

Josep A. Rosselló

Jardí Botànic

Departament de Biologia Vegetal. Universitat de València

La variació genètica és el substrat que possibilita el canvi evolutiu, i aquesta diversitat molecular és la que permet a les poblacions evolucionar en resposta als canvis ambientals, ja siguin les referències clàssiques a l'aparició de noves malalties, el descobriment de nous hostes per als paràsits, la diversificació de nous competidors o depredadors, o els lligats als esdeveniments de la societat industrialitzada com ara l'efecte hivernacle, la reducció de la capa d'ozó o altres resultats de la contaminació. La variabilitat genètica preexistent és crítica per al canvi evolutiu a curt termini ja que s'estima que la freqüència d'aparició de noves mutacions que siguin favorables és força baixa tret que les mides poblacionals siguin realment molt grans. La manca de variabilitat genètica per afrontar aquests canvis ambientals desfavorables ha estat considerada un dels factors més greus, si no més greu, que pot afectar aquelles espècies que viuen restringides en àrees petites i que presenten una mida poblacional excepcionalment reduïda. En conseqüència, conèixer quina és l'estructura genètica dels organismes amenaçats sembla fonamental per aplicar correctament directrius lligades a la conservació (Falk i Holsinger, 1991). La recent implantació del terme «genètica de la conservació» (que té una poc afortunada tendència a deslligar-se del més inclúsiu «biologia de la conservació») i la seva àmplia distribució i utilització reflecteixen el gran nombre de treballs que cada vegada més utilitzen els marcadors moleculars per esbrinar aspectes clau en conservació.

Tot i això, han tengut un ampli ressò els punts de vista oposats que dubten que la diversitat genètica tenguí realment un paper decisiu en la supervivència dels organismes (Lande, 1988; Schemske *et al.*, 1994). Així s'ha suggerit que els estudis ecològics i demogràfics haurien de constituir els objectius que caldria prioritzar per assolir dades decisives en la conservació de plantes rares i amenaçades. Amb independència de quina tasca d'investigació vulgui ser prioritzada (i entenguin *priorització* també en el sentit més prosaic de rebre preferències en el finançament públic de les tasques investigadores), la Unió Internacional per a la Conservació de la Natura (IUCN) ha reconegut que la diversitat genètica és un dels tres nivells de diversitat biològica que cal conservar. Sembla, doncs, fora de discussió que alguns dels principals objectius que s'han d'assolir dins la biologia de la conservació sense menyspreu d'altres aproximacions igualment valuoses són

conèixer: 1) quins són els nivells de variabilitat genètica que es troben als organismes rars i amenaçats, 2) com es troba estructurada aquesta reserva genètica en l'espai i al llarg del temps dins de les espècies, i 3) quines són les estratègies de mostreig més adients per assolir una òptima preservació *ex situ* de la diversitat genètica.

Alguns dels casos més rellevants que de tant en tant se solen incloure en les revisions usuals de la genètica de la conservació inclouen espècies extraeuropees. Qui amb sensibilitat conservacionista no ha rebut informació de les polèmiques (sovint un pèl massa tèrboles) sobre la categoria taxonòmica que hauria de tenir i quines són les directrius que s'haurien d'aplicar a l'emblemàtic llop roig d'Amèrica del Nord, *Canis rufus*? Pels voltants dels anys seixanta ja es pensava que aquest cànid podria extingir-se en poc temps a causa de la indiscriminada exterminació dels depredadors en general i de la destrucció dels hàbitats del llop roig. D'altra banda, se sospitava que el flux gènic existent entre aquesta espècie i els coiots també hauria de contribuir a l'esfumadura del genoma del llop roig i afavorir-ne l'extinció. El Servei Nord-Americà de Pesqueres i Vida Silvestre (USFWS) va decidir capturar els pocs exemplars de llop roig existents a fi d'establir un programa de cria en captivitat per a una eventual reintroducció. Només catorze animals varen ser capturats i, el 1980, l'USFWS va declarar *Canis rufus* com a espècie extinta a la natura. L'aplicació de diverses tècniques moleculars (ADN mitocondrial, microsatèl·lits) a l'estudi de les relacions dels cànids nord-americans ha permès concloure que el llop roig no és un vertebrat relict de qui ha minvat la distribució com a conseqüència de la implacable pressió humana. El que sabem és que el llop roig aparegué en l'arbre de la vida com a conseqüència de l'encreuament entre coiots (*C. latrans*) i llops grisos (*C. lupus*). La data en què es va produir aquesta hibridació ha estat recentment estimada utilitzant microsatèl·lits, els quals suggereixen que el flux gènic entre les espècies progenitores es va iniciar al llarg dels darrers dotze mil vuit-cents anys, i molt probablement no gaire més tard de fa dos mil cinc-cents anys.

