



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA ANIMAL,
BIOLOXÍA VEGETAL E ECOLOXÍA

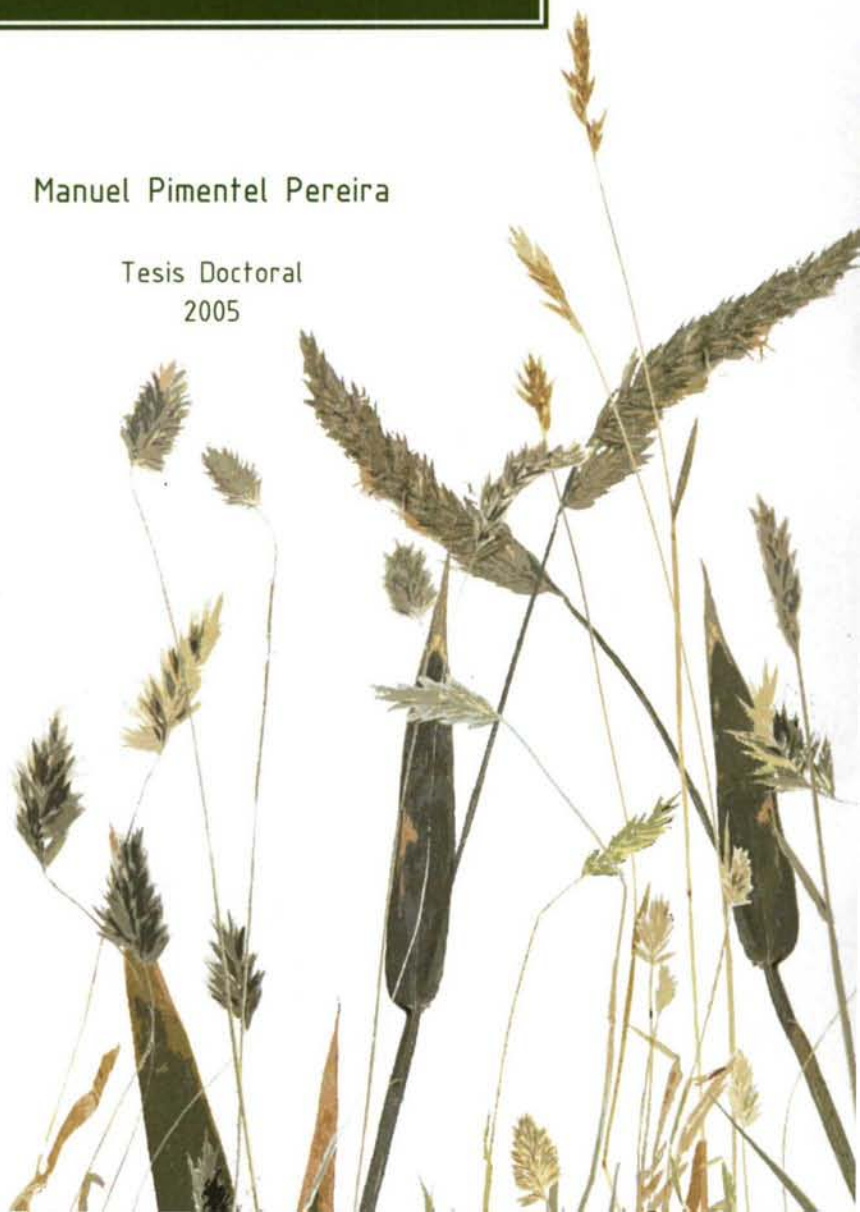
Estudio taxonómico y biogeográfico
de las especies europeas del género

Anthoxanthum L.

(Poaceae: Pooideae: Aveneae)

Manuel Pimentel Pereira

Tesis Doctoral
2005



et al.(2005). We selected *P. coerulescens* as a suitable outgroup as Soreng & Davis (1998) indicated the close relatedness between this speciesgenus *Phalaris* and *Anthoxanthum*.

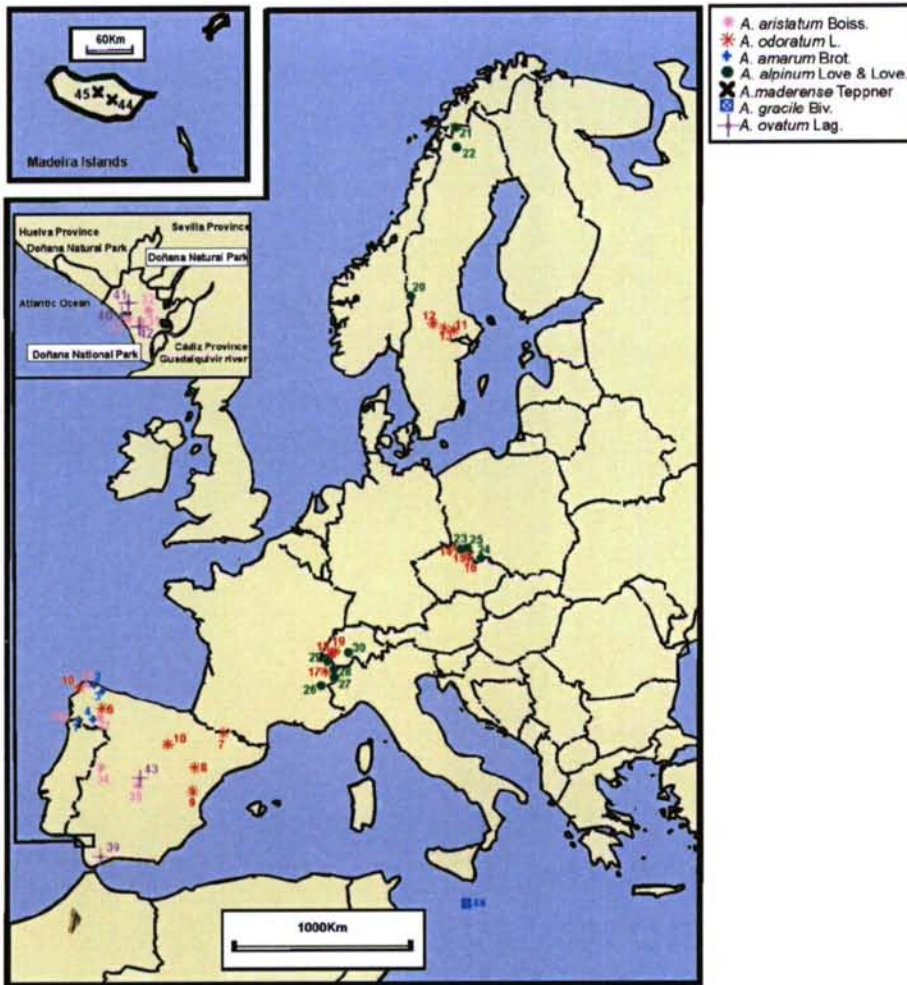


Figure 6.1. Geographic location of the 46 studied populations of *Anthoxanthum*.

Leaf material from five individuals were randomly collected per population and included in silica gel (Chase & Hills, 1991). Each sampled specimen was separated by at least 10 m from the next one. This number of specimens is usual in studies where large scale geographical variation is investigated (*e.g.*, Gabrielsen *et al.*, 1997; Tribsch, Schönschwetter & Stuessy, 2002). The total number of analyzed individuals was 235. Differentiation of species in those localities where more than one *Anthoxanthum* taxa

POP. NUMBER	TAXON	MAIN REGION	COLLECTION DATA	VOUCHER CODE	
1	<i>Anthoxanthum amarum</i> Brot.	NW Iberian Peninsula	Amorin, Tomiño, Pontevedra, Spain. 4-5-1999	SANT-52217	
2			San Andrés de Teixido, Cedeira, A Coruña, Spain. 12-6-1999	SANT-52216	
3			Esteiro, Xove, Lugo, Spain. 20-5-2004	SANT-52215	
4			Gabin, Montederramo, Ourense, Spain. 2-6-2002	SANT-52222	
5	<i>Anthoxanthum odoratum</i> L.	NW Iberian Peninsula	A Zapateira, A Coruña, Spain. 9-3-2000	SANT-52188	
6		Alto de Pedrafitá, O Courel, Lugo, Spain. 8-6-2001	SANT-52190		
7		La Renciana, Benasque, Huesca, Spain. 6-7-2004	SANT-52210		
8		Fuente Buena, Albarracín, Teruel, Spain. 21-5-2004	SANT-52212		
9		El Boixar, La Pobla de Benifassà, Castellón, Spain. 21-5-2004	SANT-52213		
10		Embalce de la Cuerda del Pozo, Cidones, Soria, Spain. 22-5-2004	SANT-52211		
11		Lövudden, Västmanland, Sweden. 12-6-2002	SANT-52199		
12		Stallalen, Västmanland, Sweden. 12-6-2002	SANT-52201		
13		Skinnkatteberg, Västmanland, Sweden. 12-6-2002	SANT-52200		
14		Svetlanka, Žákouti, Rokytice, Czech Republic. 10-6-2003	SANT-52203		
15		Modrý Důl valley, Krkonoše Mts., Czech Republic. 11-6-2003	SANT-52206		
16		Florení Domky chalets, Rokytice, Czech Republic. 10-6-2003	SANT-52208		
17		La Rosière, Savoie, Rhône Alpes, France. 5-8-2004	SANT-52218		
18		Pas de Morgins, Valais, Switzerland. 5-8-2004	SANT-52214		
19		Col des Mosses, Vaud, Switzerland. 5-8-2004	SANT-52192		
20		<i>Anthoxanthum alpinum</i> A. & D. Löve	N Scandinavia	Nipfjället, Dalarna, Sweden. 14-6-2002	SANT-52182
21			Näkkalouka, Lappland, Sweden. 7-7-2002	SANT-52198	
22			Hjörkliden, Lappland, Sweden. 9-7-2002	SANT-52202	
23			Novákova Louka ski tow, Dolní Měsecký, Krkonoše Mts., Czech Republic. 11-6-2003	SANT-52204	
24	Vysoká Hole Mt., Hrubý Jeseník Mts., Czech Republic. 12-6-2003		SANT-52207		
25	Čacléřské Houdy chalets, Krkonoše Mts., Czech Republic. 11-6-2003		SANT-52205		
26	Col de Galibier, Hautes Alpes, France. 2-8-2004		SANT-52189		
27	Col de L. Isfran, Isère, France. 5-8-2004		SANT-52219		
28	Piccolo San Bernardo, Aosta, Italy. 5-8-2004		SANT-52209		
29	Pico Brevent, Chamonix, France. 4-8-2004		SANT-52191		
30	Grimspass, Valais, Switzerland. 6-8-2004	SANT-52220			
31	<i>Anthoxanthum aristatum</i> Boiss. subsp. <i>macranthum</i> Valdés	SW Iberian Peninsula	Pinar de San Agustín, Parque Nacional de Doñana, Huelva, Spain. 24-4-2002	SANT-52181	
32		Cabo del Tío Antofito, Parque Nacional de Doñana, Huelva, Spain. 24-4-2002	SANT-52185		
33	<i>Anthoxanthum aristatum</i> Boiss.	SW Iberian Peninsula	Laguna de Santa Ollalla, Parque Nacional de Doñana, Huelva, Spain. 24-4-2002	SANT-52187	
34		C Iberian Peninsula	Fuente Tres Cantos, Parque Nacional de Monfragüe, Cáceres, Spain. 4-4-2001	SANT-52197	
35		Navafria, Madrid, Spain. 18-5-2002	SANT-52194		
36		San Cristovo, Ferrol, A Coruña, Spain. 7-5-2001	SANT-52196		
37		NW Iberian Peninsula	Sequeiros, Quiroga, Lugo, Spain. 2-5-2004	SANT-52195	
38		Cabo Silleiro, Baiona, Pontevedra, Spain. 1-6-2002	SANT-52193		
39	<i>Anthoxanthum ovatum</i> Lag.	SW Iberian Peninsula	Montera del Toro, Los Barricos, Cádiz, Spain. 6-6-2001	SANT-52186	
40		Laguna de Santa Ollalla, Parque Nacional de Doñana, Huelva, Spain. 24-4-2002	SANT-52184		
41		Navazo del Toro, Parque Nacional de Doñana, Huelva, Spain. 24-4-2002	SANT-52180		
42		Pinar de San Agustín, Parque Nacional de Doñana, Huelva, Spain. 24-4-2002	SANT-52183		
43		C Iberian Peninsula	El Pájar, Madrid, Spain. 4-6-2002	SANT-52221	
44	<i>Anthoxanthum madeirense</i> Teppner	Madeira	Poça da Neve, on the road to Pico Arriero, Madeira, Portugal. 2-8-2004	SANT-52179	
45		Achada do Teixeira, on the path to Raivo Mt., Madeira, Portugal. 30-7-2004	SANT-52178		
46	<i>Anthoxanthum gracile</i> Eiv.	Malta	Wied Zembaq, Malta. 25-3-2004	SANT-52223	
47	<i>Phalaris coerulescens</i> Desf.	Iberian Peninsula	Malpartida de Plasencia, Cáceres, Spain. 19-4-2002	SANT-53430	

Table 6.1. Sampled populations of *Anthoxanthum* and *Phalaris coerulescens* (outgroup) from the different geographical areas considered. Precise localities and collectors are provided on the voucher labels.

grew in sympatry was made following different floras and monographs on the genus (*e.g.*, Valdés, 1973; Tutin, 1980; Lauber & Wagner, 2001). Voucher specimens from all the populations were stored in the Herbarium of the University of Santiago de Compostela (SANT) (Holmgren, Holmgren & Barnett, 1990).

DNA ISOLATION AND AFLP FINGERPRINTING

Total genomic DNA from perennials was extracted from 25 mg of dried leaves using the CTAB protocol (Doyle & Doyle, 1990). As plant material was often scarce in annuals, extractions were performed with the Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The quality of the DNA was checked on 1% TAE-agarose gel, and its concentration was quantified by spectrometry with a Cary 3E Spectrophotometer (Varian, Palo Alto, USA). The AFLP method was performed with the AFLP Analysis System I for plant genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, USA) following the manufacturer's protocol. Two PCR primer pairs with three selective bases, E.AAG/M.CTC and E.AGC/M.CAG, were chosen over twelve pairs tested for the quality of the produced bands (even distribution of bands with relatively homogeneous intensity). The use of three selective bases is recommended in species where the genome size is between 0.3-12.0 pg (Fay, Cowan & Leitch, 2005). DNA content (measured as the 1C value) of the tetraploid *A. odoratum* has been established in 5.9 pg (Grime & Mowforth, 1982; Bennet & Leitch, 2004), so its average DNA amount per genome was clearly within the appropriate range. Moreover, the quality of AFLP bands appears to be independent to the ploidy level within a genus (Fay, Cowan & Leitch, 2005 and references therein).

Products were separated by electrophoresis on a 6% denaturing polyacrylamide gel. Visualization of AFLP markers was achieved by silver staining (Bassam, Caetano-Anollés & Gresshoff, 1991). Amplified traces were scored as presence (1) or absence (0) in a matrix that was manually constructed. Only bands with homogeneous intensity were taken into account, and a DNA molecular weight marker (weight marker VI, Roche Pharmaceuticals, Basel, Switzerland) was included as a reference. We repeated twice the whole AFLP protocol for 10 randomly chosen individuals. Thus, the reproducibility of the observed patterns was assured.

DATA ANALYSIS

All the analyses performed were based in several assumptions. First, AFLP markers behave as dominant markers. Second, comigrating fragments are considered homologous loci. Lastly, populations are at the Hardy-Weinberg equilibrium (Després, Lorient & Gaudeul, 2002).

To establish the mean genetic diversity within populations and within taxa, the percentage of polymorphic fragments, the Shannon diversity index (H_{Sh} , Shannon, 1948) and the Nei's average heterozygosity (Nei, 1987) were calculated. Subsequently, average values of these parameters for each taxon (and geographical region) were obtained. In addition to this, the mean number of rare (N_{RI}) and private (N_p) fragments were estimated for each population, taxon and region. Fragments with a prevalence under 10% were considered rare, whereas private ones were confined to one group (Legendre & Legendre, 1998; Després, Lorient & Gaudeul, 2002; Schönswetter *et al.*, 2004). All these parameters were calculated using the program SPSS Version 11.5 (SPSS Inc. Chicago, USA).

Different distance measures (Euclidean distance, Nei's unbiased distance, Dice's similarity coefficient and Jaccard distance) were used to assess the similarity between individuals and populations. Subsequently, the equivalence among the different measures was assessed by means of a Mantel correlation test (Mantel, 1967; Legendre & Legendre, 1998). To represent the relationships among samples, dendrograms based on the Euclidean distance were constructed using the UPGMA and Neighbor-joining (NJ) clustering methods. All cluster tests were performed with the program MEGA Version 2.1 (Kumar *et al.*, 2002). A principal coordinates analysis (PCoA) with minimum spanning tree (MST, Gower & Ross, 1969) based on a matrix of inter-individual Euclidean distances was calculated and plotted to search for groupings of populations. This analysis was performed using the program NTSYS-pc Version 2.1 (Rohlf, 2002).

The genetic differentiation among taxa, regions and populations was calculated as the unbiased F_{ST} estimator of Weir & Cockerham (1984) using TFGPA Version 1.3 (Miller, 1997). The 95% confidence interval for the estimator was obtained by bootstrapping 5000 replicates over loci.

To evaluate among-population or among-region genetic differentiation, a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier, Smouse & Quattro, 1992) on Euclidean pairwise distances was performed using ARLEQUIN 2.000 (Schneider *et al.*, 2000). For each AMOVA analysis, 1000 permutations were performed to obtain

significance levels of the variance. Different subsets of populations were analysed separately to investigate possible differences in the hierarchical apportioning of molecular variation among the main geographical regions (Gabrielsen, Brochmann & Ruess, 2002). Given that only one *P. coerulescens* and *A. gracile* populations were included in the survey, both of them were excluded from the AMOVA analysis.

The Mantel test (Mantel, 1967; Legendre & Legendre, 1998) has been extensively used to quantify the genetic distance between pairs of individuals as a function of their geographical distance (Gabrielsen *et al.*, 1997; Stehlik, Schneller & Bachmann, 2001; Després Lorient & Gaudeul, 2002; Tribsch, Schönswetter & Stuessy, 2002; Schönswetter *et al.*, 2003). To apply this analysis, a matrix of geographical distances (Km) among the populations was constructed. For all the performed Mantel tests, the normalized statistic R_M was estimated. The level of significance was assessed by means of a permutation test (999 replicates). All the Mantel tests were carried out using NTSYS-pc Version 2.11a (Rohlf, 2002).

Mantel tests were applied in two ways. Firstly, by means of a direct comparison between both genetic and geographic distance matrices. Secondly, by following Oden & Sokal (1986), who proposed a modification in this method to compute a correlogram for multivariate data using the normalized Mantel statistic R_M . A correlogram is a plot of genetic similarity as a function of geographical distance. To obtain it, the geographical matrix must be transformed into a *model matrix* that represents the phylogeographical hypothesis to be tested. By means of this test, region-wise and population-wise spatial-genetic relationships were analysed (*e.g.*, Stehlik, Schneller & Bachmann, 2001; Schönswetter *et al.*, 2004). All the R_M values obtained were Bonferroni-corrected.

Mantel tests were not applied to *P. coerulescens* and *A. gracile* populations. On the other hand, *A. maderense* was not considered for the population-wise analyses.

RESULTS

AFLP PATTERNS AND POLYMORPHISM

The two primer combinations used generated 205 unambiguously scorable fragments. Two of them (0.97%) were monomorphic in the entire data set. If only *Anthoxanthum* populations are considered, 174 scorable traces were produced, three of which were monomorphic (1.7%). The number of fragments revealed in each taxon varied from 60 in diploid *A. gracile* to 111 in tetraploid *A. odoratum*. The maximum and minimum number

of AFLP traces generated per population in each taxa and the overall number of fragments scored per species are listed in Table 6.2. Differences between annuals and perennial are generally low despite the higher number of perennial specimens analysed. The ploidy level does not seem to affect the amount of fragments produced.

Taxa	N° of populations	N° of markers	N° of markers per population		
			Minimum/Maximum	Mean	SD*
<i>A. odoratum</i>	15	111	66-94	82.7	7.9
<i>A. alpinum</i>	11	97	55-72	63.2	5.9
<i>A. amarum</i>	4	92	76-83	78.75	3
<i>A. maderense</i>	2	87	71-84	77.5	9.2
Perennials	32	132	55-94	75.2	11.1
<i>A. aristatum</i>	8	109	59-73	66.5	3.8
<i>A. ovatum</i>	5	94	60-69	64.8	3.7
<i>A. gracile</i>	1	60	60	60	-
Annuals	14	139	59-73	65.4	3.9
<i>P. coerulescens</i>	1	52	52	52	-
Totals	47	205	55-94	71.8	10.8

Table 6.2. Overall number of bands produced per taxon and maximum and minimum number of AFLP bands generated per population in each taxa. *SD, Standard Deviation.

GENETIC DIVERSITY WITHIN REGIONS AND TAXA

The percentage of polymorphic loci and the Shannon diversity index for each population (Table 6.3) were strongly correlated (pairwise Spearman's correlation coefficient; $r^s = 0.98$, $P = 0.002$). Moreover, polymorphism percentage and Shannon index were significantly higher in annuals than in perennials, regardless of the geographical region or the taxon considered (Mann-Whitney U -test; $P = 0.002$). Regarding rare and private fragments (Table 6.3), they were scarce across all populations and taxa, with the only exception of *A. gracile* and *P. coerulescens*.

Within annuals, there were no significant differences concerning polymorphism between *A. aristatum* and *A. ovatum*, or among the regions where both species were collected (U -test *A. aristatum* vs *A. ovatum*; $P = 0.12$). Interestingly, the Maltese population of *A. gracile* was much less variable compared to the other species (e.g., U -test *A. gracile* vs *A. aristatum*; $P = 0.003$). Regarding the private fragments (*A. gracile* excluded), they were restricted to the northwestern Iberian populations of *A. aristatum*.

