

SECCIÓ DE BOTÀNICA
DEPARTAMENT DE PRODUCTES NATURALS, BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA.
FACULTAT DE FARMÀCIA



**Efectes de la fragmentació de l'hàbitat sobre la
diversitat genètica d'*Stachys maritima* (Lamiaceae) i
estat actual de conservació**

JORDI LÓPEZ I PUJOL
Llicenciat en Farmàcia
Barcelona, juliol de 2002

1. Introducció

Les principals amenaces de la biodiversitat derivades de les activitats de l'home són la destrucció de l'hàbitat, la seva fragmentació i/o la seva degradació (incloent la contaminació), el canvi climàtic global, la sobreexplotació d'espècies per a l'ús humà, la invasió d'espècies exòtiques i la propagació de plagues i malalties (Primack i Ros, 2002). La fragmentació de l'hàbitat redueix la mida i incrementa tant l'aïllament espacial de les poblacions vegetals que ocupen els fragments d'hàbitat com l'efecte de marge (Young et al., 1996; Neel i Ellstrand, 2001). Aquests canvis condueixen a una disminució de la variació genètica dels fragments, mitjançant un augment de la deriva genètica i l'endogàmia, i a un increment de la divergència genètica entre les poblacions degut a un fluxe de gens reduït (Young et al., 1996; Foré i Guttman, 1999). Aquests processos fan les poblacions més sensibles a l'extinció local, donat que les poblacions genèticament erosionades tenen una adaptabilitat reduïda als canvis ambientals biòtics i abiòtics (Barrett i Kohn, 1991) i una capacitat limitada de fer front a plagues i malalties (Frankham, 1995). L'endogàmia afecta la variació genètica reduïnt la freqüència dels heterozigots, el que pot conduir a curt termini a una disminució de l'"estat de salut" dels individus; per altra banda, la deriva genètica pot produir una pèrdua d'al·lells que, a llarg termini, redueix l'habilitat per fer front a canvis en l'hàbitat (Young et al., 1996, Buza et al., 2000).

Tot i això, aquests efectes genètics probablement són específics de les espècies sotmeses a estudi, i la resposta a la fragmentació de l'hàbitat és força dependent de les característiques biològiques de l'espècie, incloent longevitat, sistema reproductiu, mecanismes de dispersió de pol·len i llavors i existència de banc de llavors i vectors de dispersió (Young et al., 1996; Foré i Guttman, 1999; Buza et al., 2000). Un dels principals problemes en l'estudi dels efectes de la fragmentació sobre les espècies es l'absència de coneixement de la seva estructura genètica abans de la pertorbació del seu hàbitat. Com a conseqüència d'això, no tots els processos de fragmentació condueixen als efectes genètics teòrics (Young et al., 1996; Foré i

Guttman, 1999); per exemple, alguns estudis suggereixen que la fragmentació de l'hàbitat pot incrementar el fluxe de gens entre poblacions en comptes de reduir-lo (Foré et al., 1992; Young et al., 1993; Ballal et al., 1994).

La conca Mediterrània es considera actualment un dels 25 "punts calents" (*hotspots*) mundials de biodiversitat, degut a les seves concentracions excepcionals d'espècies endèmiques i també a l'excepcional pèrdua d'hàbitat; la vegetació primària remanent d'aquesta regió està al voltant del 5% de l'extensió original (Myers et al., 2000). L'home ha estat alterant els hàbitats de la Mediterrània durant diversos milers d'anys (Thompson, 1999), encara que s'ha intensificat marcadament en els darrers dos segles. Particularment a la Península Ibèrica, però també a d'altres regions mediterrànies, els hàbitats costaners s'han fragmentat extensivament o s'han destruït com a resultat de la urbanització massiva, la industrialització, la construcció d'infraestructures i les activitats turístiques, entre d'altres (Greuter, 1994; EEA, 1999). Els hàbitats dunars són un dels ecosistemes més degradats de les costes europees, amb una pèrdua estimada de superfície dunar del 25% (WWF, 2002) al 40% (EEA, 1998) en el darrer segle. A Espanya, la superfície dunar que resta actualment està al voltant del 40% (WWF, 2002).

Un dels exemples més clars de fragmentació de l'hàbitat de la flora mediterrània és el cas d'*Stachys maritima* Gouan (Lamiaceae). És una planta característica de la vegetació de dunes de sorra costaneres de la conca mediterrània, actualment distribuïda en una àrea més o menys contínua des de les costes del nord-est d'Espanya fins a Albània, encara que també pot trobar-se a les costes del mar Negre, de Còrsega i del nord d'Àfrica (Algèria i Tunísia) (Greuter et al., 1986). A la Península Ibèrica, els registres de la literatura i dels plecs d'herbari ens donen una idea de la abundància a la costa nord-est de la península fins a les dècades centrals del segle passat, quan va començar la urbanització massiva del litoral i la conseqüent fragmentació de la seva àrea de distribució. Avui dia, només resten tres poblacions de l'espècie, molt properes entre sí, localitzades a la costa nord-est de Catalunya (Fig. 1), que contenen uns 225 individus. L'extensió de presència actual és de 35 km², molt llunyana de l'estimació de 270 km² de principis del segle XX (Fig. 2), segons criteris de la UICN del 2001 (UICN, 2001). *S. maritima* està llistada com "vulnerable" (VU) en un estudi de la flora amenaçada de Catalunya (Sáez i Soriano, 2000) i a la Llista Vermella de la Flora Vasculosa Espanyola (Aizpuru et al. 2000), encara que és necessària una reevaluació basant-nos en els censos actuals i en les descripcions de disminució d'àrea.



Fig. 1. Localització de les poblacions actuals (2002) d'*Stachys maritima*. Les poblacions marcades amb una creu s'han extingit recentment. GTE: Gola del Ter; PPA: Platja de Pals; PRO: Platja de la Rovina; SME: Sant Martí d'Empúries; SPU: Sa Punta.

S'ha emprat electforesi d'isoenzims per a respondre les següents qüestions que es formulen al voltant de les poblacions ibèriques d'aquest tàxon amenaçat: (i) els nivells de diversitat genètica d'*S. maritima*; (ii) la distribució d'aquesta diversitat dins de les poblacions i entre elles (estructura de poblacions); (iii) les conseqüències de la fragmentació sobre la diversitat genètica trobada en aquesta espècie; (iv) la reevaluació del grau d'amenaça segons els criteris de la UICN (UICN, 2001); i (v) fer inferències sobre el seu estat de conservació i suggerir algunes estratègies per a la seva preservació (tant *in-situ* com *ex-situ*).

