la sección *Dipterosperma* (Rohrb) Chowdhuri cuyos caracteres morfológicos distan mucho de los de *Siphonomorpha*.

- Morfología

Los caracteres morfológicos que se estudiaron fueron los siguientes: forma de vida, inflorescencia, longitud del cáliz, indumento del cáliz (por microscopía electrónica), color de los pétalos, longitud de los pétalos y longitud del androginóforo.

- Análisis del perfil proteico por electroforesis en gel SDS-Poliacrilamida

Para realizar este análisis se utilizaron 40 semillas de diferentes poblaciones de *S. andryalifolia*, *S. gazulensis*, *S. tomentosa* y *S. colorata*. Una semilla fue pulverizada y se le añadieron 25 µl de tampón de extracción (2-mercaptoetanol, glicerol, Tris pH 6,8 1M, SDS, Pironina Y). Se incubó 1 hora con agitación ocasional y se hirvió durante minuto y medio (CASSEY *et al.* 1986).

Posteriormente se cargaron 8 µl de cada extracción en geles SDS-PAGE al 12,5% (acrilamida 35%, bisacrilamida 2%, Tris 1M pH 8,8, SDS 10%, amonio persulfato 1%, TEMED 0,05%) con gel stacking al 3%. La electroforesis se desarrolló durante 16 horas a un voltaje constante de 50 V. Terminada la electroforesis se tiñó el gel con una solución de Azul de Coomassie R250 al 0,02% durante 12 horas y para decolorar la tinción de fondo se usó ácido tricloroacético al 12%. Los marcadores usados fueron: miosina, 205 kDa; β-galactosidasa, 116 kDa; fosforilasa B, 97,4 kDa; albúmina plasmática bovina, 66 kDa; albúmina de huevo, 45 kDa y anhidrasa carbónica, 29 kDa.

- Aislamiento de ADN, amplificación y secuenciación

El material empleado para este estudio procede de las hojas frescas de la roseta basal de *S. andryalifolia*, *S. gazulensis* y *S. tomentosa*.

El ADN total fue extraído de las hojas frescas según el método descrito por TOWNER (1991) con pequeñas modificaciones. Posteriormente se amplificó, mediante PCR, un fragmento de la región espaciadora interna del ADN nuclear ribosómico. Se emplearon dos cebadores específicos, uno superior y otro inferior (5'-CCCGGCTAAACAACGA-3' ; 5'-TGCCCTAAGACAACAACAAA-3'), diseñados por el programa OLIGO V 5.0 usando dos fragmentos espaciadores internos del ADN ribosómico y el ADN ribosómico 5.8S de *S. colorata* (Gen Bank acceso nº X86842).

Las amplificaciones se realizaron con ADN genómico (100 ng /reacción) en un volumen de 25 µl con 0,5 µM de cada cebador, 0,25 µl de una mezcla de dNTP 0,1 mM, 2,5 µl de tampón 10x (100 mM Tris-HCl pH 8,3, 100 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) y 2 unidades de *Taq* polimerasa de Roche-Molecular Biochemicals. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador PTC-100 (MJ Research) con un precalentamiento a 94 °C durante 7 minutos, 35 ciclos (94 °C durante 1 minuto; 57,5 °C durante 1 minuto; 72 °C durante 1 minuto) finalizando con 72 °C durante 7 minutos.

La detección del ADN se realizó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las bandas resultantes fueron recortadas del agar y se purificaron con el

Bioclean DNA purification kit de Biotools según instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN se insertó en el plásmido pCR-TOPO con el *TOPO TA Cloning Kit* de Invitrogen según instrucciones del fabricante; y la transformación se realizó en bacterias *E. coli* competentes. Comprobado el crecimiento bacteriano, se eligieron los clones recombinantes que contenían los insertos. Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizó el *QIAprep Spin Miniprep Kit* de Qiagen siguiendo indicaciones del fabricante.

