

# MATERIAL I MÈTODES



## 2. Material i mètodes

### 2.1. Tàxons estudiats

En el marc del present treball, s'han estudiat electroforèticament un total de nou tàxons (8 espècies i una subespècie, seguint els criteris de *Flora Iberica*), la majoria de les quals són endèmics d'algun territori dels Països Catalans. Alguns són de distribució molt restringida, com ara *Delphinium pentagynum* subsp. *formenteratum* N. Torres, L. Sáez, Rosselló & C. Blanché, amb una única població a l'illa de Formentera, o *Seseli farrenyi* Molero & J. Pujadas, que només compta amb 3 poblacions en una àrea de menys d'1 km<sup>2</sup>. D'altres en canvi tenen una distribució que ultrapassa de llarg els Països Catalans: aquest és el cas d'*Stachys maritima* Gouan, de distribució pràcticament circum-mediterrània, i *Thymus loscosii* Willk., present a tota la vall de l'Ebre. Alguns dels tàxons estudiats no tenen una taxonomia gens clara (per exemple, alguns autors consideren *Petrocoptis montsiciana* O. Bolòs & Rivas Martínez i *P. pardoii* Pau com a una sola espècie, *Silene pardoii* (Pau) Mayol & Rosselló; Mayol & Rosselló, 1999). En tot cas, en el present treball sempre s'ha seguit la sistemàtica proposada per *Flora Iberica*. Per altra banda, la majoria dels tàxons tenen una càrrega cromosòmica diploide, amb dues excepcions notables, *Thymus loscosii* Willk. i *Delphinium montanum* DC., ambdós tetraploides.

**TAULA 2.1.** TÀXONS ESTUDIATS EN EL MARC DEL PRESENT TREBALL.

Tàxon	Família	Nivell de ploïdia	Àrea geogràfica de la que és endèmic	Nombre de poblacions estudiades
<i>Petrocoptis montsiciana</i> O. Bolòs & Rivas Martínez	<i>Caryophyllaceae</i>	Diploide	Pre-Pirineu català i aragonès	4
<i>Petrocoptis pardoii</i> Pau	<i>Caryophyllaceae</i>	Diploide	Vall del Riu Bergantes (Aragó-País Valencià)	3
<i>Seseli farrenyi</i> Molero & J. Pujadas	<i>Apiaceae</i>	Diploide	Cap de Creus (Alt Empordà, Catalunya)	3
<i>Delphinium pentagynum</i> subsp. <i>formenteratum</i> N. Torres, L. Sáez, Rosselló & C. Blanché	<i>Ranunculaceae</i>	Diploide	Formentera (Illes Balears)	1
<i>Stachys maritima</i> Gouan	<i>Lamiaceae</i>	Diploide	Conca Mediterrània	5
<i>Thymus loscosii</i> Willk.	<i>Lamiaceae</i>	Tetraploide	Vall del Riu Ebre	8
<i>Silene sennenii</i> Pau	<i>Caryophyllaceae</i>	Diploide	Plana de l'Empordà (Alt Empordà, Catalunya)	5
<i>Erodium rupestre</i> (Pourr. ex Cav.) Cadevall	<i>Geraniaceae</i>	Diploide	Pre-Pirineu català i aragonès	5
<i>Delphinium montanum</i> DC.	<i>Ranunculaceae</i>	Tetraploide	Pirineus orientals (Espanya i França)	7

La selecció d'espècies estudiades parteix de criteris emprats en els projectes que han finançat aquesta recerca (REN2000-0829GLO i REN2003-01815). Es tracta d'espècies endèmiques, amenaçades o legalment protegides, de les quals no es disposa d'informació sobre llurs nivells de diversitat genètica i que es trobaven sotmeses a processos de fragmentació de poblacions. Aquesta selecció inclou espècies amb especialització floral baixa, mitjana i alta i diversos nivells de ploïdia, i la seva vulnerabilitat és representativa de la casuística d'hàbitats de tipologia diversa que volíem abastar. Les seves característiques es resumeixen en les fitxes que segueixen.

## *Petrocoptis montsiciana* O. Bolòs & Rivas Martínez

**Família:** *CARYOPHYLLACEAE*

### **Descripció de l'espècie:**

Camèfit, de 10 a 40 cm, amb la base de la tija llenyosa i càudices penjants. Flors pentàmeres i hipògines, amb els pètals rosats i amb les lígules de la corona denticulades. Llavors de 1,4-1,6 mm, amb un estrofiol de 1,5-2 mm.

Pol·linització entomòfila, duta a terme per insectes del gènere *Anthophora* (himenòpters), alguns dípters (*Bombylius* sp.) i lepidòpters (*Macroglossum stellatarum*). Tot i que és una planta autocompatible, rarament es produeix autopol·linització, essent una planta principalment al·lògama (Bosch *et al.*, 2002). És un tàxon diploide de  $2n = 24$  (Fernández-Benito, 1999). Baixa taxa de germinació en condicions experimentals.



### **Àrea de distribució:**

Endemisme del Pre-Pirineu centro-oriental, amb la majoria de les poblacions a Catalunya (comarques de la Noguera, Pallars Jussà i el Solsonès), però amb les localitats més occidentals situades a l'Aragó (Llitera i Baixa Ribagorça).



Àrea de distribució de *Petrocoptis montsiciana*

### **Hàbitat:**

Creix a les esclatxes i fissures de roca calcària en balms, parets i extraploms (roques compactes o més o menys conglomerades), en llocs orientats a soler i protegits de la pluja directa. Marge altitudinal que oscil·la entre els 280 i els 1.200 m.



La Móra Comdal (Solsonès)

## *Petrocoptis pardo* Pau

**Família:** CARYOPHYLLACEAE

### Descripció de l'espècie:

Tàxon amb escassa distinció morfològica de *Petrocoptis montsiciana* (Montserrat & Fernández-Casas, 1990). Pol·linització també entomòfila, principalment per *Apis mellifera* (Sainz *et al.*, 1996). Tot i que no es disposa d'estudis sobre els sistemes reproductius, tot fa indicar que també es tracta d'una planta alògama, com en el cas de *P. montsiciana*. Tàxon diploide de  $2n = 24$  (Merxmüller & Grau, 1968). Taxonòmicament problemàtic, alguns autors consideren que cal unir ambdós tàxons en una sola unitat, *Silene pardo* (Mayol & Rosselló, 1999).

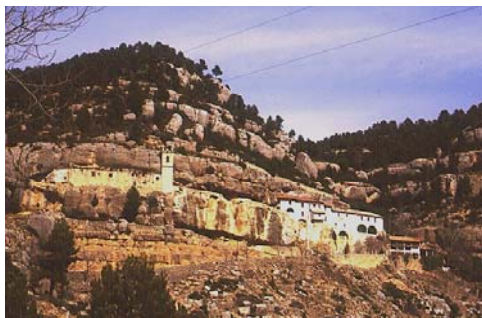
### Àrea de distribució:

Endemisme de la vall del riu Bergants, present en els conglomerats calcaris a banda i banda del riu, en un tram de 18 km de la carretera que uneix Aiguaviva amb Sorita del Maestrat, en el límit de les províncies de Castelló i Terol, encara que la majoria de poblacions cauen a la banda de Castelló.



### Hàbitat:

Creix, de manera anàloga a *P. montsiciana*, a les esclotxes dels conglomerats calcaris, en llocs insolats, en un marge d'altitud que va dels 550 als 850 m.



Santuari de Mare de Déu de la Balma (Maestrat)



El Cantal Badat (Maestrat)

## *Seseli farrenyi* Molero & J. Pujadas

**Família:** APIACEAE

### **Descripció de l'espècie:**

Hemicriptòfit amb roseta basal, de 20-30 cm, que produeix abundants umbel·les compostes. Flors petites de color blanc i fruits ovoides, compostos per mericarps de  $1,2-1,6 \times 2,7-3,3$  mm. És una planta al·lògama autocompatible i de pol·linització entomòfila molt generalista (avispes, petites abelles, formigues, mosques, sírfids, coleòpters, heteròpters; Rovira *et al.*, 2004). Es una espècie monocàrpica, i diploide amb  $2n = 18$  (Fernández-Casas *et al.*, 1979). Alta germinació de les llavors en condicions experimentals.



### **Àrea de distribució:**

Endemisme del cap de Creus, d'on només es coneixen tres nuclis poblacionals situats a l'extrem més septentrional, al tram de costa comprès entre Cala Galladera i Cala Fredosa (Alt Empordà, Catalunya).



### **Hàbitat:**

Creix a les fissures i als replans més o menys inclinats de les roques esquistoses del litoral, sobre sòls lleugerament àcids, en una franja de penya-segat no excessivament a prop de la línia de mar, però sota l'influència directa de l'hàbit marí.



Ses Estenedors, Cap de Creus



***Delphinium pentagynum* subsp. *formenteranium*** N. Torres, L. Sáez, Rosselló & C. Blanché

**Família:** RANUNCULACEAE

**Descripció de l'espècie:**

Hemicriptòfit, de 40-70 cm, que produeix una roseta basal de fulles palmatipartides. Flors blau-violàcies (17-19 mm), en inflorescència racemosa laxa. Llavors subpiramidals, cobertes per esquames estretes. Es diferencia de la subespècie tipus per una inflorescència més laxa i flors més petites. Al·lògama autocompatible, de pol·linització entomòfila. Creixement clonal moderat mitjançant rizomes. Tàxon diploide de  $2n = 16$ .



**Àrea de distribució:**

Endemisme pitiús, amb un únic nucli poblacional (constituït per tres subpoblacions) situat al Torrent de Cala Saona, al sud-oest de l'illa de Formentera. La subespècie tipus es difon pel centre i sud-oest de la península Ibèrica i pel nord d'Àfrica.



**Hàbitat:**

Creix en clarianes de les restes fragmentàries de màquia. També es troba en zones remogudes i marges de camins.



Torrent de Cala Saona (Formentera)

## *Stachys maritima* Gouan

**Família:** LAMIACEAE

### **Descripció de l'espècie:**

Hemicriptòfit pubescent, d'entre 10 i 30 cm, erecta o ascendent, amb una roseta de fulles persistent. Inflorescències formades per verticil·lastres de 4-6 flors, amb corol·la d'un groc pàl·lid. Espècie diploide, de  $2n = 34$  trobat a les poblacions ibèriques (Cerrillo, 2002), el mateix nombre cromosòmic que en d'altres territoris de l'extrem est de l'àrea de distribució (Aydin, 1978; Koeva-Todorovska, 1988; Baltisberger, 1991). Pol·linització entomòfila, mitjançant petits himenòpters que realitzen vols curts. Encara que és autocompatible, el sistema principal de reproducció és l'al·logàmia (C. Blanché, com. pers.). Existeix també una limitada reproducció vegetativa mitjançant creixement rizomatós.



### **Àrea de distribució:**

Conca mediterrània, distribuïda en una àrea més o menys contínua des de les costes del nord-est ibèric fins a Albània, encara que també pot trobar-se a les costes del mar Negre (Bulgària i Romania), de Còrsega i del nord d'Àfrica (Algèria i Tunísia). A la península Ibèrica, distribuïda a les platges del golfs de Pals i Roses (Girona) i a les dunes fòssils de Torroella de Montgrí.



### **Hàbitat:**

Creix a les sorres marítimes, preferiblement a les dunes o a les sorres més fixades de la rereduna; sol defugir la primera línia.