In perennials, despite the generally low values of polymorphism, there were some minor differences among taxa and regions. Thus, *A. amarum* presented the lowest values of genetic diversity, whereas *A. alpinum* presented the highest. Populations from southern

REGION	POPULATION NUMBER - TAXA	H_{Sh}	N_p	N_{R1}	% pol
NW Iberian Peninsula	1 <i>A. amarum</i>	2.96	0	0.4	4%
	2 <i>A. amarum</i>	1.35	0	0.6	2.6%
	3 <i>A. amarum</i>	1.83	0	0.6	3.6%
	4 <i>A. amarum</i>	1.26	0	0.4	2.6%
General values for <i>A. amarum</i>		1.85	0	0.5	3.2%
NW Iberian Peninsula	5 <i>A. odoratum</i>	7.82	0	0	15.4%
	6 <i>A. odoratum</i>	6.14	0	0	10.4%
Values for <i>A. odoratum</i> in NW Iberian Peninsula		6.98	0	0	12.9%
NE Iberian Peninsula	7 <i>A. odoratum</i>	3.08	0	0	6%
	8 <i>A. odoratum</i>	2.2	0	0	4.7%
	9 <i>A. odoratum</i>	3.78	0	0.2	7%
	10 <i>A. odoratum</i>	3.72	0	0.2	7.3%
Values for <i>A. odoratum</i> in NE Iberian Peninsula		3.19	0	0.1	6.25%
S Scandinavia	11 <i>A. odoratum</i>	0.73	0	0	1.2%
	12 <i>A. odoratum</i>	2.1	0	0.4	3.2%
	13 <i>A. odoratum</i>	3.36	0	0.6	5.5%
Values for <i>A. odoratum</i> in S Scandinavia		2.06	0	0.3	3.3%
W Carpathians	14 <i>A. odoratum</i>	2.57	0	0.2	4.5%
	15 <i>A. odoratum</i>	0.73	0	0.2	1.5%
	16 <i>A. odoratum</i>	4.4	0	0	8.8%
Values for <i>A. odoratum</i> in W Carpathians		2.56	0	0.13	4.9%
Alps	17 <i>A. odoratum</i>	1.61	0	0	3.5%
	18 <i>A. odoratum</i>	2.7	0	0	6.1%
	19 <i>A. odoratum</i>	4.03	0	0	6.8%
Values for <i>A. odoratum</i> in the Alps		2.78	0	0	5.4%
General values for <i>A. odoratum</i>		3.51	0	0.12	6.5%
N Scandinavia	20 <i>A. alpinum</i>	0	0	0.6	0%
	21 <i>A. alpinum</i>	7.1	0	1.2	15.3%
	22 <i>A. alpinum</i>	1.0	0	0.8	2.8%
Values for <i>A. alpinum</i> in N Scandinavia		2.7	3	0.86	6%
W Carpathians	23 <i>A. alpinum</i>	2.75	0	0.2	6.3%
	24 <i>A. alpinum</i>	0	0	0	0%
	25 <i>A. alpinum</i>	1.37	0	0.2	3.5%
Values for <i>A. alpinum</i> in W Carpathians		1.37	0	0.13	3.3%
Alps	26 <i>A. alpinum</i>	4.01	0	0.4	10.1%
	27 <i>A. alpinum</i>	5.94	0	0	13.8%
	28 <i>A. alpinum</i>	4.92	0	0	11.3%
	29 <i>A. alpinum</i>	6.5	0	0.4	17.5%
	30 <i>A. alpinum</i>	3.9	0	0.2	11%
Values for <i>A. alpinum</i> in the Alps		5.05	0	0.2	12.7%
General values for <i>A. alpinum</i>		3.04	3	0.36	7.3%
Madeira	44 <i>A. maderense</i>	1.82	1	2.2	4.2%
	45 <i>A. maderense</i>	1.35	1	2.2	2.4%
General values for <i>A. maderense</i>		1.58	8	2.2	3.3%
General values for perennial species		3.03	35	0.31	6.34%
SW Iberian Peninsula	31 <i>A. aristatum</i>	13.6	0	0.6	25.3%
	32 <i>A. aristatum</i>	14.36	0	0.8	30.1%
	33 <i>A. aristatum</i>	5.88	0	0.4	14%
Values for <i>A. aristatum</i> in SW Iberian Peninsula		11.28	0	0.4	23.1%
C Iberian Peninsula	34 <i>A. aristatum</i>	6.86	0	0	16.4%
	35 <i>A. aristatum</i>	10.2	0	0	22.7%
Values for <i>A. aristatum</i> in C Iberian Peninsula		8.53	0	0	19.5%
W Iberian Peninsula	36 <i>A. aristatum</i>	0.64	1	0.2	1.7%
	37 <i>A. aristatum</i>	15.5	0	0.4	38%
	38 <i>A. aristatum</i>	19.92	0	0.4	49.2%
Values for <i>A. aristatum</i> in NW Iberian Peninsula		12.02	2	0.33	29.6%
General values for <i>A. aristatum</i>		18.1	3	0.35	24.7%
SW Iberian Peninsula	39 <i>A. ovatum</i>	9.27	0	0.2	21.2%
	40 <i>A. ovatum</i>	11.81	0	0.2	27.5%
	41 <i>A. ovatum</i>	12.37	0	0.2	33.3%
	42 <i>A. ovatum</i>	10.93	0	0.2	27.4%
Values for <i>A. ovatum</i> in SW Iberian Peninsula		11.1	0	0.2	27.35%
C Iberian Peninsula	43 <i>A. ovatum</i>	11.33	0	0.2	28.4%
Values for <i>A. ovatum</i> in C Iberian Peninsula		11.33	0	0.2	28.4%
General values for <i>A. ovatum</i>		11.14	0	0.2	27.5%
Malta	46 <i>A. gracile</i>	2	23	5.6	5.1%
General values for <i>A. gracile</i>		2	23	5.6	5.1%
General values for annual species		10.33	42	0.5	24.3%
General values for <i>P. coerulescens</i> (outgroup)		1.82	31	7.0	5.7%

Table 6.3. Diversity indices in 47 studied populations of *Anthoxanthum* and *P. coerulescens*. Population numbers and details are listed in Table 6.1; H_{Sh} , Shannon diversity index; N_p , number of private fragments; N_{R1} , mean number of rare bands (frequency of 0.1 or under) per individual; % pol, percentage of polymorphic bands. In bold, average values for each taxa, region within taxa and life cycle type.

regions were generally slightly more polymorphic than northern ones, with the exception of the Scandinavian *A. alpinum* populations. However, most of these differences were not significant. Only the pairs Alps-Sudetes for *A. alpinum* and *A. odoratum* (Mann-Whitney *U*-test; $P = 0.035$ and 0.02 respectively); NE. Iberian Peninsula-S. Scandinavia for *A. odoratum* (Mann-Whitney *U*-test; $P = 0.035$) and Alps-N. Scandinavia for *A. alpinum* (Mann-Whitney *U*-test; $P = 0.045$) were significantly different in polymorphism. Conversely, there are not significant differences between none of the perennial taxa or between most of the regions (e.g., *A. odoratum* vs *A. alpinum*; $P = 0.9$; *A. odoratum* from NW and NE Iberian Peninsula; $P = 0.43$).

Within perennials, *A. maderense* showed the highest number of private and rare fragments, followed by the Scandinavian populations of *A. alpinum*. However, they are rather scarce in all populations, taxa and regions.

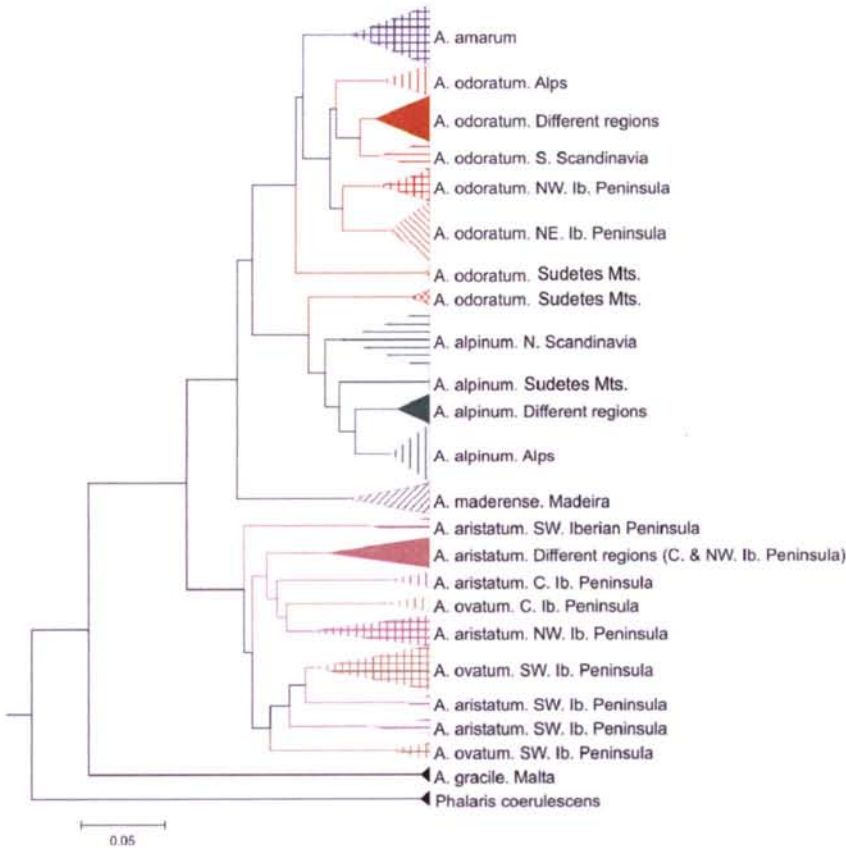


Figure 6.2. UPGMA dendrogram based on pairwise Euclidean distances between individuals.

PHENOTYPIC RELATIONSHIPS AMONG POPULATIONS AND TAXA

Mantel correlation coefficients between the different pairwise distance measures calculated were high and significant (*e.g.*, Euclidean vs Nei's unbiased genetic distance, $R_M = 0.97$, $P = 0.005$; Euclidean distance vs Dice coefficient, $R_M = -0.96$, $P = 0.005$). In the light of this, the Euclidean distance was used for all subsequent analyses.

The UPGMA tree (Figure 6.2) based on the pairwise distances between individuals showed a clear differentiation between annuals (except *A. gracile*) and perennials. There was no taxonomical structuring within the *A. aristatum/A. ovatum* clade, although a limited region-wise differentiation was observed between populations from SW Iberian Peninsula and populations from other regions.

Within perennials, *A. maderense* was basal to the other species, whereas *A. amarum* and *A. odoratum* grouped together and apart from *A. alpinum*. Both *A. alpinum* and *A. odoratum* clades showed a neat geographical structuring. We distinguished three main groups within *A. odoratum*: Iberian Peninsula, S. Scandinavia and the Alps. The populations from the Sudetes Mts. were intermingled or slightly differentiated. A similar pattern was observed in *A. alpinum*. The maltese *A. gracile* was clearly distinct from all the other populations, both perennials and annuals, acting as a basal group. The same clustering pattern was revealed by UPGMA dendrograms based on the distances between populations as well as by the Neighbor-Joining trees (data not shown).

The results of the UPGMA dendrogram were supported by the PCoA with superimposed MST (Figure 6.3). The first three axes extracted 45% of the total variation (first component: 21.1% of the variation; second component: 16.5% and third component: 7.1%). We observed a clear split between annuals and perennials along the first axis of the plot. Within annuals, there was no differentiation among taxa nor regions, although a separate PCoA for *A. aristatum* and *A. ovatum* revealed a weak separation between SW Iberian Peninsula and the other areas (results not shown). Regarding perennials, *A. alpinum* and *A. odoratum* were separated mainly in the second axis, with populations from the Sudetes in an intermediate position between both species. Geographical structuring in the PCoA was less evident than showed by the dendrogram, but it may still be appreciated. Alpine populations appeared more widely scattered in *A. odoratum* than in *A. alpinum*, while Scandinavian populations were well defined in both taxa. Moreover, *A. maderense* populations were connected to *A. odoratum* in the minimum spanning tree,

although they are clearly separated along axis two. Within annuals, *A. aristatum* and *A. ovatum* were connected to the *A. alpinum* clade in the minimum spanning tree. Again, *A. gracile* remained clearly isolated from all the other species of *Anthoxanthum*. The obtained results support the traditionally discussed taxonomic differentiation between annuals and perennials.

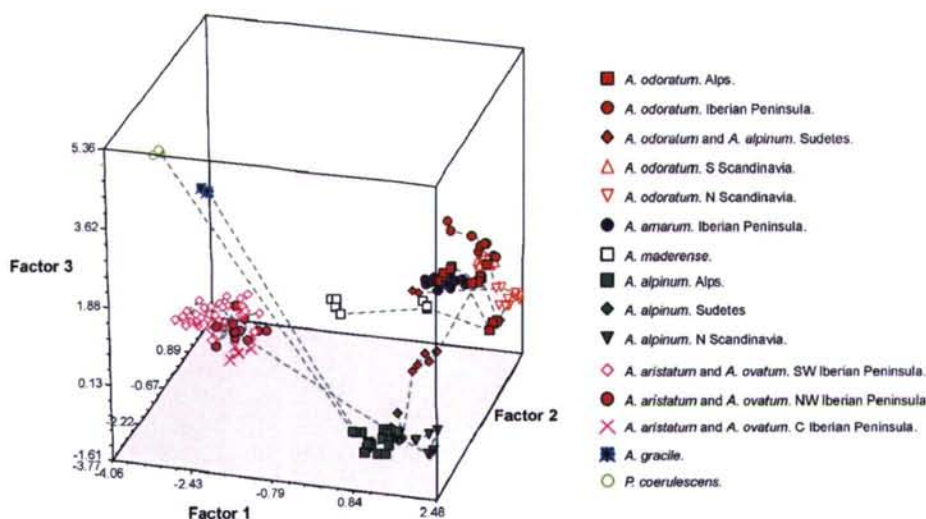


Figure 6.3. Principal coordinate analysis performed with the complete dataset.

GENETIC DIFFERENTIATION AMONG-TAXA AND AMONG-REGION

The Global F_{ST} value among all populations was high in both perennials [$F_{ST} = 0.9$; 95% confidence interval (CI) 0.88-0.94; $P = 0.02$] and annuals ($F_{ST} = 0.8$; CI 0.77-0.83). Within perennials, among-population differentiation was similarly high in *A. alpinum* ($F_{ST} = 0.94$; CI 0.90-0.97) *A. odoratum* ($F_{ST} = 0.87$; CI 0.84-0.90) and *A. amarum* ($F_{ST} = 0.91$; CI 0.85-0.96).

Regarding among-region differentiation, it was moderate in perennials ($F_{ST} = 0.34$; CI 0.29-0.39), being higher in *A. alpinum* than in *A. odoratum* ($F_{ST} = 0.4$; 95% CI 0.34-0.46 vs 0.3; CI 0.23-0.37). Conversely, it was much lower within annuals ($F_{ST} = 0.14$; CI 0.075-0.22). The overall partition of the genetic variation (AMOVA) for both perennials and annuals (Table 6.4) showed that the most of the diversity was found among populations (90.94% and 77.34% respectively). The variation within populations was generally low, and significantly higher in annuals than in perennials (22.66% vs 9.06%). The low intra-population variability is remarkable, and could be partially due to the

SOURCE OF VARIATION	df	SS	VARIANCE COMPONENTS	PERCENTAGE OF VARIATION
Global analysis. Perennials (a)				
Among populations	31	2554.17	16.15	90.94%
Within populations	128	206.0	1.6	9.06%
Global analysis. Annuals (b)				
Among populations	12	988.83	15.56	77.34%
Within populations	52	237.2	4.56	22.66%
Perennials. Region-wise analysis (c)				
Among regions	6	1205.82	6.68	35.65%
Among pops. within regions	25	1348.35	10.46	55.77%
Within populations	128	206	1.6	8.58%
<i>A. odoratum</i>. Region-wise analysis (d)				
Among regions	4	381.45	4.02	31.32%
Among pops. within regions	10	355.93	6.68	51.99%
Within populations	60	128.8	2.14	18.69%
<i>A. alpinum</i>. Region-wise analysis (e)				
Among regions	2	217.64	4.34	36.9%
Among pops. within regions	8	254.61	6.09	51.82%
Within populations	44	58.40	1.32	11.28%
Annuals. Region-wise analysis (f)				
Among regions	2	263.89	3.03	14.31%
Among pops. within regions	10	724.93	13.58	64.15%
Within populations	52	237.20	4.56	21.54%
Perennials. Taxon-wise analysis (g)				
Among taxa	3	1183.73	10.08	47.66%
Among pops. within taxa	28	1370.44	9.46	44.74%
Within populations	128	206.0	1.6	7.61%
Perennials. Taxon-wise analysis (*) (h)				
Among taxa	2	961.99	10.13	47.25%
Among pops. within taxa	29	1592.17	10.65	47.57%
Within populations	128	206	1.6	7.18%
Annuals. Taxon-wise analysis (i)				
Among taxa	1	127.16	1.58	7.59%
Among pops. within taxa	11	861.66	14.75	70.58%
Within populations	52	237.20	4.56	21.82%

Table 6.4. Analyses of molecular variance (AMOVA). Hierarchical partitioning of the overall genetic variation on two levels (within and between population) for perennials and annuals (a and b); region-wise analysis for perennials (c); region-wise analyses for *A. odoratum* and *A. alpinum* (d and e); region-wise analysis for annuals (f); taxon-wise analysis for perennials (g and h). (*), *A. amarum* merged in *A. odoratum*; taxon-wise analysis for annuals (i). df, degrees of freedom; SS, sum of squares. All the estimated values were highly significant. Pops., populations.

scarce number of individuals analysed, although other factors such as inbreeding or the prevalence of vegetative reproduction cannot be discarded.

AMOVAs for several groupings of populations were performed separately for annuals and perennials. Also, within the latter, *A. odoratum* and *A. alpinum* were analysed separately (Table 6.4). The tested groupings of specimens reflected different taxonomic arrangements proposed for these species, as well as the geographical distribution of the selected populations.

The results yielded by the AMOVAs revealed a clear geographical structure for *A. odoratum* and *A. alpinum*, and were coincident with the patterns observed in the UPGMA dendrogram and in the PCoA. In perennials, 35.65% of the genetic variation was found among regions (31.32% in *A. odoratum* and 36.9% in *A. alpinum*). Conversely, only 14.31% of the variation was inter-regional in annuals. Moreover, intrapopulation variation was higher in annuals (21.54%) than in perennials (all perennials: 8.58%; *A. odoratum*: 18.69%; *A. alpinum*: 11.28%).

Regarding taxon-wise analyses, only 7.59% of the observed genetic variation was found between taxa in annuals. In perennials, the differentiation among species explained 47.66% of the variation encountered. The merging of *A. amarum* into *A. odoratum* did not modify this value. No alternative grouping of populations rendered a higher level of among-taxa discrimination.

GENETICS AND GEOGRAPHY

Pairwise genetic distance increased with geographical distances (Table 6.5) (overall $R_M = 0.34$). This correlation was even higher when different subsets of data were analysed. The R_M value for *A. alpinum* and *A. odoratum* were 0.66 and 0.62 respectively, whereas the overall R_M value for perennials was 0.42. The lowest R_M value was obtained for annual species (0.30). All the estimated Mantel correlation coefficients were significant ($P = 0.001$).

Mantel correlograms computed within and between geographical regions were performed separately for perennials and annuals. Autocorrelation values were high and significant for all regions in both life-cycles (Figure 6.4). In perennials, all region pairs except NW-NE Iberian Peninsula and Sudetes Mts.-S Scandinavia were significantly correlated. Positive R_M values were obtained for NW Iberian Peninsula-S Scandinavia (0.044; $P = 0.001$); S Scandinavia-NE Iberian Peninsula (0.15; $P = 0.002$), Alps-Sudetes (0.11; $P = 0.001$) and Sudetes-N. Scandinavia (0.037; $P = 0.001$) (Figure 6.4, B). All other significant correlations were negative (Figure 6.4, A & B). In annuals, correlation coefficients within regions were significantly high and positive, whereas R_M values between regions were always significant and negative (Figure 6.4, C).

Population Mantel correlograms were also plotted separately for both life cycles, perennials (*A. odoratum*, *A. alpinum* and *A. amarum*) and annuals (*A. aristatum*/*A. ovatum*). Regarding *A. odoratum* (Figure 6.5, A), populations from the Iberian Peninsula

SUBSET OF DATA	OVERALL R_M
Overall	0.336**
Perennials	0.422**
Annuals	0.303**
<i>A. alpinum</i>	0.663**
<i>A. odoratum</i>	0.394**

Table 6.5 Overall R_M values for different subsets of data. (**) significant value ($P=0.001$)

6

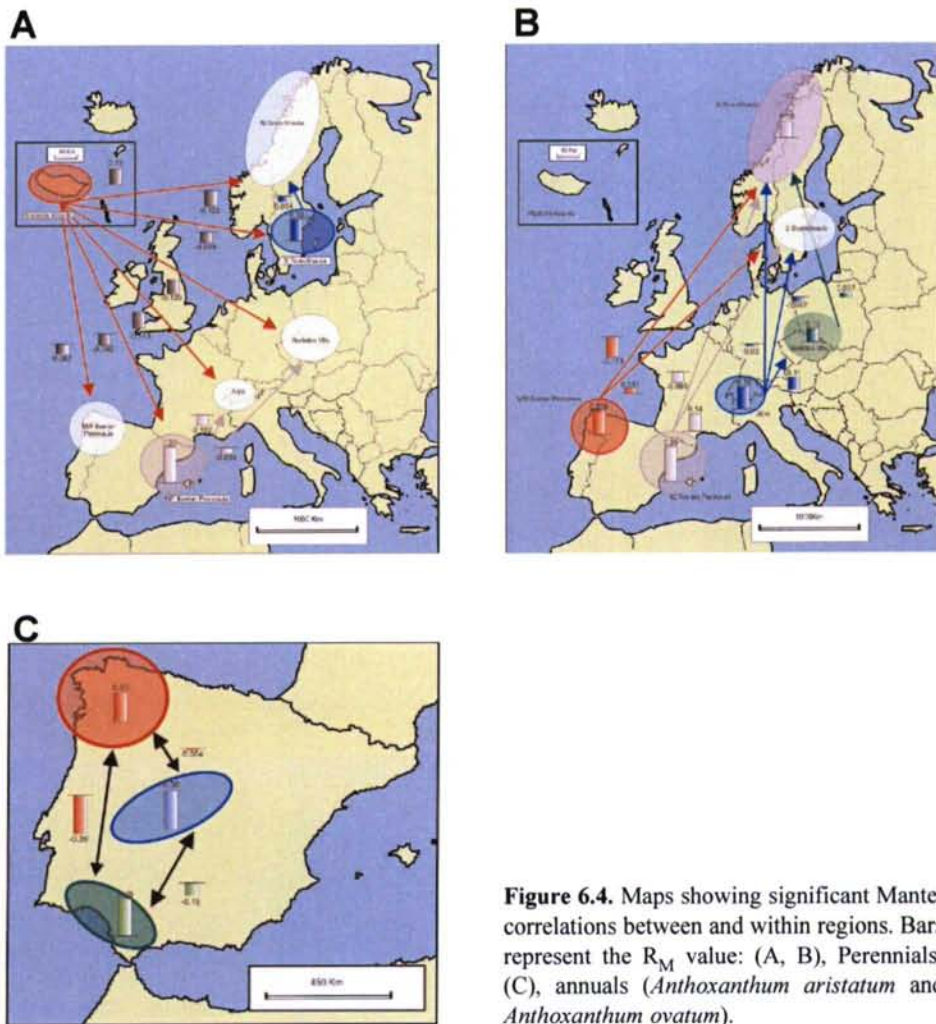


Figure 6.4. Maps showing significant Mantel correlations between and within regions. Bars represent the R_M value: (A, B), Perennials; (C), annuals (*Anthoxanthum aristatum* and *Anthoxanthum ovatum*).

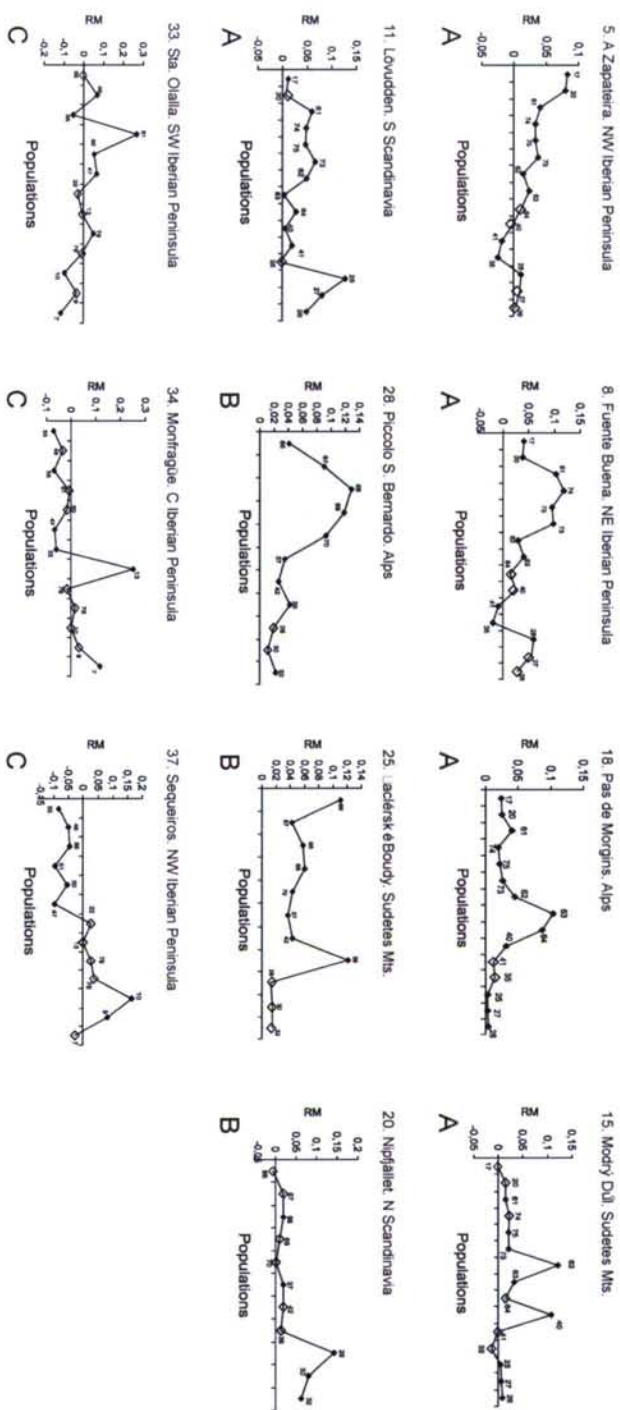


Figure 6.5. Correlograms of Mantel (R_M): (A), Correlograms based on 15 *A. odoratum* populations; (B), correlograms based on 12 *A. alpinum* populations; (C), Correlograms based on 13 *A. aristatum/A. oratum* populations. Only one correlogram per region and taxa is represented. Filled squares, significant correlation; empty squares, non-significant correlation.