La secuenciación del fragmento se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid, con secuenciador automático *ABI PRISM 377 DNA Sequencer* de Perkin Elmer. Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa de ordenador MEGALIGN DNASTAR que utiliza el método Clustal para hacer las comparaciones.

RESULTADOS

• Morfología

Los caracteres morfológicos estudiados se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracteres morfológicos de las especies de *Silene* sect. *Siphonomorpha*.

Caracteres	<i>S. andryalifolia</i>	<i>S. tomentosa</i>	<i>S. gazulensis</i>
Forma de vida (longitud cm)	Hemicriptófito ascendente (10-40)	Hemicriptófito ascendente (10-30)	Hemicriptófito pulviniforme (c.10)
Inflorescencia	Laxa	Laxa	Contraída
Longitud del cáliz (mm)	17-23	16-20	15-20
Indumento del cáliz	Pelos glandulíferos de superficie lisa y glándulas sentadas	Pelos eglandulíferos de superficie verruculosa y glándulas sentadas	Pelos eglandulíferos de superficie verruculosa y glándulas sentadas
Color de los pétalos	Blancos o ligeramente rosados por el envés	Violeta pálido en el haz y el envés	Blancos o ligeramente rosados por el envés
Longitud de los pétalos (mm)	7-9	7-8	c. 10
Longitud del androginóforo (mm)	6-11	7,5-9,5	6-8

• Análisis proteico

Los perfiles proteicos de las cuatro especies se pueden observar en la Fig. 1 y en la Tabla 2 se presenta un esquema de la distribución de los polipéptidos.

La presencia de un polipéptido indica la existencia de un gen estructural. Con un patrón electroforético se puede averiguar los genes estructurales que son polimórficos. Así, en *S. tomentosa* se observan diversos polipéptidos en

condición polimórfica (P82 y P78; P36, P35 y P34; P31 y P30; P26 y P24; P22 y P20), mientras que en *S. gazulensis* únicamente se observa polimorfismo en P36, P35 y P34. Este último también se presenta en *S. andryalifolia* junto con P82 y P78; Sin embargo, en *S. colorata* encontramos algunos polipéptidos distintos como P73, P62 y P33.

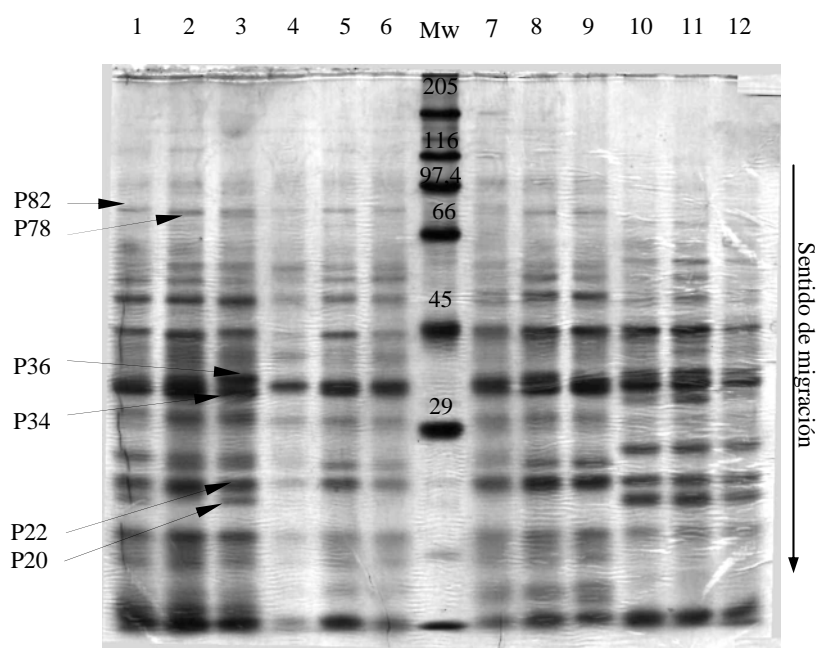


Fig. 1. Perfil proteico de las proteínas procedentes de las semillas de *S. tomentosa* (1, 2, 3), *S. gazulensis* (4, 5, 6), *S. andryalifolia* (7, 8, 9) y *S. colorata* (10, 11, 12). Mw = marcadores.