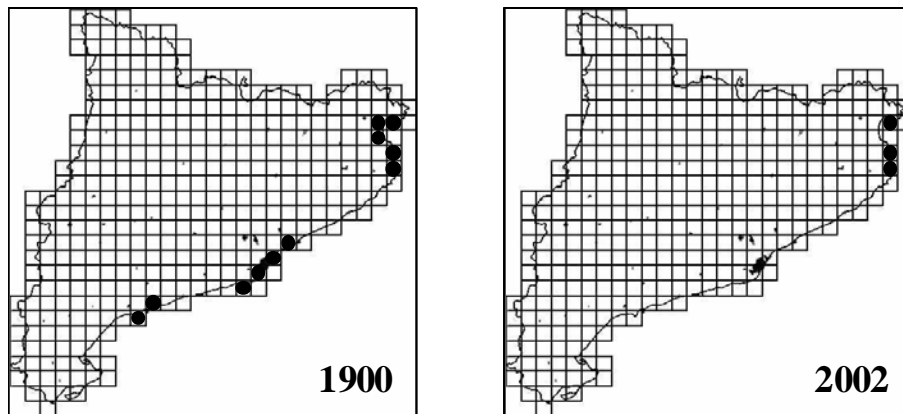


Fig. 2. Disminució de l'àrea de distribució d'*Stachys maritima* durant l'últim segle, detallada mitjançant quadrats UTM 10×10 km.

2. Material i Mètodes

2.1. La planta

Stachys maritima es una herba perenne pubescent, d'entre 10 i 30 cm d'alçada, erecta o ascendent, amb una roseta de fulles persistent. Les inflorescències estan composades per verticil·lastres de 4-6 flors, amb una corol·la d'un groc pàl·lid. És una espècie presumiblement diploide, de recompte $2n = 34$ trobat a les poblacions ibèriques (Cerrillo, 2002), el mateix nombre cromosòmic que en d'altres territoris de l'extrem est de l'àrea de distribució (Aydin, 1978; Koeva-Todorovska, 1988; Baltisberger, 1991). S'ha observat que la pol·linització d'aquesta espècie és entomòfila, mitjançant petits himenòpters que realitzen vols curts. Encara que s'ha vist que l'espècie és autocompatible, el sistema principal de reproducció és l'al·logàmia. És possible també una limitada reproducció vegetativa mitjançant creixement rizomatós (C. Blanché, dades no publicades). Creix a les sorres marítimes, preferiblement a les dunes. S'ha observat certa capacitat colonitzadora en aquesta espècie, que resulta d'una certa adaptabilitat a la mobilitat dels hàbitats dunars.

2.2. Estratègia de mostratge

Totes les tres poblacions conegudes s'han mostrejat des del març a l'abril de 2002: 71 individus a la població més gran, Platja de Pals (PPA), 24 individus a Platja de la Rovina (PRO) i 7 individus a la població més petita, Gola del Ter (GTE). PPA i GTE són molt properes entre sí (només separades per uns 2 km). Mentre que PRO forma un nucli de plantes relativament compacte, PPA forma una població que s'extén al llarg d'1 km de la línia de costa, que es compon d'un nucli dens de 80-90 individus i alguns nuclis esparsos de 1-10 plantes separats per 20-50 m entre ells, totalitzant 123 individus. El mostratge s'ha portat a terme realitzant òbviament un transecte lineal dins les poblacions, i les mostres s'han recollit separades entre 50-100 cm per evitar la recol·lecció de *ramets* del mateix *genet*. Les mostres han consistit en fulles joves de les rosetes basals que s'han dipositat en sobres, transportat al laboratori i guardat a 4°C fins al moment de l'extracció un dia després. Les mostres fol·liars es recullen acuradament per a minimitzar el dany potencial a les poblacions.

Codi poblacional	Localització	Mida poblacional	Mida mostral
PPA	Platja de Pals (31TEG1649, 31TEG1650)	123	71
GTE	Gola del Ter (31TEG1651, 31TEG1652)	9	7
PRO	Platja de la Rovina (31TEG1278)	92	24

Taula 1. Poblacions estudiades d'*Stachys maritima*. La localització de les poblacions es detalla mitjançant quadrats UTM 1 × 1 km.

2.3. Electroforesi

La diversitat genètica s'ha avaluat utilitzant els mètodes estàndard per electroforesi (Soltis et al. 1983; Soltis i Soltis 1989; Kephart 1990). Els fragments fol·liars s'han homogeneïtzat en gresols de porcellana refrigerats usant principalment un tampó d'extracció fred consistent en 0,05 M tris-àcid cítric, 0,1% cisteïna·HCl, 0,1% àcid ascòrbic, 8% PVP-40 (polivinil-pirrolidona) i 1mM 2-mercaptoetanol. L'enzim IDH s'ha resolt específicament amb un tampó d'extracció alternatiu compost per pH 7,6 tris-HCl 0,011 M, 4% tioglicolat sòdic, 2% polietilenglicol i 8% PVP-40. Els extractes s'han absorbit sobre paper de filtre Whatman de 3 mm, per ser analitzats immediatament o bé guardats a -20°C fins al moment de l'anàlisi 1 o 2 dies més tard. Utilitzant

gels horitzontals de midó al 12,5%, s'han assajat 26 enzims, 13 dels quals s'han resultat satisfactòriament en 4 sistemes de tampons, obtenint 20 *loci* interpretables: *Aat-1*, *Aco-1*, *Aco-2*, *Acp-2*, *Adh-1*, *Dia-1*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *6Pgd-1*, *6Pgd-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Skd*, *Sod-1*, *Tpi-1* i *Tpi-2*. El ME i la PRX han mostrat activitat però no són interpretables degut a la pobre o inconsistent resolució de les bandes. S'han detectat duplicacions aparents per la *Mdh-3*, encara que no interpretable, amb patrons inconsistents de fins a 6 bandes, i per la *Idh-2*, que ha mostrat un patró de bandes d'heterozigosi fixada. L'aconitat hidratasa (ACO, EC 4.2.1.3), l'àcid fosfatasa (ACP, EC 3.1.3.2), la malat deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), la fosfoglucoisomerasa (PGI, EC 5.3.1.9), la fosfoglucomutasa (PGM, EC 5.4.2.2) i la superòxid dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) s'han resultat satisfactòriament amb el tampó d'Histidina-citrat pH 5,7 (Jefferies i Gottlieb, 1982); l'alcohol deshidrogenasa (ADH, EC 1.1.1.1), la fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD, EC 1.1.1.44), i la xiquimat deshidrogenasa (SKD, EC 1.1.1.25) s'han resultat amb el tampó de Morfolina-citrat 6,1 (Odrzykoski i Gottlieb, 1984); i l'aspartat aminotransferasa (AAT, EC 2.6.1.1), la diaforasa (DIA, EC 1.6.99.-) i la triosafosfat isomerasa (TPI, EC 5.3.1.1) s'han resultat amb el tampó de Tris-citrat/Liti-borat pH 8,2 (Scandalios, 1969). Només la isocitrat deshidrogenasa s'ha obtingut amb el tampó d'Histidina pH 7,0 (Wendel i Weeden, 1989). Els procediments de tinció per a tots els enzims segueixen el mètode descrit per Vallejos (1983), Shields et al. (1983) i Wendel i Weeden (1989), amb petites modificacions.

