Identificació molecular, amb tècniques d'ADN, de la població de *Limonium majoricum* present al Molí d'en Regalat

desembre de 2004

Miquel À. Conesa [1]

Josep A. Rosselló [2*]

[1] Laboratori de Botànica, Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears, carretera de Valldemossa km 7,5, 07122 Palma de Mallorca, Illes Balears

[2] Jardí Botànic, Universitat de València, C/Quart 80, 46008 València

* Autor de contacte: rossello@uv.es. Telèfon: 96-3156800. Fax: 96-3156826.

Índex

pàgina

1. Introducció 2
2. Característiques biològiques i taxonòmiques dels *Limonium* illencs de la conca Mediterrània 3
   - Diversitat taxonòmica i fitogeogràfica
   - Dades cariològiques
   - Sistema reproductiu
3. Antecedents 11
4. Objectius 16
5. Marcadors moleculars: generalitats 17
   - Marcadors cloroplàstics
   - Marcadors nuclears
6. Material i Mètodes 26
   - Mostreig de *L. majoricum*, *L. gymnesicum* i altres espècies
   - Extracció de l'ADN
   - Amplificacions dels microsatèl·lits cloroplàstics (cpSSR)
   - Electroforesis de les mostres dels cpSSR
   - Amplificació per PCR dels locus ISSR
   - Electroforesis de les mostres dels ISSR
   - Codificació dels resultats
7. Resultats 33
   - Microsatèl·lits cloroplàstics (cpSSR)
   - Marcadors nuclears: ISSR
8. Conclusions i propostes d'actuació 41
9. Referències bibliogràfiques 49

– **Annex de fotografies** (© de les fotografies: els autors) 54

1. Introducció

Fruit d'una assistència tècnica contractada per la Conselleria de Medi Ambient del Govern de les Illes Balears, s'ha avaluat la singularitat molecular de *Limonium majoricum* Pignatti (Plumbaginaceae) suposat endemisme balear restringit a un indret de la costa nord est de Mallorca (Molí d'en Regalat, Artà) i espècie inclosa al Catàleg Nacional d'Espècies Vegetals Amenaçades (1990).

En concret, s'han dut a terme les següents actuacions:

1. Mostreig no destructiu d'una mostra representativa de l'única població viva atribuida a *L. majoricum* i situada al Molí d'en Regalat. El mostreig s'ha realitzat sobre individus prèviament cartografiats pels companys del Jardí Botànic de Sóller, a fi de tenir marcats els individus analitzats.

2. Mostreig no destructiu de cinc poblacions de *L. gymnesicum* Erben, endemisme mallorquí i espècie més propera morfologicament a *L. majoricum* i de la que és extremadament dificultosa la seva separació.

3. Mostreig no destructiu de poblacions de *L. minutum* (L.) Chaz. i *L. virgatum* (Willd.) Fourr., espècies amb les que conviuen *L. majoricum* i *L. gymnesicum* i que s'han pres com a referència per a la interpretació dels resultats genètics obtinguts.

4. Genotipat molecular, amb tècniques d'ADN, de totes les anteriors poblacions utilitzant marcadors nuclears i cloroplàstics.

5. Integració de les dades moleculars amb les basades amb la morfologia, fitodermologia i el sistema reproductor.

6. Propostes d'actuació sobre la conservació de la població.

2. Característiques biològiques i taxonòmiques dels *Limonium* illencs de la conca Mediterrània

La conca Mediterrània es un àrea d'extrema complexitat paleobiogeogràfica i comprèn milers d'illes de diferent edat, àrea i grau d'aïllament. Això permet un escenari extraordinari per a estudiar els patrons de especiació vegetal que no solen ocórrer a les illes oceàniques. Les revisions sobre els aspectes generals dels endemismes illencs de la Mediterrània s'han centrat típicament sobre els tàxons d'angiospermes amb reproducció sexual (Cardona & Contandriopoulos 1977). Per contra, es coneix ben poc al respecte dels aspectes més bàsics sobre la taxonomia, fitogeografia, i aspectes evolutius que presenten bona part dels endemismes agamospèrmics (o apomíctics, es a dir sense reproducció sexual) a les illes. Un dels gèneres més diversificats i rics en espècies descrites es *Limonium*, amb més d'un centenar d'estirps (sexual i apomíctiques) citades a les illes, les quals juguen un paper molt important en la composició i dinàmica dels ecosistemes litorals (roquissars i salobrars) de la conca Mediterrània.

Diversitat taxonòmica i fitogeografia

Les illes són les unitats biogeogràfiques amb el nombre més alt d'indicacions d'espècies de *Limonium* presents a la Mediterrànea. Així, més del 50% de la diversitat total citada del gènere a n'aquesta àrea es troba restringida a territoris insulars. Els arxipèlags situats a la part occidental i central de la conca (Balears, Còrsega, Sardenya, Sicília i altres illes petites) presenten més espècies de *Limonium* que aquells situats a l'est, a on el catàleg de *Limonium* d'illes relativament grans com Creta o Xipre no arriba a les 20 espècies. Tot i això, les illes i illots de la Mediterrània no són sols singulars per la seva riquesa específica, ans també per la distribució força restringida de bona part de les espècies de *Limonium* que viuen

a les seves costes. Per exemple, més de 15 espècies [*L. parvifolium* (Tineo) Pignatti, *L. planesiae* Pignatti, *L. savianum* Pignatti, *L. gorgonae* Pignattii, *L. dianium* Pignatti, *L. tenuiculum* (Tineo) Pignatti, *L. albidum* (Guss.) Pignatti, *L. intermedium* (Guss.) Brullo, i *L. aegusae* Brullo a la Mediterranea occidental, i *L. zacynthium* Artelari, *L. pithosianum* Artelari, *L. arcuatum* Artelari, *L. cephalonicum* Artelari, *L. antipaxorum* Artelari, i *L. damboldtianum* Phitos & Artelari a la costa oriental] creixen en petites illes i illots d'àrea molt reduïda.

Típicament, altes taxes d'endemicitat caracteritzen la flora de *Limonium* de bona part de les illes mediterrànies. Els endemismes illencs van dels valors més baixos de Xipre (25%) fins als dels arxipèlags occidentals més diversificats com les Balears o Còrsega-Sardenya (81.1-86.5%). De fet, són molt poques les espècies que es troben presents a dos o més arxipèlags. Sols unes poques espècies d'ample distribució com *Limonium avei* (De Not.) Brullo & Erben, *L. echioides* (L.) Mill., *L. narbonense* Mill., *L. sinuatum* (L.) Mill., i *L. virgatum* (Willd.) Fourr. es troben a la major part de les illes mediterrànies més grans.

L'altre component illenc, però no endèmic, sols estar geogràficament restringit a petites regions del continent europeu com la península Ibèrica [*L. cossonianum* Kuntze, *L. gibertii* (Sennen) Sennen]; sud de França [*L. companyonis* (Gren. & Billot) Kuntze]; la península italiana [*L. panormitanum* (Tod.) Pignatti]; Anatolia [*L. effusum* (Boiss.) Kuntze, *L. gmelinii* (Willd.) Kuntze, *L. meyeri* (Boiss.) Kuntze], la península balcànica [*L. brevipetiolatum* Artelari & Erben, *L. frederici* (W. Barbey) Rech. fil., *L. graecum* (Poir.) Rech. fil., *L. hyssopifolium* (Girard) Rech. fil., *L. ocymifolium* (Poir.) Kuntze, *L. pigadiense* (Rech. fil.) Rech. fil., *L. sieberi* (Boiss.) Kuntze]. Amb l'única excepció de *L. zembrae* Pignatii, que es troba present a la petita illa de Zembra (situada a 15 km de la costa Africana) i Tunissia, no hi ha cap altre espècie que visqui exclusivament a les illes mediterrànies i el continent africà.

Dins el gènere *Limonium*, la major diversificació a la Mediterrània correspon a la secció *Limonium*, que és l'única que presenta endemismes illencs. Prop del 98% de tota la flora illenca de *Limonium* pertany a aquesta secció. *Pteroclados*, *Myriolepis*, *Ctenostachys*, *Pruinosa*, *Hyalolepidae*, *Siphonanta* i *Schizhymenium*, que són les altres seccions del gènere present a la Mediterrània, no s'han diversificat en els ecosistemes insulars, i bona part d'elles no es troben sols presents a illes.

Dades cariològiques

Les espècies mediterrànies de *Limonium* que pertanyen a les seccions *Pteroclados* i *Myriolepis* son diploids, mentre que dins la secció *Schizhymenium* es troba un diploid força distribuït (*L. echioides*) i una espècie triploid força emparentada (*L. avei*). En contrast, la secció *Limonium* mostra una diversitat citogenètica força destacada, que inclou des de espècies diploids fins a hexaploids. Tot i això, les dades citogenètiques a l'abast dels *Limonium* illencs que pertanyen a la secció *Limonium* no són exhaustives i sols d'un nombre moderat d'espècies (72%) es disposa del nombre cromosòmic.

Tot i això, les illes de la Mediterrània occidental mostren un més que acceptable coneixement cariològic de la seva flora de *Limonium*, amb més d'un 50% d'espècies contades (Balears: 79.6%; Còrsega-Sardenya: 60%). Fins i tot, l'exhaustiva recerca cariològica feta a l'arxipèlag de Sicília (Brullo & Petrone 1981; Brullo 1988) proporciona dades cromosòmiques per pràcticament totes les espècies (33 de 34). Aquest panorama és clarament diferent a les illes orientals, a on les dades cromosòmiques no són conegudes per moltes espècies (sols entre el 28.6% i el 41.6% de les espècies illenques).

Dins de la secció *Limonium* les espècies diploids (**2n=16**, **2n=18**) presenten dos nombres cromosòmics bàsics (x=8 i x=9). Es creu que les espècies poliploids

s'han originat per entrecreuaments interespecífics a partir d'espècies progenitores que presenten genomes x=8 i x=9 (Erben 1978, 1979). Les espècies poliploids de *Limonium* poden ser triploids [**2n=24** (8+8+8), **2n=25** (9+8+8), **2n=26** (8+9+9), **2n=27** (9+9+9)], tetraploids [**2n=32** (8+8+8+8), **2n=34** (8+8+9+9), **2n=35** (8+9+9+9), **2n=36** (9+9+9+9)], pentaploids [**2n=43** (8+8+9+9+9)], i hexaploids [**2n=51** (8+8+8+9+9+9), **2n=54** (9+9+9+9+9+9)]. Fins ara no s'han detectat cromosomes accessoris (B) a les espècies diploids i pràcticament tots els tàxons estudiats s'han caracteritzat per un sol nombre cromosòmic.

En contrast, evidències contradictòries s'han citat per algunes espècies poliploids que viuen a la Mediterrània. Alguns autors han trobat diferent nombres cromosòmics no sols dins de la mateixa espècie, ans fins i tot dins de la mateixa població o, fins i tot, en el mateix individu (Dolcher & Pignatti 1967, 1971; Arrigoni & Diana 1993; Rosselló et al. 1998; Sáez et al. 1998). Una situació extraordinàriament inusual ha estat detectada a l'endemisme cors *L. bonifaciense* Arrigoni & Diana. Gairebé 50 llavors recollides al camp provinents de 18 individus es posaren a germinar i s'estudiaren citogenèticament. En sols 46.9% de les plàntules es va determinar un sols nombre cromosòmic, fos 2n=27 (34.7%), 2n=36 (10.2%) o 2n=18 (2%). Als altres individus, es va detectar mixoploïdia i es trobaren diverses plantes que combinaven els següents nombres cromosòmics 2n=9, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 32 i 36 (Diana 1995).

L'aneuploïdia s'ha també detectat a *L. carvalhoi* Rosselló & L. Sáez, un endemisme de Balears que creix a un salobrar del sudoest de Mallorca. Els nombres cromosòmics 2n=24, 2n=25 i 2n=26 s'han trobat a plàntules de *L. carvalhoi*. El nombre 2n=25 es va detectar a totes les plantes examinades i va ser, amb diferència, el nombre cromosòmic més freqüent (70.3% de les cèl·lules). En contrast, tres dels nou individus presentaren 2n=24 (21.6% de les cèl·lules) i el citòtip amb 2n=26 es va detectar a una sola planta (2.7%). La mixoploïdia es va trobar a un terç de les plàntules estudiades i a partir de la morfologia dels

cromosomes es va suggerí que el nombre cromosòmic original era de 2n=26, essent els altres nombres derivats per aneuploïdia descendent (Rosselló et al. 1998).

Per contra, aquesta variabilitat intraespecífica no s'ha indicat a la majoria d'espècies mediterrànies triploids i tetraploids (Erben 1978, 1979, 1988; Brullo & Pavone 1981; Artelari 1989 a,b,c, 1992) i cada espècie ha estat caracteritzada per un sols nombre cromosòmic. Tot i això, hi ha algunes contradiccions en els recomptes cromosòmics d'algunes espècies de Balears que presenten una distribució força restringida [*L. balearicum*, 2n=18 i 2n=27, Erben 1988, 1993; *L. caprariense* 2n=18 i 2n=27, Erben 1988, 1989; *L. marisolii* 2n=25 i 2n=27, Erben 1988, 1993) que poden ser indicadores que els polimorfismes cromosòmics en les espècies poliploids de *Limonium* poden trobar-se més distribuïdes del que s'havia cregut prèviament. No és descartable assumir, doncs, que alguns dels nombres cromosòmics anòmals trobats poden simplement haver estat rebutjats pels mateixos investigadors en la creença de que representaven artefactes tècnics.