• Secuencias de ADN

Se secuenciaron un total de 487 pares de bases pertenecientes al fragmento espaciador 1 (ITS1), fragmento espaciador 2 (ITS2) y 5.8S. En el alineamiento de estas secuencias (Apéndice 1) y teniendo en cuenta la secuencia consenso, se encuentran 21 sustituciones en *S. colorata*: en las posiciones 47 y 70 una G por A; en 71, 91, 243, 302, 376 y 438 una C por T; en 370, 381 una T por A; en 379 y 454 una A por G; en 412 una A por C; en 460 una G por A y en 226 una G por C. Además observamos dos deleciones en las posiciones 31 y 293 y una inserción de C en 304 y 439.

Tabla 2. Distribución de los polipéptidos en *S. tomentosa* (1, 2, 3), *S. gazulensis* (4, 5, 6), *S. andryalifolia* (7, 8, 9) y *S. colorata* (10, 11, 12). PM = Peso Molecular; + = banda presente; - = banda ausente

PM		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
82	P82	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
78	P78	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
73	P73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
62	P62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
54	P54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	P37	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
35	P35	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	P34	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
33	P33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
31	P31	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	P30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	P26	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
24	P24	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
22	P22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	P20	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+

En *S. andryalifolia* destacamos una deleción en 429 y una sustitución en 456 de una T por C. En *S. gazulensis* encontramos una sustitución de G por A en la posición 335. Además, en las posiciones 301, 385, 410 y 483, las bases de *S. andryalifolia* y *S. tomentosa*, que son iguales entre sí, son diferentes de *S. colorata* y *S. gazulensis*, que también son iguales entre ellas.

A partir de dicho alineamiento se deduce la matriz de similitud y divergencia que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Matriz de similitud y divergencia de las secuencias amplificadas.

		Porcentaje de similitud			
		1	2	3	4
Porcentaje de divergencia	1		98,1	96,7	87,2
	2	0,2		98,2	88,9
	3	1,5	1,2		89,9
	4	5,6	5,4	4,8	

De estos valores obtenemos un dendrograma (Fig. 2) en el que se observa a *S. andryalifolia* y a *S. tomentosa* como especies más cercanas entre sí, y a *S. colorata* más alejada de las otras tres especies citadas.

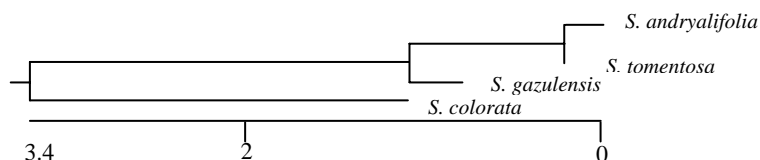


Fig. 2. Dendrograma de las secuencias amplificadas.

DISCUSIÓN

• Morfología

S. andryalifolia, *S. gazulensis* y *S. tomentosa* son muy próximas entre sí, al igual que ocurre con otras especies de la misma sección (JEANMONOD 1984; TALAVERA 1990).

S. gazulensis se diferencia de *S. andryalifolia* y *S. tomentosa* por su aspecto pulviniforme. Además se aparta de *S. andryalifolia* por los pelos calicinos eglandulíferos y verruculosos, y se separa de *S. tomentosa* por las hojas no crasiúsculas y la inflorescencia comprimida.

S. andryalifolia presenta el cáliz con un indumento de pelos glandulíferos de superficie lisa mientras que en *S. tomentosa* y *S. gazulensis* los pelos son eglandulíferos y verruculosos (Fig. 3) (GALÁN DE MERA 1995).