(NW and NE) were positively correlated to each other (R_M ranging from 0.025 to 0.117) and to all other populations from the Alps and S Scandinavia, and negatively correlated to Sudetes Mts. populations. On the other hand, R_M values were higher between Scandinavia and the Iberian Peninsula than between the latter and the Alps. Finally, Mantel correlations between populations from the pairs Iberian Peninsula (NW and NE)-Sudetes Mts were rarely significant.

Alpine populations showed a significantly positive correlation with each other that ranged from 0.025 to 0.087. Moreover, significant R_M values were also obtained between Alpine and S Scandinavian populations. Conversely, correlations between populations from the Sudetes Mts. and the Alps were rarely significant. In addition to this, Mantel coefficients calculated between populations within the Sudetes Mts region were not significant (ranging from -0.003 to -0.013), and comparisons of these populations to those from other regions except S. Scandinavia produced low and non significant R_M values. Finally, Mantel correlations within S. Scandinavia yielded positive and significant R_M values ranging between 0.05 and 0.081.

In *A. alpinum*, significantly positive correlations between populations were more frequent than in *A. odoratum* (Figure 6.5, B), and were obtained between populations within the three regions considered; Alps (R_M from 0.04 to 0.128), Sudetes (R_M from 0.037 to 0.046) and N. Scandinavia (R_M from 0.04 to 0.081). Positive correlations also occurred in the pair Alps-Sudetes (R_M from 0.012 to 0.04). On the other hand, correlations between populations from both Alps and Sudetes and populations from N. Scandinavia were positive, but generally not significant.

Finally, regarding *A. amarum*, most of the between-populations correlations were positive, although not significant (not shown).

The lack of geographical structuring in *A. aristatum* and *A. ovatum* was also reflected on Mantel tests (Figure 6.5, C), as no clear pattern was encountered by population-wise comparisons. Correlation coefficients calculated between populations within the three considered regions showed wide variation intervals (e.g., R_M ranged from -0.087 to 0.105 in SW. Iberian Peninsula). Generally, R_M values between populations from SW. Iberian Peninsula and from the other regions were negative and, in general, not significant. Correlation between populations from central and NW Iberian Peninsula was generally low and not significant, with some exceptions like populations from Fuente de Tres Cantos (population 13, C Iberian Peninsula) and S. Cristovo (population 7, NW Iberian Peninsula) that were positively correlated.

DISCUSSION

The analysis of 230 plants from 46 populations belonging to the different European species of genus *Anthoxanthum* has been useful to draw different consequences about the phylogeography of this genus, as well as to clarify the taxonomical relationships among these taxa.

GENETIC DIVERSITY DISTRIBUTION

Our results indicated a clear genetic distinction between two main groups, corresponding to annuals (but *A. gracile*) and perennials. Also, a certain geographical structure of genetic variation was observed.

In all perennial taxa, the highest genetic variation was detected among populations within regions, whereas the lowest was found within populations (*e.g.*, *A. odoratum*, 51.99% vs 18.69%; *A. alpinum*, 51.82 vs 11.28) (Table 6.4). This pattern does not agree with the one usually reported for outcrossing, wind-pollinated, widespread species (Hamrick *et al.*, 1991; Després, Loriot & Gaudeul, 2002; Schönswetter *et al.*, 2004). This could be due to the low number of individuals analysed per population. Nevertheless, the particular conditions in which sampled populations grow could favour the clonal spread of individuals, reducing the intra-population genetic variation (Richards, 1990). This trend has been also observed in other perennial grasses, such as *Lolium perenne* L., *Agrostis curtisii* Kerguelen or *Puccinellia maritima* (Hudson) Parl. (reviewed in Richards, 1990). Although Wu & Subodh (1980) considered that asexual reproduction is not likely to be common in *Anthoxanthum*, Antonovics, Clay & Schmitt, (1987) pointed out the occurrence of clonal-derived tillers in natural populations of *A. odoratum*. Interestingly, some of the populations collected in disturbed habitats (*e.g.*, population 5 from A Zapateira or population 21 from Nikkaloukta. Table 6.3) presented relatively higher levels of genetic variation.

In overall, 90.94% of the genetic variation was found among populations in perennials (Table 6.4, a). This percentage, as well as the global F_{ST} values obtained for perennial species, indicate that there is little gene-flow among populations and taxa. This is not surprising given the wide geographical range considered (maximum distance between two populations = 6300Km) and the higher than expected genetic distance among some of the studied species (Figure 6.2). Regarding regions, the F_{ST} values obtained for *A. odoratum* and *A. alpinum* (0.3 and 0.4 respectively) indicated that among-regions isolation is higher in *A. alpinum* than in *A. odoratum*. This is probably due to the different

distribution of both taxa.

Despite the low within-population genetic diversity observed, it can be seen that, in perennials, mean genetic variation is higher in southern populations than in northern ones regardless of the taxon considered (e.g., H_{Sh} : 6.98 in NW Iberian Peninsula vs 2.06 in S. Scandinavia for *A. odoratum*; 5.05 in the Alps vs 1.37 in the Sudetes for *A. alpinum*). In our opinion, this fact might be due to its past history in relation with the *tabula rasa* hypothesis (Hewitt, 1996; King & Ferris, 1998; Després, Lorient & Gaudeul, 2002). The relatively high genetic variation of *A. alpinum* in the Alps might be related to the existence of a glacial refugium for mountain flora in southwestern Alps (Scotti *et al.*, 2000). Apparently, this is not valid to *A. odoratum*, whose genetic diversity in this region is relatively low.

Regarding the prevalence of private fragments, they were circumscribed to northern Scandinavia in *A. alpinum*. This pattern could be explained by the confluence of a southern lineage and a putative eastern one in this area, that has been highlighted as suture zone by different authors (e.g., Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt 1999, 2004; Carlsson, Söderberg & Tegelstrom, 2003). Given the distribution of *A. alpinum*, from Scandinavia to Japan and along different European mountain ranges, we postulate that the Balkans may have acted as glacial refugia for this taxon. Unfortunately, no specimens were collected in that region.

Within perennials, *A. maderense* presented the highest prevalence of rare and private fragments (2.2 and 8 respectively, Table 6.3). This could reflect the isolation and ancient origin of this taxa, endemic to high altitude inland cliffs of Madeira Island. Finally, *A. amarum* populations showed a low level of genetic polymorphism that could be related to the prevalence of clonal spread in this taxon. Its close relationship with *A. odoratum* and the absence of private markers suggest a recent origin for this high polyploid.

In annuals, the highest diversity was also detected among populations within regions (64.15%; $F_{ST} = 0.8$). Nevertheless, intra-population variation was still substantial in annuals (21.54%) due to their outcrossing breeding system, their short life cycle and their occurrence in the early serial stages (Hamrick *et al.*, 1991).

Regarding annuals, no clear geographical structure was found. In addition to this, genetic differentiation among regions was low (14.31%). Interestingly, our results reflect a certain differentiation of the populations from SW Iberian Peninsula. This is consistent with the observations of Tremetsberger *et al.* (2004), who postulated that the geological

history of the Guadalquivir River basin has prevented the mixture among populations from this area and from the Iberian Massif.

Regarding the lack of geographical structure observed in annuals, it could be argued that the northern-most distribution areas of these taxa native up to northern France (Tutin, 1980) have not been sampled. However, climatic conditions in N Iberian Peninsula during last glacial maximum must have been clearly unsuitable for these mediterranean species (reviewed by Vila, 2004), so an *ex novo* colonization of northern areas may have occurred. The lack of geographical structuring of genetic diversity might be due to the origin of the southern populations, most of which were collected in sandy littoral localities of the Doñana National Park (SW Iberian Peninsula). In this area, changes in coastal environments have been pronounced during the late Quaternary (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 1996). Therefore, founder effect could be expected in these populations. Probably this region was colonized from other southern refugial areas such as SE Iberian Peninsula or even northern Africa, where annual *Anthoxanthum* species are highly variable in both morphology and ecology. Different studies suggest that the Strait of Gibraltar did not act at a severe barrier for gene flow in plants and animals (Comes, 2004; reviewed in Vila, 2004).

Within annuals, it is noteworthy the high number of private and rare fragments present in *A. gracile*. This number and the results of both PCoA and clustering analysis (Figures 6.3 and 6.2) might indicate an ancient isolation for these species. *A. gracile* grows basically in some Mediterranean islands, such as Sardinia, Malta, Sicily, Crete and other Aegean archipelagos. It has been also reported from continental Italy, the Peloponese, (Tutin 1980), Corsica (Pignatti, 1982) and some limited regions in northern Africa. However, the revision of the *A. gracile* specimens deposited in different European Herbaria (PAL, UPS, G, FI) showed that it has been often mistaken for *A. aristatum* (Quezel & Santa, 1962; Lambinon & Deschâtres, 1991; Pignatti, 1982). In the light of this, we consider that the presence of this taxon in these areas is doubtful.

Both this distribution pattern and the high level of genetic differentiation observed in this taxon may be indicating a Messinian origin for *A. gracile*. Further research involving new molecular analyses and a higher number of populations would be needed to clarify this question.

GEOGRAPHY AND GENETICS.

The Mantel analyses showed a positive and significant correlation between genetic and geographic distance for all the data subsets. The R_M coefficients (Table 6.5) were higher in those groups that were apparently more geographically structured, like *A. alpinum*, whereas they were minimum in annual *Anthoxanthum* species, whose populations and regions are totally intermingled.

Regional and populational Mantel correlograms showed a clear geographical structuring for *A. alpinum* (Figures 4 and 5). For this taxon, a significantly positive Mantel correlation was found between Alpine and Sudetes regions. This pattern is supported by the PCoA-MST (Figure 6.3) and the clustering analysis (Figure 6.2), in which populations from both regions appeared closely related. In our opinion, this lack of differentiation indicates to a narrow relationship between both areas, and would suggest the existence of a northwards colonization route for *A. alpinum*. The similarity between arctic-alpine floras from both regions and the importance of the Sudetes as a "crossroad" in plant migrations have been stressed in different studies (e.g., Stursa 1998; Després, Lorient & Gaudeul, 2002). According to different authors, the Alps and the Sudetes were ice-covered during the last glacial maximum (Huijzer & Vandenberghe, 1998; Carr *et al.*, 2002), therefore, recolonization from unglaciated areas during the following interglacial occurred. The finding of a higher genetic diversity in W. Alps for *A. alpinum* (Table 6.2) suggests that a putative subalpine glacial refugium may have existed for this taxon. This has been also reported for other cold-tolerant species such as *Trollius europaeus* L. or *Picea abies* (L.) Karst. (e.g., Scotti *et al.*, 2000; Després, Lorient & Gaudeul, 2002).

Finally, Mantel correlograms (Figures 4B and 5) showed a low and rarely significant correlation in *A. alpinum* between populations in N. Sweden and the Alps or the Sudetes. These results, as well as the finding of several private fragments in northern Scandinavia (Table 6.2), seem to indicate the existence of a suture zone for *A. alpinum*. The same pattern has been already observed in different plant and animal species (e.g., Taberlet *et al.*, 1998).

For *A. odoratum*, regional and populational correlograms showed a clear geographical structure as well. Nevertheless, the picture obtained is different. For this taxon, the highest genetic variation was found in the Iberian Peninsula, whereas Alpine populations were more genetically homogeneous.

Regional Mantel tests showed a negative correlation between the Iberian Peninsula and the Alps or the Sudetes, suggesting the existence of an eastern lineage for *A.*

odoratum. Conversely, regional and population correlograms revealed a close relationship between S Scandinavian and Iberian *A. odoratum* populations (Figures 4B and 5). These results suggest a northward colonization route between these regions for *A. odoratum*. The existence of this route has been already proposed by different authors for a wide range of plants and animals (e.g., Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 2001). According to our data, the Iberian Peninsula might have acted as glacial refugium for *A. odoratum*. This taxon is not currently frequent in southernmost areas of the Iberian Peninsula, but recent investigations suggest that different glacial refugia existed in northern Iberian Peninsula during the last glacial maximum (Comes, 2004; Vila *et al.*, 2005).

Differentiation among populations was higher in *A. alpinum* than in *A. odoratum* ($F_{ST}=0.4$ vs 0.3 respectively). Although this was probably due to the discontinuous distribution of the former, it could also indicate a more ancient establishment of *A. alpinum* populations. We put forward the hypothesis that a northward advance from W Alps to the Sudetes took place in two different stages. In the first one, *A. alpinum* might have colonized the lowlands and, as the climate became milder, its distribution range would have risen in the mountains. In the second stage, *A. odoratum* may have colonised the areas where *A. alpinum* was no longer present. The existence of sharp boundaries between the distribution ranges of both taxa in these areas (Bogenrieder, Bühler & Harringer, 1993; Felgrová & Krahulec, 1999) might be one of the consequences of this process. According to Hedberg (1967), these sharp boundaries are currently fading away because of human activities like hay transport or the use of commercial seed mixtures.

Finally, a significantly negative Mantel correlation occurred between Madeiran plants and those from the rest of the regions (Figure 6.4, A). Moreover, *A. maderense* occupies a basal position to all the other perennials in the dendrogram, and is fairly isolated in the PCoA-MST. According to these results, the divergence of *A. maderense* may have occurred before the differentiation of *A. odoratum*, *A. alpinum* or *A. amarum*. The climate change that caused the differentiation of the Macaronesian Flora was probably involved in the origin of *A. maderense*. It is widely accepted that most of the Macaronesian species have a Mediterranean origin (e.g., Francisco-Ortega *et al.*, 1997), so, the ancestor of *A. maderense* might have been a diploid, perennial and mediterranean lineage of *Anthoxanthum*. At present, perennials are mainly distributed in temperate and cold regions of Europe, however, different studies have suggested that a mediterranean perennial diploid *Anthoxanthum* was involved in the origin of tetraploid *A. odoratum* (Felber, 1986; Hedberg, 1990).

REMARKS ON *ANTHOXANTHUM* TAXONOMY

According to our results, a higher than expected differentiation exists between *A. gracile* and the other species. Within perennials, *A. odoratum* and *A. alpinum* were genetically differentiated, despite their morphological similarity (Hedberg, 1990). Also, *A. amarum* appeared remarkably close to *A. odoratum*, which suggests a recent divergence for this nonaploid taxon. Finally, *A. maderense* is basal to all other perennials in the dendrogram and its specific status seems to be clear.

Our results also indicated that the current taxonomical arrangement is particularly unsuitable for *A. aristatum* and *A. ovatum*. According to the PCoA, the AMOVA and the cluster analysis, there was no clear genetic differentiation between both taxa. Moreover, our results suggest that no infraspecific taxon should be defined in *A. aristatum* or *A. alpinum*. Ongoing research on ecological and morphological issues will help to clarify the taxonomy of this complex group of species (Pimentel & Sahuquillo, unpublished).

CONCLUSIONS

1. The AFLP technique and the different statistical analyses applied have proven to be useful to make phylogeographic and taxonomic inferences in a complex genus where a great variation in natural history parameters exists.
2. A deep effect of different natural history parameters such as life form, breeding system or ecological preferences on the genetic structure of the different taxa has been detected in *Anthoxanthum*.
3. A messinian origin is proposed for the Mediterranean diploid *A. gracile*. Also, our results suggest an ancient isolation of the Macaronesian *A. maderense*.
4. Northward colonization routes between the Iberian Peninsula and Scandinavia and between the Alps and the Sudetes Mts. have been proposed for *A. odoratum* and *A. alpinum* respectively. We postulate the existence of glacial refugia for these species in the Iberian Peninsula and the Alps respectively.
5. A higher than expected genetic differentiation between *A. odoratum* and *A. alpinum* has been observed. Conversely, our results have revealed a close relationship between the former and *A. amarum*.
6. The sampling of new populations, specially in putative glacial refugia such as the

Balkans, Italy and N Africa would be needed to get more conclusive results. Besides, increasing the number of individuals studied per population would be also necessary to improve the study.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are most grateful to P Catalán for all the facilities provided during lab work. We also deeply appreciate all the help and advice provided in the laboratory by E Pérez-Collazos and JG Segarra-Moragues. We thank M Vila, JG Segarra-Moragues, E Pérez-Collazos and M Perille for their critical review of the manuscript. R Pimentel, L Filipova, D Giraldo, M Perille and D Romero helped during fieldwork. D Romero also helped with the figures. This research was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (FPU program) to MP. We further want to thank the authorities of the Doñana Biologic Station (CSIC) for their help during fieldwork in the Doñana National Park.

REFERENCES

- Antonovics J, Clay K, Schmitt J. 1987** The measurement of small-scale environmental heterogeneity using clonal transplants of *Anthoxanthum odoratum* and *Danthonia spicata*. *Oecologia* **71**: 601-607.
- Avise JC. 1989.** Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. *Evolution* **43**: 1192-1208.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. 1991.** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annals of Biochemistry* **196**: 80-83.
- Bennet MD, Leitch IJ. 2004.** Angiosperm DNA C-values database (release 5.0, Dec. 2004) <http://www.rbkew.org.uk/cval/homepage.html>.
- Bocquet G, Widler B, Kiefer H. 1978.** The Messinian Model—a new outlook for the floristics and systematics of the Mediterranean areas. *Candollea* **33**: 269-287.
- Bogenrieder A, Bühler M, Härringer P. 1993.** *Anthoxanthum odoratum* L. und *Anthoxanthum alpinum* (Á et D Löve) am Feldberg (Schwarzwald). Ein Beispiel für Höhengvikarianz. *Carolinea* **51**: 41-50.
- Carlsson M, Söderberg L, Tegelström H. 2003.** Comparison of genetic variation in

- Fennoscandian adders between two nuclear datasets. In: Carlsson M, ed. Phylogeography of the adders. *Vipera berus* (Tesis Doctoral inédita). Uppsala: Acta Universitatis Uppsaliensis.
- Carr S, Engel ZK, Kalvoda J, Parker A. 2002.** Sedimentary evidence for extensive glaciation of the Úpa Valley, Krkonoše Mountains, Czech Republic. *Zeitschrift für Geomorphologie* **46**(4): 523-537.
- Chase MV, Hills HG. 1991.** Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* **40**: 215-220.
- Comes HP. 2004.** The Mediterranean region – a hotspot for plant biogeographic research. *New Phytologist* **164**: 11-14.
- Comes HP, Kadereit JW. 1998.** The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* **3**: 432-438.
- Dawson AG. 1992.** *Ice Age earth. Late Quaternary Geology and Climate*. Routledge, London.
- Després L, Lorient S, Gaudeul M. 2002.** Geographic pattern of genetic variation in the European globeflower *Trollius europaeus* L. (Ranunculaceae) inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* **11**: 2337-2347.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992.** Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes. Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- Fay MF, Cowan RS, Leitch IJ. 2005.** The effects of Nuclear DNA Content (C-value) on the Quality and Utility of AFLP Fingerprints. *Annals of Botany* **95**: 237-246.
- Felber F. 1986.** Distribution des cytodemes d'*Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. en Suisse. Les relations Alpes-Jura. Index des nombres chromosomiques des Spermatophytes de la Suisse: III Poaceae, Genre *Anthoxanthum*. *Botanica Helvetica*, **96**(2): 145-158.
- Felber-Girard M, Felber F, Bottler A. 1996.** Habitat differentiation in a narrow hybrid zone between diploid and tetraploid *Anthoxanthum alpinum*. *New Phytologist* **133**: 531-540.
- Felgrová M, Krahulec F. 1999.** *Anthoxanthum odoratum* and *A. alpinum*: Life history parameters at two different altitudes. *Folia Geobotanica* **34**: 19-31.

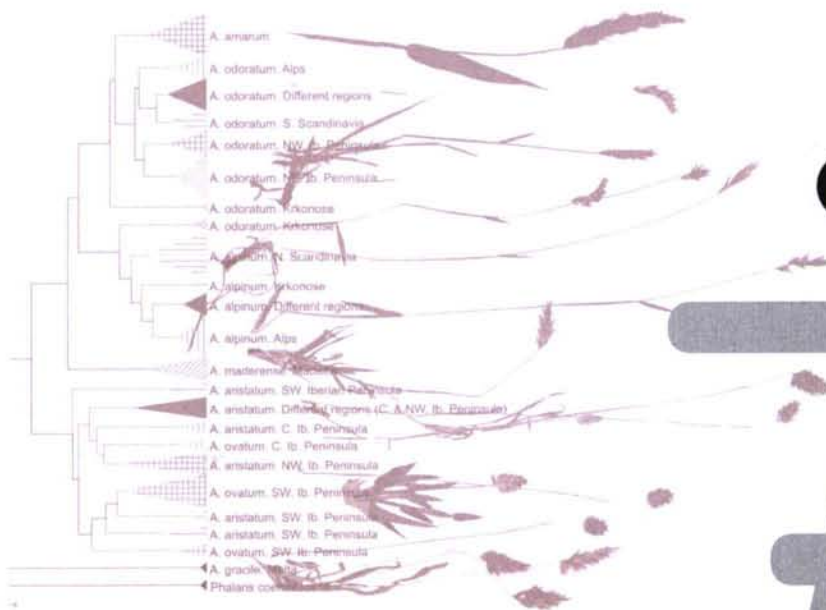
- Fernandes A, Queirós M. 1969.** Contribution à la connaissance cytotoxinomique des spermatophyta du Portugal. I. Gramineae. *Boletim da Sociedade Broteriana 2.a série* **43**: 20-140.
- Fiori A. 1969.** *Nuova Flora Analitica d'Italia. Vol. I.* Museo Tridentino di Scienze Naturali. Trento: Edagricole.
- Fjellhaim S, Elven R, Brochmann C. 2001.** Molecules and morphology in concert. II. The *Festuca brachyphylla* complex (Poaceae) in Svalbard. *American Journal of Botany* **88**(5):869-882.
- Francisco-Ortega J, Fuertes-Aguilar J, Gómez-Campo, C, Santos-Guerra A, Jansen RK. 1999.** Internal Transcribed Spacer Sequence Phylogeny of *Crambe* L. (Brassicaceae): Molecular Data Reveal Two Old World Disjunctions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **11**(3): 361-380.
- Gabrielsen TM, Bachmann K, Jakobsen KS, Brochmann C. 1997.** Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia*. *Molecular Ecology* **6**: 831-842.
- Gabrielsen TM, Brochmann C, Rueness J. 2002.** The Baltic sea as a model system for studying postglacial colonization and ecological differentiation, exemplified by the red alga *Ceramium tenuicorne*. *Molecular Ecology* **11**: 2083-2095.
- Gower JC, Ross GJS. 1969.** Minimum spanning trees and single linkage cluster analysis. *Applied statistics* **18**: 54-64.
- Grime JP, Mowforth MA. 1982.** Variation in genome size-an ecological interpretation. *Nature* **299**: 151-153.
- Hagen AR, Giese H, Brochmann C. 2001.** Trans-Atlantic dispersal and phylogeography of *Cerastium arcticum* (Caryophyllaceae) inferred from RAPD and SCAR markers. *American Journal of Botany* **88**(1): 103-112.
- Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD. 1991.** Correlations Between Species Traits and Allozyme diversity: Implications for Conservation Biology. In: *Genetics and Conservation of rare plants* (eds. Falk DA, Holsinger KE).Oxford: Oxford University Press, 75-86.
- Hansen KT, Elven R, Brochmann C. 2000.** Molecules and morphology in concert: tests of some hypotheses in arctic *Potentilla* (Rosaceae). *American Journal of Botany* **87**(10): 1466-1479.