Similars polimorfismes cromosòmics s'han ressenyat també a algunes espècies de *Limonium* de les illes Britàniques (Ingrouille & Stace 1985; Dawson 1990). Tot i això, es varen adduir raons tècniques per explicar la troballa de vuit citòtips a poblacions de *L. humile* Mill. de Gran Bretanya (2n=36, 38, 48, 49, 50, 51, 52, 54). L'excessiva pressió durant el *squash*, la mescla del contingut nuclear de dues cèl·lules contigües i la petita mida dels cromosomes es varen proposar com a raons plausibles per explicar aquesta variabilitat cromosòmica. Aquestes raons tècniques, adduïdes per Dawson (1990), semblen massa inversemblants per explicar la magnitud de la variabilitat citològica present a algunes espècies apomíctiques illenques.

La distribució dels citòtips a espècies illenques de *Limonium* (secció *Limonium*) no és a l'atzar i es troba relacionada d'alguna manera amb la localització geogràfica de les illes. Els tàxons diploids es troben moderadament representats a les illes mediterrànies, amb valors semblants (6 espècies) en cada un dels arxipèlags més grans de les conques orientals i occidentals. Amb l'excepció de *L. cossonianum* (present a les illes Balears a Formentera), totes les altres espècies diploids presenten el citòtip 2n=18. Entre els tàxons poliploids, els triploids són amb diferència el més freqüents i, entre ells, les espècies amb 2n=27 predominen. La diversitat citogenètica és particularment destacable a Balears amb elements amb 2n=24, 25, 26 i 27 són coneguts. Els tres primers nombres cromosòmics es troben absents a les altres illes mediterrànies, a on sols són coneguts els triploids amb el nombre de cromosomes bàsic x=9. El citòtip 2n=24 es prou rar al gènere i és conegut de l'apomíctic formenterenc *L. wiedmanii* Erben.

Els citòtips tetraploids no són rars a les illes en conjunt, i igualen en nombre d'espècies als diploids, però la seva contribució dins de les flores illenques particulars és marginal. La única excepció es l'arxipèlag de Sicília a on es concentren més del 60% dels tetraploids insulars coneguts. Espècies amb els nivells d'euploidia més gran (pentaploids i hexaploids) estan pobrament representats a *Limonium* i la seva presència es restringeix a algunes illes de la conca Mediterrània oriental.

Sistema reproductiu

A *Limonium*, així com a altres Plumbaginaceae (Baker 1966), existeix un sistema de autoincompatibilitat esporofítica que és heteromórfica i que es manifesta en el dimorfisme dels tipus de pol·len (de reticle ample o reticle fi) i estigma (papilós o llis, -cob en la literatura plumbanològica usual-). Hi ha quatre tipus possibles de combinacions pol·len / estigma:

A: pol·len finament reticulat / estigma cob

B: pol·len amplament reticulat / estigma papilós

C: pol·len amplament reticulat / estigma cob

D: pol·len finament reticulat / estigma papilós

Sols aquells entrecreuaments entre pól·lens de reticle amplament reticulat i estigma papilosos o bé pól·lens finament reticulats i estigmes llisos són compatibles i produeixen llavors. Els altres entrecreuaments no són viables i no es produeix la germinació del gra de pol·len sobre l'estigma. Les espècies sexuals normalment mostren individus de dos tipus (A, B) dins de les poblacions. En contrast, la major part de les espècies poliploids exhibeixen poblacions monomòfiques constituïdes per individus que sols presenten un sol tipus de combinació pol·lini-estigmàtica. A més, aquestes plantes presenten una molt reduïda fertilitat pol·línica però que no impedeix la formació de llavors viables, fet que és explicat per la possessió de reproducció apomíctica (Erben 1978, 1979; Ingrouille 1982).

Bona part de la informació disponible del sistema reproductiu de les espècies de *Limonium* es deu als treballs capdavanters de Baker (1953) i Erben (1978, 1979) els quals, tot i això, estudiaren molt poques espècies del gènere presents a les illes mediterrànies. Dins de *Limonium* secció *Limonium* el coneixement del tipus de sistema heteromòrfic (morfologia del pol·len i estigma) i els valors de fertilitat pol·línica s'han utilitzat com a evidencia indirecta per a diagnosticar que una espècie presenta reproducció apomíctica. Les espècies apomíctiques que mostren les combinacions B o A són molt més freqüents que aquelles que presenten les C o D; això està d'acord amb les observacions del gènere fetes per Baker (1953).

Malgrat hi ha citacions d'algunes espècies apomíctiques que presenten dos tipus de combinacions de pól·lens i estigmes, sembla que són errades degudes a confusions amb altres espècies. De fet, les observacions relatives al dimorfisme

pol·linic / estigmàtic de *L. gibertii* i *L. marisolii* a Balears (Llorens 1986 a,b) mai s'han confirmat i probablement es deuen a confusions amb individus de *L. minutum* o *L. grosii* (en el primer cas) o *L. leonardii-llorensii* (en el segon cas). Un cas extrem que caldria verificar es l'espècie poliploid *L. graecum*.

En contrast amb el que caldria esperar, Artelari (1989) assenyalà monomorfisme en nou poblacions de l'Aegeu (A: 8; B: 1), mentre que tres foren dimòrfiques, amb els tipus A i B presents dins de les poblacions. Finalment, la fertilitat pol·línica a les espècies apomíctiques no és tan baix com dades anteriors suggerien [0-17(28)%; Erben 1978, 1979]. De fet, els membres del complex *L. gibertii* poden assolir mitjanes poblacionals que s'apropen al 50% de pol·len viable i valors que s'acosten al 86% s'han assenyalat per *L. graecum* (Artelari 1989). Aquests valors s'apropen als que indicaren Ingrouille & Stace (1985) a alguns membres del complex apomíctic *L. binervosum* a les illes britàniques (0-38%) i suggereixen que diverses espècies apomíctiques poden presentar una certa fertilitat masculina marginal.

3. Antecedents

Limonium majoricum fou descrit per Pignatti (1955) en base a una sèrie de materials recol·lectats i enviats a l'especialista italià per l'apotecari artanenc Llorenç Garcias Font. La indicació locotípica refereix Sa Colònia [de Sant Pere] com a única localitat coneguda de l'espècie ["MALLORCA: Artà, terres i roques maritimes a Sa Colonia, 14.7.1932, GARCIAS- FONT nº 773 PAV."], no sols en el moment del seu descobriment (1932) ans també en el de la seva publicació (1955). Cap població més, llevat de la original, ha estat mai indicada a Mallorca i tan sols hi ha una citació inespecífica de Menorca deguda a Duvigneaud (1979), poc versemblant, que mai ha estat verificada per autors posteriors.

L'estatus de *L. majoricum* com a espècie singular de les Balears ha estat gairebé mantinguda en tots els treballs de síntesis que cobreixen el territori illenc (Pignatti 1972; Llorens 1986 a,b, Erben 1993) si bé alguns autors amb criteris taxonòmics excessivament sintètics ho reconeixen a nivell subespecífic dins de *L. auriculae-ursifolium* (Malagarriga 1976) o *L. girardianum* (Bolòs et al. 1990).

Donada la seva raresa apareix com a espècie protegida en el Reial Decret 439/90 del 30 de març de 1990 que regula el Catàleg Nacional d'espècies amenaçades i fa pocs anys es va elaborar el pla de recuperació de l'espècie (Llorens et al. 1999). Tot i això Sáez & Rosselló (2001) en el Llibre vermell de la flora vascular de les Illes Balears esmenten *L. majoricum* dins de les espècies dubtoses a la categoria IUCN DD. Les raons que addueixen aquests autors es fonamentaven en que Llorens et al. (1999) insinuen que les subpoblacions atribuïdes a *L. majoricum* podrien correspondre en realitat a híbrids entre *L. majoricum* i altres espècies, com *L. gymesicum* o *L. virgatum.* L'existència d'híbrids entre aquestes espècies ja havia estat posat de manifest per Erben (1993) i també prèviament per Llorens (1972) qui va descriure (invàlidament des de el punt de vista

nomenclatural) el *Limonium* × *mansanetii* A. Llorens & L. Llorens, suposat híbrid entre *L. majoricum* i *L. virgatum*.

Tanmateix hi ha altres circumstàncies que conviden a la reflexió sobre la independència taxonòmica de *L. majoricum* o, alternativament, la pervivència en la actualitat a Artà de formes atribuïdes a *L. majoricum*.

En primer lloc, els autors d'aquesta memòria no han vist mai a Sa Colònia d'Artà exemplars de *Limonium* que coincideixin bé amb la morfologia atribuïda a *L. majoricum*, bé amb exemplars d'herbari que corresponguin amb el tipus nomenclatural de l'espècie. Un dels autors (JAR) ha visitat repetidament la localitat clàssica, des de l'any 1980 en endavant, en companyia d'altres botànics illencs (Lleonard Llorens, Jeroni Orell) que sabien el indret exacte de la població de *L. majoricum* per haver-los estat mostrada pel seu descobridor, Llorenç Garcias Font. A part de *L. virgatum,* a la dita localitat de Sa Colònia de Sant Pere (Molí d'en Regalat) sols existia una població prou homogènia d'exemplars en forma de coixinets atapeïts, fulles no planes i amb les inflorescències denses i amb poques o cap branca estèril. Aquests exemplars no són exclusius del Molí d'en Regalat i es poden trobar al llarg de la costa artanenca entre Sa Colònia d'Artà i Es Caló dels Cans, així com als roquissars marítims vora la desembocadura del torrent de Son Bauló i als talussos litorals prop del Cap Pinar.

És a dir, des de el punt de vista macromorfològic no existeix cap caràcter que permeti discriminar els exemplars existents en l'actualitat (i des de fa més prop de 25 anys) al Molí d'en Regalat de la resta de la costa NE mallorquina. És significatiu el comentari que Llorens (1986 a) afegeix al respecte de *L. majoricum*: " Las plantas descritas por Pignatti corresponden a las formas más desarrolladas de esta especie, y que hoy, dadas las diversas modificaciones realizadas en el área de la única población conocida ya no existen".

Tradicionalment els exemplars de Es Caló dels Cans s'han denominat *L. gymnesicum* Erben (≡ *L. gougetianum* subsp. *balearicum* Pignatti ≡ *L. girardianum* subsp. *balearicum* (Pignatti) O. Bolòs, Vigo, Masalles & Ninot) també endemisme mallorquí, i de fet la localitat típica de l'espècie correspon a aquesta petita cala d'Artà. Ara bé, segons Pignatti (1955) el *L. gymesicum* (sub *Limonium gougetianum* subsp. *balearicum*) també es troba present a la mateixa localitat, i als voltants, d'on va ser descrit el *L. majoricum*:

"MALLORCA: Roques marit. al Corp-marí de Sa Colònia (Artà) 22.6.1932, GARCIAS-FONT, BCG; terres litorales a Sa Colonia 22.6.1932, GARCIAS-FONT nº 1273, PAV; La Colònia de Artà 14.7.1932, GARCIAS-FONT 1273, PAV; La Colònia de Artà, roq. lit. de la Cala dels Cans 10.7.1950, GARCIAS-FONT, BCG; ibid. litoral a l'ombra dels Tomarells 10.7.1950, GARCIAS-FONT, BCG"

Les diferencies morfològiques que Erben (1993) dóna per separar *L. majoricum* de *L. gymnesicum* són força subtils i es basen exclusivament en variacions en alguns caràcters quantitatius, no en qualitatius, tal i com es pot veure reflexat en aquesta taula comparativa de les morfologies d'ambdues espècies.