Dins del món vegetal, dos exemples ens han il·lustrat sobre l'aparent dificultat de trobar correlacions entre la diversitat genètica i alguns paràmetres ecològics i demogràfics. Així, el pi roig d'Amèrica del Nord, *Pinus resinosa*, vicariant del pi roig europeu (*P. sylvestris*) ens mostra el paradigma d'una planta relativament estesa que presenta uns nivells extraordinàriament reduïts de polimorfisme genètic, característica més aviat lligada als organismes estenòcors. Ni els treballs que han emprat proteïnes enzimàtiques (que no han trobat cap polimorfisme) ni els altament variables marcadors RAPD han pogut documentar altra cosa que el fet que l'espècie es troba genèticament depauperada. Això sembla que es deu a repetits colls d'ampolla genètics (i poblacionals) que patí l'espècie fa uns vint-i-set milions d'anys, data assumida de la cladogènesi en què divergiren els dos pins roigs vicariants.

Un altre cas més ortodox, pel que fa a les prediccions teòriques, és l'estirp illenca *Lactoris fernandeziana*. Aquesta espècie és un relict evolutiu que pertany a la família de les lactoridaes, que compta amb un únic gènere i una única espècie, que sovint s'ha considerat com a integrant d'un sol ordre lactorida i del qual sobreviuen comptades poblacions dels boscos nebulosos de les illes de Juan Fernández a l'hemisferi sud (les també anomenades illes de Robinson Crusoe pels anglosaxons). Alguns aspectes importants relacionats amb *Lactoris*, a part de la seva raresa, són

els trencaclosques fitogeogràfics i evolutius que l'envolten. La seva morfologia floral (sis estams i tres carpels gairebé lliures, més aviat típics de monocotiledònies) suggereix que pertany a una antiga estirp. Tot i això, les illes de Juan Fernández, d'origen volcànic, tenen una edat estimada de quatre milions d'anys com a límit superior, la qual cosa no concorda amb l'edat que s'infereix (uns cent milions d'anys com a mínim a partir de la seva morfologia). Fa poc més d'una dotzena d'anys es varen reconèixer els característics grans de pol·len de *Lactoris* (tètrades) als sediments provinents de sondejos marins efectuats prop de les costes occidentals d'Àfrica. La troballa suggeria que *Lactoris* devia haver estat, durant un temps, més àmpliament difós a l'hemisferi sud, probablement quan els continents australs estaven units formant Gondwana. Al llarg dels anys, la família esdevingué més restringida pel que fa a la seva distribució i finalment arribà a les illes de Juan Fernández (o potser fóra millor dir en aquest cas de Robinson Crusoe?) dins els darrers quatre milions d'anys, on perviu testimonialment amb menys de cinc-cents individus coneguts. L'espècie és ginomonoica i protogina i no ofereix recompenses als pol·linitzadors; de fet, se sospita que és una espècie anemòfila, si bé és autocompatible. *Lactoris* forma part de la cinquantesena de plantes vasculares de què es coneix que no presenten polimorfisme enzimàtic. Tot i això s'han mesurat unes taxes baixes de diversitat gènica utilitzant tècniques de *fingerprinting* (RAPD) i de restricció de l'ADN ribosòmic nuclear. Aquestes dades, que impliquen una molt baixa diversitat genètica, suggereixen autopol·linització i impliquen una dispersió molt limitada del pol·len pel vent. Les dimensions reduïdes de l'illa on viu, la baixa mida poblacional i la disposició penjant de les flors han permès la pervivència d'un sistema reproductiu autògam (geitonògam) amb una gran producció de llavors, però amb una notable depauperació genètica. De fet, és factible que aquesta espècie presenti una certa depressió per autogàmia (*inbreeding depression*) pel que fa a la germinació de les llavors i al vigor de les plàntules, ja que *Lactoris* és molt difícil de conrear.