2.4. Anàlisi genètica

Els *loci* s'han numerat consecutivament i els al·lels de cada *locus* s'han designat alfabèticament, començant pel més anòdic en ambdós casos. La interpretació dels patrons de bandes s'ha realitzat prenent com a base l'estructura quaternària dels isoenzims, la localització subcel·lular i el nombre de *loci* que s'expressen habitualment a les plantes diploides, i d'acord amb els principis estàndard (Gottlieb, 1982; Soltis i Soltis, 1989; Kephart, 1990). Per calcular els nivells de diversitat genètica, s'han computat els següents estadístics: P , el percentatge de *loci* polimòrfics quan la freqüència de l'al·lel més comú és inferior a 0,95; A , el nombre mitjà d'al·lels per *locus*; H_o , l'heterozigosi observada i H_e , l'heterozigosi esperada. També s'ha calculat l'índex de fixació (F) mitjà per a tots els *loci* polimòrfics, amb l'objectiu de comparar les proporcions genotípiques amb les esperades sota l'equilibri de Hardy-Weinberg. S'ha utilitzat un test xi-quadrat (χ^2) per avaluar les desviacions de F respecte de zero, amb la correcció de Levene (1949) per mides mostrals petites. L'estructura de poblacions s'ha analitzat usant els estadístics-

F de Wright (1951; 1965): F_{IS} mesura els nivells d'endogàmia dins les poblacions, F_{ST} mesura l'endogàmia deguda a la diferenciació entre les poblacions, i F_{IT} mesura els nivells de endogàmia globals. El nombre de migrants per generació (Nm) s'ha determinat usant l'equació de Wright (1951): $Nm = 1 - F_{ST} / 4 F_{IS}$, on N es la mida poblacional i m la taxa mitjana d'immigració. També s'ha calculat la identitat genètica (I) de Nei (1978) entre parells de poblacions. El càlcul de tots els paràmetres s'ha portat a terme amb el programa BIOSYS-2 (Swofford i Selander 1997).

3. Resultats

D'entre els 20 *loci* interpretables, només s'han detectat 25 al·lels, les freqüències dels quals s'han calculat (Taula 2). PPA conté tots els al·lels, mentre que GTE tots menys un, i PRO tots menys 3. No s'han trobat al·lels privats en cap de les poblacions. Només PPA ha mostrat un al·lel rar, *Mdh-2b* (els al·lels rars són els que tenen freqüències inferiors a 0,05). La majoria dels *loci* han estat monomòrfics en totes les poblacions, éssent només polimòrfics (si considerem que els loci són polimòrfics quan exhibeixen més d'un al·lel) els següents *loci* en algunes de les poblacions estudiades: *Aco-1*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Mdh-2* and *6Pgd-2*. Una gran part de la diversitat genètica trobada en aquesta espècie és deguda al *locus Idh-2*, que ha mostrat un patró de bandes d'heterozigosi fixada en tots els individus analitzats. La resta de *loci* polimòrfics no ha mostrat més de 2 al·lels.

Taula 2. Freqüències al·lèliques per a 20 *loci* a les tres poblacions d'*Stachys maritima*.

<i>Locus</i>	Al·lel	Poblacions		
		PPA	GTE	PRO
<i>Aat-1</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Aco-1</i>	<i>a</i>	0,824	0,929	1,000
	<i>b</i>	0,176	0,071	0,000
<i>Aco-3</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Acp-2</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Adh-1</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Dia-1</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
	<i>b</i>	0,492	0,571	0,000
<i>Idh-1</i>	<i>a</i>	0,508	0,429	1,000
	<i>b</i>	0,500	0,500	0,500
<i>Idh-2</i>	<i>a</i>	0,500	0,500	0,500
	<i>b</i>	0,500	0,500	0,500
<i>Mdh-1</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Mdh-2</i>	<i>a</i>	0,986	1,000	0,750
	<i>b</i>	0,014	0,000	0,250

<i>6Pgd-1</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>6Pgd-2</i>	<i>a</i>	0,298	0,571	1,000
	<i>b</i>	0,702	0,429	0,000
<i>Pgi-1</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Pgi-2</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Pgm-1</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Pgm-2</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Skd</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Sod-1</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Tpi-1</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000
<i>Tpi-2</i>	<i>a</i>	1,000	1,000	1,000

La variabilitat genètica s'ha quantificat a les tres poblacions d'*S. maritima*, mostrant els principals índexs valors molt baixos a nivell poblacional (Taula 3): $P = 16,7$, $A = 1,18$ i $H_e = 0,073$. Els valors de P han fluctuat del 10,0 al 20,0%, A de 1,10 a 1,25 i H_e de 0,045 a 0,088. La població més variable ha estat PPA ($H_e = 0,088$), GTE ha mostrat una diversitat genètica molt similar ($H_e = 0,087$) i la menys variable ha estat PRO ($H_e = 0,045$). Tot i això, les diferències entre les poblacions no són estadísticament significatives si atenem els valors d'error estàndard (Taula 3). Els valors d'heterozigosi observada han estat lleugerament inferiors que els d'heterozigosi esperada en les poblacions PPA i GTE, a PRO succeeix el contrari (Taula 3). Per a comparar les freqüències genotípiques amb les esperades sota l'equilibri de Hardy-Weinberg, s'ha calculat l'índex de fixació per a tots els *loci* polimòrfics en cada població. S'ha usat un test xi-quadrat (χ^2) per avaluar les desviacions de F respecte de zero (Taula 4). D'11 tests vàlids, tres valors de F han estat conformes amb les proporcions de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$), mentre que els 8 restants són significativament més grans que zero ($p < 0,05$). D'aquests 8 valors, 5 són positius i 3 negatius; els valors positius indiquen deficiència d'heterozigots, els valors negatius excés. Tot i això, és destacable que els tres valors negatius trobats són deguts al patró de bandes d'heterozigosi fixada que mostra el *locus Idh-2* ($F = -1,000$) a totes les poblacions. El valor mitjà de F_{IS} (0,058; Taula 5), juntament amb els valors de F per als *loci* polimòrfics, indiquen baixos nivells d'endogàmia a les poblacions d'*S. maritima*; no obstant, el petit valor mitjà de F_{IS} és bàsicament degut al *locus Idh-2* ($F_{IS} = -1,000$) donat que els *loci* polimòrfics restants mostren valors alts i positius de fixació (Taula 5).

Taula 3. Resum de la variació genètica per a 20 *loci* a les tres poblacions d' *Stachys maritima*.

Població	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>
PPA	69,4	20,0	1,25	0,077 (0,051)	0,088 (0,040)
GTE	7,0	20,0	1,20	0,071 (0,051)	0,087 (0,043)
PRO	23,6	10,0	1,10	0,058 (0,050)	0,045 (0,031)
Mitjana	33,3	16,7	1,18	0,069	0,073
Desviació estàndard	32,3	5,8	0,08	0,010	0,024

N: mida de la mostra; *P*: percentatge de *loci* polimòrfics; *A*: nombre mitjà d'al·lels per locus; *H_o*: heterozigosi observada; *H_e*: heterozigosi esperada. Error estàndard entre parèntesi.