	L. majoricum	***L. gymnesicum***
Port	Perenne	Perenne, almohadillada
Indument	Glabra	Glabra
Fulles	18-45 x 8-16	15-25 x 3-7
Limbe	verdes a l'antesis de espatulades a estretament cuneades-espatulades planes, amb el marge revolut amb 3 nervis àpex arrodonit	verdes a l'antesis estretament cuneades-espatulades planes, estretament revolutes amb 1-3 nervis àpex arrodonit o emarginat
Pecíol	1,5 - 2,5 mm 1/3 – 1/2 del limbe	0,8 – 2 mm 1/3 – 1/2 del limbe
Escapus	15 – 30 cm sense o amb poques branques estèrils	5 – 18 cm sense o amb poques branques estèrils

Inflorescència	Branques de primer ordre fins a 10 cm	Branques de primer ordre fins a 10 cm
Angle esbrancament	30 – 45°	35 – 50°
Espigues	6 – 18 casi dretes	10 –45 dretes o lleugerament arquejades
Espiguetes	5,5 – 6 mm 8 – 12 / cm 2 – 5 flors	6 – 6,5 mm 6 – 7/ cm 1 – 3 flors
Bràctea externa	2 – 2,5 x 1,9 – 2,3 mm triangular ovada àpex agut part central carnosa amb àpex que quasi arriba al marge	2 – 2,4 x 2 – 2,3 mm de triangular a triangular ovada àpex agut part central carnosa amb àpex que quasi arriba al marge
Bràctea mitjana	2,1 – 2,6 x 1,3 – 1,9 mm oblonga-el·líptica	2 – 2,3 x 1,3 – 1,8 mm oblonga-el·líptica
Bràctea interna	5 – 5,6 x 2,9 –3,2 mm el·líptica àpex subobtús o arrodonit part central 3,3 – 3,9 x 1,7 – 2,1 mm, amb àpex 1 – 1,2 mm	4,3 – 4,9 x 3 – 3,4 mm el·líptica àpex subobtús o arrodonit part central 2,8 – 3,4 x 1,4 – 2 mm, amb àpex 1 – 1,2 mm
Calze	4 – 4,8 mm sobrepassa 0,5 – 1 mm a la bràctea interna tub pilós dents 0,7 – 1 mm	4,7 – 5 mm sobrepassa 0,5 – 1 mm a la bràctea interna tub pilós dents 0,8 – 1,1 mm
Corol·la	6,5 – 6,8 x 1,7 – 1,9 mm violàcia-vermella	7,9 – 8,3 x 2 – 2,2 mm violàcia-vermella
Nombre cromosòmic	2n=27	2n=27
	L. majoricum	***L. gymnesicum***

No obstant a la mateixa obra, a la clau de determinació, hi ha una sèrie de contradiccions amb aquestes dades. Així, per arribar a *L. majoricum* cal que la densitat de les espiguetes sigui 10-14 /cm (Erben 1993: 11), mentre que a la descripció (veure taula) dóna un valors de 8–12 / cm. D'altre banda, per assolir una determinació de *L. gymnesicum* cal que els exemplars tinguin calzes entre 5-6 mm (Erben 1993: 12), en clara contradicció amb els valors donats de 4,7-5 mm. Donada

la gran semblança morfològica existent entre *L. majoricum* i *L. gymnesicum* és pertinent demanar-se fins a quin punt els suposats exemplars hibridògens entre ambdues espècies, que foren detectats a sa Colònia de Sant Pere (Erben 1993), ho són realment o si més aviat cal considerar-los com a formes de transició entre dos extrems de variació d'una mateixa entitat taxonòmica.

Pérez Rocher (1995) realitzà, sota la direcció d'un dels autors d'aquesta memòria (JAR), una tesina de llicenciatura sobre les característiques de les epidermis foliars d'algunes espècies baleàriques de *Limonium*, principalment del grup *L. minutum,* entre els que inclogué l'anomenat complex *L. majoricum*, que comprenia aquesta espècie i *L. gymnesicum*. No es va detectar cap diferència entre les dues espècies pel que fa a la disposició dels estomes (presents sols al revers de les fulles; fulles hipoestomàtiques), la longitud de les cèl·lules oclusives dels estomes, la morfologia i densitat de les glàndules de Scopoli, la morfologia i disposició de les papil·les i la ornamentació al microscopi electrònic d'escandallatge (SEM) de la cutícula foliar. En aquest treball el material de *L. majoricum* fou obtingut a partir de plecs d'herbari cedits per Jeroni Orell agafats a la localitat clàssica i que coincidien amb el concepte que d'aquesta espècie s'ha tingut tradicionalment per part dels botànics illencs: plantes idèntiques a *L. gymnesicum* però més grans pel que fa a la alçada de la planta i amplària de les fulles.

D'altre banda els exemplars atribuîts a *L. majoricum* i *L. gymnesicum* presenten el mateix tipus de combinació de pol·len i estigma (B), son igualment apomíctiques, presenten baixa fertilitat pol·línica i tenen el mateix nombre de cromosomes (són triploids amb 2n=27).

De tota la informació que es disposa fins ara sembla més que justificada la adscripció de *L. majoricum* com a espècie deficientment coneguda (categoria DD) proposada per Sáez & Rosselló (2001). L'estat de la qüestió es pot resumir en els següents punts:

i) *L. majoricum* va ser descrit i sols ha estat conegut d'una única localitat mallorquina, Sa Colònia de Sant Pere, a la costa artanenca.

ii) Els exemplars atribuïts a *L. majoricum* i que es conserven als herbaris clàssics (Garcias Font, Bonafé, Orell) estan agafats abans de 1980 i es caracteritzen, en general, per presentar una morfologia general semblant a l'espècie *L. gymnesicum*, endèmic de poques localitats ubicades a la costa de la badia d'Alcudia i de Pollença, però amb els escapus més llargs i amb fulles amb el limbe més ample.

iii) Actualment no es troben a la població original (Molí d'en Regalat) exemplars amb aquesta morfologia. De fet, els exemplars presents a aquesta localitat són impossibles de separar morfològicament de les poblacions veïnes de *L. gymnesicum*. Ambdues espècies comparteixen un idèntic sistema reproductiu (apomictic, amb una combinació pol·len/estigma tipus B), varis caràcters micromorfològics (mida estomàtica i la seva localització hipoestomàtica, les glàndules de Scopoli, papil·les foliars, ornamentació de la cutícula) i el mateix nombre cromosòmic.

iv) *L. majoricum* i *L. gymnesicum* s'han citat a la mateixa localitat de la Colònia de Sant Pere, fet reconegut per l'autor que va descriure *L. majoricum*, així com per Llorens (1986 a, 1987) en els articles referits a *L. majoricum*.

v) Diversos autors han reconegut explícitament la presencia d'individus intermedis entre ambdues espècies a la Colònia de Sant Pere. Han estat interpretats com a híbrids interespecífics, però no s'ha presentat cap evidència sòlida, ni tan sols circumstancial, que permeti recolzar aquesta hipòtesis.

4.Objectius

S'ha examinat la morfologia dels exemplars tipus (isòtips) de *L. majoricum* presents a l'herbari de Garcias Font dipositat a la Societat d'Història Natural, a fi de tenir elements de referència respecte a la adscripció dels exemplars recollits a la població del Molí d'en Regalat així com a les altres poblacions de *L. gymnesicum*.

S'han dut a terme anàlisis de la variabilitat molecular, basats en els polimorfismes d'ADN, per comparar els patrons genètics dels exemplars atribuïts per altres autors (Llorens et al. 1999) a *L. majoricum* a la localitat del Molí d'en Regalat, amb les poblacions de l'espècie endèmica *L. gymnesicum*, amb la que comparteix rellevants semblances morfològiques, antòmiques, reproductives i cromosòmiques.

Es pretén avaluar les següents hipòtesis de treball a fi de presentar evidències sòlides independents sobre la adscripció taxonòmica dels individus atribuïts a *L. majoricum* presents a la costa artanenca:

i) la població del Molí d'en Regalat es troba formada per individus homogenis que, malgrat presenten una morfologia semblant a *L. gymnesicum*, tenen una singularitat genètica respecte a aquesta, testimoni d'una originalitat evolutiva i taxonòmica

ii) la població del Molí d'en Regalat és idèntica a *L. gymnesicum* amb les dades moleculars obtingudes, coincidint aquestes dades amb l'absència de marcadors morfològics, anatòmics i reproductius entre aquesta espècie i els exemplars atribuïts a *L. majoricum*

iii) la població del Molí d'en Regalat pot ser heterogènia i pot estar formada per dos o més genotips diferents, malgrat presentin una morfologia similar. En aquest cas és factible discriminar cada individu basat en el seu perfil d'ADN i avaluar la presencia d'exemplars hibridògens entre aquests dos genotips, o amb espècies taxonòmicament no relacionades, com es el cas de *L. virgatum* (que es troba present a la població).

5.Marcadors moleculars: generalitats

Les accions encaminades a l'establiment dels plans de recuperació d'espècies en greu perill d'extinció requereixen una gran quantitat d'informació sobre la seva autoecologia, demografia, i estructuració genètica abans de que es duguin a terme actuacions encaminades a preservar determinades poblacions, a crear-ne de noves o bé a reforçar demogràficament les poblacions ja conegudes (Pavlik et al. 1993, Schemske et al. 1994).

Les dades autoecològiques, demogràfiques i reproductives són mal conegudes a les plantes amenaçades de Balears. De fet, es coneixen escardusseres dades sobre la estructuració genètica de la major part de les població dels endemismes baleàrics. Aquest coneixement és crític i hauria de ser conegut pels gestors de la conservació a l'hora de dissenyar les estratègies de recuperació de l'espècie, un fet que ha estat passat per alt en plans de recuperació d'altres endemismes baleàrics, com per exemple l'endemisme menorquí *Lysimachia minoricensis* J.J. Rodr. (Ibáñez et al. 1999).

Desafortunadament, les prediccions sobre els nivells de diversitat genètica presents en plantes rares (i com estan estructurats dins i entre poblacions) fetes en base a les característiques de distribució geogràfica, dades ecològiques, reproductives i demogràfiques, així com el tipus de cicle vital, no són sovint fiables (Gitzendanner & Soltis 2000), la qual cosa implica que es requereixen dades empíriques per la adequada gestió i millora de les estratègies conservacionistes que afecten a plantes amenaçades.

Marcadors cloroplàstics

Els microsatèl·lits, o seqüències simples repetides (SSRs), són marcadors moleculars altament polimòrfics que consisteixen en un nombre variable de repeticions en tàndem (entre dues i centenars) de mononucleòtids, dinucleòtids, tri nucleòtids o, rarament, tetraucleòtids. Aquestes regions solen ser altament variables entre els individus d'una mateixa espècie, de tal manera que cada una d'aquestes unitats de repetició (locus) pot tenir diferents variants (al·lels), les quals són el resultat de canvis en el nombre de repeticions del motiu del microsatèl·lit (Figura 1).

Els microsatèl·lits es troben dispersos arreu d'una gran varietat d'organismes eucariotes, incloses les plantes, i es troben principalment en regions del genoma que no són codificants per a la síntesi de proteïnes, com els introns o els espaciadors intergènics. En vegetals els microsatèl·lits s'han detectat als tres tipus de genomes presents, el nuclear, mitocondrial i cloroplàstic, si bé són molt més freqüents en el genoma nuclear (però apareixen amb una freqüència menor que en els genomes d'animals).

L'obtenció dels genotipatges mitjançant microsatèl·lits és tècnicament senzilla i es basa en una reacció PCR (Polymerase Chain Reaction) en la que s'inclouen els cebadors específics que flanquejen cada locus del microsatèl·lit. Una vegada obtingut el producte de PCR es caracteritza la seva mida mitjançant electroforesis d'alta resolució i amb un patró intern. Cada producte de PCR que té una mida diferent es considera que es deu a les mutacions produïdes en el nombre del motiu repetit i es considera un al·lel diferent.

Figura 1. Exemples de regions genòmiques amb motius microsatèl·lits o SSR, i algunes variants al·lèliques.