El color de los pétalos parece ser un carácter bastante importante (JEANMONOD 1984). En *S. tomentosa* se presentan de color violeta pálido, mientras que en *S. andryalifolia* y *S. gazulensis* son de color blanco o ligeramente rosados en el envés.

• Análisis proteico

Como se observa en la Fig.1 los patrones electroforéticos de las cuatro especies son bastante similares siendo *S. gazulensis* la especie que menos variabilidad intraespecífica presenta.

S. andryalifolia y *S. tomentosa* se diferencian en la condición polimórfica de P26 y P24, y de P22 y P20, que están presentes en *S. tomentosa* pero no en *S. andryalifolia*. Sin embargo, *S. colorata* tiene un patrón claramente diferente ya que tiene un mayor número de polipéptidos que en las otras tres especies no están presentes (P73, P62, P33), aunque también se observan polimorfismos que se dan en las otras especies. Por tanto, el patrón electroforético de *S. colorata* está más separado de las otras tres especies debido a que pertenece a una sección distinta: pero aún así, se observa una gran semejanza con las otras tres, lo que hace pensar en el gran parecido existente dentro de especies del mismo género.

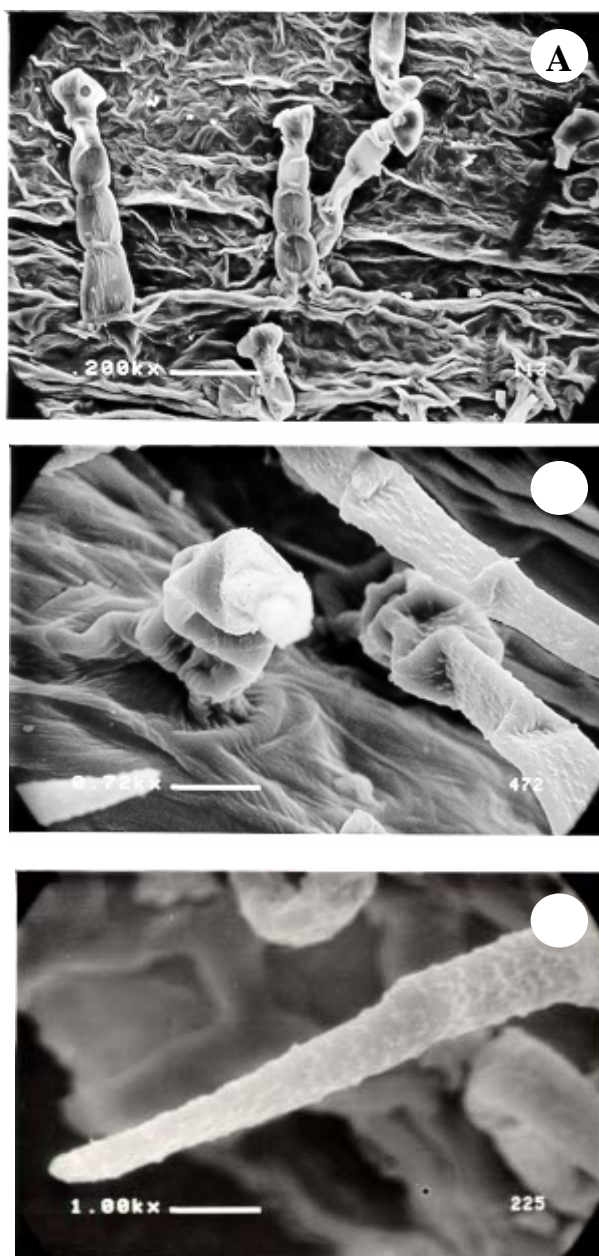


Fig. 3. Fotografías electrónicas del indumento del cáliz. A = *S. andryalifolia*, B = *S. gazulensis*, C = *S. tomentosa*.