La divergència genètica entre poblacions s'ha quantificat computant el paràmetre F_{ST} – un indicador de la diferenciació genètica entre les poblacions- i la identitat genètica de Nei (I). El valor mitjà de F_{ST} és relativament alt (0,164), indicant que una fracció significativa de la variabilitat genètica total del tàxon (16,4%) es atribuïble a la diferenciació entre les tres poblacions (Taula 5), i que al voltant del 83,6% de la diversitat es troba dins les poblacions. El valor de Nm és petit (1,27), indicant un nivell limitat de fluxe de gens entre poblacions. Un valor de Nm d'1,0 es considera suficient per prevenir la divergència per deriva genètica (Wright 1951). Els valors de I (mitjana = 0,976, intèrval: 0,957-0,999) són elevats entre parells de poblacions (Taula 6), tal i com s'espera per poblacions conespecífiques (mitjana = 0,950; intèrval: 0,900-1,000; Gottlieb, 1981; Crawford, 1983). Les dues poblacions més properes (només separades per 2 km), PPA i GTE, són genèticament quasi idèntiques ($I = 0,999$), mentre que PRO (separada per uns 25 km de les altres dues) és una mica diferent.

Taula 4. Valors de l'índex de fixació (F) per a tots els *loci* polimòrfics a les tres poblacions d' *Stachys maritima*.

<i>Locus</i>	PPA	GTE	PRO
<i>Aco-1</i>	0,446 ***	-0,077 ns	–
<i>Idh-1</i>	0,555 ***	0,417 ns	–
<i>Idh-2</i>	-1,000 ***	-1,000 *	-1,000 ***
<i>Mdh-2</i>	-0,014 ns	–	0,556 **
<i>6Pgd-2</i>	0,695 ***	1,000 *	–

La conformitat a l'equilibri de Hardy-Weinberg s'ha avaluat usant l'anàlisi xi-quadrat: ns $p \geq 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4. Discussió

4.1. Diversitat genètica en *Stachys maritima*

Els nivells de variació genètica trobats a les poblacions d'*S. maritima* són extremadament baixos, en concordança amb la manca de diversitat que s'espera teòricament en les espècies rares, degut principalment a la petita mida de les poblacions i a l'aïllament d'aquestes (Barrett i Kohn, 1991; Ellstrand i Elam, 1993). Seguint els plantejaments de Rabinowitz (1981), la "rarsa" de les espècies pot determinar-se mitjançant diverses raons: àrea geogràfica reduïda, especificitat d'hàbitat i baixa densitat local, o una combinació d'aquestes. Les espècies rares "de forma natural", en oposició a les "noves" rares, són aquelles espècies que sempre han tingut una distribució geogràfica limitada o unes condicions d'hàbitat restringides, ben adaptades a tenir poblacions petites i aïllades, i relativament tolerants a endogàmia i baixa densitat local. Per tant, la majoria d'aquestes espècies rares de forma natural mostren petits nivells de variació genètica i semblen estar-hi adaptades. Més vulnerables són les noves espècies rares, aquelles que tenen una àmplia distribució històrica i que han sofert fragmentació del seu hàbitat i ara estan restringides a petites àrees, i que són més susceptibles a petites mides poblacionals i a l'aïllament de les poblacions (Huenneke, 1991; Oostermeijer, 1996). D'entre les noves rares, podem trobar alguns exemples d'espècies amb petits nivells de variació genètica, com ara *Gentiana pneumonanthe* (Raijmann et al., 1994) i *Arnica montana* (Luijten et al., 2000). Paradoxalment, s'han trobat valors alts de diversitat genètica en altres espècies fragmentades: *Helianthus occidentalis* (Foré i Guttman, 1999), *Rutidosia leptorrhynchoides* (Brown i Young, 2000), *Erigeron parishii* (Neel i Ellstrand, 2001) i *Swainsona recta* (Buza et al., 2000), encara que l'alta diversitat d'aquesta última pot ésser resultat de la poliploidia. Les característiques biològiques de les espècies poden explicar uns resultats tan variables.

Taula 5. Estimació dels estadístics- F per a tots els *loci* polimòrfics a les tres poblacions d'*Stachys maritima*.

<i>Locus</i>	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>Aco-1</i>	0,443	0,051	0,471
<i>Idh-1</i>	0,542	0,205	0,636
<i>Idh-2</i>	-1,000	0,000	-1,000
<i>Mdh-2</i>	0,453	0,159	0,540
<i>6Pgd-2</i>	0,740	0,340	0,828
Mitjana	0,058	0,164	0,212

F_{IS} : nivells s'endogàmia dins les poblacions, F_{ST} : diferenciació entre poblacions, i F_{IT} : nivells globals d'endogàmia.

Les antigues espècies d'àmplia distribució sotmeses a pèrdua i fragmentació del seu hàbitat tendeixen teòricament a mostrar erosió de la variació genètica en forma de reduccions en la riquesa al·lèlica i l'heterozigosi, com a conseqüència d'un increment de la deriva genètica, endogàmia i divergència entre poblacions. La reducció de l'heterozigosi com a conseqüència d'un coll d'ampolla poblacional és habitualment petita, donat que el creixement poblacional restaura l'heterozigosi però no la riquesa al·lèlica, la qual únicament pot ser recuperada amb mutació o migració. Tot i això, la creació de variació genètica mitjançant mutacions és poc probable en poblacions petites (Raijmann et al., 1994; Primack i Ros, 2002) i la fragmentació incrementa la resistència a la migració entre poblacions. El descens de l'heterozigosi pot conduir a efectes negatius en l'estat de salut, degut a depressió per endogàmia (*inbreeding depression*) (Charlesworth i Charlesworth, 1987), que pot tenir greus implicacions per al manteniment de les poblacions. De forma general, els estudis que es coneixen sobre espècies fragmentades mostren una correlació positiva entre la mida de les poblacions i la riquesa al·lèlica (Van Treuren et al., 1991; Prober i Brown, 1994; Raijmann et al., 1994; Young et al., 1999; Buza et al., 2000; Luijten et al., 2000), i entre la mida de les poblacions i l'heterozigosi (Prober i Brown, 1994; Raijmann et al., 1994; Buza et al., 2000), encara que aquesta última no sempre es produeix (Van Treuren et al., 1991; Luijten et al., 2000). També s'ha trobat una relació entre l'heterozigosi i l'estat de salut a *Gentiana pneumonanthe* (Oostermeijer et al., 1995), *Arnica montana* (Luijten, 2001) i *Swertia perennis* (Lienert et al., 2002).

Taula 6. Matriu de la identitat genètica de Nei (1978) entre poblacions d'*Stachys maritima*.