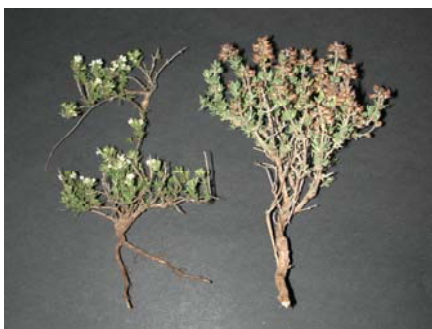
Gola del Ter



Platja de la Rovina

***Thymus loscosii* Willk.****Família:** LAMIACEAE**Descripció de l'espècie:**

Camèfit, de 9-10 (15) cm, que fa abundants branques estoloníferes. Inflorescències formades per verticils de 2-6 flors, petites, blanquinoses i zigomorfes. Fruit en núcula de  $0,4 \times 1,1$  mm, de color bru clar. És una espècie ginodioica i de pol·linització entomòfila (principalment per *Apis mellifera*); l'autopol·linització és rara, tot i que es tracta d'una espècie autocompatible (Orellana *et al.*, 2004). Presenta reproducció vegetativa per estolons. És tetraploide de  $2n = 4x = 54$  (Morales, 1986). Baixa germinació de les llavors en condicions experimentals. Localment produeix híbrids amb *Thymus vulgaris*, *T. zygis* i *T. mastichina* (Blanché *et al.*, 2002).

**Àrea de distribució:**

Endemisme de la conca del riu Ebre, amb nombroses poblacions localitzades en diferents Comunitats Autònomes de l'Estat Espanyol (Castella-Lleó, País Basc, La Rioja, Navarra, Aragó i Catalunya).

**Hàbitat:**

Creix en formacions vegetals obertes, com ara timonedes, clarianes de matolls, espartars i brolles, en un gradient altitudinal que oscil·la entre 130 i 1010 m. Mostra preferència pels sòls carbonatats, salins o guixencs, poc evolucionats i de consistència tova (margues).



La Granadella (Garrigues)



## *Silene sennenii* Pau

**Família:** CARYOPHYLLACEAE

### Descripció de l'espècie:

Hemicriptòfit que anualment produeix nombroses tiges floríferes, que assoleixen de 15 a 80 cm. Les flors són proteràndriques, agrupades en dicasis, amb la corol·la de color blanc o rosa pàl·lid. Els pètals (7-9 mm) es repleguen durant les hores de màxima insolació. El període de floració es tardà (entre agost i octubre), amb una elevada producció de fruits i grans, però que contrasta amb una pobre observació de plàntules al camp. Pol·linització entomòfila. Espècie diploide de  $2n = 24$  (J. Font, com. pers.).



### Àrea de distribució:

Endemisme restringit a 5 poblacions localitzades a la plana de l'Empordà, molt a prop de Figueres (Alt Empordà, Catalunya).



Àrea de distribució de *Silene sennenii*

### Hàbitat:

Creix exclusivament en fenassars (*Brachypodium phoenicoides*), comunitat en la majoria de casos associada als marges dels camps de cultiu, talussos i, excepcionalment, en cultius abandonats.



Riu Manol (Alt Empordà)

## *Erodium rupestre* (Pourr. ex Cav.) Cadevall

**Família:** GERANIACEAE

### **Descripció de l'espècie:**

Camèfit, de menys de 20 cm, amb fulles basals d'un color grisenc a l'anvers, amb indument constituït per nombrosos pèls rectes i curts, mentre que el revers és de color verd viu i gairebé glabre. Flors de color rosa pàl·lid, pentàmeres i actinomorfes, i molt sovint amb els pètals amb una taca fosca central. La pol·linització és entomòfila i altament inespecífica, duta a terme per un ampli ventall de petits insectes. Encara que és autocompatible en condicions experimentals, a la natura es mostra exclusivament al·lògama (Álvarez, 2003; Álvarez *et al.*, 2004). És una espècie diploide de  $2n = 20$  (Guittonneau, 1965). Amb una taxonòmica controvertida, plena de nombrosos canvis, al capítol de *Geraniaceae* a *Flora Iberica* (Aldasoro & Sáez, en premsa) recupera el grau d'espècie i es clarifica la seva corologia, criteri que adoptem en aquest treball.



### **Àrea de distribució:**

Endemisme de distribució exclusiva a la Muntanya de Montserrat i en algunes serres del Pre-Pirineu català i aragonès.



### **Hàbitat:**

Creix a les esquerdes de les roques calcàries i conglomerats, però també sobre replans i terrenys rocallosos amb una petita cobertura de sòl, en un interval d'altituds que oscil·la entre 900 i 1.600 m.



Sant Romà de la Clusa (Berguedà)

***Delphinium montanum* DC.**

**Família:** RANUNCULACEAE

**Descripció de l'espècie:**

Hemicriptòfot, de 15-50 (70) cm, amb fulles palmades i palmatisectes. Produeix una roseta basal i 15-20 flors en inflorescència racemosa; cada planta pot arribar a produir fins a 30 inflorescències. Flors blaves (23-33 cm), amb un esperó de 11-15 mm que conté nèctar. Llavors subpiramidals, negres, llises i alades, de 2.5-3.5 × 1.75-3.0 mm. Espècie bàsicament alògama, de pol·linització entomòfila (sobretot per *Bombus hortorum*; Simon *et al.*, 2001). Dormància observada en condicions naturals (Bosch, 1999). Les parts aèries rebroten al juny, i floreix al juliol i a l'agost. Espècie tetraploide de  $2n = 4x = 32$  (Blanché, 1991).



**Àrea de distribució:**

Endemisme dels Pirineus orientals, amb poblacions tant a la banda francesa com a l'espanyola, als massissos del Cadí, Puigmal i Madres.



**Hàbitat:**

Creix en terrenys rocosos, sobretot tarteres, sobre substrat calcari, en un interval d'alçades comprès entre els 1.600 i els 2.200m.



Bastanist (Cerdanya)

## 2.2. L'electroforesi d'isoenzims

### 2.2.1. Material vegetal

Per tal de portar a terme l'electroforesi d'isoenzims (esquematzada a la Figura 2.1), podem utilitzar material procedent de qualsevol part de la planta, sempre i quan presenti suficient activitat enzimàtica. Els teixits vegetals més emprats són fulles, juvenils o adultes, i llavors, encara que alguns autors també han assajat amb branques, arrels, flors, pol·len i antereres (Kephart, 1990), i fins i tot amb material d'herbari (Ranker & Werth, 1986). Sigui quin sigui el material vegetal escollit, cal tenir en compte que les diferents mostres estiguin en les mateixes condicions fisiològiques i ontogèniques (Wendel & Weeden, 1989). Al nostre laboratori sempre s'han utilitzat fulles procedents de la recol·lecció directa al camp de poblacions naturals, constatant empíricament que les fulles joves presenten més activitat enzimàtica que no pas les velles, fet àmpliament reportat a la literatura (Kephart, 1990): així doncs, és recomanable triar les primeres per optimitzar la visualització de les bandes. El teixit foliar presenta una sèrie d'avantatges a l'hora de portar a terme l'electroforesi d'isoenzims: (i) el mostratge de fulles no representa cap perjudici per a la conservació de l'espècie, atès que la quantitat de teixit que requerim per a la realització dels experiments és mínima; és tracta doncs, d'un mètode conservatiu (Bosch, 1999); i (ii) l'interval fenològic en què podem recollir les mostres és molt més ampli que per a d'altres teixits, com per exemple les granes, que solament poden recollir-se en determinades èpoques de l'any.

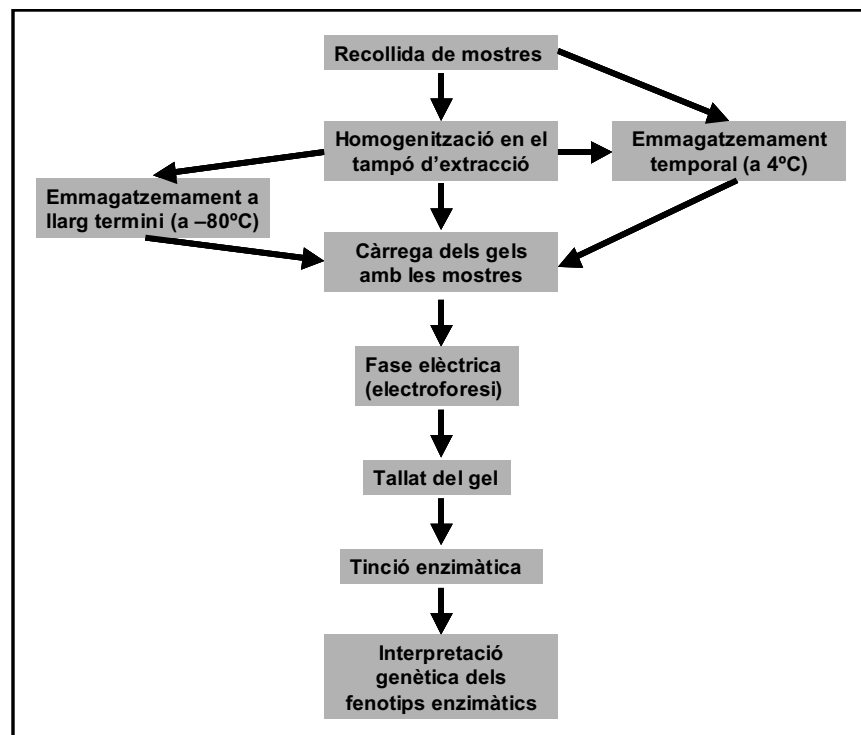


FIGURA 2.1. FASES DE L'ELECTROFORESI D'ISOENZIMS.

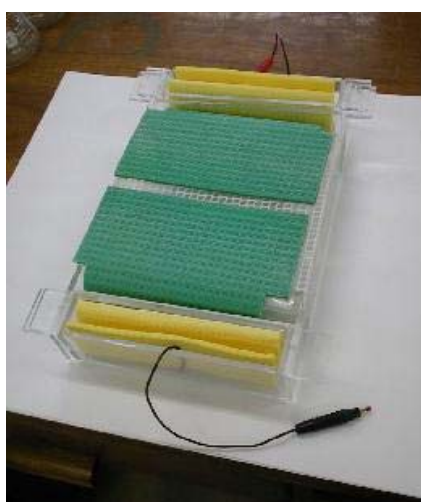


Les llavors, tot i ser un material que resol molt bé per a alguns sistemes enzimàtics, presenten una sèrie d'inconvenients, com ara que en algunes espècies són massa petites, que fa que la quantitat de mostra sigui insuficient per tal d'obtenir una bona visualització dels enzims. Per altra banda, la utilització de grans suposa la destrucció de l'individu potencial, fet que xoca amb la mateixa filosofia de la conservació d'espècies vegetals (Bosch, 1999).

Les fulles que recollim (aproximadament 0,5 g) es dipositen dins de sobres de paper (preferiblement bosses de plàstic perquè protegeixen la mostra de la humitat), perfectament retolats, i són transportades immediatament al laboratori on es guarden en refrigeració (4°C) fins al moment de començar l'electroforesi. Si aquesta no es porta a terme en un termini màxim de 2-3 dies, no es recomana guardar en el congelador, atesos els resultats negatius reportats nombrosos investigadors (cf. Kephart, 1990) i la nostra propia experiència (desactivació d'alguns enzims, com ara l'aconitasa). Un cop realitzada l'extracció dels enzims, els extractes sí que cal guardar-los al congelador a -80°C, per a garantir la seva conservació a llarg termini.