En aquesta xerrada intentarem esbrinar què és el que coneixem (i què és el que podem conèixer) sobre la diversitat genètica de les espècies rares i amenaçades utilitzant models d'un entorn biogeogràfic més proper: la Mediterrània occidental. A causa de les constriccions que ens imposa el temps de què disposam i de la competència de qui us parla en altres grups taxonòmics, ens centrarem en un grup d'organismes, les plantes vasculares, del qual es disposa de prou estudis acumulats arreu del món per tal de fer més profitoses les comparacions que se'n puguin establir. Malgrat que és un dels punts calents de biodiversitat i endemicitat de la zona temperada i que presenta un gran nombre d'espècies en risc d'extinció, relativament poc coneixen sobre el grau de diferenciació genètica present a les estirps mediterrànies les administracions encarregades de vetllar per la seva conservació i de dissenyar òptims plans de recuperació.

Quin grau de coneixença hem assolit?

De les estimades vint-i-quatre mil espècies de plantes nadiues que creixen a la Mediterrània, un 38 % (unes deu mil vuit-centes) són tàxons endèmics d'àrea molt reduïda. Malgrat que la taxa

d'extinció inferida (un 1,1 %) és de les més baixes entre les flors mediterrànies d'arreu del món, aproximadament unes quatre mil cinc-cents espècies (al voltant del 15 %) es troben amenaçades. En contrast, menys de cinquanta espècies han estat investigades per tal de conèixer-ne la diversitat genètica en el pla geogràfic o poblacional, i quaranta d'aquests tàxons corresponen a endemismes de la Mediterrània occidental. Les escrofulariàcies (6), asteràcies (6), fabàcies (5), plumbaginàcies (5) i poàcies (5) són els grups taxonòmics estudiats més ben representats i contrasten amb l'escassa informació que es disposa de les llabiades, les brassicàcies o els pteridòfits endèmics, per anomenar alguns dels grups que més han *especiat* a la regió que ens ocupa. Disposem de dades genètiques per a plantes que es troben extingides en estat natural (*Lysimachia minoricensis*), per a endemismes coneguts de molt poques localitats (*Centaurea maculosa*) fins a plantes més àmpliament difoses (*Marsilea strigosa*), per a plantes anuals (*Silene diclinis*) i per a perennes de cicle de vida llarg (*Quercus ilex*) i per a espècies amb reproducció apomíctica (*Limonium sp. pl.*) i sexual (*Cyclamen sp. pl.*). Sembla que no hi ha cap característica biològica que lligui el que coneixem d'aquestes espècies llevat de la seva raresa i/o del grau d'amenaça que pateixen. Tot i que la major part d'aquest coneixement de la diversitat genètica d'aquests endemismes ha estat adquirit en la darrera dècada, cal destacar que la tècnica experimental majoritàriament emprada és l'electroforesi d'isoenzims. De fet, l'estudi molecular de vint-i-nou de les quaranta espècies (72,5 %) ha estat realitzat amb un sol tipus de tècniques analítiques, de les quals vint-i-una (52,5 %) corresponen a dades isoenzimàtiques. Per concloure, sols nou espècies han estat analitzades amb més d'una eina molecular i, per sorprenent que pugui semblar en una etapa marcada per la facilitat per obtenir dades genòmiques, sols tenim constància en cinc d'aquestes d'alguna seqüència de l'ADN nuclear (separadors transcrits de l'ADN ribosomal) i cloroplàstic (introns i separadors no transcrits) obtinguda per resoldre aspectes relacionats amb la diferenciació poblacional.