Població	PPA	GTE	PRO
PPA	—		
GTE	0,999	—	
PRO	0,957	0,973	—

L'absència de coneixement de la variació genètica d'aquestes espècies abans de la fragmentació del seu hàbitat és un problema molt important a l'hora d'estudiar les noves espècies rares. En el cas d'*S. maritima*, es desconeix quin podria ser el "punt de partida" abans de l'inici de la pèrdua del seu hàbitat. La conservació actual de només tres poblacions i l'elevada proximitat entre aquestes dibuixa un escenari complicat per formular inferències sobre els processos de fragmentació soferts per aquesta espècie i sobre la supervivència de les poblacions. Com que es desconeix quina era la "salut genètica" abans de la fragmentació

d'aquesta espècie, els baixos nivells de diversitat genètica podrien ser la seva situació "natural" quan estava àmpliament distribuïda a causa de la seva especificitat a l'hàbitat dunar. No obstant, els valors extremadament baixos de variació genètica trobats a *S. maritima* –que serien inclús més petits si descartem de l'anàlisi el *locus Idh-2* ja que sembla estar duplicat (veure més avall)– són bastant més petits que els esperats per espècies d'àmplia distribució i també per espècies endèmiques, per espècies al·logames de pol·linització animal i per espècies perennes herbàcies de vida curta (Hamrick i Godt, 1990) i pràcticament comparables als nivells més baixos de variació genètica descrits per espècies de plantes (Crawford et al., 1988; Lesica et al., 1988; Waller et al., 1988; Crawford et al., 1990; Cole i Biesboer, 1992; Soltis et al., 1992; Kress et al., 1994; Godt i Hamrick, 1996; Godt et al., 1997; Soltis et al., 1997; Godt i Hamrick, 1998; Bartlett et al., 2002; Segarra-Moragues i Catalán, 2002, entre d'altres), el que suggereix que els episodis de fragmentació de l'hàbitat que s'han produït en el darrer segle podrien haver disminuït, en alguna extensió, la variació genètica en aquesta espècie.

Pel que fa a la riquesa al·lèlica trobada a les poblacions d'*S. maritima*, l'absència quasi total d'al·lels rars (només se n'ha trobat un a PPA), el màxim de dos al·lels que mostren els *loci* polimòrfics, i la gran majoria de *loci* analitzats restant fixats (15 dels 20 *loci* resolts), pot interpretar-se com el resultat de la fragmentació de l'hàbitat en base a: (i) una deriva genètica important a través de colls d'ampolla genètics que s'haurien produït en els fragments poblacionals restants i (ii) aïllament dels fragments amb disminució del fluxe de gens entre aquests, i amb una conseqüent pèrdua de la capacitat de recuperació d'al·lels mitjançant migració. Els al·lels que presenten baixes freqüències poden perdre's fàcilment per deriva genètica, procés que està potenciat per una reducció en la mida poblacional (Barrett and Kohn, 1991). Els nivells de riquesa al·lèlica semblen estar en una situació més crítica que els nivells d'heterozigosi, que són relativament propers a les proporcions de Hardy-Weinberg a *S. maritima*. El patró de bandes d'heterozigosi fixada observat en el *locus Idh-2* probablement ha produït els alts valors d'heterozigosi observada a les poblacions. Una altra explicació pot ésser els limitats episodis de reclutament observats en aquesta espècie, que poden augmentar la proporció d'heterozigots atès que el creixement poblacional teòricament restaura l'heterozigosi. De totes maneres, els baixos nivells de deficiència d'heterozigots que s'han trobat a les poblacions poden atribuir-se a un increment de l'endogàmia, potser degut a les petites taxes observades d'autofertilització (al voltant del 10%, C. Blanché, dades no publicades) o a una estructura en subpoblacions (efecte Wahlund) ja que les poblacions es poden fragmentar en petits rodals tal com s'ha observat a la població més gran d'*S. maritima* (PPA), on alguns individus estan agrupats en rodals de 1-10 plantes separades per 20-50 metres entre ells.

La població més petita (GTE) presenta uns valors de diversitat genètica molt similars als de PPA i inclús lleugerament superiors que els de PRO, fet que podria indicar una fragmentació de GTE probablement a partir de PPA degut a la seva proximitat (aproximadament 2 km). Aquestes dues poblacions són genèticament quasi idèntiques ($I = 0,999$), el que dóna suport a aquesta idea. El petit nombre d'individus analitzats de GTE (només 7) presentant nivells de variació d'una extensió similar respecte les altres poblacions és degut probablement a un episodi de fragmentació recent que pot estar encara sofrint PPA (veure també més amunt). Tot i això, no es pot descartar un nou episodi de colonització. S'ha trobat una divergència genètica moderada entre poblacions en aquesta espècie ($F_{ST} = 0,164$), que suggereix un nivell limitat d'intercanvi de gens entre poblacions, tal i com es reflecteix pel valor relativament petit de fluxe gènic (1,27). El valor trobat de F_{ST} és del mateix ordre (al voltant del 10-20%) que l'obtingut per diversos tàxons sotmesos a fragmentació (Rajimann et al., 1994; Luijten et al., 2000; Neel i Ellstrand, 2001; Lienert et al., 2002), que suggereix que la fragmentació de l'hàbitat ha incrementat la diferenciació genètica entre poblacions d'*S. maritima*. El fluxe de gens en les plantes superiors es produeix mitjançant la dispersió de pol·len i llavors. Els pol·linitzadors que visiten les plantes d'*S. maritima* són petits insectes que no són capaços de volar grans distàncies, molt més curtes que la distància que separa les dues poblacions més properes. Per tant, els insectes només podrien assegurar el fluxe de gens entre els rodals fragmentats de PPA. Pel contrari, s'ha observat que la dispersió de llavors presenta una major extensió, donat que les llavors poden ser transportades pel vent a majors distàncies que les dels pol·linitzadors, encara que insuficients per contrarrestar els efectes de l'aïllament. Per tant, l'actual intercanvi de gens entre les poblacions sembla ser molt més limitat que el que mostra teòricament el valor de Nm ; així, l'increment en la diferenciació entre poblacions sembla estar progressant actualment, intensificant d'aquesta manera els efectes de la fragmentació.

El patró de bandes d'heterozigosi fixada trobat pel *locus Idh-2* en tots els individus analitzats pot interpretar-se des de diferents punts de vista. També s'ha trobat un perfil d'heterozigosi fixada en tots els individus estudiats pels *loci Idh* and *Pgi-2* a *Borderea pyrenaica*, i només pel *locus Pgi-2* a *B. chouardii*, que s'ha interpretat com episodis de duplicació gènica en aquests *loci* o origen híbrid (al·lopoliploide) d'aquestes espècies (Segarra-Moragues i Catalán, 2002). Una de les explicacions més plausibles al patró d'heterozigosi fixada per el *locus Idh-2* a *S. maritima* és atribuir-lo a una duplicació gènica. Podem trobar a la literatura diverses descripcions de duplicacions gèniques per l'IDH (Gottlieb, 1982; Weeden i Wendel, 1989; Segarra-Moragues i Catalán, 2002). També s'ha detectat una duplicació aparent, encara que no interpretable, pel *locus Mdh-3* a *S. maritima*. Quan s'observen diverses duplicacions en una

espècie, pot sospitar-se poliploidia (Weeden i Wendel, 1989). Tot i això, per a demostrar un hipotètic origen al·lopoliploide d'*S. maritima* amb una diploidització subseqüent, calen anàlisis cariològics de la meiosi i estudis d'herència (tests isoenzimàtics de la progènie). Una selecció contra la supervivència dels homozigots (aquests siguin letals) i el consegüent increment dels heterozigots pot ésser una altra raó que expliqui els patrons de bandes de l'*Idh-2*.