TCGAGTCGTAAAAAAAAAAAGTACCTTGAC
TCGAGTCGTAAAAAAAAAAAAGTACCTTGAC
TCGAGTCGTAAAAAAAAAAAAAGTACCTTGAC
TCGAGTCGTAAAAAAAAAAAAAAGTACCTTGAC

Mononucleòtids: **A**

AGGCTGCAACTCTCTCTCTCTCTCTCAAGTGCTTC
AGGCTGCAACTCTCTCTCTCTCTCTCAAGTGCTTC
AGGCTGCAACTCTCTCTCTCTCTCTCTCAAGTGCTTC

Dinucleòtids: **CT**

GAGCTTTCGCACCACCACCACCACTAGCCTGACTAC
GAGCTTTCGCACCACCACCACCACCACTAGCCTGACTAC
GAGCTTTCGCACCACCACCACCACCACCACTAGCCTGACTAC

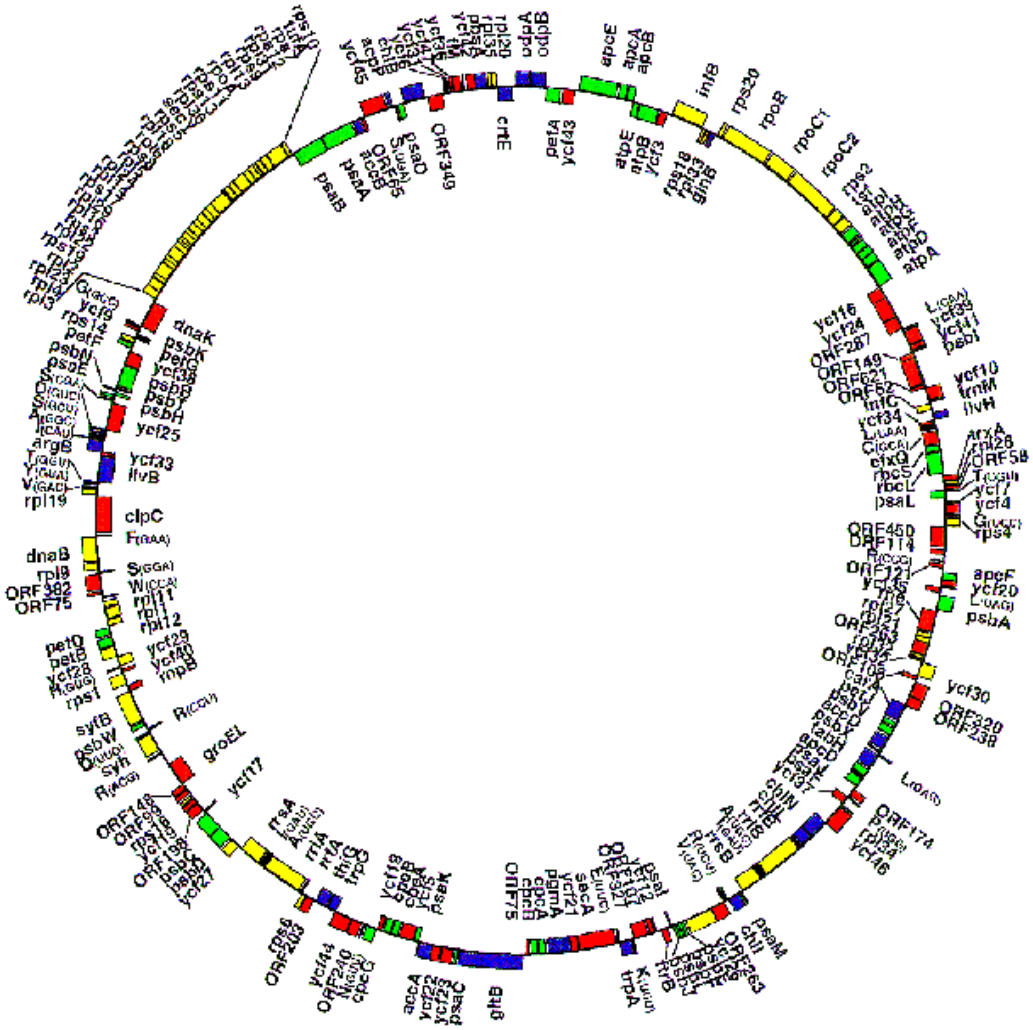
Trinucleòtids: **CAC**

La caracterització dels microsatèl·lits a plantes va començar per la caracterització de diversos locus presents a espècies d'interès agrícola, com el blat, soja, ordi (Akkaya et al. 1992, Senior & Heun 1993, Shagai-Maroof et al. 1994) si bé en la actualitat s'han desenvolupat un gran nombre d'ells en nombroses espècies vegetals, no emparentades evolutivament. i amb finalitats conservacionistes (Segarra et al. 2003). Encara que probablement el nivell de polimorfisme dels microsatèl·lits en plantes es semblant al que s'ha detectat en espècies animals, l'abundància de locus es entre 4 i 100 vegades menor (Lagercrantz et al. 1993). Aquesta característica i el fet de que es precisa un gran esforç inicial tècnic i de cost per a desenvolupar els locus a aquelles espècies de les que es desconeixen dades prèvies sobre el seu genoma han fet que l'estudi dels

microsatèl·lits a vegetals no sigui sovint la tècnica molecular a triar en primera opció.

El genoma cloroplàstic consta d'un cromosoma circular (Figura 2) i sol ser de transmissió uniparental (materna a la major part d'angiospermes; paterna a les gimnospermes). Recentment s'ha produït un notable increment en l'estudi dels microsatèl·lits ubicats en el genoma cloroplàstic (cpDNA) gràcies al desenvolupament de cebadors consens que són aplicables, si més no teòricament, a qualsevol espècie d'angiosperma (Weising & Gardner 1999).

Figura 2. Estructura típica del cromosoma cloroplàstic present a plantes vasculars. Els noms dels gens presents hi són indicats.


atpB
atpE
atpB
rbcL
psaB
psaA
ycf3
trnS
trnG
trnR
trnA
trnN
trnI
trnH
psbA
trnK
rps16
trnQ
psbK
psbI
trnS
trnG
trnR
trnT
trnE
trnY
trnD
trnM
atpE
atpB
rbcL
accD
psaI
ycf4
cemA
petA
psbJ
psbL
psbF
psbE
petL
petG
trnW
trnP
psaJ
rpl33
rps18
rpl20
rps12
clpP
psbB
psbT
psbN
psbH
petB
petD
rpoA
rps11
rpl36
infA
rps8
rpl14
rpl16
rps3
rpl22
rps19
rpl2
rpl23
trnH
rps19
rpl2
rpl23
trnH
trnA
trnI
ycf2
trnL
trnV
trnM
trnE
trnR
trnN
trnS
trnG
trnR
trnT
trnL
trnF
trnV
trnH
psbM
trnD
trnY
trnE
trnM

D'altre banda, diversos cebadors que varen ser dissenyats inicialment per a l'estudi de la variabilitat en l'ADN cloroplàstic a *Nicotiana tabacum* (Bryan et al. 1999) han funcionat a altres grups d'angiospermes, la qual cosa ha permès l'escrutini de la variabilitat del genoma cloroplàstic a plantes de les que no es coneix la seva seqüència sencera.

A diferència del que passa al genoma nuclear, els microsatèl·lits ubicats en el genomes cloroplàstic estan constituïts per repeticions de mononucleòtids, generalment adenines (A) o timines (T), (vegeu Figura 1). La seva aplicació a resoldre problemes taxonòmics, filogeogràfics i conservacionistes s'ha posat de manifest a diferents grups de gimnospermes (Dyer & Sork 2001, Gugerli et. al 2001, Marshall et al. 2002, Richardson et al. 2002) i, en menor mesura, angiospermes (Powell et al. 1996, Provan et al. 1997, Soliva & Widmer 1999, Provan 2000, Palme 2002). No obstant hi ha un esbiaixament biològic pel que fa als assaigs de la diversitat cloroplàstica a plantes utilitzant marcadors microsatèl·lits. Tot i això, la major part dels organismes assajats son arbres, espècies cultivades així com els seus ancestres silvestres, o espècies d'ampla distribució i molt poques estimes sobre la diversitat del genoma cloroplàstic s'ha investigat en plantes rares i de distribució restringida.

Marcadors nuclears

Els ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats, Figura 3) s'han desenvolupat recentment com un dels sistemes de petjada genètica (DNA fingerprinting) anònima, que és semblant als marcadors RAPD, que analitza la variabilitat genètica entre les nombroses regions de microsatèl·lits que es troben disperses arreu dels diferents genomes (especialment el genoma nuclear). La tècnica ISSR, específicament s'adreça als microsatèl·lits que presenten repeticions de di- i

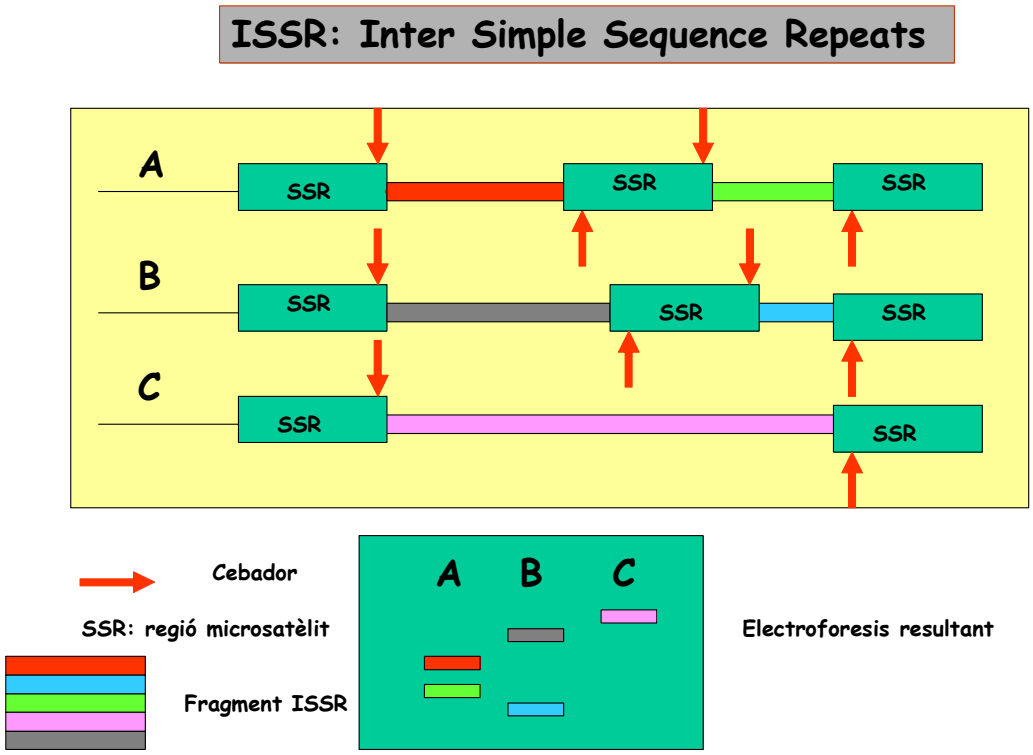
trinucleòtids, degut a que aquests són característics dels que es troben presents al genoma nuclear. Els cebadors utilitzats en la generació de variants ISSR inclouen seqüències d'aquestes regions altament variables i un parell de bases arbitrari afegits a l'extrem 3'.

Típicament, s'utilitza un sol primer a cada una de les reaccions PCR. Si aquest cebador és exitós en la localització de dues regions microsatèl·lits situades a les cadenes d'ADN de cada mostra, aleshores la reacció PCR generarà una banda determinada d'una mida igual a la distància en nucleòtids que separa les regions microsatèlits (Figura 3). Normalment, entre varies i nombroses regions microsatèl·lits existeixen en els ADN que es troben situades a distàncies curtes (menys de 3000 nucleòtids), per la qual cosa es generaran nombroses bandes en la reacció de PCR.

Els estudis de la heretabilitat dels marcadors ISSR han demostrat uns resultats que s'acosten notablement a les clàssiques relacions mendelianes esperables en marcadors de tipus dominant (Tsumura et al. 1997). Això, junt a la seva extrema variabilitat, major reproductibilitat en els experiments duplicats (és a dir, són menys proclius al canvi en el patró de bandes generades quan es canvien les concentracions d'ADN utilitzades o altres components de les reaccions PCR) fan que aquests marcadors siguin superiors als altres utilitzats en investigacions sobre la variació genètica entre individus altament relacionats en parentesc.

En aquesta memòria s'ha investigat els nivells de diversitat molecular dels genomes cloroplàstic i nuclear de *Limonium majoricum.*

Figura 3. Generació del patró de bandes ISSR a tres individus hipotètics (A, B, C) que difereixen en el nombre de parell de bases que separen els locus microsatèl·lits o SSR. Les fletxes vermelles indiquen el lloc d'aparellament del cebador. La resolució electroforètica del patró generat als tres individus es mostra a la part inferior.



Específicament, els objectius del treball han estat:

(i) analitzar el nombre i la freqüència dels genotips d'ADN cloroplàstic i nuclear presents a la població de *L. majoricum* de la població típica del Molí d'en Regalat.

(ii) comparar els genotips detectats amb els presents a la resta de poblacions conegudes de *L. gymnesicum.*

(iii) avaluar la singularitat molecular dels individus atribuïts a *L. majoricum* i suggerir propostes d'actuació en base als resultats obtinguts.

6.Material i Mètodes

Mostreig de *Limonium majoricum, L. gymnesicum* i altres espècies

La població del Molí d'en Regalat va ser visitada a inicis de setembre de 2004 amb companyia de Josep Ll. Gradaille i Magdalena Vicens, del Jardí Botànic de Sóller. Abans de realitzar la recollida de mostres es va fer una detallada inspecció dels individus presents a la localitat, a fi de prendre una visió de conjunt dels extrems de variabilitat morfològica presents a l'indret.

Es va detectar un sols tipus morfològic d'exemplars que els companys del Jardí Botànic de Sóller havien atribuït a *L. majoricum*. Un altre tipus morfològic present va ser *L. virgatum*, espècie poliploid i apomíctica i d'ample distribució a Balears i a la Mediterrània. Bàsicament hi havia molta concordança entre les determinacions inicials fetes pels membres del Jardí de Sóller i les opinions expressades per nosaltres.