Aquesta perseverança per obtenir dades sobre l'estructura genètica dels organismes rars utilitzant aproximacions moleculars indirectes, com són les proteïnes que no permeten reconèixer amb certesa quina és la causa responsable del canvi genètic, sembla certament digna de comentar. I més quan molts dels coneixements que tenim sobre la diversitat genètica dels éssers vius es basen en dades obtingudes a partir dels isoenzims. Ja fa més de trenta anys dels treballs pioners de Harris, Lewontin i Hubby que posaren de manifest que el genotip dels éssers vius (utilitzant *Drosophila* i l'espècie humana) podria ser inferit a partir de la diferent mobilitat de les bandes obtingudes als gels de midó sota la influència d'un camp elèctric i tenyides amb substrats i cofactors enzimàtics específics. La popularitat guanyada per aquesta tècnica, deguda fonamentalment a la seva senzillesa i rapidesa i al seu baix cost, no ha pogut obviar algunes qüestions fonamentals: 1) presenta un relatiu baix nivell de resolució ja que detecta una mínima part de la variabilitat genètica present als organismes (sols aquella que impliqui un canvi en la càrrega elèctrica neta de la proteïna; 2) les diferències en els patrons electroforètics poden ser degudes a diferències no en les seqüències codificants de l'ADN, sinó en la modificació posttranscripcional de les proteïnes; 3) la diferent selecció dels enzims que s'utilitzen en les anàlisis electroforètiques pot esbiaixar els descriptors regularment utilitzats com a mesures de la diversitat genètica.

Un dels casos que permet il·lustrar aquest aspecte ens el proporciona l'estudi isoenzimàtic d'un endemisme ibèric d'àrea extremament restringida, *Antirrhinum microphyllum*. Aquesta és una espècie rupícola que viu a quatre localitats properes a la delimitació de les províncies de Conca i Guadalajara. L'any passat, dos equips independents estudiaren la diversitat genètica present a l'espècie utilitzant l'electroforesi d'isoenzims resolts en gels de midó. Tres de les quatre poblacions utilitzades per ambdós grups foren les mateixes. Únicament la selecció dels sistemes enzimàtics assajats fou diferent (AAT, ACO, IDH, 6PGD, PGI, PGM, SKD i TPI en un equip; ADH, AAT, CAT, DDH, PGM, GPI, IDH, PGD, LAP, PER i SOD en l'altre). Els resultats obtinguts ens mostren conclusions contradictòries pel que fa a les directrius conservacionistes que caldria extreure'n. Així, la major diversitat genètica estimada pel nombre de loci polimòrfics (P), la riquesa al·lèlica (A) i l'heterozigositat esperada (He) correspon a la localitat de Buendía segons el primer grup d'investigadors. Probablement aquesta població no seria recomanada per a una prioritització en la conservació pels components del segon equip, ja que es correspon exactament a la que presenta els descriptors de diversitat genètica més baixos.

	P		A		He	
Bolarque	46,2	83,3	2,1	2,5	0,202	0,146
Buendía	46,2	83,3	2,2	2,5	0,216	0,358
Entrepeñas	38,5	83,3	1,9	2,8	0,188	0,470

A més, l'estima del flux gènic entre les poblacions, calculat a partir del nombre de migrants per generació, va d'1,7 a 9,4 depenent del treball considerat. Si prenem el darrer valor, aquest flux és suficient per contrarestar l'efecte de la deriva genètica, en tant que, si fem cas de l'estima més baixa, no podem excloure que la diferenciació entre les poblacions pugui ser deguda a la deriva genètica.