### 2.2.2. Aparell d'electroforesi

Per a realitzar els nostres experiments hem utilitzat un aparell (Figura 2.2) que consta de quatre cubetes de metacrilat (dues i dues a cada banda) unides per un suport horitzontal on s'hi col·loca posteriorment el gel (construït per Ecogen<sup>R</sup>). Les dues cubetes més interiors contenen aigua destil·lada, amb la finalitat de preservar el gel de la dessecació durant l'electroforesi (actuen com a refrigerants de la calor despresada durant el procés). A les dues cubetes exteriors, que contenen els dos elèctrodes (l'ànode i el càtode), s'hi aboca el tampó d'elèctrode. Els dos elèctrodes estan connectats a una font d'alimentació (model Consort E455, Bèlgica; Figura 2.3), en la qual podem regular el voltatge i la intensitat.



**FIGURA 2.2.** APARELL D'ELECTROFORESI.



**FIGURA 2.3.** FONT D'ALIMENTACIÓ.

### 2.2.3. *Elaboració del gel*

Hi ha diversos tipus de suports per a la separació electroforètica de proteïnes: gels de midó (SGE), de poliacrilamida (PAGE) i d'agarosa (AGE), i també es poden utilitzar membranes d'acetat de cel·lulosa. La missió del suport electroforètic és la de proveir una matriu on les posicions dels extractes proteïnics de la planta són posteriorment analitzades mitjançant tincions enzim-específiques. Els gels d'agarosa i les membranes d'acetat de cel·lulosa donen una resolució més aviat pobre, el que fa que siguin poc utilitzats en electroforesi d'isoenzims (Wendel & Weeden, 1989). Els gels de poliacrilamida en canvi sí que presenten un gran poder de resolució. Els gels de midó, però, continuen éssent els més utilitzats, tot i el poder superior de resolució dels gels de poliacrilamida, per les següents raons: simplicitat en la seva preparació, baixa toxicitat dels materials usats, despeses relativament baixes, facilitat a l'hora de carregar les mostres, i sobretot la possibilitat d'assajar diversos sistemes enzimàtics en un mateix gel, ja que pot tallar-se en diferents capes o "llesques" (Wendel & Weeden, 1989). A més, els gels de midó proporcionen una matriu en la qual els seus porus tenen una mida similar a la de les proteïnes, creant una mena de "sedàs" molecular que incrementa la resolució de la separació proteïnaica (Kephart, 1990).

En el present treball hem utilitzat únicament gels de midó. Per l'elaboració dels tampons de gel i d'elèctrode, s'han seguit les recomanacions de diferents autors (Pedrola, 1993; Caujapé-Castells, 1995; Bosch, 1999), adaptant-les a les condicions de treball del Laboratori de Botànica de la Facultat de Farmàcia. A la Taula 2.3 s'esquematitzen les condicions òptimes d'electroforesi i les característiques dels tampons de gel i d'elèctrode utilitzats per als diferents enzims habitualment assajats. Els gels es solen preparar a partir de 27 g de midó en pols (Sigma Starch potato, St. Louis), amb el qual, un cop barrejat amb 250 ml del tampó de gel corresponent a l'enzim que volem resoldre (Taula 2.3) obtindrem una concentració final del gel dels voltants del 10-11%, que ens assegura una consistència adequada. Per tal de procedir a la preparació d'un gel, el midó en pols s'aboca en primer lloc en un matràs kitasato. A continuació afegim al kitasato entre 1/3 i 1/4 part de la solució de tampó de gel que haurem preparat prèviament, i agitem enèrgicament fins a obtenir una suspensió homogènia. La resta del tampó de gel l'aboquem a un erlenmeyer i ho escalfem fins a ebullició. Seguidament, es vessa el contingut de l'erlenmeyer sobre el kitasato (que no hem deixat d'agitar en cap moment), punt en què hem d'observar la formació del gel (col·loide). Ara el kitasato s'escalfa uns segons a la placa calefactora per tal de fluidificar-lo una mica, i a continuació es connecta a una bomba de buit (Ulvac-Sinku Kiku, model DA-15D) per eliminar bombolles d'aire que hagin pogut quedar al sí del gel. Ara només ens resta abocar la massa gelatinosa en un motlle de vidre, que tindrà les mides adequades per a desenvolupar-hi posteriorment l'electroforesi, i es deixa refredar entre 12 i 16 hores a temperatura ambient (habitualment es prepara la tarda anterior al dia de l'experiment; Kephart, 1990; Murphy *et al.*, 1996), tapant-la amb una placa de vidre (també pot posar-s'hi un full de plàstic) per evitar-ne la dessecació.

### 2.2.4. *Extracció i càrrega de mostres*

Un dels passos més importants en tota la mecànica de l'electroforesi d'isoenzims és l'extracció de proteïnes de la mostra vegetal. Es recomana que el tampó d'extracció es prepari amb una antelació mínima de 12 hores (Bosch, 1999), i no s'hauria d'utilitzar passada una

setmana des del moment de la seva elaboració, perquè perd activitat (Kephart, 1990). La composició dels tampons hauria de dependre de la quantitat de compostos del metabolisme secundari i d'altres inhibidors enzimàtics de la planta que estem analitzant (Kephart, 1990; Sosa *et al.*, 2002). L'homogenització dels teixits vegetals durant el procés d'extracció anul·la la compartimentació subcel·lular, la qual cosa pot posar en contacte els enzims amb diverses substàncies interferents, d'entre les quals la més important són els fenols (Murphy *et al.*, 1996). Tot i això, hi ha d'altres substàncies que també poden interactuar amb els enzims, com ara terpens, pectines, resines, cumarines i fins i tot pigments de tipus carotenoide (Loomis, 1974; Kephart, 1990). Aquests compostos apareixen gradualment durant el desenvolupament de la planta, i per tant la seva concentració a les etapes juvenils és menor; és recomana doncs la utilització d'individus joves per a la realització dels experiments (Sosa *et al.*, 2002). La polivinilpirrolidona (PVP) és potser el reactiu químic més efectiu per a reduir les interaccions entre fenols (i les quinones, que deriven dels fenols per oxidació d'aquests) i proteïnes. D'altres antioxidants emprats en l'extracció són el ditiotretol, l'àcid ascòrbic i el metabisulfit de sodi i el mercaptoetanol (Kephart, 1990). Els tensioactius, com el Triton X-100 i d'altres, s'utilitzen per a afavorir l'alliberament dels enzims de les membranes cel·lulars (Kephart, 1990).

Per a l'estudi isoenzimàtic dels diferents tàxons tractats en aquest treball, s'han emprat diferents tampons d'extracció, la composició dels quals es detalla a la Taula 2.2. El tampó més utilitzat és el que al nostre laboratori anomenem "clàssic", atesa la seva alta versatilitat. D'altres tampons ocasionalment emprats han estat: (i) un tampó específic per a espècies del gènere *Thymus*, emprat pel Centre d'Ecologia Funcional i Evolutiva del CNRS (*Centre National de la Recherche Scientifique*) de Montpellier (Tarayre & Thompson, 1997; Tarayre *et al.*, 1997); (ii) un tampó específic per a teixits amb una alta quantitat de substàncies interferents (Wendel & Weeden, 1989), i (iii) un d'específic per al gènere *Pinus* (Cheliak & Pitel, 1984), que va donar resultats acceptables per a *Erodium rupestre*. La determinació del tampó d'extracció, així com la composició dels tampons de gel (pH, concentració, etc), és una tasca particularment complexa i, de vegades, lenta, com adverteixen Soltis & Soltis (1989). En el nostre cas, la fixació de les condicions experimentals per a *Petrocoptis* va requerir fins a 89 experiments previs, mentre que per a *Thymus loscosii*, es van arribar a fer 103 assaigs previs.

L'extracció es fa triturant mostres foliars fresques, aproximadament entre 0,25 i 0,50 g, en uns 100-200 µl del tampó d'extracció (depenent de la espècie vegetal i de les condicions de turgència de la mostra), utilitzant gresols de porcellana i una mà de morter. Cal molturar fins a l'alliberació total dels enzims del teixit vegetal. Els enzims un cop extrets són molt termolàbils, i per tant és recomanable fer la trituració i l'homogenització de les fulles (procés que desprèn força calor) amb els gresols sobre una capa de gel picat. Un cop obtinguts els extractes, aquests poden centrifugar-se per eliminar restes cel·lulars. Si la càrrega del gel no és fa immediatament, cal guardar els extractes a la nevera (4°C) com a màxim durant unes hores; en cas contrari s'emmagatzemarà en congelador a -80°C en tubs eppendorf numerats. Les mostres que carreguem al gel estan impregades en tires de paper de filtre *Whatman* núm. 3, de 8×3 mm, que es submergeixen en la solució extractiva un cop finalitzada l'homogenització. Cal eixugar les tires amb paper absorbent per tal d'eliminar restes foliars i l'excedent d'extracte, per tal d'evitar posteriors problemes de difusió de les mostres durant l'electroforesi.

**TAULA 2.2.** COMPOSICIÓ DELS DIFERENTS TAMPONS D'EXTRACCIÓ EMPRATS AL NOSTRE LABORATORI.

<p>1. TAMPÓ "CLÀSSIC" (Bosch, 1999):</p> <p>50 ml de solució tris 0,05 M – àcid cítric 0,07 M</p> <p>0,05 g de cisteïna-HCl</p> <p>0,05 g d'àcid ascòrbic</p> <p>4 g de polivinil-pirrolidona (PVP-40)</p> <p>100 µl de 2-mercaptoetanol</p>
<p>2. TAMPÓ PER A <i>THYMUS</i> (Tarayre &amp; Thompson, 1997; Tarayre <i>et al.</i>, 1997):</p> <p>50 ml de solució de tris 0,011 M, ajustada a pH 7,6 amb HCl</p> <p>2 g de tioglicolat sòdic</p> <p>1 g de polietilenglicol (PEG)</p> <p>4 g de polivinil-pirrolidona (PVP-40)</p>
<p>3. TAMPÓ PER A TEIXITS AMB MOLTES SUBSTÀNCIES INTERFERENTS (Wendel &amp; Weeden, 1989):</p> <p>50 ml de solució de tris 0,011 M, ajustada a pH 7,5 amb HCl</p> <p>3,5 g de sacarosa</p> <p>5 g de polivinil-pirrolidona (PVP-40)</p> <p>2,2 g d'àcid ascòrbic</p> <p>0,17 g de dietilditiocarbamat</p> <p>0,5 g d'albumina sèrica bovina (BSA)</p> <p>0,19 g de metabisulfit sòdic</p> <p>3,81g de tetraborat sòdic</p> <p>1 ml de Triton X-100</p> <p>1 g de polietilenglicol (PEG)</p> <p>0,1 g de MgCl<sub>2</sub></p> <p>77 mg de ditiotreitòl</p> <p>400 µl de 2-mercaptoetanol</p>
<p>4. TAMPÓ PER A <i>PINUS</i> (Cheliak &amp; Pitel, 1984)</p> <p>50 ml de solució de tris 0,011 M, ajustada a pH 6,7 amb HCl</p> <p>4 g de polivinil-pirrolidona (PVP-40)</p> <p>5,13 g de sacarosa</p> <p>9,3 mg de EDTA</p> <p>3,8 mg de ditiotreitòl</p> <p>8,8 mg d'àcid ascòrbic</p> <p>50 mg d'albumina sèrica bovina (BSA)</p> <p>11,5 mg de NADP</p> <p>13,7 mg de NAD</p> <p>2,6 mg de piridoxal-5-fosfat</p> <p>0,33 ml de 2-mercaptoetanol</p>

Per a passar a la fase de càrrega de les mostres, el gel de midó (que s'ha d'haver refrigerat a 4 °C entre una i dues hores abans de la sembra, per agafar la temperatura de treball) s'ha de tallar, perpendicularment a la seva dimensió més llarga, en dues parts asimètriques (una aproximadament el doble que l'altra) que separem uns centímetres per procedir a la càrrega o sembra de les mostres. Les tires de paper es dipositen verticalment on hem fet el tall, i en un dels extrems en posem una que es mulla amb solució de blau de bromofenol en el lloc d'extracte, que actuarà com a indicador de la mobilitat del front. A continuació tornarem a unir els dos fragments del gel.