L'única petita discrepancia corresponia a la presència d'individus amb la morfologia intermitja entre *L. majoricum* i *L. virgatum*, que havien estat inicialment detectats pels companys de Sóller. En el nostre parer tals exemplars no presentaven morfologies equívoques i podien ser atribuïts sense dificultats a una o altre espècie, per la qual cosa no confirmarem la presencia actual d'híbrids entre ambdues espècies, fet que ha estat recolzat per les anàlisis moleculars realitzades. Donada la morfologia semblant de tots els individus atribuïts a *L. majoricum* presents a la població es va procedir a realitzar un mostreig amb les següents premisses:

(i) els individus haurien d'incloure el màxim de variabilitat morfològica present dins de la població, encara que fos molt subtil

(ii) la única restricció havia de ser que els individus disposassin d'un mínim nombre de fulles verdes per assegurar l'extracció d'ADN de bona qualitat

(iii) els individus foren identificats sobre la cartografia realitzada per J.L. Gradaille i M. Vicens, assignant-los el mateix nombre amb el que ja apareixien. En cas dels individus amb dubtes respecte a la correcta correspondència amb la cartografia feta es va decidir no incloure'ls al mostreig

(iv) individus de *L. virgatum* presents a la població també foren mostrejats amb les mateixes premisses

(v) els individus seleccionats per les anàlisis genètiques es varen marcar per part dels companys del Jardí Botànic de Sóller a fi de possibilitat una re-localització més ràpida i efectiva

(vi) en general, sols els exemplars adults i ben desenvolupats es varen mostrejar, però degut al conspicu creixement de les saladines era sovint difícil individualitzar exemplars discrets que creixien molt junts. En tals casos sols s'agafaren mostres que es podia verificar que corresponien a un sols individu.

Les mateixes premisses es tingueren en compte a l'hora de prendre mostres de les poblacions de *L. gymnesicum* dels voltants de Sa Colònia de Sant Pere (incloent la població tipus del Caló dels Cans), Son Bauló i el Cap Pinar, poblacions també mostrejades amb l'ajut de V. Forteza, J. Ll. Gradaille, M. Mus i M. Vicens, excepte que els individus no foren marcats.

El nombre d'individus mostrejats i la ubicació d'altres poblacions de congèneres utilitzats com a referència es detallen a continuació.

Espècie	**Població**	**Exemplars**
L. majoricum	Molí d'en Regalat	27
L. gymnesicum	Sa Colònia, anant al Caló dels Cans	17
L. gymnesicum	Caló dels Cans	10
L. gymnesicum	Torrent de Son Bauló	19
L. gymnesicum	Cap Pinar	27
L. virgatum	Molí d'en Regalat	11
L. virgatum	Cap Pinar	4
L. minutum	Cap Pinar	13

Extracció de l'ADN

Una petita fulla de cada individu es va col·locar dins bosses de polietilé plenes de gel de sílice a fi d'aconseguir un dessecat ràpid de la mostra, evitant la degradació dels àcids nuclèics per l'acció de nucleasses, les quals són inactivades per desnaturalització durant el dessecament ràpid del material. Els àcids nuclèics totals s'extragueren amb el protocol de Doyle & Doyle (1987), que es basa en la utilització del detergent CTAB, fet dins tub de microcentrifugues de 1.5 mL. El procés consta de les següents etapes:

1. Trituració de la mostra en un morter, en fred, amb 500 μl de tampó CTAB [TAMPÓ CTAB: 2% CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM tris-HCl pH 8. Autoclavatge 20 minuts a 1 atmosfera. Afegir 0.2 % β-mercaptoetanol en el moment de la seva utilització]
2. Transferència de l'homogenitzat a un tub Eppendorf i incubació entre 30-45 minuts a 60 °C amb agitació
3. Addició de 200 μl de Cloroform:Alcohol Isoamílic (24:1) i posterior mescla de les dues fases en un vórtex
4. Centrifugació 10 minuts a 13000 rpm
5. Transferència de la fase aquosa a un Eppendorf nou
6. Addició de 2 volums d'etanol 96 % (800 μl aproximadament)
7. Incubació dels Eppendorf uns 20 minuts a –20 °C
8. Centrifugació 15 minuts a 13000 rpm
9. Decantació i rentat del *pellet* amb 200 μl d'etanol 70 %
10. Centrifugació 5 minuts a 13000 rpm
11. Decantació i evaporació de l'etanol amb una bomba de buit
12. Ressuspensió del *pellet* en 30 μl d'aigua

Amplificacions dels microsatèlits cloroplàstics (cpSSR)

Deu cebadors universals per a angiospermes (ccpm 1 - ccpm 10), dissenyats per Weising & Gardern (1999) i dos cebadors addicionals (NT37, NT39) dissenyats a tabac (Bryan et al 1999) foren utilitzats per el genotipatge cloroplàstic. Les reaccions PCR es desenvoluparen en un volum total de 10 µl, que contenia 1X PCR buffer [75 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), 5 mM KCl, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.0001% BSA, 1.5 mM $MgCl_2$, 5% DMSO], 200 µM de cada desoxinucleotid dATP, dCTP, dGTP i dTTP, 0.2 µM de cada cebador (el cebador directe de cada parella es va marcar amb diferent fluorocroms), aproximadament 50-100 ng d'ADN genòmic i 0.75 unitats de *Taq* polimerasa. Les amplificacions comprenien una incubació inicial de 94° C durant 3 minuts; 40 cicles de 15 segons a 94° C (desnaturalització), 15 segons a 56° (anellament del cebador) i 30 segons a 72° C (extensió). Es va incloure un cicle final de 5 minuts a 72°C, per permetre l'acabament de les extensions fetes.

Electroforesis de les mostres dels cpSSR

Els productes de les diferents PCR que estaven marcats amb diferents fluorocroms s'ajuntaren i combinaren amb un tampó de càrrega, el qual contenia un marcador intern de mida que estava marcat amb el fluorocrom ROX. Les mostres així preparades es diluïren i es carregaren en capil·lars plens d'acrilamida per a la seva electroforesis capil·lar en condicions desnaturalitzants (emprant formamida) en un seqüenciador automàtic d'ADN ABBI (Applied Biosystems) 310 DNA ubicat al Laboratori de Biologia Molecular del Jardí Botànic de la Universitat de València. La determinació de les mides amplificats es va fer automàticament mitjançant el programa informàtic GeneScan versió 3.1 (Perkin Elmer).

Amplificació per PCR dels locus ISSR

S'utilitzaren 25 cebadors ISSR per assajar en un estudi pilot els nivells de variabilitat molecular nuclear. D'ells se seleccionaren quatre, que corresponen als que donaren millors senyals d'amplificació en totes les mostres. Bon apart dels cebadors utilitzats no produïren cap producte d'amplificació, la qual cosa indicava que en les espècies analitzades no es trobaven en el genoma els motius del microsatèl·lits assajats o bé, que aquests es trobaven en ubicacions del genoma prou allunyades que no permetien la amplificació dels productes. El nom i la seqüència dels cebadors utilitzats es presenta a continuació:

•ISSR - 1:
5´- CAC ACA CAC ACA CAC AT- 3´
•ISSR - 2:
5´- ACA CAC ACA CAC ACA CT- 3´
•ISSR - 9:
5´- CAC ACA CAC ACA CAC AG- 3´
•ISSR - 10:
5´- ACA CAC ACA CAC ACA CG- 3´

Les reaccions per amplificar els marcadors nuclears ISSR es desenvoluparen en volums de 25 μl, que contenien 10 mM Tris-HCl (pH 8.8 a 25°C), 50 mM KCl, entre 2 i 4 mM $MgCl_2$ segons cebador, 200 μM de cada desoxinucleòsid dATP, dCTP, dGTP i dTTP, 15 ng de cebador, aproximadament 25 ng d'ADN genòmic i una unitat de Taq polimerassa. Es va incloure un control, que contenia tots els components de la reacció PCR excepte DNA, a cada bateria d'amplificacions per comprovar que no hi havia indicis de contaminació exògena. Les amplificacions es dugueren a terme en un termociclador Eppendorf utilitzant el següent programa: una incubació inicial de 94° C durant 3 minuts; 40 cicles de 15 segons a 94° C (desnaturalització), 15 segons a 50° C i 30 segons a 72° C (extensió). Es va incloure un cicle final de 5 minuts a 72°C, per permetre l'acabament de les extensions fetes.

Electroforesis de les mostres dels ISSR

Els amplificats varen ser separats en gels horitzontals d'agarosa al 1.2% preparats en tampó TBE a uns 120 V. A continuació els gels es tenyiren amb una solució bromur d'etidi i es visualitzaren sota un transil·luminador amb llum ultraviolada a 260 nm. Es dugueren a terme duplicats de les amplificacions que mostraren polimorfismes a fi d'assegurar la reproductibilitats dels resultats i minimitzar els errors experimentals.

Codificació dels resultats

El conjunt de bandes presents a cada amplificació es va designar com el genotip parcial corresponent a cada cebador. Per a cada individu es va determinar el seu genotip compost atenent a la singularitat dels genotips parcials observats.

7.Resultats

Microsatèl·lits cloroplàstics

Dels 12 cebadors utilitzats cinc d'ells pertanyents als loci Ccmp2, Ccmp3, Ccmp4, Ccmp6 i NTcp37 varen donar amplificacions consistents en totes les mostres. En canvi, els parells de cebadors que amplificaven els locus Ccmp5, Ccmp 7, Ccmp 9 i NTcp39 donaren productes febles o poc o gens reproduïbles, per la qual cosa no es pogueren utilitzar en totes les mostres i foren descartats. A la Taula següent es presenta la mida dels al·lels obtinguts a cada una de les espècies analitzades, així com els polimorfismes obtinguts dins d'algunes poblacions.

	Ccmp2	Ccmp3	Ccmp4	Ccmp6	NTcp37
L. majoricum					
Molí d'en Regalat	120	215	167	134	108
L. gymnesicum					
Sa Colònia	120	215	167	134	108
Calò dels Cans	120	215	167	134	108
T. de Son Bauló	120	215	167	134	108
Cap Pinar	120	215	167	134	108
L. virgatum					
Molí d'en Regalat	121	217	165	134	108
Cap Pinar	121	217	165	134	108
L. minutum					
Cap Pinar	119,120	215,216	167	134	108

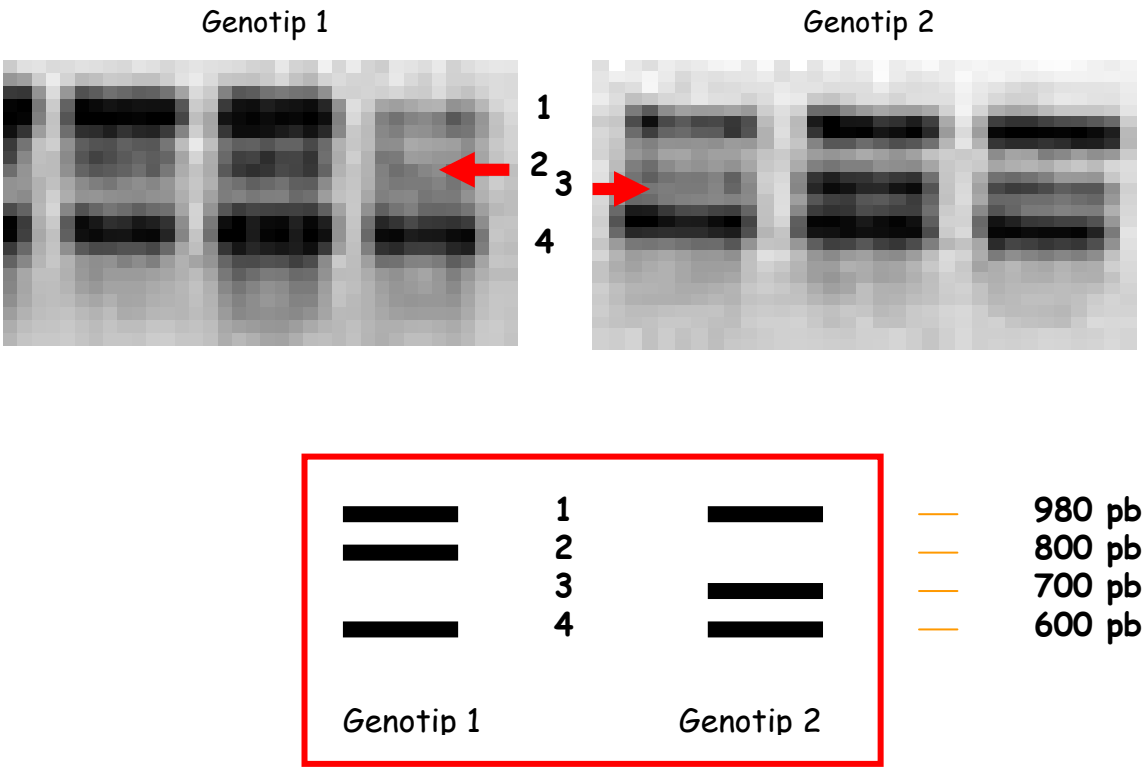
Els locus Ccmp6 i NTcp37b foren idèntics en totes les espècies de *Limonium* analitzades, en tant que els altres locus foren polimòrfics intra o interespecíficament. L'anàlisi de tots els individus de *L. majoricum* ha resultat en la detecció d'un sol genotip cloroplàstic, no havent-se pogut verificar la presencia de variabilitat intraespecífica en la població del Molí d'en Regalat. Resultats anàlegs s'han obtingut en totes les altres poblacions de *L. gymnesicum* i *L. virgatum*. Sols en l'espècie sexual *L. minutum* s'ha trobat polimorfisme intraespecífic als locus Ccmp 2 i Ccmp 3, amb 2 al.lels respectivament. L'anàlisi dels al·lels trobats a les quatre espècies de *Limonium* posa de manifest l'existència de sols tres genotips: el que comparteixen *L. majoricum* i *L. gymnesicum*, l'exclusiu de *L. virgatum*, i els dos presents a *L. minutum*. Cap genotip és compartit entre dues espècies, llevat de *L. majoricum* i *L. gymnesicum*.