- Secuenciación de ADN

Las relaciones filogenéticas reconstruidas con parte de los fragmentos espaciadores 1 y 2 y la región 5,8S de ADN ribosómico coinciden bastante bien con la morfología de las plantas (SUH *et al.* 1993).

Como refleja el dendrograma, *S. colorata* es la especie que se encuentra más distante, lo cual es lógico por su pertenencia a una sección diferente de la *Siphonomorpha*. También se puede observar que *S. gazulensis* se separa claramente de *S. andryalifolia* y *S. tomentosa*.

Descartando a *S. colorata*, el porcentaje de divergencia varía entre un 0,2% y un 1,2%. Este nivel de variación es tan bajo como el que encontramos en otras secciones del género (OXELMAN 1996) y más bajo que en otras familias de angiospermas (BALDWIN 1992), lo que puede explicar el gran parecido de las especies pertenecientes a la sección *Siphonomorpha*.

CONCLUSIONES

Las diferencias genéticas y proteicas en las tres especies tratadas en el texto pertenecientes a la sección *Siphonomorpha* no es muy alta, e incluso se observan pocas diferencias con *S. colorata* que pertenece a la sección *Dipterosperma*. Esto confirma la proximidad morfológica entre las especies de la sección *Siphonomorpha* indicada ya por JEANMONOD (1984) y TALAVERA (1990).

Aunque las secuencias de ADN obtenidas son muy parecidas, las diferencias existentes en poblaciones de la sección *Siphonomorpha* apoyan la existencia de nuevos táxones.

La cercanía de los caracteres de *S. gazulensis* con los de *S. tomentosa* y *S. andryalifolia*, puede hacernos pensar que estas dos últimas originaron poblaciones de origen hibridógeno en los roquedos interiores del área del estrecho de Gibraltar.

Posiblemente esta variabilidad de táxones sea debida a la retirada del mar de las áreas interiores próximas al estrecho de Gibraltar apareciendo una alta endemidad (GALÁN DE MERA 1995). Esto nos lleva a la reconsideración de la metodología clásica anteriormente utilizada en este territorio para el estudio de la vegetación (GALÁN DE MERA 1993b). Por ello, habría que interpretar a la vegetación considerando asociaciones fitosociológicas en territorios más amplios, y a ellas subordinar razas geográficas en localidades concretas (SCHUHWERK 1990).

Apéndice 1. Alineamiento de las secuencias. N= indeterminación. -= ausencia. CON = secuencia consenso. AND = *S. andryalifolia*; COL = *S. colorata*; TOM = *S. tomentosa*; GAZ = *S. gazulensis*.