### 2.2.5. Electroforesi

El gel, sense retirar-lo del seu motlle, es col·loca al suport horitzontal de l'aparell d'electroforesi. Cal omplir les dues cubetes exteriors (cadascuna de les quals conté un elèctrode) amb el tampó d'elèctrode (solució ionitzada que condueix el corrent elèctric a través del gel durant l'experiment) corresponent, solució que prèviament ha d'haver estat en refrigeració entre una i dues hores. Es reparteixen 400 ml de solució de tampó d'elèctrode entre les dues cubetes, i s'assegura el contacte entre el tampó d'elèctrode i el gel amb una esponja, que cobreix part del gel. Els elèctrodes es connecten a la font d'alimentació, i s'apliquen les condicions elèctriques corresponents al tipus de gel que hàgim preparat (Taula 2.3). Aquest punt marca l'inici de la primera fase de l'electroforesi, interval de temps en què els enzims migren des de les tiretes de paper fins al gel. Una vegada ha transcorregut la primera fase, s'atura el corrent, es retiren les tiretes, netegem la zona de tall de restes d'extracte, i tornem a aplicar el corrent amb les condicions elèctriques corresponents (Taula 2.3), per tal que comenci la segona fase. Com que durant la primera fase el gel de midó s'ha contret una mica a causa de la dessecació, potser caldrà posar una vareta de vidre en un dels extrems del motlle, per a garantir el contacte entre les dues parts del gel. Tota la fase elèctrica s'ha de portar a terme en refrigeració (idealment en una nevera condicionada per a l'experiment).

**TAULA 2.3.** CARACTERÍSTIQUES DELS DIFERENTS GELS EMPRATS EN EL NOSTRE LABORATORI.

Gel	pH	Tampó de gel	Tampó d'elèctrode	Condicions elèctriques
Histidina-citrat	5,7	L-histidina (base lliure) 0,009 M, ajustat a pH 5,7 amb àcid cítric monohidrat 0,3 M	Tris 0,13 M, àcid cítric monohidrat 0,04 M, ajustat a pH 5,7 amb tris o àcid cítric	1ª fase: 150 V, 40 mA, 0,3 h 2ª fase: 200 V, 40 mA, 3 h
Morfolina-citrat	6,1	Àcid cítric monohidrat 0,016 M, ajustat a pH 6,1 amb N-(3-aminopropil)-morfolina	Àcid cítric monohidrat 0,04 M, ajustat a pH 6,1 amb N-(3-aminopropil)-morfolina	1ª fase: 150 V, 20 mA, 0,3 h 2ª fase: 200 V, 30 mA, 3 h
Borat de liti	8,2	Tris 0,03 M, àcid cítric anhidre 0,005 M, àcid bòric 0,03M, ajustat a pH 8,2 amb LiOH	Àcid bòric 0,26 M, ajustat a pH 8,2 amb LiOH	1ª fase: 150 V, 30 mA, 0,4 h 2ª fase: 300 V, 40 mA, 4 h
Tris-citrat	7,0	Àcid cítric monohidrat 0,004 M ajustat a pH 7,0 amb tris 0,61 M	Àcid bòric 0,3 M, ajustat a pH 7,0 amb NaOH	1ª fase: 150 V, 40 mA, 0,3 h 2ª fase: 300 V, 40 mA, 3 h
Tris-citrat	8,2	Tris 0,015 M, ajustat a pH 8,2 amb àcid cítric monohidrat 0,3 M	Àcid bòric 0,3 M, ajustat a pH 8,2 amb NaOH	1ª fase: 150 V, 40 mA, 0,3 h 2ª fase: 300 V, 40 mA, 4 h
Histidina	7,0	DL-histidina monohidratada 0,005 M, ajustat a pH 7,0 amb NaOH	Tris 0,13 M, àcid cítric monohidrat 0,04 M, ajustat a pH 7,0 amb tris o àcid cítric	1ª fase: 150 V, 40 mA, 0,3 h 2ª fase: 200 V, 40 mA, 3 h

La càrrega neta de les proteïnes (cal recordar que aquestes són *zwitterions* –és a dir, tenen una part carregada positivament i una negativament-), i per tant la seva migració dins el camp elèctric del gel, dependrà del pH del sistema tampó (tampó de gel més tampó d'elèctrode). Aquesta varia segons el pH, en funció del seu punt isoelèctric (pI). Per sota del seu pI, els grups amino de les proteïnes adquireixen càrrega positiva i migraran envers el pol negatiu (càtode); per

damunt del seu  $pI$ , el grup carboxil es carrega negativament i les proteïnes migraran envers el pol positiu (ànode). Si el  $pH=pI$ , la proteïna és elèctricament neutra i no migra. La mida i la conformació de les proteïnes també afecten a la seva migració en un camp elèctric, depenent de la mida del porus de la matriu del gel. La velocitat de migració d'una proteïna sobre una matriu electroforètica s'incrementa amb la càrrega neta i disminueix amb el pes molecular; aquests dos factors permetran la seva separació i posterior visualització (Murphy *et al.*, 1996).

### 2.2.6. Tallat del gel

Un cop finalitzada l'electroforesi, hem de tallar el gel transversalment, obtenint diferents capes a mode de "llesques", cadascuna de les quals ens permetrà fer una tinció específica per a un enzim determinat. Per tal de procedir al tallat del gel, aboquem aquest sobre una base de metacrilat, que als vèrtexs té quatre pivots on hi encaixem unes làmines de plàstic de 1 mm o bé 1,5 mm de gruix, de manera que quedi una làmina a cada costat del gel. Per tallar el gel, s'utilitza una serra de marqueteria on s'ha substituït la fulla per una corda de guitarra tensada. La corda es fa lliscar sobre les dues làmines de plàstic, seccionant el gel en capes que tindran un gruix de 1 mm o 1,5 mm depenent del gruix de les làmines. Per a portar a terme les tincions quasi sempre són més adequades les capes inferiors, ja que els enzims descriuen una trajectòria curvilínia lleugerament descendent; és per aquesta raó que se sol rebutjar la capa superior (Kephart, 1990). El terç inferior del gel (des de la línia de sembra cap avall) es sol rebutjar atès que només alguns enzims (com la peroxidasa) migren en direcció catòdica.

### 2.2.7. Tincions enzimàtiques

Els enzims no són visibles sobre el gel perquè es troben a concentracions molt baixes, però poden visualitzar-se mitjançant tincions específiques per a cadascun. Els enzims es poden tenyir perquè catalitzen específicament alguna reacció bioquímica. Si afegim els substrats de l'enzim, podrem visualitzar-lo sobre el gel mitjançant un sistema adequat (habitualment un colorant –que formarà precipitats acolorits en les zones d'activitat enzimàtica- o bé una substància que emeti fluorescència) per algun dels productes de la reacció enzimàtica. Les solucions de tinció que fem es preparen segons el protocol de la Taula 2.4, basades en les proposades per Shields *et al.* (1983), Vallejos (1983) i Wendel & Weeden (1989). El protocol de tinció per l'enzim SORDH s'ha extret de Van Treuren *et al.* (1991). Els enzims es poden designar pel seu nom col·loquial i abreviatura habitual, però també indiquem el seu nom sistemàtic proposat per la *International Union of Biochemistry* (IUB, 1984), i la numeració acordada per la *Enzyme Commission* (EC) (Taula 2.4).

Per procedir a la tinció de les diferents capes del gel de midó, cal submergir cadascuna d'elles en la solució de tinció específica segons l'enzim que ens interessi visualitzar. Es fan servir unes cubetes de metacrilat rectangulars (Ecogen<sup>®</sup>) amb dues cel·les comunicades entre sí, que permet fer una tinció determinada simultàniament a dues capes de gel de midó, abocant-hi 100 ml de solució de tinció. El temps d'incubació depèn de cada tinció en particular, però generalment està al voltant dels 10-20 minuts (Kephart, 1990). Durant aquest període, les cubetes es posen a l'estufa a 40-60°C, a temperatura ambient o a les fosques depenent del protocol de cada tinció (Taula 2.4). Un cop ha transcorregut el temps d'incubació, rentem les

cubetes amb aigua, amb molta cura per tal de no trencar les llesques, amb la finalitat d'aturar la reacció enzimàtica.

**TAULA 2.4.** PROTOCOLS DE TINCIÓ PER ALS ENZIMS ASSAJATS.

<b>AAT o GOT / Aspartat amino-transferasa o Glutamat oxalacetat transaminasa / L-Aspartat:2-oxoglutarat amino-transferasa / EC 2.6.1.1</b>	
Tampó GOT*	100 ml
Piridoxal-5P	10 mg
Fast Blue	200 mg
*Tampó GOT: Està compost per Tris 0,1 M, àcid cetoglutàric i àcid aspàrtic, ajustat a pH 8,0 amb HCl. La solució de tinció és fotosensible, cal fer la mescla ràpidament i de seguida col·locar a la foscor. No cal escalfar.	
<b>ACO / Aconitasa / Citrat (isocitrat) hidrolasa / EC 4.2.1.3</b>	
Tris 0,1 M	100 ml
MTT	20 mg
NADP	8 mg
PMS	5 mg
MgCl <sub>2</sub>	5 ml
Àcid cis-aconític	60 mg
IDH	13,5 mg (70 U)
Cal escalfar la solució de tinció.	
<b>ACP / Fosfatasa àcida / Monoester-ortofosfòric fosfohidrolasa / EC 3.1.3.2</b>	
Na- $\alpha$ -naftil àcid fosfat	100 mg
Fast Garnet	100 mg
Aigua destil·lada	92 ml
Sol. fosfatasa àcida	5 ml
MgCl <sub>2</sub>	2 ml
La solució de tinció és fotosensible, cal fer la mescla ràpidament i de seguida col·locar a la foscor. No cal escalfar.	
<b>ADH / Alcohol deshidrogenasa / Alcohol; NAD<sup>+</sup> òxido-reductasa / EC 1.1.1.1</b>	
Tris 0,1 M	100 ml
MTT	10 mg
NAD	20 mg
PMS	5 mg
MgCl <sub>2</sub>	5 ml
Alcohol etílic	7 ml
Cal escalfar la solució de tinció.	
<b>AMP / Aminopeptidasa / <math>\alpha</math>-Aminoacil-pèptid-hidrolasa / EC 3.4.11.1 (inclou el LAP, v. més avall)</b>	
Tris 200 mM – Maleat 200 mM (pH 3,7)	40 ml
NaOH 0,2 N	30 ml
H <sub>2</sub> O	30 ml
MgCl <sub>2</sub>	2 ml
L-leucil- $\beta$ -naftilamina-HCl	40 mg
N,N-dimetilformamida	4 ml
Fast Black	40 mg
Dissoldre els tres primers ingredients. Dissoldre la L-leucil- $\beta$ -naftilamina-HCl amb N,N-dimetilformamida; afegir aquesta última solució amb la resta de reactius a la solució inicial. Cal escalfar la solució de tinció.	