Marcadors nuclears: ISSR

Tres dels quatre marcadors ISSR analitzats, i que han donat amplificacions bones i reproduïbles, han resultat polimòrfics. A continuació es descriuen els genotips obtinguts per a cada marcador, il·lustrant amb fotografies dels gels d'electroforesis i la interpretació dels mateixos per a una millor comprensió dels resultats.

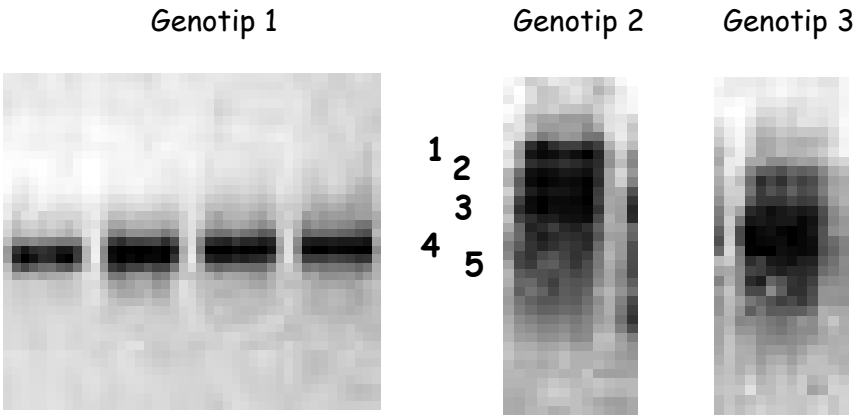
ISSR-1. El perfil d'amplificació amb el cebador $(CA)_8T$ consta de quatre bandes que van dels 600 (banda 4) fins els 980 (banda 1) parell de bases. S'han trobat únicament dos genotips. El genotip 1 consta de les bandes 1, 2 i 4, mentre que el genotip 2 consta de les bandes 1,3 i 4. Per tant els dos genotips comparteixen les bandes 1 i 4 i sols difereixen per la distinta migració en el gel d'una banda situada als 800 parells de bases (banda 2) en el genotip 1, mentre que en el genotip 2 la banda té menor mida i es troba als 700 parells de bases. Tots els individus de cada població analitzada mostren el mateix genotip, però les diferents poblacions

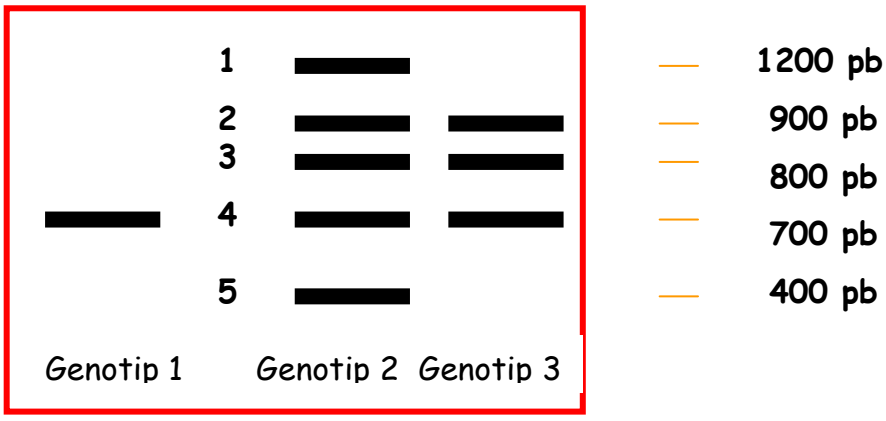
analitzades presenten genotips diferents. Així els individus de *L. majoricum* presenten el genotip 1, a l'igual que les poblacions del Torrent de Son Bauló i de Sa Colònia, i Caló dels cans i es distingeixen del que presenten els de *L. gymnesicum* de Cap Pinar. Les dues poblacions de *Limonium virgatum* presenten el genotip 1, mentre que la població analitzada de *L. minutum* mostra el genotip 2.



Espècie	Població	**Genotip 1**	**Genotip 2**
L. majoricum	El Molí	×	
L. gymnesicum	Colònia de St. Pere	×	
L. gymnesicum	Caló dels Cans	×	
L. gymnesicum	Torrent de son Bauló	×	
L. gymnesicum	Cap Pinar		×
L. virgatum	El Molí	×	
L. virgatum	Cap Pinar	×	
L. minutum	Cap Pinar		×
L. sp.	Caló des Cans		×

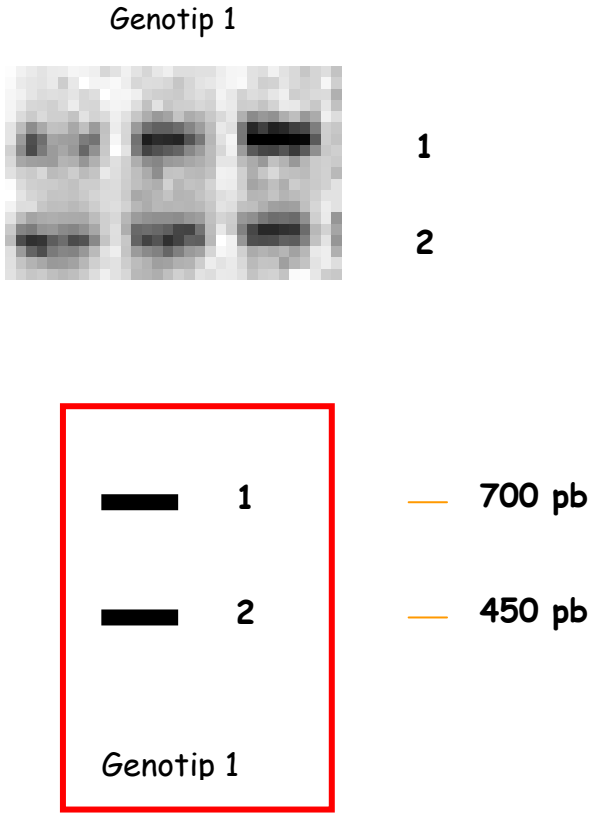
ISSR-2. Els perfils d'amplificació T amb el cebador $(AC)_8T$ consten de fins a cinc bandes que van dels 400 (banda 5) fins els 1200 (banda 1) parell de bases. S'han trobat tres genotips clarament delimitats. El genotip 1 consta únicament de la banda 4, mentre que els altres genotips són més complexos i consten de patrons multibanda. El genotip 2 consta de cinc bandes i es força semblant al genotip 3, que sols consta de tres bandes (2, 3 i 4). Tots els individus de cada població analitzada mostren el mateix genotip. La població del Molí d'en Regalat és idèntica a les analitzades de *L. gymnesicum* (genotip 1) i ambdues difereixen del genotip trobat a *L. minutum* (genotip 2) i *L. virgatum* (genotip 3). La població de *Limonium* del Caló des Cans que presenta morfologia singular és indistingible del genotip que presenten *L. majoricum* i *L. gymnesicum*.





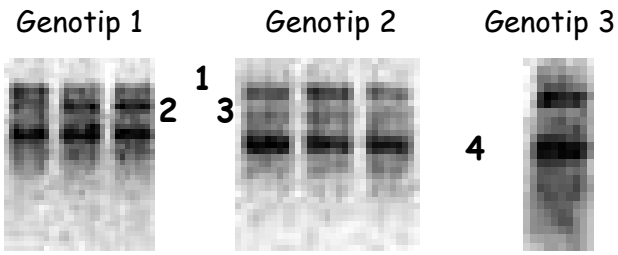
Espècie	Població	Genotip 1	Genotip 2	Genotip 3
L. majoricum	El Molí	×		
L. gymnesicum	Colònia de St. Pere	×		
L. gymnesicum	Caló dels Cans	×		
L. gymnesicum	Torrent de son Bauló	×		
L. gymnesicum	Cap Pinar	×		
L. virgatum	El Molí		×	
L. virgatum	Cap Pinar		×	
L. minutum	Cap Pinar			×
L. sp.	Caló des Cans	×		

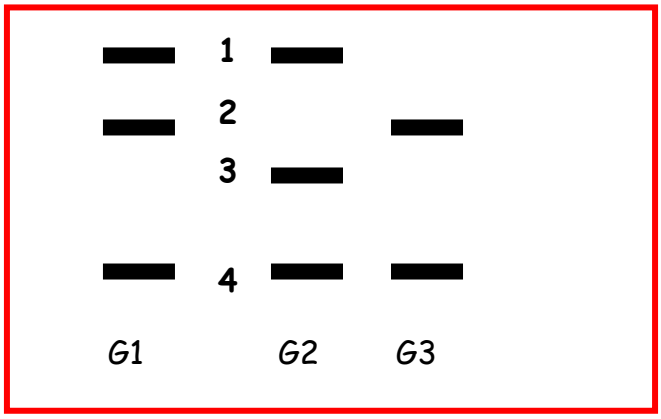
ISSR-9. Les amplificacions amb el cebador $(CA)_8G$ consten de dues bandes de 450 (banda 2) i 700 (banda 1) parell de bases. S'ha trobat únicament un sol genotip a tots els individus analitzats, independentment de la població i espècie analitzada.



Espècie	Població	Genotip 1
L. majoricum	El Molí	×
L. gymnesicum	Colònia de St. Pere	×
L. gymnesicum	Caló dels Cans	×
L. gymnesicum	Torrent de son Bauló	×
L. gymnesicum	Cap Pinar	×
L. virgatum	El Molí	×
L. virgatum	Cap Pinar	×
L. minutum	Cap Pinar	×
L. sp.	Caló des Cans	×

ISSR-10. El cebador $(AC)_8G$ ha proporcionat tres patrons de amplificació, resultat de la variabilitat de quatre bandes: la 1 (1025 parell de bases), comuna a tots els individus analitzats excepte *L. minutum* i la població del Cap Pinar de *L. gymnesicum*; la 2 (900 parell de bases), que sols apareix als exemplars de la costa artanenca de *L. majoricum* i *L. gymnesicum*; la 3 (880 parell de bases), restringida a la població del Torrent de Son Bauló, i la 4 (650 parell de bases) que sols està als exemplars de Cap Pinar. Així, la població del Molí d'en Regalat presenta el genotip 1, a l'igual que la poblacions properes de sa Colònia. El genotip 2 és exclusiu de *L. gymnesicum* del Torrent de Son Bauló i *L. virgatum*, mentres que el genotip 3 de Cap Pinar. Tots els individus dins de cada població analitzada mostren el mateix genotip.





Espècie	Població	G1	G2	G3
L. majoricum	El Molí	×		
L. gymnesicum	Colònia de St. Pere	×		
L. gymnesicum	Caló dels Cans	×		
L. gymnesicum	Torrent de son Bauló		×	
L. gymnesicum	Cap Pinar			×
L. virgatum	El Molí		×	
L. virgatum	Cap Pinar		×	
L. minutum	Cap Pinar			×
L. sp.	Caló des Cans		×	

Multigenotips. L'anàlisi conjunt de tots els marcadors polimòrfics ha posat de manifest l'existència de una homogeneïtat genètica dins de l'espècie apomíctica *L. virgatum* (un sol genotip). En contrast, dins de les quatre poblacions pertanyents al complexe *L. majoricum* – *L. gymnesicum* es poden distinguir el grup corresponent a la costa d'Artà, que inclou a *L. majoricum* i *L. gymnesicum* de Sa Colònia, Molí d'en Regalat i Caló dels Cans per la distinta combinació dels genotips individuals, tal i com es pot apreciar a la taula resum següent.

Espècie	Població	Multigenotip
L. majoricum	El Molí	**1**
L. gymnesicum	Colònia de St. Pere	**1**
L. gymnesicum	Caló dels Cans	**1**
L. gymnesicum	Torrent de son Bauló	**2**
L. gymnesicum	Cap Pinar	**3**
L. virgatum	El Molí	**4**
L. virgatum	Cap Pinar	**4**
L. minutum	Cap Pinar	**5**
L. sp.	Caló des Cans	**6**

Ara bé, si volem tenim en compte el grau de diferenciació que hi ha entre aquests diferents multigenotips, es posen de manifest els següents resultats:

i) Les espècies *L. virgatum* i *L. minutum* presenten una diferenciació molecular força remarcable respecte dels genotips presents dins del complex *L. majoricum- L. gymnesicum*.

ii) Les poblacións de *L. gymnesicum* dels voltants de la Colònia de Sant Pere són idèntiques a la de *L. majoricum* del Molí d'en Regalat. La distinció entre aquestes poblacions artanenques i les altres poblacions de *L. gymnesicum* de Cap Pinar i Torrent de Son Bauló és menor que l'existent entre la que s'ha trobat entre les poblacions de referència analitzades a aquest estudi.