CON	<u>CCCGGCTAAACAACGAACCCCGGCGCGTAAATGCGTCAAGGAATATAAAC</u>	
AND	CCCGGCTAAACAACGAACCCCGGCGCGTAAATGCGTCAAGGAATATAAAC	50
COL	CCCGGCTAAACAACGAACCCCGGCGCGTAA-TGCGTCAAGGAATATGAAC	49
TOM	CCCGGCTAAACAACGAACCCCGGCGCGTAAATGCGTCAAGGAATATAAAC	50
GAZ	CCCGGCTAAACAACGAACCCCGGCGCGTAAATGCGTCAAGGAATATAAAC	50
CON	<u>TTTATGTGTGTGCTCTCCTATCGCCCGGTTAGCCGGGCGTTGGAGTGGTG</u>	
AND	TTTATGTGTGTGCTCTCCTATCGCCCGGTTAGCCGGGCGTTGGAGTGGTG	100
COL	TCTATGTGTGTGCTCTCCTGCTGCCCGGTTAGCCGGGCGTCCGGAGTGGTG	99
TOM	TTTATGTGTGTGCTCTCCTATCGCCCGGTTAGCCGGGCGTTGGAGTGGTG	100
GAZ	TTTATGTGTGTGCTCTCCTATCGCCCGGTTAGCCGGGCGTTGGAGTGGTG	100
CON	<u>CCATGTCTTAAACAATAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGC</u>	
AND	CCATGTCTTAAACAATAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGC	150
COL	CCATGTCTTAAACAATAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGC	149
TOM	CCATGTCTTAAACAATAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGC	150
GAZ	CCATGTCTTAAACAATAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGC	150
CON	<u>ATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATC</u>	
AND	ATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATC	200
COL	ATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATC	199
TOM	ATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATC	200
GAZ	ATCGATGAAGAACGTANCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATC	200
CON	<u>CCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCTTCCGGCT</u>	
AND	CCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCTTCCGGCT	250
COL	CCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCTTCCGGCT	249
TOM	CCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCTTCCGGCT	250
GAZ	CCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCTTCCGGCT	250
CON	<u>GAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCACATTCCAC</u>	
AND	GAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCACATTCCAC	300
COL	GAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCA-ATTCCAC	298
TOM	GAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCACATTCCAC	300
GAZ	GAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCCATATTCCAC	300
CON	<u>GTT-GGTGGAGGGGAAGGAGGATGGTTTCCCGGACTACCCGGTCGCGGC</u>	
AND	GTT-GGTGGAGGGGAAGGAGGATGGTTTCCCGGACTACCCGGTCGCGGC	349
COL	CCTCGGTGGAGGGGAAGGAGGATGGTTTCCCGGACTACCCGGTCGCGGC	348
TOM	GTT-GGTGGAGGGGAAGGAGGATGGTTTCCCGGACTACCCGGTCGCGGC	349
GAZ	CTT-GGTGGAGGGGAAGGAGGATGGTTTCCCGGACTACCCGGTCGCGGC	349
CON	<u>TGGCCTAAAATTGGAGCCACGGCATCGGGATGCTGCGGCGATAGGTGGT</u>	
AND	TGGCCTAAAATTGGAGCCACGGCATCGGGATGCTGCGGCGATANGTGGT	399
COL	TGGCCTAAAATTGGAGCCCTCGGCACNGAGTTGTCGCGGCGATAGGTGGT	398
TOM	TGGCCTAAAATTGGAGCCACGGCATCGGGATGCTGCGGCGATAGGTGGT	399
GAZ	TGGCCTAAAATTGGAGCCACGGCATCGGGATGCCGCGGCGATAGGTGGT	399
CON	<u>GAACAAGGCTTCGGCCAAGCAAGCAACCCGTCGCGCAT-GCCGTGCCAAT</u>	
AND	GAACAAGGCTTCGGCCAAGCAAGCAACC-GTCGCGCAT-GCCGTGCCAAT	447
COL	GAACAAGGCTTAGGCCAAGCAAGCAACCCGTCGCGCACCCGCTGTGCCAAT	448
TOM	GAACAAGGCTTCGGCCAAGCAAGCAACCCGTCGCGCAT-GCCGTGCCAAT	448
GAZ	GAACAAGGCTTCGGCCAAGCAAGCAACCCGTCGCGCAT-GCCGTGCCAAT	448
CON	<u>GCGGGCTCGAAGGACCCTTTGTTGTTGTCTTAGGGCAXX</u>	
AND	GCGGGTTCGAAGGACCCTTTGTTGTTGTCTTAAGGCA''	486
COL	GCGGGCTCGGAGGACCCTTTGTTGTTGTCTTAGGGCA''	487
TOM	GCGGGCTCGAAGGACCCTTTGTTGTTGTCTTAAGGCA''	487
GAZ	GCGGGCTCGAAGGACCCTTTGTTGTTGTCTTAGGGCA''	487