- Hedberg I. 1967.** Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. II. Investigations of some Swedish and of a few Swiss population samples. *Symbolae Botanicae Uppsaliensis* **18**(5): 1-88.
- Hedberg I. 1990.** Morphological, cytotaxonomic and evolutionary studies in *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat.- A critical review. *Sommerfeltia* **11**: 97-107.
- Heuertz M, Fineschi S, Anzidei M, Pastorelli R, Salvini D, Paule L, Frascaria-Lacoste N, Hardy OJ, Vekemans X, Vendramin GG. 2004.** Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular Ecology* **13**: 3437-3452.
- Hewitt GM. 1996.** Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247-276.
- Hewitt GM. 1999.** Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87-112.
- Hewitt GM. 2004.** Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **359**: 183-195.
- Holmgren PK, Holmgren NH, Barnett LC. 1990.** *Index Herbariorum. Part I: Herbaria of the World*. 8th edition. New York: New York Botanical Garden.
- Huijzer B, Vandenberghe J. 1998.** Climatic reconstruction of the Weichselian Pleniglacial in northwestern and central Europe. *Journal of Quaternary Science* **13**(5): 391-417.
- Karp A, Seberg O, Buiatti M. 1996.** Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* **78**(2): 143-149.
- Kellogg EA. 2001.** Evolutionary History of the Grasses. *Plant Physiology* **125**: 1198-1205.
- King AK, Ferris C. 1998.** Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology* **7**: 1151-1161.
- Kjølner J, Sæstad S, Taberlet M, Brochmann C. 2004.** Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. *Molecular Ecology* **13**: 81-86.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001.** *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*, Version 2.1. Arizona State University, Arizona, USA.
- Lambinon J, Deschâtres R. 1991.** Les *Anthoxanthum* annuels de Corse. *Candollea* **46**: 217-219.

- Legendre P, Legendre L. 1998.** *Numerical Ecology*. Amsterdam: Elsevier.
- López-González G. 1994.** Nota sobre el género *Anthoxanthum* L. (Gramineae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **51**(2): 309-312.
- Mantel N. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
- Marhold K, Lihová J, Perný M, Bleeker W. 2004.** Comparative ITS and AFLP analysis of diploid *Cardamine* (Brassicaceae) taxa from closely related complexes. *Annals of Botany* **93**:507-520.
- Merino B. 1909.** *Flora de Galicia Vol. III*. Santiago de Compostela: Tipografía Galaica.
- Miller MP. 1997.** *Tools for Population Genetic Analysis (TFGPA)*, Version 1.3. Arizona (USA):Department of Biological Sciences, Northern Arizona University.
- Nei M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Oden NL, Sokal RR. 1986.** Directional autocorrelation: an extension of spatial correlograms to two dimensions. *Systematic Zoology* **35**: 608-617.
- Pignatti S. 1982.** *Anthoxanthum*. In: *Flora d'Italia, III* (ed Pignatti S). Bolonia:Edagricole, 582-583.
- Quezel P, Santa S. 1962.** *Nouvelle Flore de L'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris: Editions du Centre National de la Recherche Scientifique.
- Richards AJ. 1990.** Reproductive versatility and grass population structure. In: *Reproductive versatility of grasses* (ed. Chapman GP). Cambridge: Cambridge University Press, 131-153.
- Rodríguez-Ramírez A, Rodríguez-Vidal J, Cáceres L, Clemente L, Belluomini G, Manfra L, Improta S, De Andrés JR. 1996.** Recent coastal evolution of the Doñana National Park (SW. Spain). *Quaternary Science Reviews* **15**: 803-809.
- Rohlf FJ. 2002.** *NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Version 2.11a. New York:Exeter Software.
- Sahuquillo E, Lumaret R. 1999.** Chloroplast DNA variation in *Dactylis glomerata* L taxa endemic to the Macaronesian islands. *Molecular Ecology* **8**: 1797-1803.
- Schneider S, Küffer JM, Rössli D, Excoffier L. 2000.** *Arlequin*, Version 2.0: a Software for Population Genetic Data Analysis. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.

- Schönswetter P, Tribsch A, Schneeweiss M, Niklfeld H. 2003.** Disjunctions in relict alpine plants: phylogeography of *Androsace brevis* and *A. wulfeniana* (Primulaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 437-446.
- Schönswetter P, Tribsch A, Stehlik I, Niklfeld H. 2004.** Glacial history of high alpine *Ranunculus glacialis* (Ranunculaceae) in the European Alps in a comparative phylogeographical context. *Biological Journal of the Linnean Society* **81**: 183-195.
- Schüle W. 1993.** Mammals, vegetation and the initial human settlement of the Mediterranean islands: a palaeoecological approach. *Journal of Biogeography* **20**: 399-412.
- Scotti I, Vendramin GG, Matteotti LS, Scarponi C, Sari-Gorla M, Binelli G. 2000.** Postglacial recolonization routes for *Picea abies* in Italy as suggested by the analysis of sequence-characterized amplified region (SCAR) markers. *Molecular Ecology* **9**: 699-708.
- Shannon CE. 1948.** A mathematical theory of communications. *Bell System Technical Journal* **27**: 379-423.
- Smouse PE. 1998.** To tree or not to tree. *Molecular Ecology* **7**: 399-412.
- Soreng RJ, Davis JI. 1998.** Phylogenetics and Character Evolution in the Grass Family (Poaceae): Simultaneous Analysis of Morphological and Chloroplast DNA Restriction Site Character Sets. *The Botanical Review* **64**(1): 1-85.
- Stehlik I, Schneller JJ, Bachmann K. 2001.** Resistance or emigration: response of the high-alpine plant *Eritrichium nanum* (L.) Gaudin to the ice age within the Central Alps. *Molecular Ecology* **10**: 357-370.
- Stenström A, Jonsson BO, Jónsdóttir IS, Fagerström T, Augner M. 2001.** Genetic variation and clonal diversity in four clonal sedges (*Carex*) along the Arctic coast of Eurasia. *Molecular Ecology* **10**: 497-513.
- Stuessy TF, Tremetsberger K, Müllner AN, Jankowicz J, Guo YP, Baeza CM, Samuel RM. 2003.** The melding of systematics and biogeography through investigations at the populational level: examples from the genus *Hypochaeris* (Asteraceae). *Basic and Applied Ecology* **4**: 287-296.
- Stursa J. 1998.** Research and management of the Giant Mountain's arctic-alpine tundra. *Ambio* **27**(4): 358-360.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cossons JF. 1998.** Comparative

- phylogeography and postglacial colonization route in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.
- Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy TF, Ortiz MA, Weiss-Schneeweiss H, Kadlec G. 2004.** Relationships of *Hypochaeris salzmanniana* (Asteraceae, Lactuceae), an endangered species of the Iberian Peninsula, to *H. radicata* and *H. glabra* and biogeographical implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* 146: 79-95.
- Tribsch A, Schönswetter P, Stuessy TF. 2002.** *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the Ice Age in the European Alps. *American Journal of Botany* 89(12): 2024-2033.
- Trusty JL, Olmstead RG, Santos-Guerra A, Sá-Fontinha S, Francisco-Ortega J. 2005.** Molecular phylogenetics of the Macaronesian-endemic genus *Bystropogon* (Lamiaceae): palaeo-islands, ecological shifts and interisland colonizations. *Molecular Ecology* 14: 1177-1189.
- Tutin TG. 1980.** *Anthoxanthum*. In: *Flora Europaea* (eds. Tutin GH, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA). Cambridge: Cambridge University Press, 229-230.
- Valdés B. 1973.** Revisión de las especies anuales del género *Anthoxanthum* (Gramineae). *Lagascalia* 3(1): 99-141.
- Vila M. 2004.** Effects of environmental changes during the Quaternary on the distribution of extant species. The case of the butterflies *Erebia triaria* and *E. palarica*. PhD Thesis. A Coruña:Universidade da Coruña.
- Vila M. 2005.** The importance of time-scale and multiple refugia: Incipient speciation and admixture of lineages in the Butterfly *Erebia triaria* (Nymphalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36(2): 249-260.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Peleman J. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984.** Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wu L, Jain S. 1980.** Self-fertility and seed set in natural populations of *Anthoxanthum odoratum* L. *Botanical Gazette* 141(3): 300-304.



R

esumen de los resultados y
Discusión general

Resumen de los resultados y discusión general

El creador de la Naturaleza, cuando creó las especies, impuso en sus creaciones una ley eterna de reproducción y multiplicación dentro de los límites de sus propias clases. En realidad, en muchos casos les permitió variar su apariencia externa, pero jamás pasar de una especie a otra.

(C. Linneo, tomado de Grant, 1989)

I confess that after Shakespeare and Spinoza the greatest effect was produced upon me by Linnaeus, namely by the opposition to which he challenged me. While I tried to take up his sharp, ingenious separation, and his well-aimed, useful, but often also arbitrary rules, I felt a discord in my inner self: what he wanted to keep apart with force, seemed to aspire towards union according to its innermost necessity.

(J. W. Goethe, tomado de Weber, 2003)

En el presente trabajo se han abordado las complejas relaciones taxonómicas entre las especies europeas del género *Anthoxanthum* L. Muchos de estos taxones no han sido, hasta el momento, bien caracterizados morfológicamente y, por otro lado, persisten numerosas incógnitas sobre su distribución y sobre el tratamiento taxonómico que pudiera resultar más adecuado para este grupo y sus componentes. Estas incógnitas no se refieren exclusivamente a la categoría taxonómica que pudiera corresponder a cada una de las variantes europeas de las gramas de olor, sino que afectan sobre todo a las relaciones de proximidad evolutiva entre estos taxones, todos ellos muy íntimamente relacionados. En el presente capítulo, se resumirán brevemente los resultados obtenidos en los distintos apartados de la tesis. Asimismo, se elaborará nuestra propuesta taxonómica para las especies europeas del género *Anthoxanthum*.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

En el **capítulo 2**, se estudian los patrones de variación morfológica observados en los distintos taxones europeos de *Anthoxanthum*, tanto específicos como infraespecíficos. Se analizaron un total de 1787 individuos pertenecientes a 60 poblaciones provenientes de la Península Ibérica, los Alpes, los Balcanes, los Montes Sudetes, Escandinavia, Madeira y Malta. Además se incluyeron seis individuos pertenecientes a dos especies africanas del género-*Anthoxanthum aethiopicum* Hedberg y *Anthoxanthum nivale* K. Schum-como grupos externos. En cada uno de los individuos se midieron un total de 59 caracteres macromorfológicos y micromorfológicos de la epidermis foliar abaxial y de la sección transversal del limbo de la hoja. A continuación, se emplearon diversos análisis estadísticos de uso común en Taxonomía Numérica para establecer las relaciones morfológicas entre los taxones (Sneath & Sokal, 1973; Rohlf, 1993; Legendre & Legendre, 1998).

Los resultados obtenidos mostraron que dos de los taxones europeos se encuentran bien caracterizados en base a su micro y macromorfología; *A. gracile*, especie diploide anual con distribución mediterránea no bien conocida en la actualidad y *A. amarum*, poliploide y perenne, endémico del NW de la Península Ibérica. Hasta donde sabemos, es la primera vez que se aportan datos sobre la anatomía foliar de estas dos especies. La diferenciación morfológica entre las restantes especies resultó más conflictiva basándose en los caracteres analizados, si bien podían distinguirse dos grupos de taxones. El primer grupo estaba compuesto por las especies perennes: *A. odoratum*, tetraploide de amplia distribución, *A. alpinum*, diploide de distribución alpino-boreal y *A. maderense*, diploide endémico de los archipiélagos de Madeira y Azores. De acuerdo con nuestros resultados, la diferenciación morfológica entre estas especies es difícil. El segundo grupo de especies incluía a los diploides anuales mediterráneos: *A. aristatum* y *A. ovatum*, cuyo estatus taxonómico ha sido muy discutido ya desde mediados del siglo XIX (revisado por López-González, 1994). En este capítulo se pusieron de manifiesto los problemas taxonómicos que serán abordados durante los siguientes apartados.

En el **capítulo 3**, se estudiaron las relaciones morfológicas y moleculares entre *A. odoratum*, tetraploide, y *A. alpinum*, diploide. Tanto la taxonomía como las relaciones evolutivas de las especies de este complejo poliploide han sido profusamente estudiadas, fundamentalmente mediante trabajos cariológicos y macromorfológicos (revisado por Hedberg, 1990). Sin embargo, los patrones de variación morfológica no habían sido analizados mediante métodos de Taxonomía Numérica y, hasta donde nosotros sabemos,

tampoco se había estudiado la afinidad genética entre ambos citotipos.

Para la consecución de estos objetivos, se analizaron 14 poblaciones, ibéricas y escandinavas, pertenecientes a los dos citotipos; el tetraploide *A. odoratum* s. str. y el diploide *A. alpinum*. Un total de 45 individuos fueron recolectados en cada población. De éstos, en 35 se llevaron a cabo estudios macromorfológicos, mientras que en 5 se analizaron variables micromorfológicas (anatomía foliar) de la epidermis abaxial y de la sección transversal del limbo. Los 5 individuos restantes por población se dedicaron al estudio molecular mediante la técnica de los marcadores RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNAs*; Williams *et al.*, 1991).

De acuerdo con nuestros resultados, los caracteres macromorfológicos seleccionados no son útiles en la diferenciación de los citotipos, ni siquiera aquellos como la pubescencia de las glumas o la escabridéz de las flores fértiles, que han sido atribuidos de forma exclusiva a una de las dos formas (Knaben, 1950). Asimismo, hemos detectado una gran influencia de las variables ambientales en los caracteres micromorfológicos foliares analizados. De acuerdo con diversos autores (*e.g.*, Rozmus, 1960; Humbert-Droz & Felber, 1992), la anatomía foliar es útil en la determinación del nivel de ploidía en poblaciones naturales de *Anthoxanthum* s. lat. Sin embargo, dados nuestros resultados consideramos que tal utilidad es dudosa.

Con respecto a los datos moleculares, los marcadores RAPDs no revelaron una diferenciación genética entre los citotipos sino su relación geográfica. En resumen, la baja diferenciación morfológica y molecular (o bien, morfológica en un sentido amplio) entre *A. odoratum* (tetraploide) y *A. alpinum* (diploide) no permite su diferenciación a nivel específico. De acuerdo con nuestros resultados, el rango de subespecie sería más adecuado para el diploide, si bien nuevas poblaciones de áreas no muestreadas deben ser consideradas en el estudio molecular para obtener resultados concluyentes.

En el capítulo 4, se planteó el análisis de las relaciones morfológicas y moleculares entre los taxones del complejo *A. aristatum/A. ovatum* mediante el estudio de poblaciones simpátricas de ambas especies. En estas áreas los límites entre los taxones se difuminan por la aparición de formas transicionales entre ellos. Dos hipótesis se han propuesto para explicar este comportamiento: (i), la hibridación puntual entre dos especies bien definidas y (ii), la total introgresión entre dos taxones todavía en proceso de diferenciación.

Para determinar qué hipótesis es más factible, se recolectaron un total de 608 plantas pertenecientes a ambas especies y a sus taxones infraspecíficos. De los especímenes

muestreados, 494 lo fueron en 6 poblaciones simpátricas del Parque Nacional de Doñana (Huelva, España), mientras que las restantes 114 pertenecían a poblaciones alopátricas de *A. aristatum*, *A. ovatum*, y de *A. alpinum* que fueron utilizadas como grupos externos.

Como en los casos anteriores, los individuos recolectados se analizaron desde el punto de vista macromorfológico, micromorfológico (caracteres de la epidermis abaxial de la hoja y del corte transversal del limbo) y molecular (marcadores moleculares AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*; Vos *et al.*, 1995)

Los diversos análisis realizados con los datos moleculares muestran que, en todos los casos, las poblaciones simpátricas están más próximas entre sí que a cualquiera de los grupos externos, independientemente de su identidad taxonómica. Por otro lado, los datos macromorfológicos y micromorfológicos de la epidermis foliar abaxial indican que las poblaciones simpátricas presentan un fenotipo intermedio entre las alopátricas, éstas sí bien diferenciadas. Finalmente, los análisis de asociación realizados muestran que el agrupamiento de los individuos no es coherente con las categorías taxonómicas consideradas y, por lo tanto, los caracteres analizados no son, aparentemente, útiles en la identificación de los taxones. Únicamente el taxon *A. aristatum* subsp. *macranthum* muestra una cierta diferenciación genética, si bien esta subespecie se encuentra muy próxima morfológicamente a *A. ovatum* var. *ovatum*.

En nuestra opinión, el complejo *A. aristatum/A. ovatum* es un ejemplo de evolución en curso. Ambos taxones forman unidades bastante bien definidas en alopatria, sin embargo, su diferenciación es problemática en simpatria, tanto más cuando no existen diferencias ecológicas claras entre ellas. En principio, nuestros resultados parecen no apoyar la diferenciación a nivel específico entre ambos taxa. Asimismo, en nuestra opinión, las diversas categorías infraespecíficas definidas en estas especies son el resultado de variaciones puntuales, reflejo de su plasticidad fenotípica, por lo que su validez taxonómica es dudosa. Sin embargo, y dada la ligera diferenciación genética observada para *A. aristatum* subsp. *macranthum*, consideramos que el estudio de nuevas poblaciones de este taxon sería conveniente.

El punto de partida del **capítulo 5** es el análisis de la importancia de la diferenciación morfológica y ecológica detectada dentro del poliploide *A. amarum* (Pimentel & Sahuquillo, 2003), en el que se han observado 2 morfotipos (Norte y Sur). El primero de ellos (tipo N), se caracteriza por sus hojas pruinosas y por la presencia de estolones. Habita principalmente localidades del N del área de distribución de la especie. Por su parte, el segundo tipo (tipo S) presenta hojas no pruinosas y bulbillos en la base de la

planta. Crece generalmente en zonas del S del área de distribución. Sin embargo, la separación entre ambos grupos no es completa, y existen poblaciones mixtas.

Los principales objetivos de este capítulo fueron: (i), determinar el grado de diferenciación genética y morfológica entre ambos morfotipos y (ii), abordar la biogeografía de esta especie en Galicia (NW Península Ibérica) mediante el análisis de la estructura genética de las poblaciones.

Para la consecución de estos objetivos, se analizaron 358 individuos de 10 poblaciones gallegas de *A. amarum*. De éstos, 279 se usaron en el análisis morfológico y 79 se analizaron en ensayos moleculares mediante los marcadores moleculares RAPDs.

Los resultados muestran que la diferenciación entre los morfotipos sólo se apoyaba en los caracteres macromorfológicos cualitativos (presencia de pruina en las hojas y presencia de estolones y bulbillos), si bien también se detecta una fuerte dependencia de éstos con respecto a diversos parámetros ambientales, tales como las precipitaciones o la sequía estival. Por contra, los resultados moleculares y los rasgos macromorfológicos cuantitativos muestran una baja diferenciación entre estos morfotipos, obteniéndose una mezcla total entre poblaciones. Estos resultados indican que ambos morfotipos se pueden considerar ecotipos y por lo tanto, no se les puede asignar ninguna categoría infraespecífica.

Con respecto a su Biogeografía, los análisis de asignación (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000) y de partición de la varianza molecular revelan una cierta estructura genética. En base a los resultados moleculares, pueden distinguirse tres grupos de poblaciones, si bien es necesario tener en cuenta que el mayor porcentaje de variabilidad genética se encuentra entre las poblaciones dentro de los grupos. El primer grupo incluye las poblaciones del S de la provincia de Pontevedra, el segundo las poblaciones del Valle del Miño y el tercero, el más heterogéneo, diversas poblaciones dispersas y bastante diferenciadas ecológicamente. El mismo agrupamiento de poblaciones se refleja también en los análisis de asociación obtenidos con los datos moleculares. Estos resultados indican una mayor relación genética entre las poblaciones incluidas en los grupos 1 y 2, mientras que no se detecta relación entre los diversos grupos. En nuestra opinión, la alta frecuencia de la reproducción vegetativa en este taxon influye en el aislamiento entre los grupos y poblaciones. Asimismo, es destacable que dos de los grupos obtenidos se corresponden a dos de las rutas de migración propuestas por Izco (1987) para la Flora de Galicia, la ruta costera y la interior, paralela al río Miño.

En el **capítulo 6** se abordó, mediante el uso de los marcadores moleculares AFLPs, el estudio de la filogeografía del género *Anthoxanthum* en Europa (Avice, 1989). Para la consecución de este objetivo, fueron incluidos en el estudio 235 especímenes procedentes de 46 poblaciones de los diversos taxones europeos del género. Los resultados obtenidos acerca de la distribución de la varianza genética, así como de las correlaciones entre las distancias genéticas y geográficas han permitido establecer diversas hipótesis sobre la Filogeografía del género *Anthoxanthum*.

En primer lugar, para los taxones perennes del género, se ha encontrado una mayor variabilidad genética en las poblaciones del S de Europa con respecto a las del Norte. El mismo resultado se ha obtenido en distintas especies de animales y plantas, y se ha atribuido al efecto que tuvieron las glaciaciones del Cuaternario sobre el origen y distribución de los taxones en Europa. En cambio, en las especies anuales no se ha observado este efecto debido a su distribución en el entorno mediterráneo.

La estructura genética observada en las especies *A. alpinum* y *A. odoratum* sugiere una intensa influencia de las glaciaciones cuaternarias en la distribución actual de estos taxones. La fuerte correlación entre las poblaciones del NW de la Península Ibérica y las del S de Escandinavia, indica la existencia de una ruta de colonización costera entre estas dos áreas tras la retirada de los glaciares. Por otro lado, esta relación no fue detectada entre las poblaciones Ibéricas y las de los Alpes o los Sudetes, lo que indicaría la existencia de más de un linaje en *A. odoratum*. Con respecto a *A. alpinum*, la variabilidad genética observada en las poblaciones de los Alpes es mucho mayor que en los Sudetes o Escandinavia, encontrándose una fuerte correlación entre las poblaciones Alpinas y las de los Sudetes. Estos resultados refuerzan la idea, propuesta ya por diversos autores, de la existencia de una ruta de migración para la flora ártico-alpina entre ambas regiones.

Los análisis realizados indican una alta diferenciación genética de dos de las especies analizadas, *A. gracile* y *A. maderense*. Dadas sus distribuciones respectivas (islas del Mediterráneo y el archipiélago macaronésico de Madeira), y su elevada diferenciación, sugerimos un origen Messiniense para el primero de los taxones. Con respecto al segundo, su diferenciación parece ser previa a la de *A. odoratum*, *A. amarum* y *A. alpinum*, y podría estar ligada a los procesos climáticos que diferenciaron a las floras mediterránea y macaronésica durante el Terciario.

Con respecto a las posibles consecuencias taxonómicas de nuestros resultados, cabe decir que las diferencias genéticas observadas entre varios de los taxones analizados son mayores de lo esperado a la luz de resultados anteriores referidos a su macro y

micromorfología. Por otra parte, los datos de los AFLPs indican una fuerte semejanza entre *A. aristatum* y *A. ovatum*.

DISCUSIÓN GENERAL

En este apartado se discutirá nuestra propuesta taxonómica para las especies europeas del género *Anthoxanthum* a la luz de los resultados obtenidos en las distintas fases del estudio. En dicha propuesta hemos pretendido reflejar las relaciones de proximidad morfológica, en su sentido más amplio (Stuessy, 2003), entre los diversos taxones del grupo.

En la clasificación que proponemos para el género en Europa no se ha considerado un único concepto de especie, sino que se han recogido distintos aspectos de los conceptos biológico, genético y morfológico. El primero de ellos se basa en la existencia de barreras reproductivas entre las especies, ya sean éstas fisiológicas o ecológicas (Mayr, 1942, 1982; Stuessy, 1990; Carrión, 2003). Este concepto no resulta siempre aplicable en las plantas, especialmente en el caso de grupos de diversificación reciente como las gramíneas (Stuessy, 1990; Castroviejo, 2004). Por otra parte, el establecimiento de barreras reproductivas puede deberse a modificaciones en muy pocos genes o en muy pocos caracteres morfológicos, de forma que las proximidad global (morfológica y genética) entre los taxones no se tiene en cuenta. El concepto genético postula que la medida de las distancias genéticas entre los grupos es el mejor método para definir especies (Stuessy, 1990; Carrión, 2003). Este concepto presenta la ventaja de incluir una gran cantidad de caracteres que, en el caso de marcadores moleculares inespecíficos como los RAPDs y los AFLPs, estarán distribuidos por todo el genoma del organismo. Por otra parte, permite tener en cuenta el parentesco entre los individuos en la definición de las especies (Stuessy, 1990). La principal desventaja es que resulta poco útil para la diferenciación de los taxones a simple vista (Grant, 1989; Castroviejo, 2004). En el concepto morfológico, la diferenciación fenética es la base para separar las especies. Su principal desventaja es no tener en cuenta el parentesco entre los taxones (Castroviejo, 2004). Por otra parte, el número de caracteres utilizados en la diferenciación específica suele ser bajo.