**CAT / Catalasa / Peròxid d'hidrogen:peròxid d'hidrogen òxido-reductasa / EC 1.11.1.6**

Solució A:

Tiosulfat sòdic 60 mM	30 ml
Peròxid d'hidrògen 3 %	70 ml

Solució B:

Iodur potàssic 90 mM	100 ml
Àcid acètic	0,5 ml

Incubar 30 segons a la solució A. Es decanta i s'afegeix la solució B. Tinció negativa.

**DIA / Diaforasa / NAD(P)H: (acceptor) òxido-reductasa / EC 1.6.99.-**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	20 mg
NADH	20 mg
2,6-dicloroindofenol	4 mg

Cal escalfar la solució de tinció.

**ENP / Endopeptidasa / EC 3.4.-.-**

Tris 200 mM – Maleat 200 mM (pH 3,7)	50 ml
NaOH 0,2 N	20 ml
H <sub>2</sub> O	30 ml
MgCl <sub>2</sub>	2 ml
α-N-benzoil-DL-arginina- β-naftilamida·HCl	50 mg
N,N-dimetilformamida	4 ml
Fast Black	40 mg

Dissoldre els tres primers ingredients. Dissoldre la α-N-benzoil-DL-arginina-β-naftilamida·HCl amb N,N-dimetilformamida; afegir aquesta última solució amb la resta de reactius a la solució inicial. Cal escalfar la solució de tinció.

**EST / Esterasa / - / EC 3.1.1.-**

Tampó fosfat pH 6,3	100 ml
Alfa-naftil acetat	50 mg
Fast Black	100 mg

L'alfa-naftil acetat es dissol en 2 ml d'acetona i s'afegeix al tampó fosfat. És una reacció lenta.

**FDH / Format deshidrogenasa / Format; NAD+ òxido-reductasa / EC 1.2.1.2**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	20 mg
NAD	20 mg
PMS	4 mg
Àcid fòrmic*	100 mg

\*Àcid fòrmic: es prepara en Tris 50 mM i s'ajusta el pH a 8,0 amb HCl. Cal escalfar la solució de tinció.

**FUM / Fumarat hidratasa (≡ Fumarasa) / (S)-Malat hidro-liasa / EC 4.2.1.2**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	20 mg
NAD	20 mg
PMS	4 mg
Àcid fumàric	400 mg
Malat deshidrogenasa	0,08 ml (400 U)

No cal escalfar.



**GDH / Glutamat deshidrogenasa / L-Glutamat:NAD<sup>+</sup> òxido-reductasa (desaminant) / EC 1.2.1.2**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	30 mg
NAD	30 mg
PMS	9 mg
MgCl <sub>2</sub>	2 ml
Àcid L-glutàmic	400 mg

Cal escalfar la solució de tinció.

**GAL / β-galactosidasa / β-D-galactòsid galactohidrolasa / EC 3.2.1.23**

Tampó Na-fosfat 100 mM (pH 6,0)	100 ml
β-naftil-β-D-galactopiranòsid	50 mg
Fast Garnet	100 mg

Dissoldre el β-naftil-β-D-galactopiranòsid amb una mica d'acetona.

**GLU / β-glucosidasa / β-D-glucòsid glucohidrolasa / EC 3.2.1.21**

Tampó Na-fosfat 50 mM (pH 6,5)	100 ml
6-bromo-2-naftil- β-D-glucopiranòsid	100 mg
Fast Blue BB	100 mg
PVP-40	2 g

Cal escalfar la solució de tinció.

**IDH / Isocitrat deshidrogenasa / Isocitrat:NAD(P)<sup>+</sup> òxido-reductasa (descarboxilant) / EC 1.1.1.42 (forma NADP); EC 1.1.1.41 (forma NAD)**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	30 mg
NADP	12 mg
PMS	9 mg
MgCl <sub>2</sub>	2 ml
Àcid isocítric	60 mg

Cal escalfar la solució de tinció.

**LAP / Leucina aminopeptidasa / α-Aminoacil-pèptid-hidrolasa / EC 3.4.11.1**

Tampó fosfat pH 6,3	100 ml
L-leucil- β -naftilamida (1%)	5 ml
Fast Black	100 mg

**LDH / Lactat deshidrogenasa / (S)-Lactat:NAD<sup>+</sup> òxido-reductasa / EC 1.1.1.27.**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	20 mg
NAD	20 mg
PMS	4 mg
Àcid làctic	100 mg

Cal escalfar la solució de tinció.

**MDH / Malat deshidrogenasa / (S)-Malat:NAD<sup>+</sup> òxido-reductasa / EC 1.1.1.37**

Tris 0,1 M	75 ml
MTT	15 mg
NAD	15 mg
PMS	4 mg
Solució L-malat	25 ml (Àcid màlic ajustat a pH 7,5 amb NaOH)

Cal escalfar la solució de tinció.

**ME / Enzim màlic / (S)-Malat:NADP<sup>+</sup> òxido-reductasa (oxalacetat descarboxilant) / EC 1.1.1.40**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	10 mg
NADP	8 mg
PMS	6 mg
MgCl <sub>2</sub>	2 ml (Àcid màlic ajustat a pH 7,5 amb NaOH)
Àcid L-màlic	500 mg

Cal ajustar la solució de tinció a pH 8,0 amb NaOH. Cal escalfar la solució de tinció.

**6PGD / Fosfogluconat deshidrogenasa / 6-fosfo-D-gluconat:NADP<sup>+</sup> 2-òxido-reductasa (descarboxilant) / EC 1.1.1.44**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	20 mg
NADP	8 mg
PMS	6 mg
Àcid-6-fosfogluconic	30 mg

Cal escalfar la solució de tinció.

**PGI / Fosfoglucoisomerasa / D-Glucosa-6-fosfat cetol-isomerasa / EC 5.3.1.9**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	20 mg
NAD	8 mg
PMS	6 mg
Fructosa-6-P	20 mg
Glucosa-6-P-DH	4 mg (30 U)

Cal escalfar la solució de tinció.

**PGM / Fosfoglucomutasa /  $\alpha$ -D-Glucosa 1,6-fosfomutasa / EC 5.4.2.2**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	20 mg
NADP	8 mg
PMS	6 mg
MgCl <sub>2</sub>	2 ml
Glucosa-1-P	25 mg
Glucosa-6-P-DH	4 mg (30 U)

Cal escalfar la solució de tinció.

**PRX / Peroxidasa / Donador:peròxid d'hidrogen òxido-reductasa / EC 1.11.1.7**

Solució A:

Solució de peroxidasa	5 ml
Peròxid d'hidrògen 3 %	1 ml
Aigua destil·lada	94 ml

Solució B:

N,N-dimetilformamida	3 ml
3-amino-9-etilcarbazol	50 mg

Les solucions A i B es barregen immediatament abans de la tinció. Cal escalfar la solució de tinció.

**RBC / Ribulosa bifosfat-carboxilasa (Rubisco) / 3-Fosfo-D-glicerat-carboxilasa (dimeritzant) / EC 4.1.1.39.**

Amido Black 50 mg

Solució fixadora:

Metanol	182 ml
Aigua destil·lada	182 ml
Àcid acètic	36 ml

Mesclar l'Amido Black amb ¼ de fixador i deixar 15-30 minuts. Rentar 3 cops amb ¼ de fixador, deixant 15 minuts entre cada rentada. No escalfar.

**SKD / Xiquimat deshidrogenasa / Xiquimat:NADP<sup>+</sup> 3-òxido-reductasa / EC 1.1.1.25**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	20 mg
NADP	8 mg
PMS	6 mg
MgCl <sub>2</sub>	2 ml
Àcid xiquímic	30 mg

**SOD / Superòxid dismutasa / Superòxid:superòxid òxido-reductasa / EC 1.15.1.1**

Tris 0,1 M	100 ml
Riboflavina	4 mg
EDTA	2 mg
NBT	20 mg

Escalfar la solució de tinció 30 min. Tinció negativa.

**SORDH / L-iditol 2-deshidrogenasa (≡ Sorbitol deshidrogenasa) / L-iditol:NAD 2-òxido-reductasa / EC 1.1.1.14**

Tris 0,1 M (pH 8,1)	100 ml
Sorbitol	250 mg
NAD	40 mg
MTT	10 mg
PMS	2 mg
Pirazol	100 mg
Piruvat sòdic	100 mg

**TPI / Triosa-fosfat isomerasa / D-gliceraldehid-3-fosfat cetol-isomerasa / EC 5.3.1.1**

Tris 0,1 M	100 ml
MTT	20 mg
NAD	20 mg
PMS	4 mg
Àcid arsènic	150 mg
Dihidroxiacetona-fosfat	20 mg
Gliceraldehid-3-fosfat-Deshidrogenasa	8,5 mg (600 U)

Col·locar a la foscor. No cal escalfar.

### 2.2.8. Interpretació dels gels

Un cop obtenim el zimograma (el patró de bandes del gel) es disposa sobre un rectangle de vidre blanc per a fer-li una fotografia (càmera reflex Nikon F-401X; càmera digital Nikon Coolpix 990) i dibuixar la interpretació. Els negatius fotogràfics de tots els assajos realitzats es conserven al nostre laboratori. Hi ha d'altres autors, en canvi, que fixen i posteriorment dessequen les llesques dels gels per tal de conservar-les (Wendel & Weeden, 1989; Torres, 1999; Murphy *et al.*, 1996). A l'hora d'interpretar el patró de bandes, que de vegades és força complicat, cal establir un sistema de nomenclatura per a definir els al·lells i els *locus* isoenzimàtics (gens). Per a interpretar-lo, dividim el zimograma perpendicularment a la direcció del front en les diferents zones o regions d'activitat que apareixin per a un determinat sistema enzimàtic. Cada regió, que correspon a un isoenzim determinat, s'anomena amb l'abreviatura habitual de l'enzim (Taula 2.4) en majúscules, seguida d'un número, en el cas que aparegui més d'una regió d'activitat (per exemple, MDH-1). Es comença a numerar per les regions d'activitat més anòdiques, que correspondran als isoenzims de migració més ràpida. Els *locus* isoenzimàtics (la interpretació genètica dels isoenzims) es designen amb l'abreviatura habitual de l'enzim però ara en minúscules i cursiva, seguida del número corresponent (p.e. *Mdh-1*). Al zimograma, a més, en cadascun dels isoenzims o regions d'activitat es poden diferenciar diferents al·loenzims o polipèptids. Aquestes formes fenotípiques s'anomenen amb majúscules per ordre alfabètic a partir del més anòdic (p.e. A, B,...). La interpretació genètica dels al·loenzims són els al·lells, que es designen amb minúscules en cursiva, per ordre alfabètic a partir del més anòdic (per exemple, *a,b,c,...*).