Com poden explicar-se aquestes discrepàncies? Aquests resultats probablement posen de manifest que les diferents proteïnes enzimàtiques mostren desiguals nivells mitjans d'heterozigositat. Nombrosos estudis han intentat relacionar aquesta variació amb propietats estructurals o catalítiques dels enzims, com per exemple el nombre de subunitats, el pes molecular de la subunitat, el tipus de substrat sobre el qual actua, i la funció reguladora. A més, es va provar la hipòtesi que els isoenzims mitocondrials són menys variables que les corresponents formes citoplasmàtiques. L'heterozigositat mitjana analitzada en quatre sistemes enzimàtics amb formes citosòliques i mitocondrials a vertebrats posà de manifest una diferència considerable en aquest descriptor genètic, amb la qual cosa es confirmava que els isoenzims organulars presentaven un 50 % menys d'heterozigositat que els observats per als isoenzims citoplasmàtics. Manquen dades per afirmar si passa el mateix amb els isoenzims cloroplàstics. Si fos així, un dels aspectes que no ha fet sang en la genètica de la conservació, com és la manca de criteris per a l'elecció dels isoenzims que cal assajar a l'hora d'establir la diversitat genètica dels individus, hauria de ser reconsiderat. Aquest no és un aspecte menor en conservació. Gràcies a les regulars recopilacions efec-

tuades per Hamrick i el seus col·laboradors sobre els estudis de diversitat genètica a les plantes vasculares s'han trobat algunes correlacions significatives entre els nivells de variabilitat gènica i alguns paràmetres taxonòmics, biològics i ecològics. Això ha conduït a establir una sèrie de prediccions que poden permetre inferir quins poden ser els nivells esperables de variabilitat genètica en espècies de les quals es coneix el cycle vital, el sistema reproductiu, el tipus de reproducció, el mecanisme de pol·linització, el tipus de dispersió de llavors o fruits, el rang geogràfic, així com la mida, densitat i estructura espacial de les poblacions. Clarament, aquestes associacions entre les característiques dels organismes i la diversitat genètica en el pla específic i poblacional poden tenir conseqüències d'utilitat per a la biologia de la conservació, ja que poden permetre desenvolupar estratègies bàsiques per a la conservació de la diversitat genètica.

Si es té present, a més, que la variació genètica està relacionada amb la mida poblacional, es preveu que dins de les espècies la diversitat genètica estarà positivament correlacionada amb els efectius poblacionals; que les espècies d'àrea restringida tendran menys diversitat que aquelles més àmpliament distribuïdes; que les poblacions insulars amb reproducció sexual tendran com a mitjana menys variabilitat que les poblacions continentals, i que els endemismes que viuen a les illes tenen una reducció en la reserva (*pool*) gènica en comparança amb els congèneres no endèmics que viuen als continents. Així, les espècies endèmiques tenen un nombre significativament menor de loci polimòrfics, menor nombre d'al·lels per locus polimòrfic i menor diversitat genètica intrapoblacional que les espècies més àmpliament difoses. Tot i això, no hi ha dubte que aquestes generalitzacions estan subjectes a error, ja que les anàlisis de Hamrick i col·laboradors no permeten explicar més enllà d'un 50 % de l'heterogeneïtat en la diversitat genètica interespecífica. Sense el coneixement de la història evolutiva de cada espècie en particular qualsevol predicció estarà subjecta a error. A continuació analitzarem alguns casos concrets d'endemismes de la Mediterrània occidental que posen de manifest aquestes dificultats:

—*Cyclamen balearicum*. Poblacions restringides al sud de França i a les Balears. Les poblacions insulars presenten menys variabilitat que les continentals pel que fa a tres descriptors genètics. Però les mides poblacionals de les poblacions insulars són molt més grans que les de França.

—*Limonium dufourii*. Espècie de reproducció apomíctica que malviu a quatre poblacions costaneres del litoral mediterrani. Presenta reproducció apomíctica, pol·len majoritàriament avortat, un nombre senar de cromosomes ($2n = 27$) i un sol tipus de combinació pol·len/estigma (autoincompatible). Marcadors RAPD i AFLP han posat de manifest una notable diversitat intrapoblacional en una localitat. Les dades són excepcionals ja que contrasten amb altres resultats obtinguts en altres espècies.

—*Armeria villosa* subsp. *longiaristata*. Endemisme ibèric que presenta un mecanisme d'autoincompatibilitat heteromòrfica i una àrea prou reduïda. Les anàlisis filogenètiques posen de manifest una aparent polifília de l'espècie causada per un flux gènic interespecífic intensiu, la qual cosa fa que el tàxon presenti una notable diversitat genètica i actuï com una vertadera compilo-espècie.