En nuestra propuesta, tanto la posibilidad de hibridación entre los grupos como la diferenciación genética y morfológica se han tenido en cuenta según los criterios de Stuessy (1990). Sin embargo, en todo proceso de asignación de una categoría taxonómica

a un conjunto de individuos hay una alta carga de subjetividad (Grant, 1989; Stuessy, 1990; Heywood, 1998; Castroviejo, 2004). En los casos en los que se observó discrepancia entre los distintos tipos de datos se primó la diferenciación macromorfológica, ya que uno de los objetivos del presente trabajo fue hallar caracteres que permitan una diferenciación de los taxones. La revisión de pliegos de herbario procedentes de diversas instituciones oficiales permitió detectar la variabilidad de algunos de los caracteres tradicionalmente utilizados.

Según los resultados obtenidos, consideramos que el género *Anthoxanthum* en Europa está constituido por 5 especies: *A. gracile* Biv., *A. ovatum* Lag., *A. maderense* Teppner, *A. amarum* Brot. y *A. odoratum* L.; 2 subespecies: *A. odoratum* L. subsp. *odoratum* y *A. odoratum* L. subsp. *alpinum* (Löve & Löve) Hultén y dos variedades: *A. ovatum* Lag. var. *ovatum* y *A. ovatum* var. *aristatum* Pérez Lara. A continuación se realizará una breve descripción de los taxones citados. Con respecto a la micromorfología foliar, la terminología empleada es la de Ellis (1976, 1979) modificada por Nicora y Rúgolo de Agrassar, Devesa (1992) y Aliscioni y Arriaga (1998).

***Anthoxanthum gracile* Biv.**

Los diferentes aspectos biogeográficos y taxonómicos de esta especie han sido tratados en los capítulos 2 y 5. Este taxon presenta un nivel muy elevado de diferenciación morfológica, principalmente en base a caracteres florales tales como la longitud de la arista, la longitud y anchura de la lema estéril superior o la longitud de las espiguillas. Los caracteres florales cuantitativos han sido comúnmente empleados en la diferenciación de esta especie en distintas floras y monografías (e.g. Valdés, 1973; Tutin, 1980; Pignatti, 1982). En cambio, los caracteres vegetativos no son útiles en su caracterización. Los rasgos macromorfológicos cualitativos y micromorfológicos, asocian este taxon a los otros *Anthoxanthum* anuales de distribución mediterránea, *A. ovatum* y *A. aristatum*.

Con respecto a los caracteres nanomorfológicos (en este caso marcadores AFLPs), también revelan una alta diferenciación genética para este taxon, que podría indicar un aislamiento muy antiguo, probablemente desde el Mesiniense.

Dado que *A. gracile* está claramente caracterizado en base a diversos rasgos morfológicos, y dada su diferenciación genética frente al resto de las especies europeas del género, consideramos que debe mantenerse como una especie diferente.

***Anthoxanthum gracile* Biv., *Stirp. Rar. Sicilia* 1:13 t.1, f.2. (1813).**

Planta anual de pequeño tamaño (hasta 30 cm), de tallos simples o ramificados en la base. Sus hojas presentan una vaina hinchada y pubescente en la parte superior. Lígula corta. Inflorescencia laxa y pauciflora, de pequeño tamaño, con espiguillas de 10-12 mm, que presentan una arista en la lema estéril superior el doble de larga que la espiguilla (hasta 2 cm).

Propia de ambientes secos. Endemismo del mediterráneo central y oriental, citado en Albania, Grecia e Italia, pero que se distribuye fundamentalmente por las Islas de Creta, Cerdeña, Sicilia y Malta, aunque su área podría ser más reducida. Pignatti (1982) no lo considera presente en Sicilia. $2n = 10$

MICROMORFOLOGÍA FOLIAR. Epidermis abaxial: Zona internerval homogéneo-exodérmica o silícico-exodérmica. Células largas de tipo 12 y 13, de longitud media entre 100-500 μm . Células cortas escasas. Estomas solitarios, en líneas paralelas a ambos lados de los nervios, con células subsidiarias de lados paralelos. Longitud media de los estomas 50 μm . Zonas navales silícico-exodérmicas, con células largas tipo 12 y 13 y de longitud media 100-200 μm . Células cortas tipo S1', de 11-20 μm . Elementos exodérmicos agujijones y macropelos (Figura 7.1, A).

Sección transversal: Epidermis con células subredondeadas a poligonales. Células buliformes de 10-30 μm en grupos de 5-8 en forma de abanico en el fondo de los valles de la cara abaxial. Esclerénquima en islotes asociaciados a los haces vasculares y en los extremos del limbo. Haz vascular central trabado o semitrabado, de diámetro 30-60 μm , con vaina doble y mestoma completo formado por 14-17 células (Figura 7.1, B).

***Anthoxanthum aristatum* Boiss. y *Anthoxanthum ovatum* Lag.**

La posición taxonómica de estas dos especies anuales ha sido muy discutida ya desde su definición en el siglo XIX. Dos aspectos han sido especialmente controvertidos: (i) su posible identidad taxonómica y (ii) sus relaciones con *A. odoratum*, especie perenne pero que bajo ciertas condiciones se comporta como bienal o incluso anual. Por otra parte, la gran variabilidad morfológica que se ha detectado en este grupo ha llevado a la definición de numerosos taxones infraespecíficos, cuya validez ha sido muy discutida (revisado por López-González, 1994).

De acuerdo con nuestros resultados, la diferenciación morfológica entre *A. ovatum* y

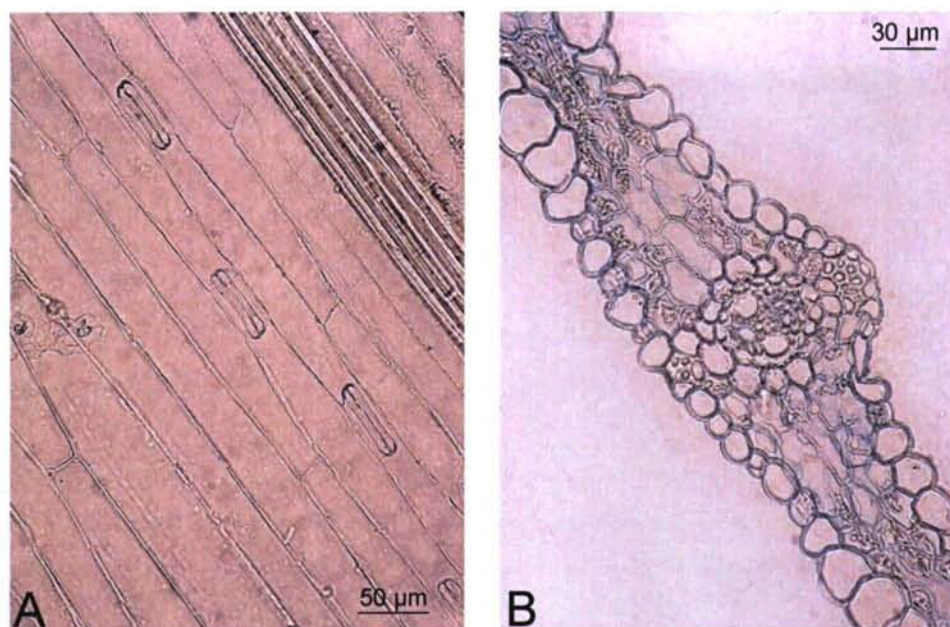


Figura 7.1. Micromorfología foliar de *A. gracile* (ejemplar de la población de Wied Zembaq, Malta): (A), Detalle de la superficie epidérmica abaxial; (B), Sección transversal.

A. aristatum es muy difícil en base a los caracteres seleccionados, ya sean macro o micromorfológicos. Rasgos generalmente utilizados para la separación entre ambas especies, tales como el grado de cobertura de la lema fértil por parte de las estériles o la forma de la inflorescencia (Paunero, 1953; Valdés, 1973; Tutin, 1980), han mostrado variabilidad intrapoblacional en la práctica totalidad de las localidades visitadas, muy especialmente en aquellas en las que varios taxones del complejo *A. aristatum/A. ovatum* crecían en simpatria. Asimismo, esta variabilidad se ha observado también en muchos de los especímenes de herbario analizados. Con respecto a los distintos taxones infraespecíficos, los rasgos macro y microanatómicos estudiados tampoco apoyan su diferenciación, ya que los caracteres que los definen, tales como la longitud de la arista o la forma de las lemas estériles (Valdés, 1973), son también altamente variables. Este elevado polimorfismo dentro de las poblaciones ya ha sido apreciado por otros autores como Briquet (1910) o López-González (1994).

Con respecto a los datos moleculares, apenas hay diferencias entre los perfiles de bandas de los diferentes taxones y, por lo tanto, los análisis genéticos realizados no apoyan su posible diferenciación.

Los resultados obtenidos muestran que cuando las poblaciones simpátricas y los

taxones infraespecíficos no son tenidos en cuenta, sí se observa una cierta separación entre las especies, en base principalmente a los caracteres macromorfológicos cuantitativos y los micromorfológicos de la epidermis foliar. El hecho de que ambos taxones constituyan grupos bien diferenciados en alopatria, pero que sus límites desaparezcan cuando ambas especies se ponen en contacto, indica que todavía no existen barreras que impidan la fecundación cruzada y, en consecuencia, todavía se encuentran en un proceso de especiación.

Con respecto a las relaciones entre el complejo *A. aristatum/A. ovatum* y el perenne *A. odoratum*, los análisis moleculares realizados muestran que estos taxones están bien diferenciados a nivel genético. A nivel morfológico, los análisis multivariantes realizados indican que una ligera diferenciación es posible, especialmente en base a caracteres vegetativos tales como el tamaño de la inflorescencia, el tamaño de la planta, la longitud de la rama floral inferior de la inflorescencia y la longitud de la hoja.

Consideramos que la diferenciación específica entre *A. ovatum* y *A. aristatum* no está justificada, si bien estos taxones están claramente diferenciados de *A. odoratum*. En nuestra opinión, dada la diferenciación morfológica existente entre los taxones en alopatria, y dada la ligera caída que se produce en la viabilidad de los híbridos (Borrill, 1962), el rango apropiado para *A. aristatum* es el de variedad. Consideramos que el nombre *A. ovatum* debe conservarse por el principio de prioridad. Esta estructura taxonómica ya fue propuesta con anterioridad por Pérez-Lara (1866).

Por otra parte, ni los estudios morfológicos ni los genéticos apoyan la descripción de categorías infraespecíficas en estos taxones. Por otra parte, coincidimos con López-González (1994) en que el *A. aristatum* subsp. *macranthum* debe ser englobado en *A. ovatum*. Con respecto a *A. ovatum* var. *exertum*, en nuestra opinión está más próximo a *A. aristatum*.

***Anthoxanthum ovatum* Lag., Gen. Sp. Pl. 2. (1816).**

= *Anthoxanthum aristatum* subsp. *macranthum* Valdés, *Lagasalia*, 3(1):130 (1973).

= *Anthoxanthum ovatum* subsp. *macranthum* (Valdés) Rivas Mart., *Lazaroa*, 2: 159 (1980).

= *Anthoxanthum odoratum* L. [subsp. *ovatum* (Lag) Trab.] f. *macranthum* (Valdés) G. López, *Ann. Jard. Bot. Madrid*, 51(2): 312 (1994).

Plantas anuales o bienales, con raíces fibrosas y tallos erectos de hasta 70 cm, sencillos y, a menudo, ramificados en la base y geniculados. Las hojas presentan limbo ovado o linear, piloso o glabro, de hasta 8 mm de anchura, con lígula aguda de 1-2 mm. La panícula es ovada, de hasta 6 cm. Las glumas miden hasta 8 mm, y generalmente son pilosas. Lemas estériles variables en cuanto a su forma, presencia de escotadura o margen membranoso superior. La arista de la lema estéril superior es igual o más larga que la espiguilla, a veces marcadamente más larga.

De distribución latemediterránea, ascendiendo por la orla Atlántica hasta Bélgica. 2n = 10.

Se diferencian dos variedades:

***Anthoxanthum ovatum* Lag. var. *ovatum*.**

Individuos cortamente aristados, de panícula densa y truncada en la base.

***Anthoxanthum ovatum* Lag. var. *aristatum* Pérez Lara,**

***Anal. Soc. Españ. Hist. Nat.*, 15: 382 (1866).**

= *Anthoxanthum aristatum* Boiss., *Voy. Bot. Midi Esp.*, 2: 638 (1842).

= *Anthoxanthum ovatum* var. *exertum* Lindberg, *Itin. Med.*, 11 (1932).

Individuos largamente aristados, de panícula laxa y atenuándose en la base.

MICROMORFOLOGÍA FOLIAR: Epidermis abaxial: Zonas internervales homogéneas u homogéneo-exodérmicas, con agujones exodérmicos muy escasos y con macropelos. Células largas generalmente de tipo 12 y las exteriores de tipo 13. La longitud media es de 210-258 μm . Sin células cortas. Estomas de longitud media entre 43-55 μm , situados en líneas paralelas a ambos lados de los nervios con células subsidiarias de lados paralelos. Zonas nervales silícico-exodérmicas, con células largas de tipo 12, cuya longitud es de 115,5-125 μm . Células cortas de tipo S1', escasas y solitarias, de longitud media entre 25 y 37,5 μm . Elementos exodérmicos nervales de tipo agujones.

Sección transversal: Epidermis con células subredondeadas a poligonales. Células buliformes de 20-40 μm en grupos de 4-6 en forma de abanico en el fondo de los valles de la cara abaxial. Esclerénquima en islotes asociados a los haces vasculares y en los extremos del limbo. Haz vascular central trabado o semitrabado, de diámetro entre 30 y

90 μm , con vaina doble y mestoma completo formado por 14-20 células.

***Anthoxanthum maderense* Teppner**

De acuerdo con nuestros resultados, *A. maderense* es, entre los taxones perennes, el más diferenciado genéticamente, siendo basal al conjunto de *A. alpinum*, *A. odoratum* y *A. amarum*. Por contra, esta diferenciación no se aprecia en los caracteres macro y micromorfológicos seleccionados, ninguno de los cuales ha servido para caracterizar a esta especie.

A pesar de que estos resultados apoyarían la inclusión de *A. maderense* en *A. odoratum*, consideramos que debe mantenerse su estatus específico ya que en este estudio no se han incluido los caracteres que generalmente diferencian a las gramíneas macaronésicas como son el porte, la lignificación en la base, la presencia de pruina en las hojas, etc. Por otro lado este taxon está claramente diferenciado ecológica y cariológicamente de *A. odoratum* tetraploide (Teppner, 1998).

***Anthoxanthum maderense* Teppner, *Phyton* (Horn) 38(2): 309 (1998).**

Plantas perennes cespitosas, con raíces fibrosas y de bases de los vástagos aéreos lignificadas. Tallos tipo caña decumbentes con hojas de limbo plano, glaucas, de hasta 7 mm de anchura, pilosas o pubescentes. Panículas densas, con espiguillas de 7 a 8,7 mm y aristas de longitud igual o ligeramente superior a la de la espiguilla.

Planta propia de zonas elevadas, expuestas. Endemismo de la Isla de Madeira. $2n = 10$.

MICROMORFOLOGÍA FOLIAR: Epidermis abaxial: Zona internerval homogéneo-exodérmica o silícico-exodérmica. Células largas de tipo 13, con una longitud media de 100-300 μm . Presencia de células cortas puntual. Estomas solitarios con una longitud media de 22 μm , en líneas paralelas a ambos lados de los nervios, con células subsidiarias de lados paralelos.

Zona nerval silícico-exodérmica, con células largas tipo 13, con longitud media de 100-200 μm . Las células cortas son tipo S1'. Elementos exodérmicos de dos tipos, agujijones y macropelos, en los márgenes (Figura 7.2, A).

Sección transversal: Epidermis con células subredondeadas. Células buliformes de

30-40 μm en grupos de 4-6, muy comprimidas en abanico en el fondo de los valles de la cara abaxial. Esclerenquima en islotes asociados a los haces vasculares y en los extremos del limbo. Haz vascular central trabado, de diámetro entre 60 y 120 μm , con vaina doble y mestoma completo formado por (14) 16-20 células (Figura 7.2, B).

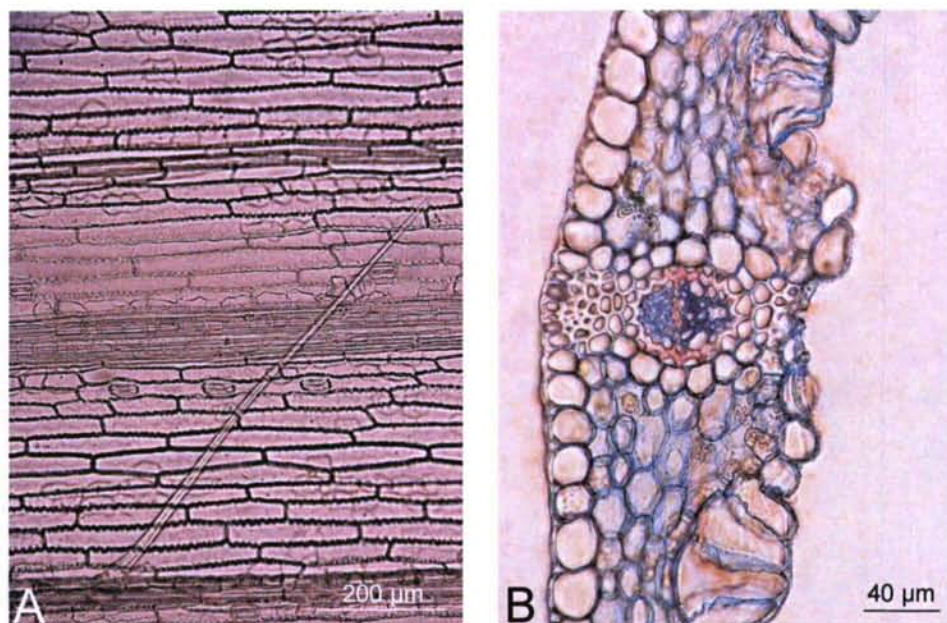


Figura 7.2. Micromorfología foliar de *A. maderense* (ejemplar de la población de Poça da Neve, Madeira): (A), Detalle de la superficie epidérmica abaxial; (B), Sección transversal.

***Anthoxanthum amarum* Brot.**

Los análisis llevados a cabo sobre los caracteres macro y micromorfológicos muestran que esta especie endémica del NW de la Península Ibérica está claramente diferenciada del resto en base a caracteres macromorfológicos vegetativos, tales como la longitud y anchura de la hoja, la talla de la planta o la presencia de bulbillos y estolones. La resolución de los rasgos micromorfológicos es menor, si bien también hay una cierta diferenciación en base a caracteres como la longitud de las células largas de las áreas internervales.

A diferencia de los análisis morfométricos, las pruebas basadas en los marcadores moleculares AFLPs muestran que *A. amarum* está muy relacionado con el tetraploide *A. odoratum* pero sus poblaciones e individuos están diferenciados genéticamente, puesto que no se entremezclan.

Consideramos que la diferenciación morfológica y genética observada en *A. amarum* justifica que se mantenga como una especie independiente. Por otra parte, se ha observado una cierta diferenciación entre dos morfotipos en *A. amarum*. Esta separación se basa en caracteres tales como la presencia de bulbillos o estolones o la presencia de pruina en las hojas. La estrecha relación observada entre estos rasgos y diferentes parámetros ambiental indica que deben ser considerados como ecotipos.

***Anthoxanthum amarum* Brot., *Fl. Lusit.* 1: 32 (1804).**

Plantas perennes, tuberosas, rizomatosas o con raíces fibrosas que presenta vástagos aéreos de hasta 130 cm de longitud. Hojas de limbo ancho y plano, siempre > 1 cm de anchura, de pilosidad variable y con lígula membranosa, truncada y hasta 5 mm de longitud, pilosa en algunos casos y con aurículas bien marcadas. La inflorescencia es cilíndrica, densa, rara vez ramosa, de hasta 14 cm. Las espiguillas siempre > 1 cm, presentan una arista largamente exerta en la lema superior de las flores estériles.

Endemismo del NW de la Península Ibérica (Galicia, Asturias, Cantabria, N y C de Portugal). $2n = 80, 86, 88, 90$.

MICROMORFOLOGÍA FOLIAR: Epidermis abaxial: Zona internerval homogéneo-exodérmica o silícico-exodérmica. Células largas mayoritariamente de tipo 13, puntualmente células tipo 12 en las zonas centrales, de longitud media entre 500 y 600 μm . Estomas solitarios, poco abundantes y de longitud media de 70-80 μm . Situados en líneas paralelas a ambos lados de los nervios, con células subsidiarias de lados paralelos o en domo. Elementos exodérmicos tipo aguijón, dispersos por toda la zona internerval. Células cortas escasas, solitarias de tipo S1'. Zonas navales silícico-exodérmicas, con células largas tipo 13 y de tamaño medio 180-270 μm . Células cortas tipo S1'. Elementos exodérmicos de dos tipos; aguijones de punta larga y macropelos en los márgenes (Figura 7.3, A).

Sección transversal: Epidermis con células redondeadas, subredondeadas o poligonales. Células buliformes de 40-50 μm en grupos de 4-6, en abanico en el fondo de los valles de la cara abaxial. Esclerénquima en islotes asociaciados a los haces vasculares y en los extremos del limbo. Haz vascular central trabado o semitrabado, de diámetro de 90 a 120 μm , con vaina doble y mestoma completo formado por 16-25 células (Figura 7.3, B).

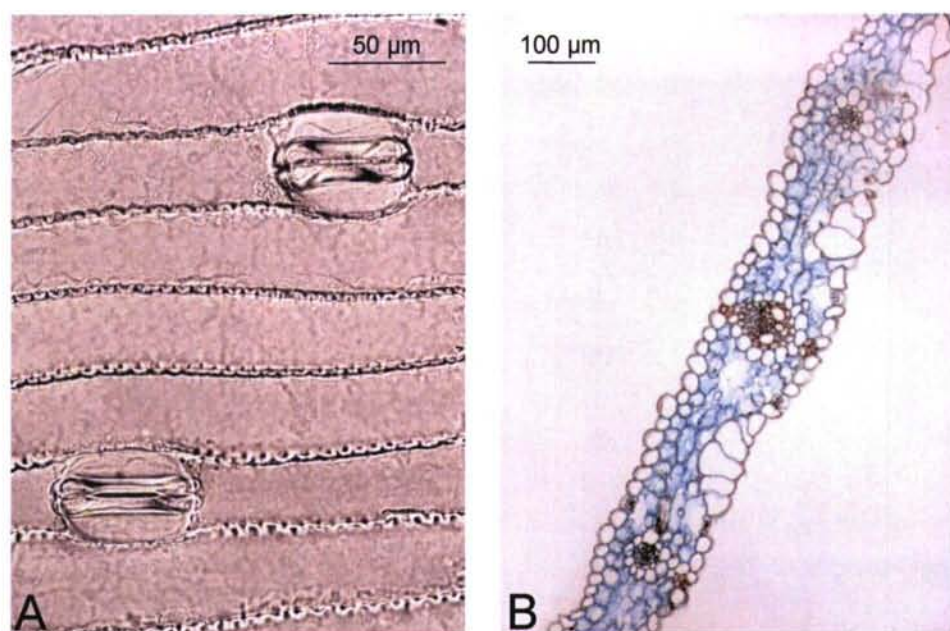


Figura 7.3. Micromorfología foliar de *A. amarum* (ejemplar de la población de San Andrés de Teixido, NW de la Península Ibérica): (A), Detalle de la superficie epidérmica abaxial; (B), Sección transversal.

***Anthoxanthum odoratum* L. y *Anthoxanthum alpinum* Löve & Löve**

Las relaciones filogenéticas entre estas especies y su posible identidad taxonómica ha sido muy discutida a lo largo del siglo XX (e.g. Löve & Löve, 1948; Knaben, 1950; Hedberg, 1990). Según nuestros resultados, la diferenciación morfológica entre estos taxones resulta difícil en base a los caracteres seleccionados. Sin embargo, a pesar del elevado grado de solapamiento observado, se encontraron diferencias significativas para la mayor parte de los caracteres cuantitativos analizados al comparar los valores medios. Por otra parte, los tests de clasificación (CDA) mostraron que un porcentaje muy elevado de los individuos de cada especie era correctamente clasificado.

Los rasgos que generalmente se han señalado como característicos de uno u otro taxon mostraban una gran variabilidad intrapoblacional. Por otro lado, variables como la pilosidad de las lemas fértiles, característica de *A. alpinum*, mostró un comportamiento diferente en cada una de las regiones estudiadas. Únicamente los caracteres microanatómicos de la epidermis foliar mostraron una cierta capacidad para diferenciar *A. odoratum* de *A. alpinum*, especialmente por sus células largas de mayor longitud.