Com hem comentat, un dels aspectes més importants de l'electroforesi d'isoenzims és la possibilitat que els zimogrames s'interpretin en termes genètics (*loci* isoenzimàtics i al·lells). D'aquesta manera, a partir del patró de bandes que obtenim per a un enzim determinat (el fenotip), es pot obtenir el genotip per a aquest enzim realitzant una senzilla interpretació. El fenotip electroforètic que visualitzem per a un determinat enzim pot variar molt en la seva complexitat, podent obtenir des d'una sola banda fins a patrons de 15 bandes o més. El nombre de bandes que s'observa en un gel depèn d'una sèrie de factors, essent els més determinants (vegeu Taula 2.5): (i) el nombre de gens (*loci*) que codifiquen per a l'enzim, (ii) el seu estat al·lèlic (homozigot o heterozigot), (iii) l'estructura quaternària de la proteïna, i (iv) la seva compartimentació subcel·lular (Wendel & Weeden, 1989). El nivell de ploïdia de l'espècie que estem estudiant també afectarà al nombre de bandes que apareguin sobre el gel. Els poliploïdes, per norma general, presentaran més bandes que les espècies diploïdes. El nombre de *loci* que codifiquen per a un determinat enzim i la seva localització subcel·lular són característiques que solen estar conservades d'una espècie a una altra; desviacions en el nombre d'isoenzims solen respondre a processos de duplicació o poliploïdia (Gottlieb, 1982).

El cas més simple és l'aparició d'una única banda al gel, que s'interpreta com un individu homozigot per a un determinat gen. En el cas d'individus heterozigots, el patró de bandes varia segons l'estructura quaternària de l'enzim. Si es tracta d'un enzim monomèric, apareixen dues bandes, però si l'enzim és dimèric, apareixen tres bandes, dues corresponents als 2 al·lells diferents (els homodímers) i una banda "híbrida" intermèdia (heterodímer). En el cas dels enzims tetramèrics, apareixen fins a 5 bandes pels individus heterozigots: els dos homotetràmers i tres heterotetràmers. L'associació a l'atzar de les subunitats de l'enzim conformant proteïnes multimèriques resulta en quantitats desiguals de cada tipus de molècula, que resulta en una desigual intensitat de tinció de les bandes. La intensitat de tinció ve donada pels coeficients de



l'expansió binomial  $(A+B)^n$ , on A i B són els polipèptids corresponents a l'al·lel  $a$  i  $b$ , i  $n$  és el nombre de polipèptids o subunitats que presenta l'enzim (Wendel & Weeden, 1989).

**TAULA 2.5.** NOMBRE, LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR I ESTRUCTURA QUATERNÀRIA DELS ISOENZIMS PER ALS SISTEMES ENZIMÀTICS HABITUALMENT ASSAJATS EN ESPÈCIES VEGETALS.

Abreviatura	Nom de l'enzim	Nombre d'isoenzims	Localització subcel·lular	Estructura quaternària
AAT (GOT)	Aspartat amino-transferasa	2 (4)	c, p, mc, mt	D
ACO	Aconitasa	1-3	c, mt	M
ACP	Fosfatasa àcida	2-4	variada	M, D
ADH	Alcohol deshidrogenasa	1-3	c	D
ADK	Adenilat quinasa	1-2	c, p	M
ALD	Aldolasa	2	c, p	T
AMP	Aminopectidasa	2-3	c	M
CAT	Catalasa	1	mb	T
DIA	Diaforasa	1-4	c, p, mt	M, T
EST	Esterasa	2-10	c	M, D
FDH	Format deshidrogenasa	1	desconeguda	D
FUM	Fumarasa	1	mt	T
GAL	$\beta$ -galactosidasa	1-3	c, p	M, D
GDH	Glutamat deshidrogenasa	1	c	H
GLU	$\beta$ -glucosidasa	1	c	D
G3PDH	Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa	3	c, p	T
G6PD	Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa	2	c, p	D
HEX	Hexoquinasa	2-3	c, p, mt	M
IDH	Isocitrat deshidrogenasa	1 (2)	c, p	D
LDH	Lactat deshidrogenasa	1	c	T
MDH	Malat deshidrogenasa	3	c, mt, mc	D
ME	Enzim màlic	1	c	T
6PGD	Fosfogluconat deshidrogenasa	2	c, p	D
PGI	Fosfoglucoisomerasa	2	c, p	D
PGM	Fosfoglucomutasa	2	c, p	M
PRX	Peroxidasa	2-13	c, pc	M, D
SKD	Xiguimat deshidrogenasa	1-2	c, p	M
SOD	Superòxid dismutasa	3	c, p, (mt)	D, (T)
TPI	Triosa-fosfat isomerasa	2	c, p	D

Abreviatures: c: citosol; p: plastidis; mt: mitocondris; mc: microcossos, pc: paret cel·lular. M: monòmer; D: dímer; T: tetràmer; H: hexàmer.

Font: Weeden & Wendel (1989); Kephart (1990); Murphy *et al.* (1996).

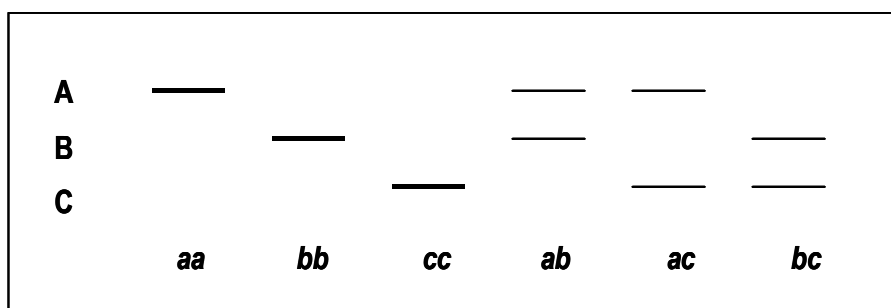
Molts enzims estan codificats per més d'un gen, cas en el qual al gel podem observar diferents isoenzims o regions d'activitat. Si els isoenzims estan localitzats en el mateix compartiment subcel·lular i són de naturalesa polimèrica, els polipèptids codificats pels diferents al·lells es poden combinar a l'atzar formant tota una sèrie de productes multimèrics: els homomultímers, els heteromultímers intragènics, i un nou tipus de producte, els heteromultímers intergènics. En moltes ocasions però, el nombre de bandes observat en el fenotip és inferior a l'esperat, entre d'altres raons per una incompleta resolució electroforètica d'aquestes o per la co-migració d'un o més productes diferents (Wendel & Weeden, 1989). Els heteromultímers intergènics no es formen en el cas que els diferents gens que codifiquen per a un enzim determinat es trobin en diferents compartiments subcel·lulars (Wendel & Weeden, 1989).

Altres fenòmens poden complicar la interpretació dels zimogrames (Wendel & Weeden, 1989; Kephart, 1990). Si els productes enzimàtics no han resolt bé sobre els gels, pot ser que els heterozigots presentin una única banda gruixuda en lloc de les dues o tres bandes que esperariem. Un dels més habituals és que els heteromultímers puguin migrar a posicions que no són intermèdies a les mobilitats dels homomultímers, o fins i tot que migrin fora de l'interval dels homomultímers. Un altre fenomen que pot dificultar la interpretació del patró de bandes d'un individu és l'existència dels anomenats al·lells "nuls", que es manifesten per absència d'activitat enzimàtica; en aquest cas, no podrem diferenciar els homozigots dels heterozigots si la proteïna és monomèrica, mentre que en el cas d'enzims dimèrics i tetramèrics els heterozigots presentaran només dues i quatre bandes, respectivament. Per a alguns enzims i en determinades condicions experimentals, poden aparèixer bandes addicionals que emmascarin les bandes primàries. De vegades la codominància, que sempre se suposa pels isoenzims, no es manifesta; en altres ocasions apareixen bandes addicionals com a conseqüència de modificacions post-traduccionals dels enzims.

A continuació s'esquemmatitzen les bases teòriques per a la interpretació genètica dels patrons de bandes que s'esperen pels casos més habituals, tant per espècies diploides com per al cas de les tetraploides.

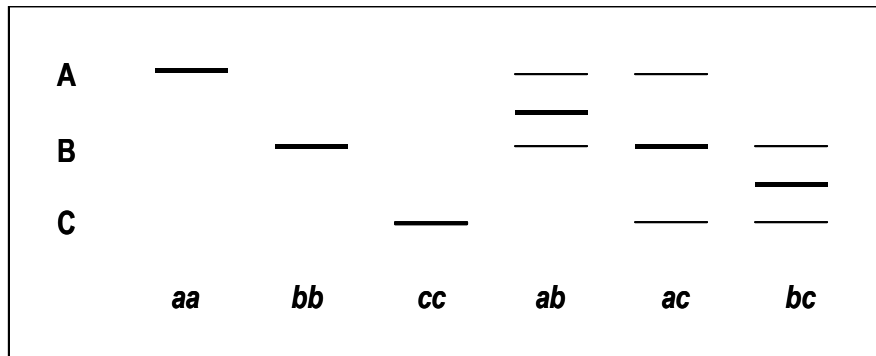
#### ESPÈCIES DIPLOIDES

##### 1. Enzims monomèrics (codificats per un sol gen):



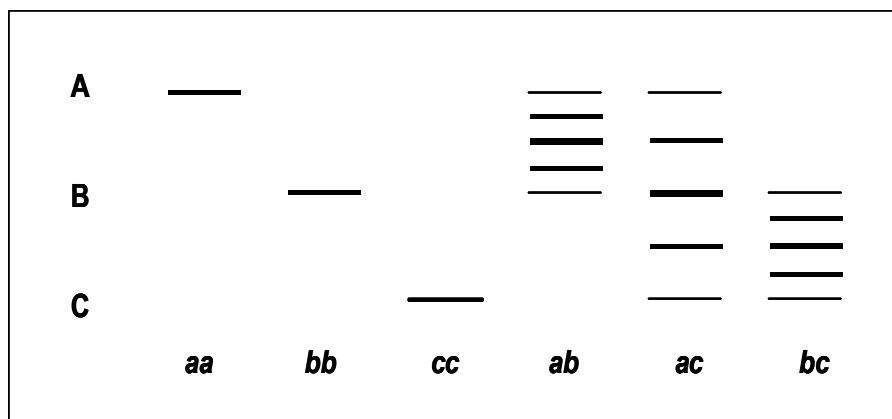
En el diagrama es representa el patró de bandes d'un enzim monomèric per a 6 individus. D'esquerra a dreta, els tres primers individus serien homozigots per a al·lells que codifiquen per un enzim o polipèptid de migració ràpida (A), un de migració intermèdia (B) i un de migració lenta (C). El quart individu és un heterozigot per als dos al·lells més ràpids i per tant presenta un fenotip AB, el cinquè individu és heterozigot per l'al·lel ràpid i el lent (fenotip AC) i el sisè és heterozigot pels dos al·lells més lents (BC). Els genotips dels sis individus serien, d'esquerra a dreta: *aa*, *bb*, *cc*, *ab*, *ac* i *bc*.