Quines directrius hem d'aplicar per preservar el màxim de variabilitat genètica?

Molt pocs són els treballs en què, un cop analitzada la diversitat genètica d'espècies rares o amenaçades, es presenten recomanacions concretes per a una òptima conservació *ex situ* d'aquesta. En aquells casos en què sí que ho fan hi ha una disparitat de criteris notable. En concret, s'ha proposat que s'ha de donar prioritat a la gestió de la conservació a aquelles poblacions dins de l'espècie que presentin els valors més baixos de diversitat genètica (*Digitalis minor*). En contrast amb això, altres autors suggereixen la prospecció d'aquelles poblacions que continguin el màxim de diversitat, estimada pel major nombre d'al·lels i per la taxa més elevada d'heterozigositat. Finalment, s'ha suggerit que simultàniament a l'establiment de programes de conservació per a les espècies rares s'hauria d'incloure una mostra gran de poblacions de tàxons relacionats que presentin diferents hàbitats i distribucions geogràfiques. Cap d'aquestes propostes no considera un enfocament filogenètic d'allò que hauria d'ésser conservat. Conservar riquesa al·lèlica sense conèixer quina d'aquesta diversitat correspon a estats de caràcters derivats (o apomòrfics) i quina pertany als estats de caràcters primitius (o plesiomòrfics) pot dur a errònies estratègies de mostreig en què siguin prioritzades poblacions que presentin un major nombre de caràcters primitius en absència de comparances filogenètiques. L'aplicació de conceptes com unitats de gestió (MU: grups de poblacions que difereixen en freqüències al·lèliques) i unitats singulars evolutives (ESU: grups de poblacions derivades de diferent avantpassats comuns) poden tenir una gran aplicabilitat dins del món vegetal.

Referències bibliogràfiques

- AFFRE, L.; THOMPSON, J. D. (1997). «Variation in the population genetic structure of two *Cyclamen* species on the island of Corsica». *Heredity*, núm. 78, p. 205-214.
- AFFRE, L.; THOMPSON, J. D.; DEBUSSCHE, M. (1997). «Genetic structure and island populations of the Mediterranean endemic *Cyclamen balearicum* (Primulaceae)». *American Journal of Botany*, núm. 84, p. 437-451.
- AINOUCHE, M.; MISSET, M. T.; HUON, A. (1995). «Genetic diversity in Mediterranean diploid and tetraploid *Bromus* L. (section *Bromus* Sm.) populations». *Genome*, núm. 38, p. 879-888.
- AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. (1996). *Conservation genetics: Case histories from nature*. Nova York: Chapman & Hall.
- BONNIN, I.; HUGUET, T.; GHERARDI, M.; PROSPERI, J. M.; OLIVIERI, I. (1996). «High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers». *American Journal of Botany*, núm. 83, p. 843-855.
- BOSCH, M.; SIMON, J.; MOLERO, J.; BLANCHÉ, C. (1998). «Reproductive biology, genetic variation and conservation of the rare endemic diploid *Delphinium bolosii* (Ranunculaceae)». *Biological Conservation*, núm. 86, p. 57-66.