A diferencia de los estudios morfométricos, los estudios genéticos llevados a cabo con marcadores AFLP mostraron una diferenciación genética importante entre estos taxones, lo que apoya la teoría de un origen alotetraploide para *A. odoratum*.

Tanto la distancia genética observada entre los taxones como su diferenciación biogeográfica y ecológica sugieren un estatus específico para *A. odoratum* y *A. alpinum*. Sin embargo, dada la imposibilidad de diferenciar entre los taxones en base a los caracteres morfológicos, consideramos que el rango de subespecie es adecuado para el diploide.

***Anthoxanthum odoratum* L., Sp. Pl. 1:28 (1753).**

Planta cespitosa perenne con raíces fibrosas cuyo tamaño oscila entre 10-80 (100) cm. Caña sencilla, erecta o geniculada. Las hojas de limbo plano, de 3-5 (0.9) mm de anchura, glabras o pilosas, especialmente en la lígula, que es oblonga, membranosa, truncada y de hasta 4 mm.

La inflorescencia es una panícula espiciforme, oblongo cilíndrica, densa y, a veces, ramificada en su base. Las espiguillas pueden alcanzar hasta 9 mm de longitud, con pedúnculos pubescentes o glabros. Las glumas son hialinas con quilla verde y nervios marcados. La gluma superior rodea y cubre las florúnculas, la inferior es mucho más corta. Las lemas de las flores estériles aristadas y pubescentes. La arista de la lema superior es más larga y a menudo geniculada. La lema de la flor fértil es orbicular. Planta generalmente aromática por su elevado contenido en cumarina.

MICROMORFOLOGÍA FOLIAR: Epidermis abaxial: Zonas internervales homogéneo-exodérmicas, con células largas mayoritariamente tipo 13, de longitud media 300-700 μm . Estomas en líneas paralelas a lo largo de los nervios con células subsidiarias de lados paralelos o en domo. Su longitud media oscila entre 45-75 μm . No se observan células cortas en las áreas internervales. Como elementos exodérmicos presenta abundantes agujijones. En ocasiones aparecen macropelos. Las zonas nervales homogéneo-exodérmicas con células largas de tipo 12 cuya longitud media es de 121-275 μm . Se observan los mismos elementos exodérmicos que en las zonas internervales.

Sección transversal: Epidermis con células de subredondeadas a poligonales. Células buliformes de (20)40-50 μm en grupos de 4-7, en abanico en el fondo de los valles de la cara abaxial. Esclerenquima en islotes asociaciados a los haces vasculares y en los extremos del limbo. Haz vascular central trabado o semitrabado, de diámetro 90-120 μm ,

con vaina doble y mestoma completo formado por 14-20 células.

Dentro de esta especie diferenciamos dos subespecies:

***Anthoxanthum odoratum* L. subsp. *odoratum*.**

Planta repartida por todo el ámbito de la especie excepto la zona Boreal y las altas montañas centroeuropeas. Se caracteriza por la presencia de hojas y glumas pubescentes o glabras, además de las lemas no escábridas. Incluye citotipos tetraploides y diploides, estos últimos todavía no caracterizados. Planta aromática por su elevado contenido en cumarina.

***Anthoxanthum odoratum* L. subsp. *alpinum* (Löve & Löve) Hultén,
*Kongl. Svenska Vetenskapsakad. Handl. BPH. 517.11 (1952).***

Planta propia de la zona boreal y de las montañas centroeuropeas. Caracterizada por presentar hojas y glumas glabras, lemas escábridas o no escábridas, coloración rojiza en las vainas y la panícula. Incluye también citotipos diploides y tetraploides, morfológica y ecológicamente indiferenciables.

BIBLIOGRAFÍA

- Aliscioni S, Arriaga M. 1998. Estudio histofoliar comparado de las especies de los grupos *Virgata* y *Quadrifaria* del género *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Candollea* 53: 333-348.
- Awise JC. 1989. Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. *Evolution* 43: 1192-1208.
- Borrill M. 1962. The experimental taxonomy of *Anthoxanthum* species. *Proceedings of the Linnean Society of London* 1960(61): 106-109.
- Briquet J. 1910. *Prodrome de la flore Corse comprenant les résultats botaniques de six voyages exécutés en Corse sous les auspices de M. Émile Burnat*. Lyon: Georg.
- Carrión JS. 2003. *Evolución Vegetal*. Murcia: DM editores
- Castroviejo S. 2004. *De familias, géneros y especies. La eterna búsqueda de la estabilidad en la clasificación biológica*. Madrid: Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
- Catalán P, Shi Y, Armstrong L, Draper J, Stace CA. 1995. Molecular phylogeny of the

- grass genus *Brachypodium* P. Beauv. based on RFLP and RAPD analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **117**: 263-280.
- Devesa JA. 1992.** *Anatomía foliar y palinología de las gramíneas extremeñas*. Badajoz: Universidad de Extremadura.
- Ellis RP. 1976.** A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. I. The leaf blade as viewed in transverse section. *Bothalia* **12**: 65-109.
- Ellis RP. 1979.** A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. II. The epidermis as seen in surface view. *Bothalia* **12**: 641-671.
- Grant V. 1989.** *Especiación Vegetal*. México DF: Limusa
- Hedberg I. 1990.** Morphological, cytotaxonomic and evolutionary studies in *Anthoxanthum odoratum* L. s.l.- a critical review. *Sommerfeltia* **11**: 97-107.
- Heywood VH. 1998.** The species concept as a socio-cultural phenomenon-a source of the scientific dilemma. *Theory Bioscience* **117**: 203-212.
- Humbert-Droz C, Felber F. 1992.** Étude biométrique des stomates et des grains de pollen comme indicateurs du degré de polyploidie chez *Anthoxanthum alpinum* Löve et Löve. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles* **115**: 31-45.
- Izco J. 1987.** Galicia. In: Peinado-Lorca M, Rivas-Martínez S, eds. *La vegetación en España*. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá, 387-451.
- Knaben G. 1950.** Chromosome numbers of Scandinavian Arctic-Alpine plant species I. *Blyttia* **8**: 129-155.
- Legendre P, Legendre L. 1998.** *Numerical Ecology*. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier.
- López-González G. 1994.** Notas sobre el género *Anthoxanthum* L. (Graminae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **51**(2): 309-312.
- Löve Á, Löve D. 1948.** Chromosome numbers of northern plant species. *Reports of the Department of Agriculture, University Institute of Applied Sciences (Iceland)*. *Séries B* **3**: 1-131.
- Mayr E. 1942.** *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a Zoologist*. Nueva York: Oxford University Press.
- Nicora EG, Rúgolo de Agrassar ZE. 1987.** *Los géneros de gramíneas de América Austral*. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur.
- Paunero E. 1953.** Las especies españolas del género *Anthoxanthum* L. *Anales del*

Instituto Botánico AJ Cavanilles 12: 401-442.

Pérez-Lara JM. 1866. Florula Gaditana. *Anales de la Sociedad Española de Historia Natural* 15: 382.

Pignatti S. 1982. *Flora d'Italia Vol. III.* Bologna: Edagricole.

Pimentel M, Sahuquillo E. 2003a. An approach to the study of morphological relationships among the sweet vernal grasses (*Anthoxanthum* L. *Poaceae, Pooideae*) in the Iberian Peninsula. *Bocconea* 16(2): 731-737.

Pimentel M, Sahuquillo E. 2003b. Study of the leaf anatomy in the Iberian species of the Genus *Anthoxanthum* L. *Bocconea* 16(2): 683-691.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Rohlf FJ. 1993. *NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system.* Nueva York: Exeter Software

Rozmus M. 1960. The taxonomical rank of *Anthoxanthum alpinum* L. et L. in the light of anatomical studies. *Acta Biologica Cracoviensia Séries Botanica* 3: 81-90.

Sneath PHA, Sokal RR. 1973. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification.* San Francisco: W. H. Freeman and Company.

Stuessy TF. 1990. *Plant Taxonomy.* Nueva York: Columbia University Press.

Stuessy TF. 2003. Morphological data in plant systematics. In: Stuessy TF, Mayer V, Hörandl E, eds. *Deep morphology.* Ruggell: A. R. G. Gantner Verlag.

Teppner H. 1998. *Anthoxanthum maderense* spec. nova und *A. odoratum* (Poaceae-Aveneae) von Madeira und deren chromosomen morphologie. *Phyton* 38(2): 307-321.

Tutin TG. 1980. *Anthoxanthum* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, eds. *Flora Europaea Vol V.* Cambridge: Cambridge University Press, 229-230.

Valdés B. 1973. Revisión de las especies anuales del género *Anthoxanthum* (Graminae). *Lagascalia* 3(1): 99-141.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

Williams JKG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV, 1990. DNA

polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531-6535.



Capítulo 8

8

Conclusiones

Hai un anxo para cada brizna de herba
Guemará

Conclusiones

8

A lo largo del presente trabajo se han extraído las siguientes conclusiones acerca de la Taxonomía y la Biogeografía de las especies europeas de *Anthoxanthum*:

1. De entre los 7 taxones del género *Anthoxanthum* analizados, sólo dos pueden ser identificados de forma no ambigua en base a los caracteres morfológicos seleccionados: *A. gracile*, que puede ser caracterizado en base a rasgos florales cuantitativos, y *A. amarum*, que se diferencia del resto de las especies principalmente por caracteres vegetativos. Asimismo, se detectó la existencia de dos ecotipos de *A. amarum* en Galicia.

2. Dentro de los taxones perennes, *A. maderense* no pudo ser caracterizado en base a los distintos caracteres macromorfológicos o anatómicos estudiados. Sin embargo, aquellos rasgos que suelen ser definitorios de los taxones macaronésicos no han sido incluidos en este análisis, por lo tanto, los resultados no son concluyentes. Por otra parte, esta especie está altamente diferenciada genéticamente del resto de las perennes.

3. Las variables morfológicas y anatómicas seleccionadas fueron relativamente poco útiles para la diferenciación taxonómica dentro del complejo *A. odoratum/A. alpinum*. Entre estas variables, los caracteres que han sido tradicionalmente utilizados en su separación han mostrado una gran variabilidad regional e incluso intrapoblacional. Asimismo, hay una clara diferenciación genética, ecológica y biogeográfica entre ambos taxones. Consideramos que el rango de subespecie es adecuado para *A. alpinum* según la

tipificación de Hultén. La diferenciación genética observada entre *A. odoratum* y *A. alpinum* sugiere un origen alotetraploide para el primero.

4. La clara estructura geográfica de la diversidad genética observada en las poblaciones estudiadas de *A. alpinum* y *A. odoratum* sugieren la influencia de los ciclos glaciares del Cuaternario en su presente distribución.

5. La fuerte afinidad genética observada en *A. odoratum* entre las poblaciones ibéricas y escandinavas apoya la existencia de una vía de migración entre ambas áreas que ha sido ya señalada para otros organismos. Con respecto a *A. alpinum*, se aprecia una estrecha relación entre las poblaciones alpinas y las de los Montes Sudetes. Esto apoyaría la existencia de una vía de migración entre ambas áreas. Por otro lado, la mayor diversidad genética observada en las poblaciones de *A. alpinum* de los Alpes apoya la existencia de un refugio subalpino en esta área.

6. Se observó una cierta diferenciación morfológica entre el complejo *A. aristatum/A. ovatum* y el tetraploide *A. odoratum*. Por otra parte, ambos grupos se separaron claramente en los estudios genéticos realizados. Nuestros resultados sugieren que ambos grupos deben mantenerse separados taxonómicamente a nivel específico.

7. *A. aristatum* y *A. ovatum* resultaron indistinguibles en base a las variables estudiadas, ya fueran macromorfológicas, micromorfológicas o marcadores moleculares. Esta falta de diferenciación es especialmente evidente en el caso de las poblaciones simpátricas, mientras que los análisis multivariantes mostraron una cierta separación entre las poblaciones de ambos taxones en alopatria. En base a estos resultados proponemos el rango de variedad para la planta de Boisser según la tipificación de Pérez Lara.

8. Los resultados obtenidos no apoyan la diferenciación de ninguna de las variedades infraespecíficas de *A. ovatum* y *A. aristatum* que han sido incluidas en el estudio. Por otra parte, *A. aristatum* subsp. *macranthum* está más próxima morfológicamente a *A. ovatum*, mientras que *A. ovatum* var. *exertum* se aproxima más a *A. aristatum*.

9. Se observó una fuerte afinidad morfológica, cuantitativa y cualitativa, entre los poliploides *A. amarum*, endémico del N de la Península Ibérica y *Anthoxanthum nivale*, de zonas montañosas tropicales de África Oriental. Serán necesarias pruebas genéticas para aclarar la posible afinidad entre ambas especies.

10. En todos los casos se ha apreciado una fuerte influencia de los parámetros ambientales estudiados, especialmente las precipitaciones, sobre los rasgos de la anatomía foliar analizados, lo que disminuye la validez taxonómica de este tipo de caracteres en el género *Anthoxanthum*.



A agradecimientos

A

Agradecimientos

Cuando ya van cinco años desde que comencé la tesis doctoral, la lista de los que de un modo o de otro colaboraron en su realización se está haciendo inabarcable. Me gustaría darles las gracias a todos, a los que trabajaron en el proyecto y también a los que simplemente estuvieron soportándome estos años. Quisiera que os considerarais coautores de esta tesis.

En primer lugar, le doy las gracias a la Dra Elvira Sahuquillo Balbuena por haberme propuesto este proyecto y por permitirme trabajar en su laboratorio. A lo largo de todo este tiempo su labor y esfuerzo han ido mucho más allá de la supervisión, y realmente le agradezco su ayuda. Ya en lo personal, gracias por haberme dado su amistad y por apoyarme en los momentos duros.

A la Dra Pilar Catalán Rodríguez, de la Escuela Politécnica Superior de Huesca, quisiera agradecerle su hospitalidad durante mis estancias en su laboratorio, en el que en todo momento me he sentido integrado. Gracias también por sus consejos, científicos y no científicos, y por haberme enseñado tantas cosas sobre marcadores moleculares. ¡También agradezco las excursiones por los Pirineos y las cenas de llegada y despedida!

Quisiera agradecer también la ayuda de las Dras Ángela Noguero Seoane y Fuencisla Merino de Cáceres. La Dra Noguero siempre estuvo dispuesta a colaborar, y también le doy las gracias por haberse preocupado en todo momento de la marcha de la tesis. La Dra Merino nos abrió las puertas del Laboratorio de Fisiología Vegetal en muchas ocasiones, permitiendo de este modo que este trabajo se llevase a cabo.

Muchas personas de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña aportaron sus conocimientos, medios o ambas cosas para que esta tesis se pudiera realizar. A todos ellos les doy las gracias, y espero no olvidarme de nadie: Las Dras Ana Insua y Ruth Freire y los (casi) Dres María José López y Alberto Arias me ayudaron en la lectura e

interpretación de los geles de agarosa. Los Dres Graciela Estévez y José Antonio Villar me ofrecieron sus consejos sobre Estadística. Finalmente, los Dres Teresa Taboada, Ruth Collado, Julián Yáñez, Silvia Pérez, Josefina Méndez y Horacio Naveira me proporcionaron material y bibliografía de gran utilidad en el desarrollo de la tesis. Carlos Caramelo me ayudó también en numerosas ocasiones.

La Dra Ester Sales Clemente, de la Escuela Politécnica Superior de Huesca, me resolvió dudas sobre el test de asignación y me permitió el uso del Laboratorio de Producción Vegetal de la citada Escuela.

Finalmente, gracias también a las personas que me ayudaron a lo largo de mi estancia en el Evolutionary Biology Center (Universidad de Uppsala). La Dra Inga Hedberg me proporcionó información esencial sobre la ploidía de las poblaciones escandinavas de *Anthoxanthum*. El Dr Bengt Oxelman me permitió usar su Laboratorio y Dick Andersson me proporcionó datos climáticos sobre las poblaciones muestreadas en Suecia. Gracias especialmente al Dr Carles Vilá, que me resolvió numerosas dudas científicas.

Vaya también un agradecimiento especial para todos los miembros, presentes y pasados, de las Áreas de Botánica y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias por su ayuda constante.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral he disfrutado de las siguientes ayudas: Beca de Tercer Ciclo otorgada por la Xunta de Galicia, Consellería de Educación; beca predoctoral del programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia y, finalmente, una beca de Investigación de la Deputación da Coruña. ¡También quisiera agradecer el trabajo de la Federación de Jóvenes Investigadores (www.precarios.org) por dignificar el trabajo de los investigadores!.

Mención aparte merecen las numerosas personas que me han ayudado en los muestreos, o que me han indicado poblaciones interesantes de las diversas especies de *Anthoxanthum*: Pilar Catalán, Félix Cerqueira, Carlos Cortizo, Javier Cremades, Ladislava Filipova, Diego Giraldo, Edwin Lanfranco, Joachim Müller, Marcos Perille, Ramón Pimentel, Antonio Prunell, Alejandro Quintanar, Antonio Rodríguez, David Romero, Elvira Sahuquillo, Miguel Sequeira, y Marta Vila. ¡Para más información sobre los proveedores de plantas mirad los agradecimientos de cada capítulo!.

A partir de este punto quería referirme más a mi vida personal, aunque a lo largo de

estos seis años resultó complicado diferenciar lo personal de lo laboral, así que me temo que estará todo mezclado...

La convivencia con mis compañeros de laboratorio Marcos Perille y David Romero ha sido sin duda la mejor parte de la tesis doctoral. Les doy las gracias sencillamente por hacer mi vida mucho mejor y por soportar estoicamente a Harry cuando se deja caer. A David especialmente gracias por el montaje de la tesis, por los dibujos, por guiarme a través de los mares tempestuosos del Corel, por librarme de los óvalos y por haber estado disponible siempre que fue necesario. Realmente es el hombre que en España lo hace todo. A Marcos le agradezco que me haya enseñado un montón de cosas a lo largo de este tiempo, ¡entre ellas muchas montañas!. Gracias por dejarte los ojos revisando la tesis bajo el sol de Picos de Europa

A mis compañeros adoptivos de laboratorio, Marta Vila y Xosé Manuel Mirás. Marta me ha ayudado siempre; resolvió mis dudas, revisó manuscritos, me consiguió alojamiento en Suecia, me dio bibliografía muy útil, solucionó papeleos, me hizo galletas y Muffins (esto ante todo), me metió en precarios-Galicia y siempre estuvo disponible. Realmente es la madrina de esta tesis. Xosé ha sido el mejor colega (e instructor musical) que uno pudiera imaginar ya desde que empezamos la carrera. Gracias a los dos.

Y ahora vuelvo a Huesca. Ernesto Pérez Collazos me enseñó todo lo necesario sobre la técnica de los AFLPs y tuvo siempre una paciencia infinita. Gracias por eso y perdona por las cosas que no pude conseguir. Le agradezco también las risas, las excursiones por Huesca, y, sobre todo, que me dejara meterme de okupa. Aprovecho para referirme a todos los habitantes del piso de Huesca, especialmente Nahikari y Juan Carlos.

José Gabriel Segarra-Moragues revisó también manuscritos ¡sacando tiempo Dios sabe de dónde!, y me ayudó en todo momento, especialmente con los programas de análisis genético. ¡Gracias también por la amistad y la compañía!. A Luis Ángel Inda Aramendia le agradezco su colaboración en este trabajo, las informaciones desde Londres y las conversaciones sobre todo tipo de temas. Alejandro Quintanar Sánchez me recordó cuando más lo necesitaba por qué me gustan las plantas y la Botánica.

Me gustaría también acordarme de todas aquellas personas que fueron o son mis compañeros en el Área de Botánica da Facultade de Ciencias, Viviana, César P, Edgar, Xacobo, Belén, Pilar y los demás. Gracias muy especialmente a César L, María y Ana, por la amistad y la colaboración continuas! También gracias a los colegas (presentes y pasados) de otros laboratorios, Alicia, Ángela, Carmen, Silvia, Alba, Alberto, Carmen y

todos los demás. Dos personas merecen “mención especial”, Cristina Silvar e Isabel González me enseñaron un montón de cosas sobre lo que es importante y lo que no lo es en esto de hacer una tesis. Quisiera acordarme también de Annabella, Harry, al Nuevo Marcos, de los priones y de los Power Rangers, nunca se sabe cuándo van a aparecer...

Por supuesto gracias a todos los amigos, que estuvieron siempre a mi lado y me acompañaron en las idas y las venidas. Gracias a Laura, Javi, Alberto, Ana, Fran, Elena, Jose, Jaime, Victoria y todos los demás que hicieron esto posible. También a los amigos de la “división internacional” Sonia y Thomas, por acogerme en su casa, y Ladka y Diego por su amistad. Grazas por suposto a Xacobo de Toro, por seres meu terceiro irmán, ¡e xa van 24 anos!.

Para rematar GRAZAS á familia, *s. str.* e *s. lat.*, tamén ós que xa non están. Vos sodes o principio e o motivo de todo. Enumerar as cousas polas que vos debo estar agradecido sería imposible, sinxelamente grazas por estardes ahí sempre.



Bibliografía

Bibliografía

- Abdel-Khalik K, van der Maesen LJG, Koopman WJM, van den Berg RG. 2002.** Numerical taxonomic study of some tribes of Brassicaceae from Egypt. *Plant Systematics and Evolution* **233**: 207-221.
- Acedo C, Llamas F. 1999.** *The genus Bromus L. (Poaceae) in the Iberian Peninsula. Phanerogamarum Monographiae XXII.* Stuttgart: J Cramer.
- Adams RP. 2000.** Systematics of the one seeded *Juniperus* of the eastern hemisphere based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochemical Systematics and Ecology* **28**: 529-543.
- Aiken SG, Darbyshire SJ, Lefkovitch LP. 1984.** The taxonomic value of using epidermal characteristics in Canadian rough fescue complex (*Festuca altaica*, *F. campestris*, *F. halii*, *F. scabrella*). *Canadian Journal of Botany* **62**: 1864-1870.
- Aizpurúa I, Aseginolaza G, Uribe-Echevarría PM, Urrutia P, Zorrakin I. 2000.** *Claves ilustradas de la Flora del País Vasco y territorios limítrofes.* Vitoria-Gasteiz: Servicio de Publicaciones del Gobierno Vasco.
- Aliscioni SS. 2000.** Anatomía ecológica de algunas especies del género *Paspalum* L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae). *Darwiniana* **38**: 187-207.
- Aliscioni S, Arriaga M. 1998.** Estudio histofoliar comparado de las especies de los grupos *Virgata* y *Quadrifaria* del género *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Candollea* **53**: 333-348.
- Almeida-Pinheiro de Carvalho MA, Wilcock CC, Marques dos Santos TM, Vale-Lucas IC, Teixeira-Ganança JF, Franco E, Thangadurai D, Muralidhara-Rao D, Freitas-Sousa N. 2004.** A review of the genus *Semele* (Ruscaceae) systematics in Madeira. *Botanical Journal of the Linnean Society* **146**: 483-497.
- Antonovics J, Clay K, Schmitt J. 1987.** The measurement of small-scale environmental

- heterogeneity using clonal transplants of *Anthoxanthum odoratum* and *Danthonia spicata*. *Oecologia* **71**: 601-607.
- Avice JC. 1989.** Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. *Evolution* **43**: 1192-1208.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. 1991.** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annals of Biochemistry* **196**: 80-83.
- Battandier JA, Trabut LC. 1895.** *Flore de l'Algerie*. Argel: A. Jourdan.
- Baum BR. 1986.** Numerical taxonomic analyses of the Poaceae. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth ME, eds. *Grass systematics and evolution*. Washington DC: Smithsonian Institution Press.
- Bennet MD, Leitch IJ. 2004.** Angiosperm DNA C-values database (release 5.0, Dec. 2004) <http://www.rbgkew.org.uk/cval/homepage.html>.
- Bennett JJ, Brown R. 1838.** *Plantae javanicae rariores.. T.3*. Londres, 8-14.
- Bentham G, Hooker JD. 1883.** *Genera plantarum. T3*. Londres, 1139.
- Black-Samuelsson S, Eriksson G, Gustafsson L, Gustafsson P. 1997.** RAPD and morphological analysis of the rare plant species *Vicia pisiformis* (Fabaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **61**: 325-343.
- Böcher TW. 1961.** Experimental and Cytological studies on plant species. VI. *Dactylis glomerata* and *Anthoxanthum odoratum*. *Botanisk Tidsskrift* **56**: 314-335.
- Böcher TW. 1979.** Xeromorphic leaf types. Evolutionary strategies and tentative semophyletic sequences. *Biologiske Skrifter* **22(8)**: 5-71.
- Bocquet G, Widler B, Kiefer H. 1978.** The Messinian Model – a new outlook for the floristics and systematics of the Mediterranean areas. *Candollea* **33**: 269-287.
- Bogenrieder A, Bühler M, Härringer P. 1993.** *Anthoxanthum odoratum* L. und *Anthoxanthum alpinum* (Á et D Löve) am Feldberg (Schwarzwald). Ein Beispiel für Höhengvikarianz. *Carolina* **51**: 41-50.
- Borrill M. 1962.** The experimental taxonomy of *Anthoxanthum* species. *Proceedings of the Linnean Society of London* **1960(61)**: 106-109.
- Borrill M. 1963.** Experimental studies of evolution in *Anthoxanthum* (Gramineae). *Genetica* **34**: 183-210.
- Borrill M, Lindner R. 1971.** Diploid-tetraploid sympatry in *Dactylis* (Gramineae). *New*

- Phytologist* 70: 1111-1124.
- Bown D. 1996.** *Enciclopedia de las hierbas y sus usos*. Barcelona: Grijalbo Mondadori.
- Briquet J. 1910.** *Prodrome de la flore Corse comprenant les résultats botaniques de six voyages exécutés en Corse sous les auspices de M. Émile Burnat*. Lyon: Georg.
- Brock RD, Brown JAM. 1969.** Cytotaxonomy of Australian *Danthonia*. *Australian Journal of Botany* 9: 62-92.
- Caizergues A, Bernard-Laurent A, Brenot F, Ellison L, Rasplus JY. 2003.** Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in Northern and Western Europe. *Molecular Ecology* 12: 2267-2274.
- Carballeira A, Devesa C, Retuerto R, Santillán E, Uceda F. 1983.** *Bioclimatología de Galicia*. A Coruña: Fundación Pedro Barrié de la Maza.
- Carlsson M, Söderberg L, Tegelström H. 2003.** Comparison of genetic variation in Fennoscandian adders between two nuclear datasets. In: Carlsson M, ed. *Phylogeography of the adders, Vipera berus*. Tesis Doctoral inédita, Universidad de Uppsala.
- Carr S, Engel ZK, Kalvoda J, Parker A. 2002.** Sedimentary evidence for extensive glaciation of the Úpa Valley, Krkonoše Mountains, Czech Republic. *Zeitschrift für Geomorphologie* 46(4): 523-537.
- Carrión JS. 2003.** *Evolución Vegetal*. Murcia: DM editores
- Castro S, Silveira P, Pereira-Coutinho A, Figueiredo E. 2005.** Systematic studies in *Tylosema* (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 147: 97-115.
- Castroviejo S. 2004.** *De familias, géneros y especies. La eterna búsqueda de la estabilidad en la clasificación biológica*. Madrid: Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
- Catalán P, Kellogg EA, Olmstead RG. 1997.** Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 150-166.
- Catalán P, Shi Y, Armstrong L, Draper J, Stace CA. 1995.** Molecular phylogeny of the grass genus *Brachypodium* P. Beauv. based on RFLP and RAPD analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 117: 263-280.
- Cerdán E, Freire MA, González, MI, Rodríguez AM. 1997.** *Biología Molecular*.