2. Enzims dimèrics (codificats per un sol gen):



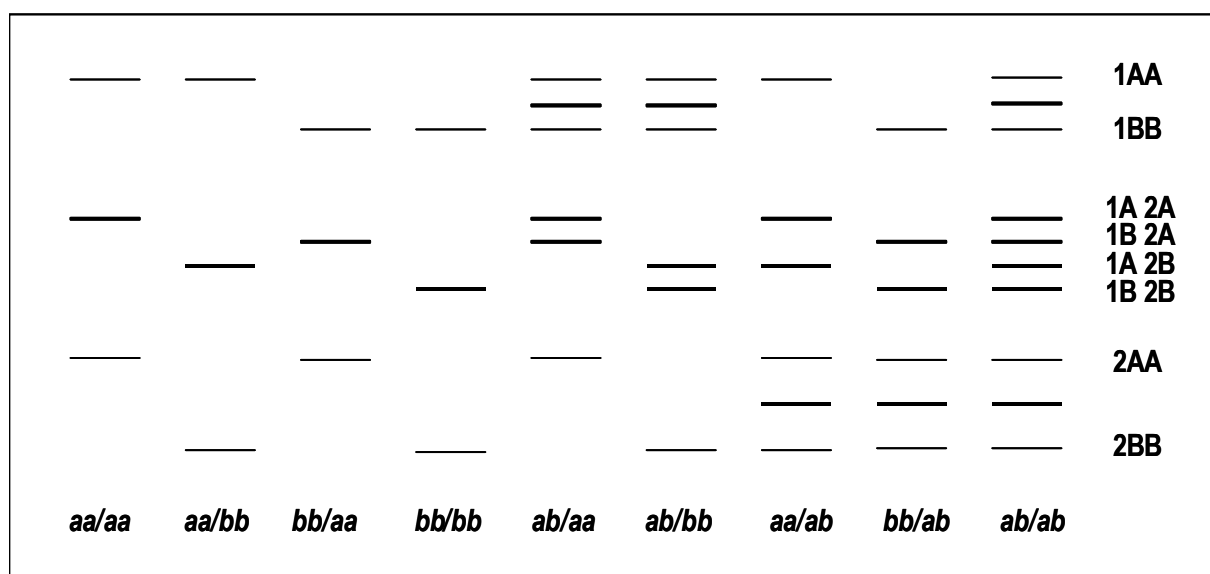
Aquí veiem representat el patró de bandes que s'espera per a un enzim dimèric per a 6 individus. D'esquerra a dreta, els tres primers individus són homozigots per un al·lel ràpid, un d'intermedi i un de lent, respectivament. El quart individu és un heterozigot per als dos al·lels més ràpids i per tant presenta un fenotip AB, el cinquè individu és heterozigot per a l'al·lel ràpid i el lent (fenotip AC) i el sisè és heterozigot per als dos al·lels més lents (AC). Els heterozigots presenten tres bandes i no dues, com a resultat de l'estructura quaternària de l'enzim, que necessita de la combinació de dos polipèptids per a ser actiu. La banda intermèdia és el resultat de la migració d'un heterodímer, compost per un polipèptid codificat per cadascun dels al·lels parentals. Mentre que els homozigots produeixen només un tipus de monòmer (A, B o C) i per tant el dímer que presenta activitat és AA, BB o CC, els heterozigots produeixen dos tipus de monòmers, en el cas del quart individu A i B, la combinació dels quals forma tres dímers actius: AA, AB i BB. La banda de l'heterodímer (AB) es tenyeix amb doble intensitat que les corresponents als homodímers, perquè si atenem que els dímers es formen per la unió a l'atzar de les subunitats, es produeix doble quantitat de l'heterodímer que dels dos homodímers. La intensitat de tinció de les bandes serà doncs 1:2:1. Els genotips dels sis individus serien, d'esquerra a dreta: *aa*, *bb*, *cc*, *ab*, *ac* i *bc*.

3. Enzims tetramèrics (codificats per un sol gen):



D'esquerra a dreta, els tres primers individus serien homozigots per als al·lels ràpid, intermedi i lent, respectivament. El quart individu és un heterozigot per als dos al·lels més ràpids, el cinquè és heterozigot per a l'al·lel ràpid i el lent, i el sisè és heterozigot per als dos al·lels més lents. Els genotips dels sis individus serien, d'esquerra a dreta: *aa*, *bb*, *cc*, *ab*, *ac* i *bc*. Cal notar que els individus heterozigots presenten fins a 5 bandes, amb intensitats relatives de tinció 1:4:6:4:1. Les dues bandes marginals són dels homotetràmers (AAAA i BBBB) i les tres centrals són tres heterotetràmers (AAAB, AABB i ABCC), conseqüència de l'associació a l'atzar de les diferents subunitats.

#### 4. Enzims dimèrics codificats per més d'un gen:



En aquest diagrama s'esquematitza el patró de bandes esperable per a un enzim dimèric i codificat per dos gens, pel que es poden observar dos isoenzims diferents, un que migra més ràpid i un que és de migració més lenta, i que estaran localitzats en el mateix compartiment subcel·lular. A la part superior hi ha l'isoenzim 1 o ràpid, i a la inferior l'isoenzim 2 o lent. Com podem veure, en tractar-se d'un enzim dimèric, es formen heterodímers intragènics per als individus heterozigots, però també s'observa la presència d'heterodímers intergènics en una zona de migració intermèdia als dos isoenzims. Els heterodímers intergènics són resultat de la combinació a l'atzar de les subunitats que conformen els dos isoenzims diferents. D'esquerra a dreta, els 4 primers individus són homozigots per als dos gens, el cinquè i el sisè són heterozigots per a l'isoenzim 1 però homozigots per a l'isoenzim 2, el setè i el vuitè són homozigots per a l'isoenzim 1 i heterozigots per a l'isoenzim 2, i l'últim individu és heterozigot per als dos isoenzims. Tant els heterodímers intergènics com intragènics es tenyeixen amb el doble d'intensitat que els homodímers. Els genotips són, també d'esquerra a dreta, *aa/aa*, *aa/bb*, *bb/aa*, *bb/bb*, *ab/aa*, *ab/bb*, *aa/ab*, *bb/ab* i *ab/ab*. Si els homodímers dels dos isoenzims estan separats la mateixa distància, les bandes corresponents a l'heterodímer 1B2A i 1A2B es solaparien i resultaria una banda amb doble intensitat de tinció.

## ESPÈCIES TETRAPLOIDES

A les espècies tetraploides, i per extensió a les poliploides, el nombre d'isoenzims per sistema enzimàtic augmenta com a conseqüència directa de l'expressió de més d'un genoma (Wendel & Weeden, 1989). Per als enzims formats per la unió de diferents subunitats polipeptídiques, els poliploides poden produir enzims "híbrids" (heteromultímers) que no es troben mai en individus diploides (Messeguer, 1987), el que permet també diferenciar-los d'aquests. Es reconeixen bàsicament dos grans tipus de poliploidia a la natura, l'autopoliploidia i l'al·lopoliploidia (Stebbins, 1947, 1950; Soltis & Rieseberg, 1986, Soltis & Soltis, 2000). L'al·lopoliploidia es pensa que és el resultat d'un procés d'hibridació interespecífica i d'una duplicació cromosòmica (no necessàriament en aquest ordre), mentre que l'autopoliploidia és conseqüència de la duplicació cromosòmica d'un mateix genoma, presumiblement per fusió de gàmetes no reduïts.

Els al·lopoliploides es caracteritzen perquè mostren herència disòmica (es formen bivalents a la meiosi) i heterozigosi fixada (no segregant) degut a la combinació de dos genomes parentals que divergeixen entre ells. Els autopoliploides es caracteritzen perquè mostren herència polisòmica atesa la formació de multivalents a la meiosi, el que resulta en la formació d'heterozigots tant equilibrats com desequilibrats (Soltis & Soltis, 2000). D'aquesta manera, suposant que un *locus* determinat presenti 2 al·lells *a* i *b* en una espècie tetraploide, es poden formar tres tipus d'heterozigots si és autotetraploide: un heterozigot "equilibrat" (*aabb*) i dos heterozigots "desequilibrats" (*aaab* i *abbb*). A més, els autopoliploides poden presentar a la vegada 2, 3 i fins a 4 al·lells en un mateix *locus*, fruit de l'herència tetrasòmica, i per tant produir un ampli ventall d'enzims "híbrids" que no trobarem mai en els al·lopoliploides. De vegades, però, no queda tant clara la distinció a nivell isoenzimàtic d'autopoliploides i al·lopoliploides. Hi ha al·lopoliploides, per exemple, que presenten heterozigots desequilibrats i cap o poca evidència d'heterozigosi fixada, probablement com a conseqüència d'una alta similitud en els genomes parentals i/o d'una desviació respecte el patró estricte d'aparellament de cromosomes homeòlegs durant la meiosi (Prober *et al.*, 1998).

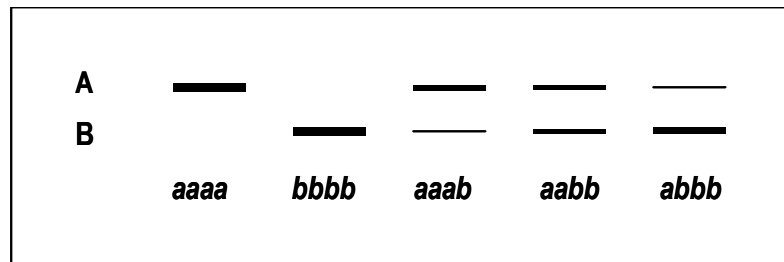
Sigui o no sigui una característica diferencial dels autopoliploides, el que sí que és característic dels poliploides és l'aparició de l'efecte de "dosi al·lèlica" o "dosi gènica" en els individus heterozigots. Prenent com a model un dels casos més senzills de poliploidia, en les espècies tetraploides, l'expressió de cada gen ve determinada per quatre al·lells enlloc de dos -tal i com succeeix als diploides-, algun dels quals pot estar repetit. El nombre de còpies que hi hagi de cada al·lel determinarà la quantitat dels al·loenzims que es formaran de cada tipus, i per tant la intensitat de tinció de les bandes que observarem al gel. Hi ha una sèrie de condicions ideals que permeten l'òptim reconeixement de la dosi al·lèlica en els zimogrames (Messeguer, 1987):

(1) Que cada al·loenzim es tenyeixi amb una intensitat proporcional al nombre de dosis de l'al·lel que el codifica.

(2) Que tots els al·loenzims tinguin la mateixa afinitat per al substrat; és a dir, que produeixin una intensitat de tinció similar a igualtat de dosi al·lèlica.

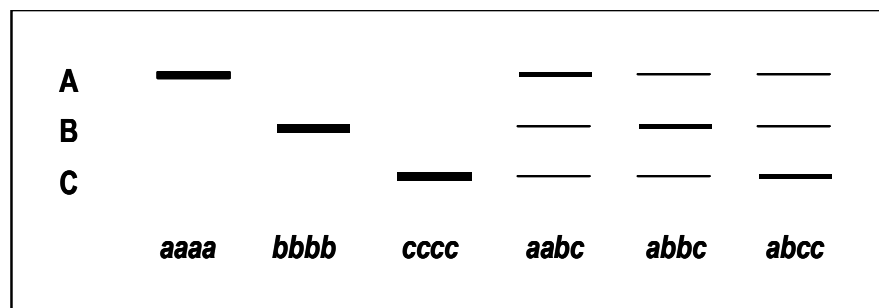
(3) Que en els enzims multimèrics (formats per diferents subunitats polipeptídiques), la quantitat que es produeixi de cada homomultímer o heteromultímer estigui determinada per l'associació a l'atzar de les diferents subunitats polipeptídiques i que, de la mateixa manera, els heteromultímers tinguin la mateixa afinitat per al substrat que els homomultímers.