4.2. Estat de conservació i prioritats

Prenent com a base els censos actuals (224 individus), els petits valors d'àrea d'ocupació (5 km²) i extensió de presència (35 km²), i la disminució de l'àrea descrita (87-99% depenent del criteri emprat per al càlcul de l'àrea de distribució del tàxon), l'avaluació del grau d'amenaça ha passat de "vulnerable" (VU) a "en perill crític" (CR) a la Península Ibèrica, segons els criteris de la UICN (UICN, 2001). Donat que les poblacions ibèriques estan aïllades respecte les poblacions conoespecífiques exteriors (les poblacions més properes, al sud de França, estan allunyades uns 50 km i la seva presència actual no s'ha confirmat) i per tant un efecte de rescat es poc probable que es produeixi, l'aplicació dels criteris de la Llista Vermella de la UICN a l'escala regional (Gärdenfors et al., 2001) sembla no ésser necessària.

Les activitats antropogèniques són les principals amenaces d'*S. maritima* a la Península Ibèrica, derivades principalment de la desnaturalització de les platges com a conseqüència de la urbanització massiva en el darrer segle. La degradació física i/o l'eliminació dels habitats costaners de dunes de sorra ha conduït a la fragmentació o inclús a la desaparició d'antigues poblacions. La conservació de plecs d'herbari ens dóna idea de la pèrdua de moltes poblacions (C. Blanché, dades no publicades). Aquesta dinàmica de degradació de l'hàbitat ha conduït algunes espècies, antigament considerades comunes a les platges ibèriques, a la seva rarificació, com és el cas de *Verbascum pseudocreticum* (Sánchez-García, 2000) i *Juniperus macrocarpa* (Aguilella et al., 1994; Sánchez-García, l.c.). De la mateixa forma, també s'ha documentat la rarificació o l'extinció de flora litoral en d'altres països de la conca mediterrània: *Halimione portulacoides*, *Tetraglonobus maritimus* i *Veronica euxina* han desaparegut de la costa de Bulgària (Anònim, 2002), *Atriplex halimus* i *Cinnomorium coccineum* ja estan extingides a Sardenya (Bocchieri, 1998), i algunes espècies rares estan suficientment amenaçades per a necessitar protecció a la costa sud de França: *Otanthus maritimus*, *Calystegia soldanella*, *Crucianella maritima*, *Echinophora spinosa* i *Eryngium maritimum* (JOLR, 1994; JOPACA, 1998).

Les amenaces naturals també poden afectar la supervivència de les espècies vegetals. Els valors extremadament petits de diversitat genètica que s'han trobat i la petita mida de les poblacions d'*S. maritima* no poden assegurar una capacitat apropiada de resposta a fenòmens estocàstics. Les poblacions petites són propenses a la reducció de la seva mida i a la extinció com a conseqüència de diverses raons, que inclouen estocasticitat genètica, estocasticitat demogràfica, estocasticitat ambiental i catàstrofes climàtiques (Menges, 1991; Primack i Ros, 2002). Un dels principals objectius de la conservació de poblacions petites i amenaçades és estimar la mida de una població viable mínima (MVP), la mida necessària per a tenir una probabilitat d'extinció acceptablement petita (Menges, 1991; Iriondo, 1996). Una MVP de l'ordre de 10^3 - 10^6 individus és suficient per amortir l'estocasticitat ambiental i les catàstrofes, però aquest nombre cau a un interval entre 50 i 500 per a contrarrestar l'estocasticitat genètica, i a només 50 per a prevenir l'estocasticitat demogràfica (Menges, 1991; Iriondo, 1996). Les poblacions d'*S. maritima* tenen una mida crítica que els requeriments de MVP per a contrarrestar les estocasticitats, fet que les deixa teòricament en una situació de risc per a la seva supervivència. Les dues poblacions més grans, PPA i PRO, tenen mides ($N = 123$ and 92 , respectivament) en el límit per a prevenir les estocasticitats genètiques i demogràfiques, però insuficients per a detenir l'estocasticitat ambiental. Les catàstrofes poden produir directament l'extinció de poblacions senceres, com ja ha succeït en dues poblacions d'*S. maritima*, vistes abans de l'anàlisi isoenzimàtica i que han desaparegut per inundació com a conseqüència dels temporals de la tardor-hivern de 2001.

Les polítiques de conservació per les espècies rares i/o amenaçades s'han centrat generalment en la preservació o la restauració de l'hàbitat natural de l'espècie, el que permet el manteniment de les interaccions entre les espècies i el seu ecosistema sense detenir els processos evolutius; aquesta estratègia només pot estabilitzar les espècies a curt termini (Barrett i Kohn, 1991). Tot i això, les noves espècies rares són més susceptibles als efectes negatius de la petita mida poblacional i el seu aïllament, i només la restauració ecològica no és suficient per assegurar la seva viabilitat a llarg termini. Els plans de conservació han de focalitzar-se en el manteniment de mides poblacionals grans i en la creació d'estratègies que permetin el fluxe de gens entre poblacions, per exemple creant corredors entre les poblacions o rodals, amb l'objectiu d'evitar els efectes nocius derivats de la fragmentació de l'hàbitat i d'estabilitzar les espècies a llarg termini (Barrett i Kohn, 1991; Neel i Ellstrand, 2001).

Donat el petit nombre d'individus que resten d'*S. maritima*, són necessàries mesures urgents de conservació *in-situ*. Actualment, els hàbitats dunars que contenen poblacions d'*S. maritima* no disposen d'una figura legal que assegurï una protecció suficient. Una mesura

adequada seria la creació de “reserves” botàniques, que incloguessin almenys l'àrea ocupada per les poblacions, encara que de difícil realització a causa de les activitats turístiques que tenen lloc en els hàbitats dunars (les dunes estan freqüentades per banyistes i inclús per motos i vehicles tot terreny). Per aquesta raó, potser és més realista la implementació de mesures “toves” com ara el tancament de les dunes. Poden ser necessàries reintroduccions i/o reforçaments de les poblacions actuals per a garantir la viabilitat de les poblacions a llarg termini. La principal política de conservació *ex-situ* és el manteniment d'un banc de germoplasma. Encara que existeixen diverses fórmules per a calcular el nombre de llavors i poblacions que han de ser recol·lectades (CPC, 1991; Hamrick et al., 1991), la limitada àrea de distribució d'aquest tàxon recomana la recol·lecció en totes les poblacions, per a garantir llavors genèticament variables per a una hipotètica reintroducció.

Agraïments

En primer lloc vull expressar el meu profund agraïment als meus directors de tesi, César Blanché i Joan Simon pel seu mestratge i dedicació; a les meves companyes de laboratori, Maria Bosch i Maria Renée Orellana per la seva col·laboració en el treball experimental, a Carles Barriocanal, per la seva ajuda en la localització de poblacions; a Pere Arús, pel seu expert consell en temes genètics, i a M^a José Rodríguez Pérez. També vull fer arribar el meu agraïment a tothom qui ha col·laborat, en una o altra manera, en la realització d'aquest treball.