8. Conclusions i propostes d'actuació.

Les anàlisis moleculars realitzats dins de tot el complexe *L. majoricum-L. gymnesicum* han posat de manifest l'existència de una lleu diferenciació genètica interpoblacional en algunes mostres analitzades. Aquest grau de diferenciació és molt menor que l'existent entre aquest complex i les altres dues espècies triades com a referència, *L. virgatum* i *L. minutum*, o bé a la que hi ha entre aquestes dues darreres.

El fet de que no s'hagi trobat cap diferenciació molecular anàloga entre les dues poblacions de *L. virgatum* analitzades, de Cap Pinar i Es Molí d'en Regalat, que presenten el mateix rang de separació geogràfica, contrasta fins a cert punt amb els resultats obtinguts a *L. gymnesicum* (però vegeu més endavant). Les anàlisis conjuntes de tots els marcadors moleculars posen de manifest l'existència d'una clara contradicció entre els resultats genètics obtinguts, la taxonomia aplicada al grup *L. majoricum - L. gymnesicum* i el concepte específic aplicat per Llorens et al. (1999) en el pla de recuperació de l'espècie: algunes poblacions de *L. gymnesicum*, en concret les situada més a prop del Molí d'en Regalat, las de Sa Colònia de Sant Pere i Caló dels Cans, presenten un genotip idèntic als individus de *L. majoricum*, que no a les altres poblacions de l'espècie.

Aquests resultats són plenament coincidents amb tota la informació morfològica, fitodermològica, de sistema reproductiu i cromosòmica de que disposen els autors d'aquest informe: si no es coneix la procedència geogràfica dels individus, no és possible la discriminació de *L. majoricum* i *L. gymnesicum*. Les dades moleculars avalen aquest fet i tenen implicacions clares de cara a la gestió del patrimoni natural dels individus de la població del Molí d'en Regalat.

D'altre banda s'ha constatat que actualment no existeix a la població del Molí d'en Regalat cap exemplar concordant amb la morfologia que presenten els exemplars tipus de *L. majoricum* dipositats a l'herbari Garcias Font. Per contra, alguns exemplars localitzats al Caló dels Cans sí que presenten morfologies que es poden atribuir a aquesta espècie. Ara bé, hem observat que d'un mateix exemplar poden sortir dos morfòtips que es corresponen amb el concepte clàssic de *L. majoricum* i el de *L. gymnesicum* (veure annex fotogràfic). Aquesta mateixa observació va ser observada per primera vegada al juliol de 2004 al Jardí Botànic de Sóller. Allà, es van observar en companyia de J.L. Gradaille i M. Vicens els exemplars de *Limonium* de la població d'en Regalat provinents de la sembra de llavors. A un mateix peu es va detectar la presència de dos morfòtips diferents, tal i com s'ha observat a la natura.

No hi ha cap evidència objectiva, ni morfològica ni molecular, que permeti la separació de les poblacions artanenques litorals atribuïdes tradicionalment a *L. majoricum* de les anomenades *L. gymnesicum* de la mateixa costa.

De totes les dades que hem analitzat concloem que els exemplars robustos que un temps hi havia al Molí d'en Regalat (ara ja no presents) i que serviren de base per a la descripció de *L. majoricum* no són més:

(i) que variacions morfològiques que potser estiguin relacionades amb alguna característica ambiental, i/o amb fenòmens de desenvolupament intern dels individus,

(ii) que aquestes variacions no són constants i no estan fixades genèticament, podent aparèixer en el si d'un mateix individu, tant en el camp com en el seu conreu en condicions homogènies

(iii) que aquests caràcters no tenen rellevància taxonòmica per a distingir variants i que cal considerar a totes les poblacions de la costa artanenca com a pertanyents a una única espècie, amb un polimorfisme intraespecífic anàleg al que presenten altres saladines endèmiques del gènere

(iv) que les anàlisis moleculars corroboren plenament aquest fets en tots els seus extrems

(v) de les dades analitzades no consta cap evidència de la existència d'una espècie al Molí d'en Regalat, avui desapareguda, els descendents de la qual serien híbrids i

(vi) no s'ha verificat, ni morfològica ni genèticament, l'existència d'hibridacions actuals entre els exemplars atribuïts a *L. majoricum* i *L. virgatum* a la població del Molí d'en Regalat.

En base a aquestes conclusions és inevitable proporcionar als gestors de la conservació vegetal balear, alhora que unes conclusions objectives, algunes recomanacions que optimitzin la gestió d'aquest patrimoni natural en base als resultats obtinguts i a la experiència d'un dels autors de l'informe en sistemàtica dels *Limoniums* i en el seu estudi molecular.

i) Quina identificació taxonòmica és la més coherent, amb el conjunt de dades de que es disposa, per a denominar a la població de saladina del Molí d'en Regalat?

Ja que no hi ha cap característica que pugui ser adduida per a discriminar objectivament la població del Molí d'en Regalat de la resta de poblacions artanenques de *L. gymnesicum* cal que el conjunt de totes aquestes tinguin una mateixa adscripció sistemàtica. Si es vol considerar aquestes poblacions a nivell específic sols hi ha dues possibilitats, *L. majoricum* o bé *L. gymnesicum*, donat que les localitats tipus (Sa Colònia de Sant Pere i Es Caló dels Cans) corresponen al conjunt de poblacions analitzades.

A nivell de prioritat nomenclatural cal triar el nom de *L. majoricum* establert l'any 1955, molt abans que el nom *L. gymnesicum* de 1986. Si es tingués un criteri ultrasintètic, com alguns autors de la escola catalana, i es volgués seguir les seves recomanacions, aleshores la cosa canvia pel fet que a nivell subespecífic té prioritat el epítet *balearicum* (Pigantii 1955) front al epítet *majoricum*, combinat a nivell subespecífic per Malagarriga el 1972 (dins de *L. auriculae-ursifolium*) o per Bolòs et al. l'any 1990 (dins de *L. girardianum*).

En opinió dels autors d'aquest informe aquesta darrera decisió seria desafortunada, doncs dins de l'eponimia dels *Limonium* de Balears ja existeix l'epítet *balearicum* i mouria a la confusió innecessària. Per tant es recomana utilitzar el nivell específic per a les poblacions artanenques prèviament adscrites a *L. majoricum* o *L. gymnesicum*, amb el nom de *L. majoricum* Pignatii.

ii) A quina espècie s'han d'adscriure les poblacions de Cap pinar i el Torrent de Son Bauló?

Els diferents genotips que presenten les poblacions de cap Pinar i el Torrent de Son Bauló respecte del que s'ha detectat a les costes artanenques indica que malgrat la gran semblança morfològica que tenen, hi ha hagut fenòmens biològics que han actuat sobre aquestes dues poblacions. Presentem dues hipòtesis de treball: és possible que els exemplars del Cap Pinar presentin antigues introgressions o hibridacions amb *L. minutum*, molt abundant a l'indret a on creix *L. gymnesicum*, i les diferències genètiques trobades en siguin constància d'aquest fet.

Altrament, és possible que s'hagin produït mutacions somàtiques que hagin afectat a les parts dels genomes analitzats. Donat que l'objectiu del treball no era aprofundir en la identitat taxonòmica de les poblacions de *L. gymnesicum*, no podem assegurar a hores d'ara quin és l'origen d'aquesta divergència genètica. Tot i això preferim incloure també a aquestes poblacions dins del concepte que presentem de *L. majoricum*, si bé recalcant que presenta una constitució genètica diferent de les poblacions artanenques. La inclusió d'aquestes poblacions dins de *L. majoricum* no distorsiona de cap manera el seu concepte morfològic d'espècie.

iii) En l'estat actual de coneixements té algun sentit biològic o taxonòmic la protecció de la població del Molí d'en Regalat?

Independentment de que considerem *L. majoricum* en sentit restrictiu (és a dir, endemisme de la costa artanenca) o bé en sentit ample (és a dir, incloent totes les poblacions de la badia d'Alcudia i la de Pollença), ens trobem davant una espècie estenòcora i que és endèmica de Mallorca, que té poblacions disjunctes, amb relativament pocs efectius i sotmeses a un greu perill per l'alteració i destrucció

del seu hàbitat, força restringit. Per aquestes raons, creiem que no és distorsionar gens ni mica els arguments que presentem en aquest informe, si avalem la protecció efectiva de la població present al Molí d'en Regalat com a part d'una espècie endèmica de Mallorca, diferenciada genèticament a les costes d'Artà i que es troba en un perill d'extinció no imminent.

Aquesta solució que proposem, que *L. majoricum* existeix com a espècie (encara que ja no és exclusiva del Molí d'en Regalat), que aquesta espècie és endèmica i que el seu genotip artanenc és diferent del present a altres poblacions de la costa nord de Mallorca, evitaria problemes de comunicació amb l'entorn social artanenc i amb els promotors immobiliaris en el cas de que simplement es digués que *L. majoricum* ja no és exclusiu d'aquesta localitat. Alhora, i donat que el nom de *L. majoricum* apareix com a espècie inclosa als catàlegs nacionals de protecció i al Llibre Vermell de la flora espanyola editat per Gómez Campo (1987), la nostra proposta evitaria la seva eliminació radical d'aquests llistats. Simplement s'haurien de recalificar el seu grau d'amenaça.

iv) Quina és la millor manera de preservar la població de *L. majoricum* present al Molí d'en Regalat?

Opinem que la població del Molí d'en Regalat hauria de tenir una doble protecció, in situ i ex situ. Per la ex situ recomanem la recol·lecció de llavors i emmagatzematge a bancs de germoplasma, com a mesures mínimes. Donat el caire apomíctic de l'espècie no és necessari la recol·lecció de granes de molts d'individus. Teòricament, la propsecció de els granes d'un sol individu bastaria per preservar el *pool* gènic predominant de l'espècie.

Tanmateix som conscients de que la utilització de tècniques de DNA *fingerprinting* més resolutives (AFLP), però molt més costoses i de més difícil interpretació que no han estat aplicades en aquest estudi, podrien revelar l'existència d'alguns genotips rars dins dels *L. majoricum* de la costa artanenca que no han estat detectats a aquest estudi. Per això, potser fora convenient una recollida de llavors d'almenys 50 individus. La selecció d'aquests individus es suggereix que sigui a l'atzar ja que no hi ha cap raó que indiqui l'existència d'estructuració poblacional genètica ni clines a escales microgeogràfiques.

La preservació ex situ hauria de tenir present:

a) l'eliminació radical de totes les espècies al·lòctones presents a la parcel·la,

b) control (i si s'escau, eliminació) de les poblacions de faneròfits i camèfits no estrictament halòfits però que viuen perfectament dins de la parcel·la,

c) control de la població de *L. virgatum* que conviu amb *L. majoricum*. Aquesta espècie és una de les que presenta més potencial hibridogen a les Balears i podria donar lloc a híbridacions no desitjades. Actualment no s'han detectat exemplars intermedis entre aquestes dues espècies, ni els exemplars analitzats mostren genotips que combinin les característiques d'ambdues espècies.

v) És recomanable la translocació d'exemplars que se vagin a destruir durant les processos de construcció?

Es recomana que, si així és el cas, els exemplars es re-ubiquin dins de la mateixa població o que, alternativament, s'incorporin a la col·lecció de plantes vives del Jardí Botànic de Sóller. No es recomana la translocació a altres poblacions de *L. majoricum*, malgrat tinguin el mateix genotip. La raó és que en tota la costa hi ha varies espècies de saladines que viuen juntes i l'increment en el nombre d'individus d'una espècie no implica necessàriament cap garantia de preservació de la seva individualitat genètica. Tal i com s'ha posat de manifest a la introducció, tot i que molts de *Limonium* siguin apomíctics això no exclou que tinguin una certa sexualitat residual que permet els processos d'hibridació.

9. Referències bibliogràfiques

Aimé S, Roiron P (1985) Les espèces vivaces du genre *Limonium* en Oranie (Algérie) I. Taxonomie et répartition. *Candollea* 40: 409-424.

Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.

Arrigoni PV, Diana S (1993) Contribution à la connaissance du genre *Limonium* en Corse. *Candollea* 48: 631-677.

Artelari R (1989a) Biosystematic study of the genus *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Aegean area (Greece), I. Some *Limonium* species from the Kikladhes islands. *Willdenowia* 18: 399-408.

Artelari R (1989b) Biosystematic study of the genus *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Aegean area (Greece), II. *Limonium hierapetrae* Rech. fil. from Kriti island. *Webbia* 43: 33-40.

Artelari R (1989c) *Limonium creticum* (Plumbaginaceae), a new species from Kriti island (Aegean sea) Greece. *Candollea* 44: 415-421.

Artelari R (1992) Reports 51-55. In: Kamari G, Felber F, Garbari F (eds.), Mediterranean chromosome number reports 2. *Flora Mediterranea* 2: 229-232.