Avances y técnicas generales. A Coruña: Universidade da Coruña.

- Chase MV, Hills HG. 1991.** Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* **40**: 215-220.
- Cheeseman TF. 1906.** *Anthoxanthum*. In: Cheeseman TF, ed. *Manual of the New Zealand Flora*. Wellington: Government of New Zealand, 1090.
- Chiapella J. 2000.** The *Deschampsia cespitosa* complex in central and northern Europe: a morphological analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **134**: 495-512.
- Clark LG, Kobayashi M, Mathews S, Spangler R, Kellogg EA. 2000.** The *Puelioideae*, a new Subfamily of *Poaceae*. *Systematic Botany* **25**:181-187
- Clayton WD, Renvoize S. 1986.** Genera Graminum: Grasses of the world. *Kew Bulletin, Additional series* **13**: 1-389.
- Clayton WD. 1970.** Gramineae (Part I). In: Redhead EM, Polhill EM, eds. *Flora of Tropical East Africa*. Londres: Ministry for Overseas Development.
- Coleman JS, McConnaughay KDM, Ackerly DD. 1994.** Interpreting phenotypic variation in plants. *Tree* **9**: 187-191.
- Comes HP, Kadereit JW. 1998.** The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* **3**: 432-438.
- Comes HP. 2004.** The Mediterranean region – a hotspot for plant biogeographic research. *New Phytologist* **164**: 11-14.
- Connor HE. 1960.** Variation in leaf anatomy in *Festuca novae-zelandiae* (Hack.) Cockayne, and *F. matthewsii* (Hack.) Cheeseman. *New Zealand Journal of Sciences* **3**: 468-509.
- Contandriopoulos J. 1957.** Caryologie et localisation des espèces végétales endémiques de la Corse. *Bulletin de la Société Botanique de France* **104**: 53-55.
- Contandriopoulos J. 1962.** Recherches sur la flore endémique de la Corse et sur ses origines. Tesis Doctoral inédita. Universidad de Montpellier.
- Cresswell JE. 2000.** Manipulation of female architecture in flowers reveals a narrow optimum for pollen deposition. *Ecology* **81**: 3244-3249.
- Crowe TM. 1994.** Morphometrics, Phylogenetic Models and Cladistics: means to an end or much to do about nothing?. *Cladistics* **10**: 77-84.
- Cutler DF. 1978.** *Applied plant anatomy*. Londres: Longman.

- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. 1985.** *The Families of the Monocotyledons. Structure, Evolution and Taxonomy.* Berlín: Springer Verlag.
- Dávila P, Clark L. 1990.** Scanning electron microscopy survey of leaf epidermis of *Sorghastrum* (Poaceae: Andropogoneae). *American Journal of Botany* **77**: 499-511.
- Davis JL, Soreng RJ. 1993.** Phylogenetic structure in the grass family (Poaceae) as inferred from chloroplast DNA restriction site variation. *American Journal of Botany* **80**:1444-1454.
- Dawson AG. 1992.** *Ice Age earth. Late Quaternary Geology and Climate.* Londres: Routledge.
- Després L, Lorient S, Gaudeul M. 2002.** Geographic pattern of genetic variation in the European globeflower *Trollius europaeus* L. (Ranunculaceae) inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* **11**: 2337-2347.
- Devesa JA. 1991.** *Anthoxanthum* L. In Devesa JA, ed. *Las gramíneas de Extremadura.* Badajoz: Universidad de Extremadura, 179-181.
- Devesa JA. 1992.** *Anatomía foliar y palinología de las gramíneas extremeñas.* Badajoz: Universidad de Extremadura.
- Díaz-Lifante Z, Aguinagalde I. 1996.** The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers for the study of taxonomical relationships among species of *Asphodelus* sect. *Verinea* (Asphodelaceae). *American Journal of Botany* **83**: 949-953.
- Dogan M. 1985.** *Anthoxanthum* L. In: Davis PH, ed. *Flora of Turkey Vol. IX.* Edinburgo: Edinburgh University Press, 371-373.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Dufrêne M, Gathoye JL, Tyteca D. 1991.** Biostatistical studies on western european *Dactylorhiza* (Orchidaceae)-the *D. maculata* group. *Plant Systematics and Evolution.* **175**: 55-72.
- Ellis RP. 1976.** A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. I. The leaf blade as viewed in transverse section. *Bothalia* **12**: 65-109.
- Ellis RP. 1979.** A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. II. The epidermis as seen in surface view. *Bothalia* **12**: 641-671.
- Endress PK. 2003.** What should a complete morphological phylogenetic analysis entail?. In: Stuessy TF, Mayer V, Hörandl E, eds. *Deep morphology.* Ruggell: A. R. G.

Gantner Verlag.

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**(8): 2247-2620.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992.** Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes. Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- Fay MF, Cowan RS, Leitch IJ. 2005.** The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. *Annals of Botany* **95**: 237-246.
- Felber F. 1986.** Distribution des cytodèmes d'*Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. en Suisse. Les relations Alpes-Jura. Index des nombres chromosomiques des Spermatophytes de la Suisse: III Poaceae, Genre *Anthoxanthum*. *Botanica Helvetica* **96**(2): 145-158.
- Felber F. 1987.** Phénologie de la floraison de populations diploïdes et tetraploïdes d'*Anthoxanthum odoratum* L. *Revue Canadienne de Botanique* **66**(11): 2258-2264.
- Felber F. 1988.** Distribution des cytodèmes d'*Anthoxanthum odoratum* L. s.l. en France et dans les régions limitrophes. *Bulletin de la Société botanique de la France*. **135**: 281-293.
- Felber F. 1993.** Présence de trois taxons pérennes d'*Anthoxanthum* L. en Corse. *Candollea* **48**: 582-591.
- Felber-Girard M, Felber F, Buttler A. 1996.** Habitat differentiation in a narrow hybrid zone between diploid and tetraploid *Anthoxanthum alpinum*. *New Phytologist* **133**: 531-540.
- Felgrová M, Krahulec F. 1999.** *Anthoxanthum odoratum* and *A. alpinum*: Life history parameters at two different altitudes. *Folia Geobotanica* **34**: 19-31.
- Fernandes A, Queirós M. 1969.** Contribution à la connaissance cytotoxinomique des spermatophyta du Portugal. I. Gramineae. *Boletim da Sociedade Broteriana 2.a sér* **43**: 20-140.
- Fiori A. 1969.** *Nuova Flora Analitica d'Italia. Vol. I.* Museo Tridentino di Scienze Naturali. Trento: Edagricole.
- Fjellhaim S, Elven R, Brochmann C. 2001.** Molecules and morphology in concert. II. The *Festuca brachyphylla* complex (Poaceae) in Svalbard. *American Journal of*

Botany 88(5):869-882.

- Francisco-Ortega J, Fuertes-Aguilar J, Gómez-Campo C, Santos-Guerra A, Jansen RK. 1999.** Internal Transcribed Spacer Sequence Phylogeny of *Crambe* L. (Brassicaceae): Molecular Data Reveal Two Old World Disjunctions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11(3): 361-380.
- Gabrielsen TM, Bachmann K, Jakobsen KS, Brochmann C. 1997.** Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia*. *Molecular Ecology* 6: 831-842.
- Gabrielsen TM, Brochmann C, Rueness J. 2002.** The Baltic sea as a model system for studying postglacial colonization and ecological differentiation, exemplified by the red alga *Ceramium tenuicorne*. *Molecular Ecology* 11: 2083-2095.
- García-González R. 1983.** Epidermis foliares de algunas especies de *Festuca*, *Poa* y *Bellardiochloa* en el Pirineo Occidental. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 39(2): 389-404.
- Gaudeul M, Till-Bottraud I, Barjon F, Manel S. 2004.** Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 92: 508-518.
- Gengler-Nowak K. 2002.** Phenetic analysis of morphological traits in the *Malesherbia humilis* complex (Malesherbiaceae). *Taxon* 51: 281-293.
- Giraldo-Cañas D. 2001.** Estudios micromorfológicos y anatómicos en el género neotropical *Axonopus* (Poaceae: Paniceae). I. Epidermis foliar. *Caldasia* 23: 119-133.
- Giraldo-Cañas DA. 2003.** Revisión de las especies del género neotropical *Axonopus* P. Beauv. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae), serie *Barbigeri* G. A. Black. Tesis Doctoral inédita. Buenos Aires: Universidad de La Plata.
- Goldman DH, van den Berg C, Griffith MP. 2004.** Morphometric circumscription of species and infraspecific taxa in *Calopogon* R. Br. (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 247: 37-60.
- Gould FW, Shaw RB. 1992.** *Gramíneas, clasificación y sistemática*. Ciudad de Méjico: AGT editor.
- Gower JC, Ross GJS. 1969.** Minimum spanning trees and single-linkage cluster analysis. *Applied Statistics* 18: 54-64.
- GPWG. 2001.** Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Annals*

of the *Missouri Botanical garden* **38**(3): 373-457.

Grant PR, Grant BR, Petren K. 2005. Hybridization in the recent past. *The American Naturalist* **166**(1): 56-67.

Grant V. 1989. *Especiación Vegetal*. Méjico DF: Limusa

Greimler J, Hermanowski B, Jang CG. 2004. A re-evaluation of morphological characters in European *Gentianella* section *Gentianella* (Gentianaceae). *Plant Systematics and Evolution* **248**: 142-169.

Grime JP, Mowforth MA. 1982. Variation in genome size - an ecological interpretation. *Nature* **299**: 151-153.

Grosstête MP. 1982. Contribution a l'étude biosystématique du genre *Anthoxanthum* L. en France. Tesis Doctoral inédita. París: Université de Paris-Sud.

Gutián F, Carballos T. 1976. *Técnicas de análisis de suelos*. Santiago de Compostela: Pico Sacro.

Hagen AR, Giese H, Brochmann C. 2001. Trans-Atlantic dispersal and phylogeography of *Cerastium arcticum* (Caryophyllaceae) inferred from RAPD and SCAR markers. *American Journal of Botany* **88**(1): 103-112.

Hagen AR, Saether T, Borgen L, Elven R, Stabbetorp OE, Brochmann C. 2002. The arctic-alpine polyploids *Cerastium alpinum* and *C. nigrescens* (Caryophyllaceae) in a sympatric situation: breakdown of species integrity?. *Plant Systematics and Evolution* **230**: 203-219.

Hagidimitrou M, Katsiotis A, Menexes G, Pontikis C, Loukas M. 2005. Genetic diversity of major Greek olive cultivars using molecular (AFLPs and RAPDs) markers and morphological traits. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **130**: 211-217.

Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD. 1991. Correlations Between Species Traits and Allozyme diversity: Implications for Conservation Biology. In: Falk DA, Holsinger KE, eds. *Genetics and Conservation of rare plants*. Oxford: Oxford University Press, 75-86.

Han TH, de Jeu M, van Ech H, Jacobsen E. 2000. Genetic diversity of Chilean and Brazilian *Alstroemeria* species assessed by AFLP analysis. *Heredity* **84**: 564-569.

Hansen K, Elven TR, Brochmann C. 2000. Molecules and Morphology in concert: Tests of some hypothesis in arctic *Potentilla* (Rosaceae). *American Journal of Botany*

87: 1466-1479.

- Hauenstein E, Arriagada V, Latsague M. 1990.** La epidermis foliar de las Loranthaceae chilenas y su relación con la ecología. *Darwiniana* **30**: 143-153.
- Hedberg I. 1961.** Cytotaxonomic studies in *Anthoxanthum* L. s. lat. *Svensk Botanisk Tidskrift* **55**(1): 118-128.
- Hedberg I. 1964.** Pubescence- a spurious taxonomic character in *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. *Svensk Botanisk Tidskrift* **58**(1): 237-241.
- Hedberg I. 1967.** Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. II. Investigations of some Swedish and of a few Swiss population samples. *Symbolae Botanicae Uppsaliensis* **18**(5): 1-88.
- Hedberg I. 1969.** Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. III. Investigations of Swiss and Austrian population samples. *Svensk Botanisk Tidskrift* **63**(1): 233-250.
- Hedberg I. 1970.** Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. IV. Karyotypes, meiosis and the origin of tetraploid *A. odoratum*. *Hereditas* **64**: 153-176.
- Hedberg I. 1976.** A cytotaxonomic reconnaissance of tropical African *Anthoxanthum* L. (Gramineae). *Botanisk Notiser* **129**: 85-90.
- Hedberg I. 1986.** The genesis of tetraploid *Anthoxanthum odoratum* L.. *Symbolae Botanicae Uppsaliensis*. **27**: 147-154.
- Hedberg I. 1990.** Morphological, cytotaxonomic and evolutionary studies in *Anthoxanthum odoratum* L. s.l.- a critical review. *Sommerfeltia* **11**: 97-107.
- Hedberg O. 1957.** Afroalpine vascular plants - a taxonomic revision. *Symbolae Botanicae Uppsaliense* **15**(1): 1-411.
- Henderson A, Martins R. 2002.** Classification of specimens in the *Geonoma stricta* (Palmae) complex: the problem of leaf size and shape. *Brittonia* **54**(3): 202-212.
- Herrera J. 2005.** Flower size variation in *Rosmarinus officinalis*: Individuals, populations and habitats. *Annals of Botany* **95**: 431-437.
- Heuertz M, Fineschi S, Anzidei M, Pastorelli R, Salvini D, Paule L, Frascaria-Lacoste N, Hardy OJ, Vekemans X, Vendramin GG. 2004.** Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular Ecology* **13**: 3437-3452.

- Hewitt GM. 1996.** Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247-276.
- Hewitt GM. 1999.** Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87-112.
- Hewitt GM. 2004.** Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **359**: 183-195.
- Heywood VH. 1998.** The species concept as a socio-cultural phenomenon- a source of the scientific dilemma. *Theory Bioscience* **117**: 203-212.
- Hilu KW, Johnson JL. 1991.** Chloroplast DNA reassociation and grass phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* **176**: 21-33.
- Hilu KW, Wright K. 1982.** Systematics of Graminae: A cluster analysis study. *Taxon* **31**(1): 9-36.
- Hitchcock AS. 1951.** *Manual of the grasses of the United States*. Washington DC: Ed. 2. U.S. Department of Agriculture.
- Holmgren PK, Holmgren NH, Barnett LC. 1990.** *Index Herbariorum. Part I: Herbaria of the World*. 8th edition. Nueva York: New York Botanical Garden.
- Honda M. 1926.** *Anthoxanthum nipponicum*. *Botanical Magazine (Tokyo)* **40**: 317.
- Honda M. 1930.** Monographia Poacearum japonicarum, Bambusoideis exclusis. *Journal of the Faculty of Science Imperial University of Tokyo, sectio III* **3**: 225-228.
- Hörandl E. 2002.** Morphological differentiation within the *Ranunculus cassubicus* group compared to variation of isozymes, ploidy levels and reproductive systems: implications for taxonomy. *Plant Systematics and Evolution* **233**: 65-78.
- Hsiao C, Jakobs SWL, Chatterton NJ, Asay KH. 1999.** A molecular phylogeny of the grass family (Poaceae) based on the sequences of nuclear ribosomal DNA (ITS). *Australian Systematic Botany* **11**: 667-668
- Huijzer B, Vandenberghe J. 1998.** Climatic reconstruction of the Weichselian Pleniglacial in northwestern and central Europe. *Journal of Quaternary Science* **13**(5): 391-417.
- Hultén, E. 1962.** The circumpolar plants I. *Konliga Svenska Vetenskapsakademiens Handligar Ser. 4* **8** (5): 1-275.
- Humbert-Droz CZ, Felber F. 1992.** Étude biométrique des stomates et des grains de

- pollen comme indicateurs du degré de polyploïdie chez *Anthoxanthum alpinum* Löve et Löve. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles* **115**: 31-45.
- Humbert-Droz CZ, Felber F. 1999.** Evidence from isozyme analysis of autopolyploidy in *Anthoxanthum alpinum* A & D. Löve. *Botanica Helvetica* **109**: 217-227.
- Hunter AWS. 1934.** A karyosystematic investigation in the Gramineae. *Canadian Journal of Research* **2**: 213-241.
- Hylander N. 1953.** *Nordisk Kärnväxtflora I*. Uppsala.
- IGME. 1977.** *Mapa Geológico de España 1:50000. Hoja 1 (Cariño)*. Madrid: Ministerio de Industria.
- Izco J. 1987.** Galicia. In: Peinado-Lorca M, Rivas-Martínez S, eds. *La vegetación en España*. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá, 387-451.
- Jacobs BF, Kingston JD, Jacobs LL. 1999.** The origin of grass-dominated ecosystems. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**: 590-643.
- Jain SK, Pal OC. 1975.** A new species and notes on the genus *Anthoxanthum* L. *Journal of the Bombay Natural History Society* **72**: 90-91.
- James SAC, Puttock F, Cordell S, Adams RP. 2004.** Morphological and genetic variation within *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae) on Hawai'i. *New Zealand Journal of Botany* **42**: 263-270.
- Jansen P. 1951.** Graminae. In: Weevers TH, ed. *Flora Neerlandica. Deel 1, Afl 2*. Amsterdam: Koninklijke Nederlandsche Botanische Vereniging, 237.
- Jones BMG, Melderis A. 1963.** *Anthoxanthum odoratum* L. and *A. alpinum* A. & D. Löve. *Exhibition Meeting*: 375-377.
- Jones BMG. 1963.** *Anthoxanthum alpinum* A. and D. Löve, new to the British Isles. *Nature* **198**: 610.
- Jones K. 1964.** Chromosomes and the origin of *Anthoxanthum odoratum* L. *Chromosoma* **15**: 248-274.
- 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**(10): 1470-1480.
- Karp A, Seberg O, Buiatti M. 1996.** Molecular techniques in the assessment of

- botanical diversity. *Annals of Botany* **78**(2): 143-149.
- Katterman G. 1931.** Über die Bildung polyvalenter chromosomenverbände bei einigen Gramineen. *Planta* **12**: 734-774.
- Kellogg EA, Campbell CS. 1987.** *Phylogenetic analyses of the Graminae*. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth MS, eds. *Grass Systematics and Evolution*. Washington D.C: Smithsonian Institution Press, 310-322.
- Kellogg EA. 1998.** Relationships of cereal crops and other grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **95**: 2005-2010.
- Kellogg EA. 2001.** Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* **125**: 1198-1205.
- King AK, Ferris C. 1998.** Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology* **7**: 1151-1161.
- Kjellqvist E. 1961.** Studies in *Festuca rubra* L. 1. Influence of the environment. *Botanisk Notiser* **114**: 403-408.
- Kjolner S, Såstad M, Taberlet P, Brochmann C. 2004.** Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. *Molecular Ecology* **13**:81-86.
- Klaas M. 1998.** Applications and impact of molecular markers on evolutionary and diversity studies in the genus *Allium*. *Plant Breeding* **117**: 297-308.
- Knaben G. 1950.** Chromosome numbers of Scandinavian Arctic-Alpine plant species I. *Blyttia* **8**: 129-155.
- Kruskal JB. 1964.** Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* **29**: 115-129
- Krzanowski WJ. 1988.** *Principles of multivariate analysis. A user's perspective*. Oxford: Oxford Science Publications.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen B, Nei M. 2001.** *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*, Version 2.1. USA: Arizona State University.
- Lambinon J, Deschâtres R. 1991.** Les *Anthoxanthum* annuels de Corse. *Candollea* **46**: 217-219.
- Lauber K, Wagner G. 2001.** *Flora Helvetica. Flore illustrée de Suisse*. Berna: Editions Paul Haupt.

- Lázaro A, Aguinagalde I. 1998.** Genetic diversity in *Brassica oleracea* L. (Cruciferae) and wild relatives (2n=18) using isozymes. *Annals of Botany* **82**: 821-828.
- Legendre P, Legendre L. 1998.** *Numerical Ecology*. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier.
- Leps J, Smilauer P. 2003.** *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lihová J, Tribisch A, Stuessy TF. 2004.** *Cardamine apennina*: a new endemic diploid species of the *C. pratensis* group (Brassicaceae) from Italy. *Plant Systematics and Evolution* **245**: 69-92.
- Linneo C. 1753.** *Anthoxanthum*. P. 28. In: Stearn WT, ed. 1957. *Species plantarum. A facsimile of the first edition*. Londres: Ray Society.
- Litardière R. 1937.** *Anthoxanthum* L. *Candollea* **7**: 230-231
- López-González G. 1994.** Notas sobre el género *Anthoxanthum* L. (Graminae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **51**(2): 309-312.
- Löve Á, Löve D. 1948.** Chromosome numbers of northern plant species. *Reports of the Department of Agriculture, University Institute of Applied Sciences (Iceland). Series B* **3**: 1-131.
- Maire R. 1931.** *Anthoxanthum* L. In: Maire R, Guinochet M, Fanel L, eds. *Flore de l'Afrique du Nord*. Paris: P Lechevalier, 25-29.
- Mantel N. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
- Marhold K, Lihová J, Perný M, Grupe R, Neuffer B. 2002.** Natural hybridization in *Cardamine* (Brassicaceae) in the Pyrenees: evidence from morphological and molecular data. *Botanical Journal of the Linnean Society* **139**: 275-294.
- Marhold K, Lihová J, Perný M, Bleeker W. 2004.** Comparative ITS and AFLP analysis of diploid *Cardamine* (Brassicaceae) taxa from closely related complexes. *Annals of Botany* **93**:507-520.
- Marhold K, Jongepierová I, Krahulcová A Kuèera. 2005.** Morphological and karyological differentiation of *Gymnadenia densiflora* and *G. conopsea* in the Czech Republic and Slovakia. *Preslia* **77**: 159-176.
- Martoja R, Martoja-Pierson M. 1970.** *Técnicas de Histología Animal*. Barcelona: Toray-Masson.