Bibliografia

- Aguilella, A., Carretero, J.L., Crespo, M.B., Figuerola, R., Mateo G., 1994. Libro de la flora rara, endémica o amenazada de la Comunidad Valenciana. Generalitat Valenciana, Conselleria de Medi Ambient, València.
- Aizpuru, I., Ballester, G., Bañares, A., Báscones, J.C., Benito, J.L. et al., 2000. Lista Roja de Flora Vasculare Española (valoración según categorías UICN). Conservación Vegetal 6, 11-38.
- Anònim, 2002. Sunny Beach Resort-Plants of Sand Dunes. Disponible a Internet: <http://www.sunny-beach.com/plants.html>.

- Aydin, A., 1978. Reports [A Löve, A. (ed.), IOPB Chromosome numbers reports LXI]. *Taxon* 27, 375-376.
- Ballal, S.R., Foré, S.A., Guttman, S.I., 1994. Apparent gene flow and genetic structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. *Canadian Journal of Botany* 72, 1311-1315.
- Baltisberger, M., 1991. Chromosomenzahlen einiger Labiaten aus Albanien. *Berichte des Geobotanischen Institutes der Eidgenössische Technische Hochschule Stiftung Rübel* 57, 165-181.
- Barrett, S.C.H., Kohn, J.R., 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. *A Genetics and Conservation of Rare Plants*, eds. D.A. Falk, K.E. Holsinger, pp 3-30. Oxford University Press, New York.
- Bartlett, E., Novak, S.J., Mack, R.N., 2002. Genetic variation in *Bromus tectorum* (Poaceae): differentiation in the eastern United States. *American Journal of Botany* 89, 602-612.
- Bocchieri, E., 1998. On the failure to find plants on some minor islands of Sardinia. *Flora Mediterranea* 8, 197-212.
- Brown, A.H.D., Young, A.G., 2000. Genetic diversity in tetraploid populations of the endangered daisy *Rutidosia leptorrhynchoides* and implications for its conservation. *Heredity* 85, 122-129.
- Buza L., Young, A., Thrall, P., 2000. Genetic erosion, inbreeding and reduced fitness in fragmented populations of the endangered tetraploid pea *Swainsona recta*. *Biological Conservation* 93,177-186.
- Center for Plant Conservation (CPC). 1991. Genetic sampling guidelines for conservation collections of endangered plants. *A Genetics and Conservation of Rare Plants*, eds. D.A. Falk, K.E. Holsinger KE, pp 225-238. Oxford University Press, New York.
- Cerrillo, N., 2002. Estudi sobre germinació d'espècies vegetals endèmiques, rares o amenaçades. Treball Pràctic de Botànica I. Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 18, 237-268.
- Cole, C.T., Biesboer, D.D., 1992. Monomorphism, reduced gene flow, and cleistogamy in rare and common species of *Lespedeza* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 79, 567-575.
- Crawford, D.J., 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. *A Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, eds. S.D. Tanksley, T.J. Orton, pp. 257-287. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Crawford, D.J., Stuessy, T.F., Silva O, M., 1988. Allozyme variation in *Chenopodium santae-clarae*, an endemic species of the Juan Fernandez Islands, Chile. *Biochemical Systematics and Ecology* 16, 279-284.

- Crawford, D.J., Stuessy, T.F., Lammers, T.G., Silva O, M., Pachecos, P., 1990. Allozyme variation and evolutionary relationships among three species of *Wahlenbergia* (Campanulaceae) in the Juan Fernandez Islands. *Botanical Gazette* 151, 119-124.
- EEA, 1998. Europe's Environment: The Second Assessment. European Environment Agency. Office for official publications of the European Communities. Disponible a Internet: <http://reports.eea.eu.int/92-828-3351-8/en>.
- EEA, 1999. State and pressures of the marine and coastal Mediterranean environment. Environmental assessment report No 5. European Environment Agency. Office for official publications of the European Communities. Disponible a Internet: <http://reports.eea.eu.int/ENVSERIES05/en>.
- Ellstrand, N.C., Elam, D.R., 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24, 217-242.
- Foré S. A., Hickey, R.J., Vankat, J.L., Guttman, S.I., 1992. The effect of forest fragmentation on genetic diversity and structure: a landscape ecology perspective. *Canadian Journal of Botany* 70, 1659-1668.
- Foré S.A., Guttman, S.I., 1999. Genetic structure of *Helianthus occidentalis* (Asteraceae) in a preserve with fragmented habitat. *American Journal of Botany* 86, 988-995.
- Frankham, R., 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29, 305-327.
- Gärdenfors, U., Hilton-Taylor, C., Mace, G.M., Rodríguez, J.P., 2001. The application of IUCN Red List criteria at regional levels. *Conservation Biology* 15, 1206-1212.
- Godt, M.J.W., Hamrick, J.L., 1996. Allozyme diversity in the endangered shrub *Lindera melissifolia* (Lauraceae) and its widespread congener *Lindera benzoin*. *Canadian Journal of Forest Research* 26, 2080-2087.
- Godt, M.J.W., Walker, J., Hamrick, J.L., 1997. Genetic diversity in the endangered lily *Harperocallis flava* and a close relative, *Tofieldia racemosa*. *Conservation Biology* 11, 361-366.
- Godt, M.J.W., Hamrick, J.L., 1998. Low allozyme diversity in *Schwalbea americana* (Scrophulariaceae), an endangered plant species. *Heredity* 89, 89-93.
- Gottlieb, L.D., 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. *Progress in Phytochemistry* 7, 1-46.
- Gottlieb, L.D., 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216, 373-380.
- Greuter, W., 1994. Extinctions in Mediterranean areas. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 344, 41-46.
- Greuter, W., Burdet, H.M., Long, G., 1986. Med-Checklist, vol. 3. Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Genève, Genève.

- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., 1990. Allozyme diversity in plant species. A Plant population genetics, breeding and genetic resources, eds. A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, B.S. Weir, pp. 43-63. Sinauer Associates, Sunderland.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Murawski, D.A., Loveless, M.D., 1991. Correlation between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. A Genetics and conservation of rare plants, eds. D.A. Falk, K.E. Holsinger, pp. 75-86. Oxford University Press, New York.
- Huenneke, L.F., 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. A Genetics and Conservation of Rare Plants, eds. D.A. Falk, K.E. Holsinger KE, pp. 31-44. Oxford University Press, New York.
- Iriondo, J.M., 1996. The survey and modelling of small plant populations as a basis for developing conservation strategies. *Bocconea* 5, 151-157.
- Jefferies, R.L., Gottlieb, L.D., 1982. Genetic differentiation of the microspecies *Salicornia europea* L. (sensu stricto) and *S. ramossisima* J Woods. *New Phytology* 92, 123-129.
- JOLR., 1998. Liste des espèces végétales protégées en région Languedoc-Roussillon par l'Arrêté du 29 octobre 1997. NOR:ATEN97600338A, Journal Officiel de la région Languedoc-Roussillon du 16 janvier 1998. Disponible a Internet: <http://perso.wanadoo.fr/bblb/botanica/ListesPIProt/lr.html>.
- JOPACA, 1994. Liste des espèces végétales protégées en région Provence-Alpes-Côte d'Azur par l'Arrêté du 9 mai 1994. NOR:ENVN9430087A, Journal Officiel de la région Provence-Alpes-Côte d'Azur du 26 juillet 1994. Disponible a Internet: <http://perso.wanadoo.fr/bblb/botanica/ListesPIProt/paca.html>.
- Kephart, S.R., 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *American Journal of Botany* 77, 693-712.
- Koeva-Todorovska, J.T., 1988. Kariologično i polenomorfologično izsledvane na vidovete ot rod *Stachys* L. v Balgarija. Centenary of Acad. N. J. Stojanov: 138-151.
- Kress, W.J., Maddox, G.D., Roesel, C.S., 1994. Genetic variation and protection priorities in *Ptilimnium nodosum* (Apiaceae), an endangered plant of the Eastern United States. *Conservation Biology* 8, 271-276.
- Lesica, P., Leary, R.F., Allendorf, F.W., and Bilderback, D.E., 1988. Lack of genetic diversity within and among populations of an endangered plant, *Howellia aquatilis*. *Conservation Biology* 2, 275-282.
- Levene, H., 1949. On a matching problem arising in genetics. *Annals of Mathematical Statistics* 20, 91-94.