Artelari R, Kamari G (1986) A kariological study of ten *Limonium* species (Plumabginaceae) endemic in the Ionian area. *Willdenowia* 15: 497-513.

Baker HG (1953) Dimorphism and monomorphism in the Plumbaginaceae II. Pollen and stigmata in the genus *Limonium*. *Ann. Bot.* 17: 433-455.

Baker HG (1966) The evolution, functioning and breakdow of heteromorphic incompatibility systems. I The Plumbaginaceae. *Evolution* 20: 349-368.

Bocquet G (1980) La differentiation des taxons méditerranéens et la crise de salinité du Miocene. In: *La mise en place, l'évolution et la caractérisation de la flore et de la végétation circumméditerranéennes*, Colloque Fondation Emberger, 2: 1-26. Montpellier.

Bocquet G, Widler B, Kiefer H (1978) The Messinian model. A new outlook for the floristics and systematics of the Mediterranean area. *Candollea* 33: 269-287.

Bolòs O, Vigo J (1995) *Flora dels Països Catalans*. Vol. 3. Ed. Barcino, Barcelona.

Brullo S, Pavone P (1981) Chromosome numbers in the sicilian species of *Limonium* Miller (Plumbaginaceae). *Anales Jard. Bot. Madrid* 37: 535-555.

Bryan GJ, McNicoll J, Ramsay G, Meyer RC, De Jong WS (1999) Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 859-867.

Cardona Ma, Contandriopoulos J (1977) L'endemisme dans les flores insulaires Méditerranéennes. *Mediterranea* 2: 49-77.

Cardona Ma, Contandriopoulos J (1979) Endemism and Evolution in the islands of the Western Mediterranean. In: Bramwell (ed.), *Plants and Islands*: 133-169. Academic Press. London.

D'amato F (1940a) Apomissia in *Statice oleaefolia* Scop. var. *confusa* Godr. *N. Giorn. Bot. Ital.* 47: 504.

D'amato F (1940b) Contributo all'embriologia delle Plumbaginaceae Godr. *N. Giorn. Bot. Ital.* 47: 349-382.

D'amato F (1949) Triploidia e apomissia in *Statice oleaefolia* Scop. var. *confusa* Godr. *Caryologia* 2: 71-84.

Dawson HJ (1990) Chromosome numbers in two *Limonium* species. *Watsonia* 18: 82-84.

Diana S (1995) Variabilità cariologica in *Limonium bonifaciense* Arrigoni et Diana (Plumbaginaceae). *Boll. Soc. Sarda. Sci. Nat.* 30: 531-544.

Dolcher T, Pignatti S (1967) Numeri cromosomici di alcune specie mediterranee del genere *Limonium*. *N. Giorn. Bot. Ital.* 101: 294-295.

Dolcher T, Pignatti S (1971) Un'ipotesi sull'evoluzione dei *Limonium* del bacino mediterraneo. *N. Giorn. Bot. Ital.* 105: 95-107.

Doyle J, Doyle JJ (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

Dyer RJ, Sork VL (2001) Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Molecular Ecology* 10: 859-866.

Erben M (1978) Die Gattung *Limonium* im südwestmediterranen Raum. *Mitt. Bot. Staatssamml. München* 14: 361-626.

Erben M (1979) Karyotype differetiation and its cosequences in Mediterranean *Limonium*. *Webbia* 34: 409-417.

Erben M (1988) Bemerkungen zur Taxonomie der Gattung *Limonium*. IV. *Mitt. Bot. Staatssamml. München* 27: 381-406.

Erben M (1989) Bemerkungen zur Taxonomie der Gattung *Limonium* V. *Mitt. Bot. Staatssamml. München* 28: 313-417.

Erben M (1993) *Limonium* . In: Castroviejo S. et al. (eds.). *Flora Iberica*. Vol.. 3. Real Jardín Botánico-C.S.I.C. Madrid.

Greuter W, Burdet HM, Long G (1989) *Med-Checklist*. Vol. 4. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève. Genève.

Gitzendanner MA, Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783-792.

Gugerli F, Senn J, Anzidel M, Madaghiele A, Büchler U, Sperisen C, Vendramin GG (2001) Chloroplast microsatellites and mitochondrial nad1 intron 2 sequences indicate congruent phylogenetic relationships among Swiss stone pine (*Pinus cembra*), Siberian stone pine (*Pinus sibirica*), and Siberian dwarf pine (*Pinus pumila*). *Molecular Ecology* 10: 1489-1497.

Ibáñez O, Calero C, Mayol M, Rosselló JA (1999) Isozyme uniformity in a wild extinct insular plant, *Lysimachia minoricensis* J.J. Rodr. (*Primulaceae*). *Molecular Ecology* 8: 813-817.

Ingrouille MJ, Stace CA (1985) Pattern of variation of agamospermous *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Brititsh Isles. *Nord. J. Bot.* 5: 113-125.

King LM, Schaal BA (1990) Genotypic variation within asexual lineages of *Taraxacum officinale* (Compositae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 998-1002.

Langercrantz U, Ellegren H, Andersson L (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research* **21**: 1111-1115.

Llorens L (1986a) Revisión sistemático-taximétrica del género *Limonium* Miller en la isla de Mallorca. *Lazaroa* 8: 11-68.

Llorens L (1986b) El género *Limonium* Miller en la isla de Formentera. *Lazaroa* 8: 69-83.

Marshall HD, Newton C, Ritland K (2002) Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics* 104: 367-378.

McGlaughlin M, Karoly K, Kaye T (2002) Genetic variation and its relationship to population size in reintroduced populations of pink sand verbena, *Abronia umbellata* subsp. *breviflora* (Nyctaginaceae). *Conservation Genetics* 3: 411-420.

Palme AE (2002) Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology* 11: 1769-1779.

Pavlik BC, Nickent DL, Howald A (1993) The recovery of an endangered plant. I. Creating a new population of *Amsinckia grandiflora*. *Conservation Biology* 7: 510-526.

Pignatti S (1955) I Limonium della flora balearica. *Arch. Bot. (Forlí)* 31: 66-100.

Pignatti S (1972) *Limonium* in: Tutin TG et al. (eds.) *Flora Europaea* 3: 38-50. Cambridge University Press. Cambridge.

Powell W, Morgante M, Doyle JJ, McNicol JW, Tingey SV, Rafalski AJ (1996) Genepool variation in genus *Glycine* subgenus *Soja* revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites. *Genetics* 144: 793-803.

Provan J (2000) Novel chloroplast microsatellites reveal cytoplasmic variation in Arabidopsis thaliana. *Molecular Ecology* 9: 2183-2185.

Provan J, Corbett G, McNicol JW, Powell W (1997) Chloroplast DNA variability in wild and cultivated rice (Oryza spp.) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Genome* 40: 104-110.

Richards AJ (1996): Genetic variability in obligate apomicts of the genus *Taraxacum. Folia Geobot. Phytotax*. 31: 405-414.

Richardson BA, Brunsfeld SJ, Klopfenstein NB (2002) DNA from bird-dispersed seed and wind-disseminated pollen provides insights into postglacial colonization and population genetic structure of whitebark pine (*Pinus albicaulis*). *Molecular Ecology* 11: 215-227.

Rossello JA, Sáez L, Carvalho A (1998) *Limonium carvalhoi* (Plumbaginaceae) a new endemic species from the Balearic Islands. *Anales Jard. Bot. Madrid* 56: 23-31.

Sáez L, Carvalho A, Rosselló JA (1998) *Limonium marisolii* L. Llorens (Plumbaginaceae) revisited. *Anales Jard. Bot. Madrid* 56: 23-31.

Saghai-Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and populations dinamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 5466-5470.

Schemske DW, Husband BC, Ruckelshaus MH, Goodwillie C, Parker MI, Bishop JG (1994) Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology* 75: 584-606.

Segarra JG, Palop M, González-Candelas F, Catalán P (2003) Characterization of 10 trinucleotide microsatellite loci in the critically endangered Pyrenean yam *Borderea chouardii* (Dioscoriaceae). *Molecular Ecology Notes* 3: 265-267.

Senior ML, Heun M (1993) Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36: 884-889.

Soliva M, Widmer A (1999) Genetic and floral divergence among sympatric populations of *Gymnadenia conopsea* s.l. (Orchidaceae) with different flowering phenology. *International Journal of Plant Sciences* 160: 897-905.

Weising KW, Gardner RC (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dycotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.

Annex de fotografies

© de les fotografies: els autors



Foto 1a. Exemplars tipus (isòtips) de *L. majoricum* presents a l'herbari Garcias Font i dipositats a la Societat d'Història Natural de Balears. Cap d'aquesta morfologia és present a la població del Molí d'en Regalat, però sí a la del Caló dels Cans, d'on es va descriure *L. gymnesicum*.



Foto 1b. Exemplars tipus (isòtips) de *L. majoricum* presents a l'herbari Garcias Font i dipositats a la Societat d'Història Natural de Balears. Cap d'aquesta morfologia és present a la població del Molí d'en Regalat, però sí a la del Caló dels Cans, d'on es va descriure *L. gymnesicum*.



Foto 2. Variabilitat morfològica dels individus atribuïts a *L. majoricum* de la població del Molí d'en Regalat. Aspecte típic dels exemplars més desenvolupats.



Foto 3. Variabilitat morfològica dels individus atribuïts a *L. majoricum* de la població del Molí d'en Regalat. Aspecte típic dels exemplars menys desenvolupats i que tenen una certa semblança amb formes de *L. minutum*, el qual no ha estat observat dins de la zona d'estudi del Molí d'en Regalat.



Foto 4. Variabilitat morfològica dels individus atribuïts a *L. majoricum* de la població del Molí d'en Regalat. Aspecte típic dels exemplars menys desenvolupats, que creixen sobre els sols esquelètics i que tenen una certa semblança amb formes de *L. minutum*, el qual no ha estat observat dins de la zona d'estudi del Molí d'en Regalat.



Foto 5. Mateix exemplar que el mostrat a la foto anterior (Molí d'en Regalat). Detall de les fulles.



Foto 6. Mateix exemplar que el mostrat a la foto anterior (Molí d'en Regalat). Detall de la inflorescència i flors.



Foto 7. Exemplar de *L. gymnesicum* provinent de la localitat typus (Caló dels Cans). La seva macromorfologia és indistingible dels atribuïts a *L. majoricum* presents al Molí d'en Regalat i reflexats a les fotografies anteriors.



Foto 8. Variabilitat morfològica de *L. gymnesicum* provinent de la localitat typus (Caló dels Cans). La seva macromorfologia és indistingible dels atribuïts a *L. majoricum* presents al Molí d'en Regalat reflexats a les fotografies anteriors.



Foto 9. Variabilitat morfològica de *L. gymnesicum* provinent de la localitat typus (Caló dels Cans). La seva macromorfologia s'acosta als exemplars tipus de l'herbari Garcias Font (Foto 1a i 1b) i als anotats com a *L. majoricum* presents als herbaris Bonafé i Orell.



Foto 10. Variabilitat morfològica de *L. gymnesicum* provinent de la localitat typus (Caló dels Cans). La seva macromorfologia és indistingible dels atribuïts a *L. majoricum* presents al Molí d'en Regalat.



Foto 11. Variabilitat morfològica de *L. gymnesicum* provinent de la localitat typus (Caló dels Cans). D'un mateix individu apareixen dues morfologies foliars lleugerament diferents pel que fa a la longitud de la fulla i la coloració, així com per la longitud de les inflorescències.



Foto 12. Variabilitat morfològica de *L. gymnesicum* provinent de la localitat typus (Caló dels Cans). D'un mateix individu apareixen dos tipus d'inflorescències: curtes i poc esbrancades (tipus *L. gymnesicum*) i molt més llargues i esbrancades (morfologia semblant al tipus de l'espècie, -veure fotografia 1- i als exemplars anotats com a *L. majoricum* als herbaris de Garcias Font, Bonafé, Orell). Observi's com l'amplària d'algunes de les fulles són indistingibles de les presents al exemplar tipus de *L. majoricum*.



Foto 13. Exemplar de *L. gymnesicum* provinent de la localitat typus (Caló dels Cans) amb la morfologia que no es pot diferenciar de la que presenten els exemplars tipus (Foto 1a i 1b) i als exemplars anotats com a *L. majoricum* als herbaris de Bonafé i Orell. Observi's que el sól es humit i l'exemplar creix entre el roquissar però amb certa acumulació de sól.



Foto 14. Morfologia típica de *L. virgatum* present al Molí d'en Regalat.



Foto 15. Exemplar dels individus de la costa est dels calons del Caló dels Cans. Presenten una morfologia intermitja entre *L. virgatum* (branques esterils, espiguetes corbades, corol.la d'un blau més intens) i *L. minutum* (planta en forma de coixinet, fulles no marcides a la floració, no aspres al tacte, no planes, amb un nervi conspicu a l'anvers de la fulla). Són interpretats com a híbrids entre ambdues espècies.



Foto 16. Exemplars típics de *L. minutum* provinents del Caló dels Cans.