- CALERO, C.; IBÁÑEZ, O.; MAYOL, M.; ROSSELLÓ, J. A. (1999). «Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers detect a single phenotype in *Lysimachia minoricensis* J. J. Rodr. (Primulaceae), a wild extinct plant». *Molecular Ecology*, núm. 8, p. 2133-2136.
- CAUJAPÉ-CASTELLS, J.; PEDROLA-MONFORT, J. (1997). «Space-time patterns of genetic structure within a stand of *Androcymbium gramineum* (Cav.) McBride (Colchicaceae)». *Heredity*, núm. 79, p. 341-349.
- COLAS, B.; OLIVIERI, I.; RIBA, M. (1997). «*Centaurea corymbosa*, a cliff-dwelling species tottering on the brink of extinction: a demographic and genetic study». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, núm. 94, p. 3471-3476.
- COMES, H. P.; ABBOT, R. J. (1998). «The relative importance of historical events and gene flow on the population structure of a Mediterranean ragwort, *Senecio gallicus*». *Evolution*, núm. 52, p. 355-367.
- (2000). «Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and quantitative trait analyses across a major phylogeographic break in the Mediterranean ragwort *Senecio gallicus* Vill. (Asteraceae)». *Molecular Ecology*, núm. 9, p. 61-76.
- COSTICH, D. E.; MEAGHER, T. R. (1992). «Genetic variation in *Ecballium elterium* (Cucurbitaceae): breeding system and geographic distribution». *Journal of Evolutionary Biology*, núm. 5, p. 589-601.
- EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. (1996a). «High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco». *Theoretical and Applied Genetics*, núm. 92, p. 832-839.
- (1996b). «Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco». *Molecular Ecology*, núm. 5, p. 547-555.
- FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. (1991). *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford: Oxford University Press.
- FRÉVILLE, H.; COLAS, B.; RONFORT, J.; RIBA, M.; OLIVIERI, I. (1998). «Predicting endemism from population structure of a widespread species: case study in *Centaurea maculosa* Lam. (Asteraceae)». *Conservation Biology*, núm. 12, p. 1269-1278.
- GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; MONTOLÍO, A. (2000). «Genetic differentiation and structure of *Hippocrepis valentina* (Leguminosae) populations». *The Journal of Heredity*, núm. 91, p. 134-141.
- HURTREZ-BOUSSÈS, S. (1996). «Genetic differentiation among natural populations of the rare Corsican endemic *Brassica insularis* Moris: implications for conservation guidelines». *Biological Conservation*, núm. 76, p. 25-30.
- IBÁÑEZ, O.; CALERO, C.; MAYOL, M.; ROSSELLÓ, J. A. (1999). «Isozyme uniformity in a wild extinct insular plant, *Lysimachia minoricensis* J. J. Rodr. (Primulaceae)». *Molecular Ecology*, núm. 8, p. 813-819.
- LANDE, R. (1988). «Genetic and demography in biological conservation». *Science*, núm. 241, p. 1455-1460.

- MARTÍN, C.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; IRIONDO, J. M. (1997). «Genetic diversity within and among populations of a threatened species: *Erodium paularense* Fern. Gonz. & Izco». *Molecular Ecology*, núm. 6, p. 813-820.
- MATEU-ANDRÉS, I. (1999). «Allozymic variation and divergence in three species of *Antirrhinum* L. (Scrophulariaceae-Antirrhinae)». *Botanical Journal of the Linnean Society*, núm. 131, p. 187-199.
- MAYOL, M.; ROSSELLÓ, J. A. (2000). «Isozyme and RAPD variation in *Silene pardoii*. [Presentat a *Molecular Ecology*]
- MICHAUD, H.; TOUMI, L.; LUMARET, R.; LI, T. X.; ROMANE, F.; DI GUISTO, F. (1995). «Effect of geographical discontinuity on genetic variation in *Quercus ilex* L. (holm oak): evidence from enzyme polymorphism». *Heredity*, núm. 74, p. 590-606.
- NEBAUER, S. G.; CASTILLO-AGUDO, L.; SEGURA, J. (1999). «RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.)». *Theoretical and Applied Genetics*, núm. 98, p. 985-994.
- PALACIOS, C.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F. (1997a). «Lack of genetic variability in the rare and endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae) using RAPD markers». *Molecular Ecology*, núm. 6, p. 671-675.
- (1997b). «Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae)». *Molecular Ecology*, núm. 6, p. 1107-1121.
- (2000). «AFLP analysis of the critically endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae)». *The Journal of Heredity*, núm. 90, p. 485-489.
- PALACIOS, C.; KRESOVICH, S.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F. (1999). «A population genetic study of the endangered plant species *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP)». *Molecular Ecology*, núm. 8, p. 645-657.
- PALACIOS, C.; ROSSELLÓ, J. A.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F. (2000). «Study of the evolutionary relationships among *Limonium* species (Plumbaginaceae) using nuclear and cytoplasmic molecular markers». *Molecular Phylogenetics and Evolution*, núm. 14, p. 232-249.
- PEDROLA-MONFORT, J.; CAUJAPÉ-CASTELLS, J. (1994). «Allozymic and morphological relationships among *Androcymbium gramineum*, *A. europaeum*, and *A. psammophillum* (Colchicaceae)». *Plant Systematics and Evolution*, núm. 191, p. 111-126.
- PEDROLA-MONFORT, J.; CAUJAPÉ-CASTELLS, J. (1995). «Genetic structure and spatial distribution of a narrow endemic plant: *Androcymbium europaeum* (Lange) K. Richter (Colchicaceae)». *Botánica Macaronésica*, núm. 21, p. 85-94.
- PEDROLA-MONFORT, J.; CAUJAPÉ-CASTELLS, J. (1996). «Allozyme diversity and morphological variation in the *Androcymbium gramineum* complex (Colchicaceae)». *Plant Systematics and Evolution*, núm. 201, p. 149-162.
- PRENTICE, H. C. (1984). «Enzyme polymorphism, morphometric variation and population structure in a restricted endemic, *Silene diclinis* (Caryophyllaceae)». *Biological Journal of the Linnean Society*, núm. 22, p. 125-143.