- Lienert J., Fischer, M., Schneller, J., Diemer, M., 2002. Isozyme variability of the wetland specialist *Swertia perennis* (Gentianaceae) in relation to habitat size, isolation, and plant fitness. *American Journal of Botany* 89, 801-811.
- Luijten, S.H., 2001. Reproduction and genetics of fragmented plant populations. Tesi doctoral, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam.
- Luijten, S.H., Dierick, A., Oostermeijer, G.J.B., Raijmann, L.E.L., den Nijs, H.C.M., 2000. Population size, genetic variation, and reproductive success in a rapidly declining, self-incompatible perennial (*Arnica montana*) in The Netherlands. *Conservation Biology* 14, 1776-1787.
- Menges, E.S., 1991. The application of minimum viable population theory to plants. A Genetics and Conservation of Rare Plants, eds. D.A. Falk, K.E. Holsinger KE, pp 45-61. Oxford University Press, New York
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858.
- Neel, M.C., Ellstrand, N.C., 2001. Patterns of allozyme diversity in the threatened plant *Erigeron parishii* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 88, 810-818.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Odrzykoski, I.J., Gottlieb, D., 1984. Duplication of genes coding 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) in *Clarkia* (Onagraceae) and their phylogenetic implications. *Systematic Botany* 9, 479-489.
- Oostermeijer, J.G.B., 1996. Population viability of the rare *Gentiana pneumonanthe*, the relative importance of demography, genetics, and reproductive biology. Tesi doctoral, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam.
- Primack R.B., Ros, J., 2002. Introducción a la biología de la conservación. Ariel Ciencia, Barcelona.
- Prober, S., Brown, A., 1994. Conservation of the grassy white box woodlands. I. Population genetics and fragmentation of *Eucalyptus albens* Benth. *Conservation Biology* 8, 1003-1013.
- Rabinowitz, D., 1981. Seven forms of rarity. A The Biological Aspects of Rare Plant Conservation, ed. H. Synge, pp. 205-217. Wiley, New York.
- Raijmann, L.E.L., van Leeuwen, N.C., Kersten, R., Oostermeijer, J.G.B., H. C. M. den Nijs, H.C.M., Menken, S.B.J., 1994. Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology* 8, 1014-1026.

- Sáez, L., Soriano, I., 2000. Catàleg de plantes vasculars endèmiques, rares o amenaçades de Catalunya, II. Tàxons no endèmics en situació de risc. Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural 68, 35-50.
- Sánchez-García, I., 2000. Flora amenazada del litoral gaditano. Junta de Andalucía y Diputación Provincial de Cádiz. Jerez de la Frontera.
- Scandalios, J., 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochemistry Genetics* 3, 37-79.
- Segarra-Moragues, J.G., Catalán, P., 2002. Low allozyme variability in the critically endangered *Borderea chouardii* and its congener *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae), two paleoendemic relicts from the central Pyrenees. *International Journal of Plant Sciences* 163, 159-166.
- Shields, C.R., Orton, T.J., Stuber, C.W., 1983 An outline of general resources needs and procedures for the electrophoretic separation of active isozymes from plant tissue. *A Isozymes in Plant Genetic and Breeding*, eds. S.D. Tanksley, T.J. Orton, pp. 443-468. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Soltis, D.E., Haufler, H., Darrow, D., Gastony, J., 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. *American Fern Journal* 73, 9-27.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., 1989. Genetic consequences of autopolyploidy in *Tolmiea* (Saxifragaceae). *Evolution* 43, 586-594.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E., Tucker, T.L., Lang, F.A., 1992. Allozyme variability is absent in the narrow endemic *Bensoniella oregana* (Saxifragaceae). *Conservation Biology* 6, 131-134.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E., Norvell, T.L., 1997. Genetic diversity in rare and widespread species of *Lomatium* (Apiaceae). *Madroño* 44, 59-73.
- Swofford, D.L., Selander, R.B., 1997. BIOSYS-2: A computer program for the analysis of allelic variation in genetics. User's Manual. Department of Genetics and Development, University of Illinois, Urbana-Champaign.
- Thompson, J.D., 1999. Population differentiation in Mediterranean plants: insights into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. *Heredity* 82, 229-236.
- UICN, 2001. Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland y Cambridge.
- Vallejos, E. 1983. Enzyme activity staining. *A Isozymes in Plant Genetic and Breeding*, eds. S.D. Tanksley, T.J. Orton, pp 469-516. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

- Waller, D.M., O'Malley, D.M., Gawler, S.C., 1988. Genetic variation in the extreme endemic, *Pedicularis furbishiae*. *Conservation Biology* 1, 335-340.
- van Treuren, R., Bijlsma, R., van Delden, W., Ouborg, N.J., 1991. The significance of genetic erosion in the process of extinction. I. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. *Heredity* 66, 181-189.
- Weeden, N.F., Wendel, F., 1989. Genetics of plant isozymes. A Isozymes in Plant Biology, eds. D.E. Soltis, P.S. Soltis, pp. 46-72. Dioscorides Press, Portland.
- Wendel, F., Weeden, N.F., 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. A Isozymes in Plant Biology, eds. D.E. Soltis, P.S. Soltis PS, pp 5-45. Dioscorides Press, Portland.
- Wright, S., 1951. The genetic structure of populations. *Annals of Eurogenics* 15, 323-354.
- Wright, S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19, 395-420.
- WWF, 2002. El litoral mediterráneo: importancia, diagnóstico y conservación. Propuesta de WWF/Adena. Disponible a Internet: http://www.wwf.es/descarga/Litoral_02.pdf.
- Young A.G., Merriam, H.G., Warwick, S.I., 1993. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. *Heredity* 71, 277-289.
- Young, A., Boyle, T., Brown, T., 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11, 413-418.
- Young, A.G., Brown, A.H.D., Zich, F.A., 1999. Genetic Structure of Fragmented Populations of the Endangered Daisy *Rutidosia leptorrhynchoides*. *Conservation Biology* 13, 256-265.