BIBLIOGRAFÍA

- BALDWIN, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the *Compositae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3-16.
- BOCQUET, G, WIDLER, B. & KIEFER, H. 1978. The Messinian Model. A new outlook for the floristics and systematics of the Mediterranean area. *Candollea* 33: 269-287.
- BRULLO, S. 1997. *Silene oenotriae* (Caryophyllaceae): a new species from S Italy. *Nord. J. Bot.* 17: 649-652.
- CASSEY, R., SOMONEY, C., ELLIS, N. 1986. Legume storage protein and their genes. *Oxford Surv. Pl. Molec. Cell Biol.* 3: 1-95.
- CORTÉS, J.E. & LINARES, L. 1993. The Gibraltar campion *Silene tomentosa* Otth. in DC: probable extinction of a Gibraltar endemic. *Alectoris* 8: 64-65.
- DEBEAUX, J. O. & DAUTEZ, G. 1888. Sinopsis de la flora de Gibraltar. *Actes Soc. Linn. Bordeaux* 42: 1-135.
- GALÁN DE MERA, A. 1993a. *Silene tomentosa* Otth. (Caryophyllaceae) from Southern Spain, is not an extinct species. *Rivasgodaya* 7: 119-126.
- GALÁN DE MERA, A. 1993b. Flora y vegetación de los términos municipales de Alcalá de los Gazules y Medina Sidonia (Cádiz, España). Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- GALÁN DE MERA, A. 1995. Contribución a las floras de la provincia de Cádiz y de la península Tingitana. *Lagascalia* 18 (1): 55-62.
- GALÁN DE MERA, A., CORTÉS, J. E., VICENTE ORELLANA, J. A. & MORALES ALONSO, R. 1999. *Silene gazulensis* sp. nov. (Caryophyllaceae): un nuevo endemismo del entorno del estrecho de Gibraltar. *Acta Bot. Malacitana* 24 (en prensa).
- GARCÍA MURILLO, P. 1993. Sobre la cita de *Silene tomentosa* Otth. para la provincia de Cádiz. *Anales Jard. Bot. Madrid* 51 (1): 147.
- HSÜ, K. J., RYAN W. B. F. & CITA, M. B. 1973. Late Miocene desiccation of the Mediterranean. *Nature* 242: 240-244.
- JEANMONOD, D. 1984. Révision de la section *Siphonomorpha* Otth. du genre *Silene* L. (Caryophyllaceae) en Méditerranée occidentale II: le groupe du *S. mollissima*. *Candollea* 39: 195-259.
- KELAART, E.F. 1846. *Flora Calpensis*. Londres.
- LINARES, L., HARPER, A. & CORTÉS, J. 1996. The Flowers of Gibraltar. *Flora Calpensis*. Madrid.
- OXELMAN, B. 1996. RAPD patterns, nrDNA ITS sequences and morphological patterns in *Silene* section *Sedoideae* (Caryophyllaceae). *Pl.Syst. Evol.* 206: 393-410.
- PINTO DA SILVA, A R. (ed.). 1956. De Flora Lusitana Commentari. *Agronomia Lusitana* 18 (1): 5-48.
- SCHUHWERK, F. 1990. Relikte und Endemiten in Pflanzengesellschaften Bayerns – eine vorläufige Übersicht. *Ber. Bayer. Bot. Ges.* 61: 303-323.
- SUH, Y., THIEN, L. B., REEVE, H. E. & ZIMMER, E. A. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in *Winteraceae*. *Amer. J. Bot.* 80 (9): 1042-1055.
- TALAVERA, S. 1990. *Silene*. En: Castroviejo, S., M. Laínz, G. López, P. Montserrat, F. Muñoz Garmendia, J. Paiva & L. Villar (eds.), *Flora Iberica*, II. Madrid.
- TOWNER, P. 1991. Purification of DNA. En: Brown, T. A. (eds.), *Essential Molecular Biology. A practical approach*. Oxford University Press I.
- WILLKOMM, M & J. LANGE. 1880. *Prodromus Florae Hispanicae*, III. Stuttgart.