- Mateo-Sanz G, Aguilera-Palasi A. 1990.** Aportación al conocimiento fitogeográfico de la Sierra del Espadán (Castellón). *Folia Botánica Miscelánea* **7**: 67-80.
- Mayová M. 1982.** A contribution to the study of *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. with special emphasize on *A. alpinum* Á et D Löve. Unpublished Ms. Dipl. Thesis. Prague: Universitas Carolinensis.
- Mayr E. 1942.** *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a Zoologist*. Nueva York: Oxford University Press.
- Mayr E. 1982.** *The growth of biological thought: Diversity, evolution and inheritance*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mehrnia M, Zarre S, Sokhan-Sanj A. 2005.** Intra- and inter-specific relationships within the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD. *Biochemical systematics and ecology* **33**: 149-158.
- Melzer H. 1986.** Notizen sur Flora des Burgenlandes, von Nieder- und Oberösterreich. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Österreich* **124**:81-92.
- Merino B. 1909.** *Flora de Galicia*. Santiago de Compostela: Tipografía Galaica.
- Metcalf CR. 1960.** *Anatomy of the Monocotyledons I. Graminae*. Oxford: Clarendon Press.
- Miller MP. 1997.** *TFGPA: Tools for Population Genetic Analysis*, Version 1.3. Department of Biological Sciences. USA: Northern Arizona University.
- Moreno-Saiz JC, Sainz-Ollero H. 1992.** *Atlas corológico de las monocotiledóneas endémicas de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Madrid: Ministerio de Agricultura Pesca e Alimentación.
- Mueller UG, Wolfenbarger LL. 1999.** AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* **14**: 389-394.
- Murray BG, Datson PM, Lai ELY, Sheath KM, Cameron EK. 2004.** Polyploidy, hybridization and evolution in *Pratia* (Campanulaceae). *New Zealand Journal of Botany* **42**: 905-920.
- Nei M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. Nueva York: Columbia University Press.
- Neuffer B, Auge H, Mesch H, Amarell U, Brandl R. 1999.** Spread of violets in polluted pine forests: morphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization. *Molecular Ecology* **8**: 365-377.

- Nicora EG, Rúgolo de Agrassar ZE. 1987.** *Los géneros de gramíneas de América Austral*. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur.
- Nielsen J, Orlík DC. 2001.** A morphometric analysis of *Prunus spinosa*, *P. domestica* ssp. *insititia*, and their putative hybrids in Denmark. *Nordic Journal of Botany* **21**(4): 349-363.
- Oden NL, Sokal RF. 1986.** Directional autocorrelation: an extension of spatial correlograms to two dimensions. *Systematic Zoology* **35**: 608-617.
- Östergren G. 1942.** Chromosome numbers in *Anthoxanthum*. *Hereditas* **33**: 242-243.
- Palacios C, González-Candelas F. 1997.** Análisis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology* **6**: 1107-1121.
- Palacios C, Kresovich S, González-Candelas F. 1999.** A population genetic study on the endangered plant species *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) based on AFLPs. *Molecular Ecology* **8**: 645-657.
- Parker PF. 1972.** II. Natural variation, distribution and systematics of the *Dactylis smithii* Link complex in Madeira and other Atlantic Islands. *New Phytologist* **71**: 371-378.
- Parthasarathy N. 1939.** Cytogenetical studies in Oryzeae and Phalaridineae. *Annals of Botany, London N.S.* **111**(9): 43-76.
- Paunero E. 1953.** Las especies españolas del género *Anthoxanthum* L. *Anales del Instituto Botánico AJ Cavanilles* **12**: 401-442.
- Pérez-Lara JM. 1866.** Florula Gaditana. *Anales de la Sociedad Española de Historia Natural* **15**: 382.
- Petit C, Thompson JD. 1997.** Variation in phenotypic response to light availability between diploid and tetraploid populations of the perennial grass *Arrhenatherum elatius* from open and woodland sites. *Journal of Ecology* **85**: 657-677.
- Phillips S. 1995.** Poaceae (Gramineae). In Hedberg I, Edwards S, eds. *Flora of Ethiopia and Eritrea*. Uppsala: Swedish Science Press, 40-42.
- Pignatti S. 1982.** *Anthoxanthum* In: Pignatti S, ed. *Flora d'Italia Vol. III*. Bolonia: Edagricole, 582-583.
- Pignatti S. 1982.** *Flora d'Italia Vol. III*. Bolonia: Edagricole.
- Pimentel M, Sahuquillo E. 2003a.** An approach to the study of morphological

- relationships among the sweet vernal grasses (*Anthoxanthum* L. *Poaceae*, *Pooideae*) in the Iberian Peninsula. *Bocconeia* **16**(2): 731-737.
- Pimentel M, Sahuquillo E. 2003b.** Study of the leaf anatomy in the Iberian species of the genus *Anthoxanthum* L. *Bocconeia* **16**(2): 683-691.
- Pinto da Silva AR, Teles AN. 1971.** Treze espécies e subespécies novas para a flora de Portugal. *Agronomia Lusitânica* **36**: 1-3
- Platenkamp GAJ. 1990.** Phenotypic plasticity and genetic differentiation in the demography of the grass *Anthoxanthum odoratum*. *Journal of Ecology* **78**: 772-788.
- Polatschek A. 1966.** Cytotaxonomische Beiträge zur Flora der Ostalpenländer. II. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* **113**(1): 101-147.
- Polunin N. 1959.** *Circumpolar Arctic Flora*. Oxford: Clarendon Press.
- Prat H. 1948.** General features of the epidermis of *Zea mays*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **35**: 341-351.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Pritchard JK, Wen W. 2003.** *Documentation for STRUCTURE software: Version 2*. Chicago: University of Chicago.
- Pundeva RS. 1974.** Karyological study on two varieties of *Anthoxanthum odoratum* L.-var. *odoratum* and var. *montanum* Aschers et Graebn. *Comptes rendues de l'Academie bulgare des Sciences* **27**: 1-4.
- Quezel P, Santa S. 1962.** *Nouvelle Flore de L'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris: Editions du Centre National de la Recherche Scientifique.
- Rae TC. 1998.** The Logical Basis for the use of Continuous Characters in Phylogenetic Systematics. *Cladistics* **14**: 221-228.
- Rajakaruna N. 2004.** Edaphic factor in the origin of plant species. *International Geology Review* **46**: 471-478.
- Ramesar-Fortner NS, Aiken SG, Dengler NG. 1995.** Phenotypic plasticity in leaves of four species of arctic *Festuca* (*Poaceae*). *Canadian Journal of Botany* **73**: 1810-1823.
- Raybould AF, Gray AJ, Lawrence MJ, Marshall DF. 1991.** The evolution of *Spartina anglica* CE Hubbard (*Gramineae*): origin and genetic variability. *Biological Journal of the Linnean Society* **44**: 369-380.

- Reales A, Rivera D, Palazón JA, Obón C. 2004.** Numerical Taxonomy study of the *Salvia* sect. *Salvia* (Labiatae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **145**: 353-371.
- Reпка R. 2003.** The *Carex muricata* aggregate in the Czech Republic: multivariate analysis of quantitative morphological characters. *Preslia* **75**: 233-248.
- Richards AJ. 1990.** Reproductive versatility and grass population structure. In: Chapman GP, ed. *Reproductive versatility of grasses*. Cambridge: Cambridge University Press, 131-153.
- Richardson JE, Fay MF, Cronk QCB, Chase MW. 2003.** Species delimitation and the origin of populations in island representatives of the *Phyllica* (Rhamnaceae). *Evolution* **57**(4): 816-827.
- Rieseberg LH, Ellstrand NC. 1993.** What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization?. *Critical review in Plant Sciences* **12**: 213-241.
- Rivas-Martínez S, Costa M, Castroviejo S, Valdés E. 1980.** Vegetación de Doñana (Huelva, España). *Lazaroa* **2**: 5-190.
- Rodríguez-Ramírez A, Rodríguez-Vidal J, Cáceres L, Clemente L, Belluomini G, Manfra L, Improta S, De Andrés JR. 1996.** Recent coastal evolution of the Doñana National Park (SW Spain). *Quaternary Science Reviews* **15**: 803-809.
- Rohlf FJ. 1993.** *NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Nueva York: Exeter Software.
- Rohlf FJ. 2002.** *NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 2.11a. Nueva York: Exeter Software.
- Román B, Alfaro C, Torres AM, Moreno MT, Satovic Z, Pujadas A, Rubiales D. 2003.** Genetic Relationships among *Orobanchae* Species as Revealed by RAPD Analysis. *Annals of Botany* **91**(6): 637-642.
- Rošhevits RY. 1946.** *Sistema zlakov v svyazi s ikh evolyutsiei*. Leningrado: Kamarov Botanical Institute, U.S.S.R., Academy of Sciences.
- Royen PV. 1980.** *The alpine flora of New Guinea. T.2*. Vaduz, 1183-1195.
- Rozmus M. 1958.** Cytological investigations on *Anthoxanthum alpinum* L. et L. a new species of the flora of Poland. *Acta Biologica Cracoviensia, Séries Botanica* **1**: 171-185.
- Rozmus M. 1960.** The taxonomical rank of *Anthoxanthum alpinum* L. et L. in the light of anatomical studies. *Acta Biologica Cracoviensia Séries Botanica* **3**: 81-90.

- Rozmus M. 1963.** Cytogenetical studies in biotypes of *Anthoxanthum alpinum* with accessory chromosomes. *Acta Biologica Cracoviensia Séries Botanica* **6**: 115-141.
- Sahuquillo E, Fraga MI, Martínez M. 1991.** A comparison of classical and numerical taxonomic methods as applied to infraspecific taxa of *Triticum aestivum* cultivated in Galicia (NW Spain). *Agronomia Lusitana* **45**: 225-239.
- Sahuquillo E, Lumaret R. 1995.** Variation in the Subtropical group of *Dactylis glomerata* L. - 1. Evidence from allozyme polymorphism. *Biochemical Systematics and Ecology* **23**(4): 407-418.
- Sahuquillo E, Lumaret R. 1999.** Chloroplast DNA variation in *Dactylis glomerata* L. taxa endemic to the Macaronesian islands. *Molecular Ecology* **8**: 1797-1803.
- Saint-Laurent L, Baum BR, Akpagana K, Arnason JT. 2000.** A numerical taxonomic study of *Trema* (Ulmaceae) from Togo, West Africa. *Systematic Botany* **25**(3): 399-413.
- Sammul M, Kull K, Oksanen L, Veromann P. 2000.** Competition intensity and its importance results of field experiments with *Anthoxanthum odoratum*. *Oecologia* **125**: 18-25.
- Sargent DJ, Geibel M, Hawkins JA, Wilkinson MJ, Battey NH, Simpson DW. 2004.** Quantitative and qualitative differences in morphological traits revealed between diploid *Fragaria* species. *Annals of Botany* **94**: 787-796.
- Sasanuma T, Endo TR, Ban T. 2002.** Genetic diversity of three *Elymus* species indigenous to Japan and East Asia (*E. tsukushiensis*, *E. humidus* and *E. dahuricus*) detected by AFLP. *Genes Genetics Systems* **77**: 429-438.
- Schaeffer TN, Smith GJ, Foster MS, De Tomaso A. 2002.** Genetic differences between two growth-forms of *Lithophyllum margaritae* (Rhodophyta) in Baja California Sur, Mexico. *Journal of Phycology* **38**: 1090-1098.
- Scheen AC, Elven R, Brochmann C. 2002.** A molecular-morphological approach solves taxonomic controversy in arctic *Draba* (Brassicaceae). *Canadian Journal of Botany* **80**: 59-71.
- Schneider S, Küffer JM, Rössli D, Excoffier L. 2000.** *Arlequin V.2000: a Software for Population Genetic Data Analysis*. Ginebra: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Schönswetter P, Tribsch A, Schneeweiss M, Niklfeld H. 2003.** Disjunctions in relict

- alpine plants: phylogeography of *Androsace brevis* and *A. wulfeniana* (Primulaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 437-446.
- Schönswetter P, Tribsch A, Stehlik I, Niklfeld H. 2004.** Glacial history of high alpine *Ranunculus glacialis* (Ranunculaceae) in the European Alps in a comparative phylogeographical context. *Biological Journal of the Linnean Society* **81**: 183-195.
- Schouten Y, Veldkamp JF. 1985.** A revision of *Anthoxanthum* including *Hierochloë* (Gramineae) in Malesia and Thailand. *Blumea* **30**: 319-351.
- Schüle W. 1993.** Mammals, vegetation and the initial human settlement of the Mediterranean islands: a palaeoecological approach. *Journal of Biogeography* **20**: 399-412.
- Scotti I, Vendramin GG, Matteotti LS, Scarponi C, Sari-Gorla M, Binelli G. 2000.** Postglacial recolonization routes for *Picea abies* in Italy as suggested by the analysis of sequence-characterized amplified region (SCAR) markers. *Molecular Ecology* **9**: 699-708.
- Segarra-Moragues JG, Catalán P. 2003.** Life history variation between species of the relictual genus *Borderea* (Dioscoreaceae): phylogeography, genetic diversity, and population genetic structure assessed by RAPD markers. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**: 483-498.
- Segarra-Moragues JG. 2004.** Genética y Evolución del género *Borderea* Miégeville (Dioscoreaceae). Implicaciones para su conservación. Tesis Doctoral inédita. Zaragoza. Universidad de Zaragoza.
- Shannon CE. 1948.** A mathematical theory of communications. *Bell System Technical Journal* **27**: 379-423.
- Smouse PE. 1998.** To tree or not to tree. *Molecular Ecology* **7**: 399-412.
- Snow N. 1996.** The phylogenetic utility of lemmatal micromorphology in *Leptochloa* s.l. and related genera in subtribe Eleusininae (Poaceae, Chloridoideae, Eragrostidae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **83**: 504-529.
- Sneath PHA, Sokal RR. 1973.** *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W. H. Freeman and Company.
- Soltis DE, Gitzendanner MA, Strenge DD, Soltis PS. 1997.** Chloroplast phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant systematics and evolution* **202**: 353-373.

- Soltis DE, Soltis PS. 1999.** Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Tree* **14**: 348-352.
- Soreng RJ, Davis JI. 1998.** Phylogenetics and Character Evolution in the Grass Family (Poaceae): Simultaneous Analysis of Morphological and Chloroplast DNA Restriction Site Character Sets. *The Botanical Review* **64**(1): 1-85.
- Soreng RJ, Peterson PM, Davidse G, Judziewicz EJ, Zuloaga FO, Filgueiras TS, Morrone O. 2003.** Catalogue of New World Grasses (Poaceae): IV. Subfamily Pooideae. *Contributions from the United States National Herbarium* **48**: 111-115.
- Soreng RJ, Davis JI. 2000.** Phylogenetic structure in Poaceae subfamily Pooideae as inferred from molecular and morphological characters: misclassification versus reticulation. In: Jacobs SWL & Everett J, eds. *Grasses. Systematics and evolution*. Collingwood: CSIRO, 61-74.
- Stace CA, Cotton R. 1976.** Nomenclature, comparison and distribution of *Vulpia membranacea* (L.) Dumort and *V. fasciculata* (Förskal) Samp. *Watsonia* **11**: 117-123.
- Stebbins GL. 1985.** Polyploidy, hibridization and the invasion of new habitats. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **72**: 824-832.
- Stebbins GL, Crampton B. 1961.** A suggested revision of the grass genera of temperate North America. *Recent Advances Botany* **1**: 133-145.
- Stehlik I, Schneller JJ, Bachmann K. 2001.** Resistance or emigration: response of the high-alpine plant *Eritrichium nanum* (L.) Gaudin to the ice age within the Central Alps. *Molecular Ecology* **10**: 357-370.
- Stenström A, Jonsson BO, Jónsdóttir IS, Fagerström T, Augner M. 2001.** Genetic variation and clonal diversity in four clonal sedges (*Carex*) along the Arctic coast of Eurasia. *Molecular Ecology* **10**: 497-513.
- Stevens PF. 1984.** Homology and Phylogeny: Morphology and Systematics. *Systematic Botany* **9**(4): 395-409.
- Stevens PF. 2000.** On characters and character states: do overlapping and non-overlapping variation, morphology and molecules all yield data of the same value?. In Scotland RW, Pennington RT, eds. *Homology and Systematics: Coding characters for phylogenetic analyses*. Londres: Routledge.
- Strid A. 1991.** *Anthoxanthum* L. In Strid A, Tan K, eds. *Mountain Flora of Greece*. Edinburgh: Edinburgh University Press, 810-811.

- Stuessy TF. 1990.** *Plant Taxonomy*. Nueva York: Columbia University Press
- Stuessy TF. 2003.** Morphological data in plant systematics. In: Stuessy TF, Mayer V, Hörandl E, eds. *Deep morphology*. Ruggell: A. R. G. Gantner Verlag.
- Stuessy TF, Tremetsberger K, Müllner AN, Jankowicz J, Guo YP, Baeza CM, Samuel RM. 2003.** The melding of systematics and biogeography through investigations at the populational level: examples from the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). *Basic and Applied Ecology* **4**: 287-296.
- Stursa J. 1998.** Research and management of the Giant Mountain's arctic-alpine tundra. *Ambio* **27**(4): 358-360.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cossons JF. 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization route in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.
- Takhtajan A. 1997.** *Diversity and Classification of Flowering Plants*. Nueva York: Columbia University Press.
- Tateoka T. 1957.** Miscellaneous papers on the phylogeny of Poaceae X: Proposition of a new phylogenetic system of Poaceae. *Journal of Japanese Botany* **32**: 275-287.
- Tateoka T. 1966.** Notes on *Anthoxanthum nipponicum* Honda. *Journal of Japanese Botany* **41**(3): 85-88.
- Tateoka T. 1967.** *Anthoxanthum* L. In: Löve A, IOPB chromosome number reports. *Taxon* **16**: 562.
- Tava A. 2001.** Coumarin-containing grass: volatiles from sweet vernalgrass (*Anthoxanthum odoratum* L.). *Journal of Essential Oil Research* **13**: 367-370.
- Teppner H. 1970.** Karyotypen europäischer, perennierender Sippen der Gramineen-Gattung *Anthoxanthum*. *Österreichische Botanische Zeitschrift* **118**: 280-292.
- Teppner H. 1998.** *Anthoxanthum maderense* spec. nova und *A. odoratum* (Poaceae-Aveneae) von Madeira und deren chromosomen morphologie. *Phyton* **38**(2): 307-321.
- Teppner H. 2002.** Poaceae in the greenhouses of the Botanic Garden of the Institute of Botany in Graz (Austria, Europe). *Fritschiana* **31**: 1-42.
- Ter Braak CJF. 1987.** The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* **69**: 69-77.
- Ter Braak CJF, Smilauer P. 1998.** *Canoco* 4.0. Wageningen: Centre for Biometry

Wageningen CPRO-DLO.

- Thormann CE, Ferreira ME, Camargo LEA. 1994.** Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics* **88**: 973-980.
- Thorne RF. 2000.** The classification and geography of flowering plants: dicotyledons of the class Angiospermae (subclasses Magnolidae, Ranunculidae, Caryophyllidae, Dilleniidae, Rosidae, Asteridae and Lamiidae). *Botanical Review* **66**: 441-647.
- Torreçilla P, López-Rodríguez JA, Stancik D, Catalán P. 2003.** Systematics of *Festuca* L. sects. *Eskia* Willk., *Pseudatropis* Kriv., *Amphigenes* (Janka) Tzevel., *Pseudoscariosa* Kriv. and *Scariosae* Hack. Based on analysis of morphological characters and DNA sequences. *Plant Systematics and Evolution* **239**: 113-139.
- Tovar O. 1993.** Las gramíneas (Poaceae) del Perú. *Ruizia* **13**: 1-480.
- Tovar-Sánchez E, Oyama K. 2004.** Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* **91**: 1352-1363.
- Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy TF, Ortiz MA, Weiss-Schneeweiss H, Kadlec G. 2004.** Relationships of *Hypochaeris salzmanniana* (Asteraceae, Lactuceae), an endangered species of the Iberian Peninsula, to *H. radicata* and *H. glabra* and biogeographical implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* **146**: 79-95.
- Tribisch A, Schönswetter P, Stuessy TF. 2002.** *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the Ice Age in the European Alps. *American Journal of Botany* **89**(12): 2024-2033.
- Trusty JL, Olmstead RG, Santos-Guerra A, Sá-Fontinha S, Francisco-Ortega J. 2005.** Molecular phylogenetics of the Macaronesian-endemic genus *Bystropogon* (Lamiaceae): palaeo-islands, ecological shifts and interisland colonizations. *Molecular Ecology* **14**: 1177-1189.
- Tutin TG. 1950.** A note on species pairs in the Gramineae. *Watsonia* **1**: 224-227.
- Tutin TG. 1980.** *Anthoxanthum* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, eds. *Flora Europaea. Vol. V*. Cambridge: Cambridge University Press, 229-230.
- Valdés B. 1973.** Revisión de las especies anuales del género *Anthoxanthum* (Graminae). *Lagasalia* **3**(1): 99-141.
- Valdés B. 1987.** *Anthoxanthum* L. In: Valdés B, Talavera S, Galiano EF, eds. *Flora*

Vascular de Andalucía Occidental. Barcelona: Ketres, 349-351.

- Vázquez-Garcidueñas S, Palacios R, Segovia-Quiroz J, Frías-Hernández J, Olalde-Portugal V, Martínez de la Vega O, Mullard FPO, Vázquez-Marrufo G. 2003.** Morphological and molecular data to determine the origin and taxonomic status of *Prosopis chilensis* var. *riojana* (Fabaceae, Mimosoideae). *Canadian Journal of Botany* **81**: 905-917.
- Vila M. 2004.** Effects of environmental changes during the Quaternary on the distribution of extant species. The case of the butterflies *Erebia triaria* and *E. palarica*. Tesis Doctoral inédita. Universidade da Coruña.
- Vila M. 2005.** The importance of time-scale and multiple refugia: Incipient speciation and admixture of lineages in the Butterfly *Erebia triaria* (Nymphalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**(2): 249-260.
- Visauta B. 1998.** *Análisis estadístico con SPSS de Windows*. Madrid: McGraw Hill.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995.** AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- Vos P, Kuiper M. 1998.** AFLP Analysis. In Caetano-Anollés G, Gresshoff PM, eds. *DNA markers: protocols, applications and overviews*. Nueva York.
- Warcholinska AU, Sicinski JT. 1976.** Studies on the occurrence and spread of *Anthoxanthum aristatum* in central Poland. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* **22**: 409-413
- Watson L, Dallwitz M. 1992.** *The grass genera of the world*. Wallingford: CAB.
- Weber A. 2003.** What is morphology and why is it time for its renaissance in plant systematics?. In: Stuessy TF, Mayer V, Hörandl E, eds. *Deep morphology*. Ruggell: A. R. G. Gantner Verlag.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984.** Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- Williams JKG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV, 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531-6535.
- Willkomm M, Lange J. 1870.** *Prodromus Florae Hispanicae. Vol. I*. Stuttgart: E. Schweizerbart.

- Wilson P. 1992.** On inferring hybridity from morphological intermediacy. *Taxon* **41**: 11-23.
- Wu L, Jain S. 1980.** Self-fertility and seed set in natural populations of *Anthoxanthum odoratum* L. *Botanical Gazette* **141**(3): 300-304.
- Yamamoto Y. 1995.** Allelopathic potential of *Anthoxanthum odoratum* for invading *Zoysia*-grassland in Japan. *Journal of Chemical Ecology* **21**(9): 1365-1373.
- Zeid M, Madkour M, Koraiem Y, Nawar A, Soliman M, Zaitoun F. 1997.** Molecular studies on *Orobanchae*. *Journal of Phytopathology* **145**: 351-355.
- Zeven AC. 1986.** Landrace groups of bread wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). *Acta Horticulturae* **182**: 365-367.
- Zhang LB, Kadereit JW. 2002.** The systematics of *Soldanella* (Primulaceae) based on morphological and molecular (ITS AFLPs) evidence. *Nordic Journal of Botany* **22**(2): 129-169.