- REICH, D. E.; WAYNE, R. K.; GOLDSTEIN, D. B. (1999). «Genetic evidence for a recent origin by hybridization of red wolves». *Molecular Ecology*, núm. 8, p. 139-144.
- ROY, M. S.; GEFFEN, E.; SMITH, D.; OSTRANDER, E. A.; WAYNE, R. K. (1994). «Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci». *Molecular Biology and Evolution*, núm. 11, p. 553-570.
- SALES, E.; NEBAUER, S. G.; MUS, M.; SEGURA, J. (2000). «Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* using RAPD markers». [Presentat a *Molecular Ecology*]
- SCHEMSKE, D. W.; HUSBAND, B. C.; RUCKELSHAUS, M. H.; GOODWILLIE, C.; PARKER, I. M.; BISHOP, J. G. (1994). «Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants». *Ecology*, núm. 75, p. 584-606.
- TARAYRE, M.; THOMPSON, J. D. (1997). «The population genetic structure of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France». *Journal of Evolutionary Biology*, núm. 10, p. 157-174.
- TARAYRE, M.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; CUGUEN, J.; COUVET, D.; THOMPSON, J. D. (1997). «The spatial genetic structure of cytoplasmic (cpDNA) and nuclear (allozyme) markers within and among populations of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France». *American Journal of Botany*, núm. 84, p. 1675-1684.
- THOMPSON, J. D. (1999). «Population differentiation in mediterranean plants: insights into colonization history and the evolution and conservation of endemic species». *Heredity*, núm. 82, p. 229-236.
- TORRES, M. E. (1999). *Estudios de autoecología, biología reproductiva y estructura genética de Antirrhinum microphyllum Rothm. (Scrophulariaceae). Evaluación de su estado de conservación*. [Madrid:] Universidad Politécnica de Madrid. [Tesi doctoral]
- TROIA, A.; CONTE, L.; CRISTOFOLINI, G. (1997). «Isolation and biodiversity in *Cytisus villosus* Pourret (Fabaceae, Genisteae): enzyme polymorphism in disjunct populations». *Plant Biosystems*, núm. 131, p. 93-101.
- VILA, C.; AMORIM, I. R.; LEONARD, J. A.; POSADA, D.; CASTROVIEJO, J.; PETRUCCI-FONSECA, F.; CRANDALL, K. A.; ELLEGREN, H.; WAYNE, R. K. (1999). «Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*». *Molecular Ecology*, núm. 8, p. 2089-2103.
- VITALIS, R.; COLAS, B.; RIBA, M.; OLIVIERI, I. (1998). «*Marsilea strigosa* Willd.: statut génétique et démographique d'une espèce menacée». *Ecologia Mediterranea*, núm. 24, p. 145-157.