## 1. Enzims monomèrics (amb 2 al·lells):



En el diagrama hi trobem representat el patró de bandes d'un enzim monomèric. D'esquerra a dreta, els dos primers individus són homozigots per a l'al·lel ràpid i per al lent, respectivament. Els fenotips de dues bandes corresponen als individus heterozigots, i la intensitat de les bandes depèn de la dosi al·lèlica. En els heterozigots equilibrats, la intensitat relativa de tinció de les bandes és 1:1, atès que cadascun dels al·lells presenta la mateixa dosi; en els heterozigots desequilibrats la intensitat relativa de tinció és 3:1, on 3 correspon al polipèptid de 3 dosis i 1, al d'una dosi. Els genotips dels cinc individus són, d'esquerra a dreta: *aaaa*, *bbbb*, *aaab*, *aabb* i *abbb*.

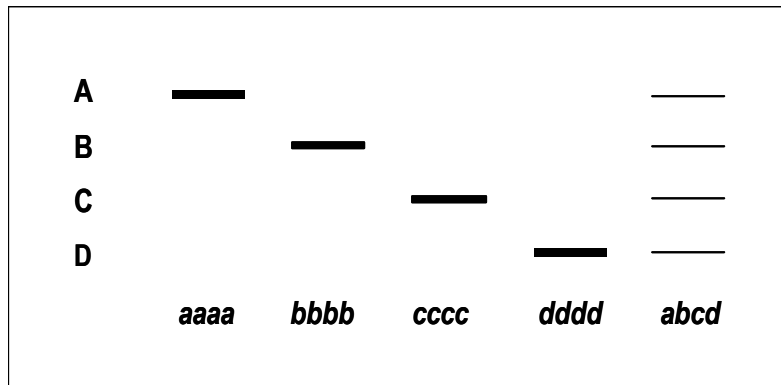
## 2. Enzims monomèrics (amb 3 al·lells):



Els tres primers individus són homozigots per als tres al·lells diferents, i per tant només presenten una sola banda al seu fenotip. Els genotips d'aquests individus seran doncs *aaaa*, *bbbb* i *cccc*. Els fenotips de tres bandes corresponen als individus que presenten els 3 al·lells però amb diferent dosi al·lèlica. Les intensitats relatives de tinció de les bandes d'aquests heterozigots són 2:1:1, on 2 correspon a l'al·lel en doble dosi que la resta. Els genotips són, d'esquerra a dreta: *aaaa*, *bbbb*, *cccc*, *aabc*, *abbc* i *abcc*.

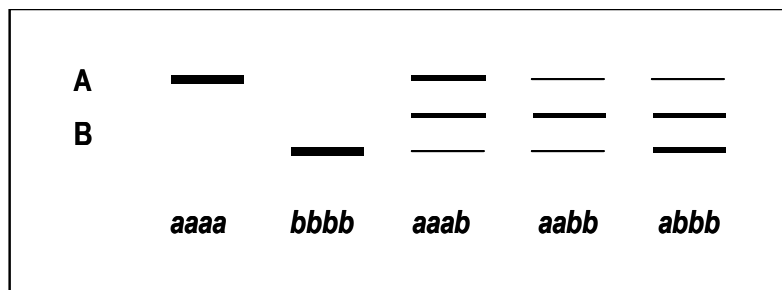


3. Enzims monomèrics (amb 4 al·lells):



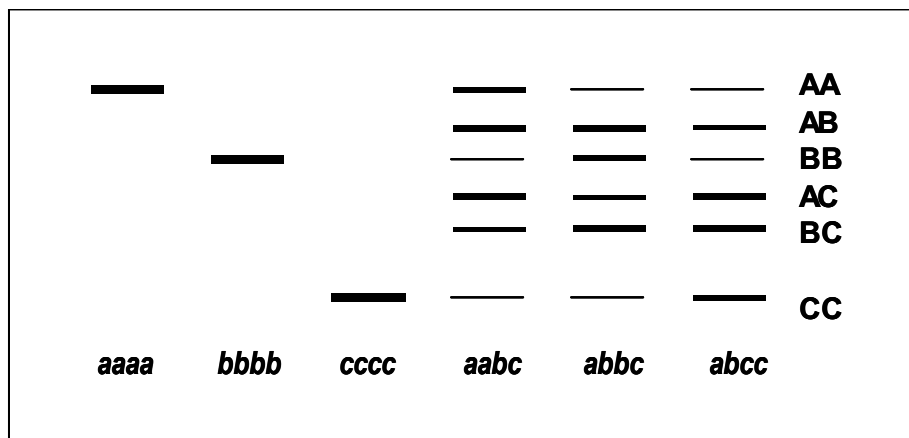
Els quatre primers individus són homozigots per als quatre al·lells diferents, i per tant només presenten una sola banda al seu fenotip. Els genotips d'aquests individus seran doncs *aaaa*, *bbbb*, *cccc* i *dddd*. El quart patró de bandes correspon a un individu heterozigot que presenta els 4 al·lells diferents (*abcd*), amb una única dosi de cada al·lel, per això les quatre bandes que presenta tenen la mateixa intensitat de tinció.

4. Enzims dimèrics (amb 2 al·lells):



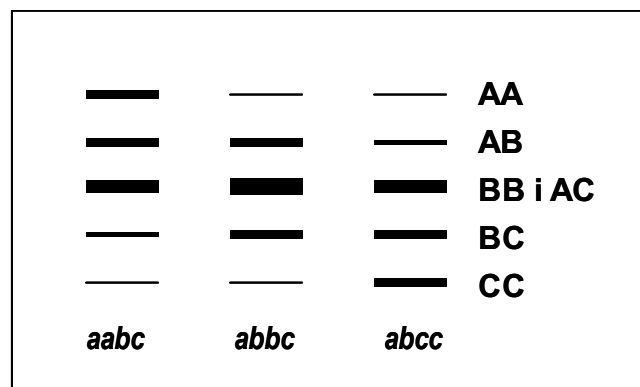
Els individus homozigots es caracteritzen per la presència d'una única banda, però els heterozigots en mostren tres, dos de corresponents als homodímers i la central a l'heterodímer. Els heterozigots poden ser de tres tipus depenent de la dosi al·lèlica. En el cas dels heterozigots equilibrats (amb el genotip *aabb*) la intensitat relativa de tinció de les bandes és 1:2:1 –igual que en les espècies diploides–, on 2 correspon a la banda central i 1 a les dues bandes marginals. Els heterozigots desequilibrats (*aaab* i *abbb*) mostren tres bandes amb una intensitat relativa de tinció 9:6:1, on 9 correspon a l'homodímer codificat per l'al·lel de tres dosis, 6 a l'heterodímer i 1 a l'homodímer amb dosi senzilla.

## 5. Enzims dimèrics (amb 3 al·lells):

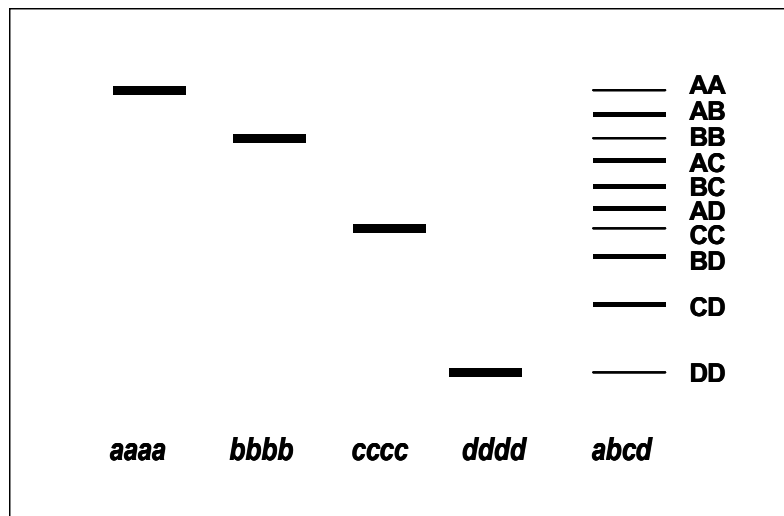


Al diagrama es representa el patró de bandes per a un enzim dimèric per a 6 individus, tres d'homozigots i tres d'heterozigots per als tres al·lells diferents. Els tres primers individus són homozigots per a cadascun dels tres al·lells, el ràpid, l'intermedi i el lent, respectivament, i per tant presenten una única banda corresponent a l'homodímer codificat. Els tres individus heterozigots presenten els tres al·lells, però en diferent dosi al·lèlica. El nombre total de bandes que formen els heterozigots tri·al·lèlics és de sis, amb una intensitat relativa de tinció 4:4:4:1:2:1 per a l'heterozigot *aabc*, 1:4:4:2:4:1 per l'heterozigot *abbc*, i 1:2:1:4:4:4 per l'heterozigot *abcc*. Les bandes amb intensitat de tinció 4 corresponen tant a l'homodímer codificat per l'al·lel que està en doble dosi com a les bandes dels heterodímers resultants de la combinació dels productes de l'al·lel en doble dosi amb els altres dos al·lells. La banda amb intensitat de tinció 2 correspon a l'heterodímer entre els 2 al·lells en dosi senzilla, i les dues bandes amb intensitat de tinció 2 són dels homodímers codificats pels al·lells en dosi senzilla.

En el cas que els tres homodímers siguin equidistants al gel, l'heterodímer entre l'al·lel més ràpid i el més lent es superposa amb l'homodímer de l'al·lel de mobilitat intermèdia, obtenint un patró de 5 bandes. Les intensitats relatives de tinció de les bandes serien 4:4:5:2:1 per a l'heterozigot *aabc*, 1:4:6:4:1 per a l'heterozigot *abbc* i 1:2:5:4:4 per a l'heterozigot *abcc*. El patró de bandes que obtindrem és el següent:



6. Enzims dimèrics (amb 4 al·lells):



Els quatre primers individus són homozigots per cadascun dels quatre al·lells, i per tant presenten una única banda corresponent a l'homodímer codificat. El quart individu és un heterozigot que presenta els quatre al·lells diferents (*abcd*), i presenta un patró de 10 bandes si els homodímers no són equidistants al gel. Les bandes corresponents als sis heterodímers possibles es tenyeixen amb doble intensitat de tinció respecte als homodímers. Si tots o alguns dels homodímers són equidistants, algunes bandes es superposaran i obtindrem un patró de 7 a 9 bandes.

2.2.9. Anàlisi de les dades

Una vegada interpretats els diferents zimogrames, obtenim els genotips individuals, que ens permetran calcular les freqüències al·lèliques de cada població. Aquestes, a la vegada, ens serveixen per determinar els diferents paràmetres de diversitat genètica, recollits per Hamrick & Godt (1996a) i Berg & Hamrick (1997) per a espècies diploides, i per Thrall & Young (2000) per a espècies autotetraploides (i tetraploides en general). Aquests paràmetres ens donen una idea prou clara dels nivells i de la distribució de la diversitat genètica a nivell d'espècie, dins d'una població o entre diferents poblacions. Els paràmetres més usats en els estudis de diversitat genètica són els següents (es marquen amb un asterisc els paràmetres que només s'usen per espècies tetraploides):

**PARÀMETRES QUE MESUREN LA DIVERSITAT GENÈTICA (PARÀMETRES DESCRIPTORS BÀSICS):**

1. **Percentatge de loci polimòrfics (*P*):** proporció de *loci* polimòrfics en relació amb el total de *loci* estudiats. En principi, un *locus* és polimòrfic quan presenta més d'un al·lel. El criteri més

emprat però, que és el que nosaltres prenem, és considerar un *locus* polimòrfic quan la freqüència de l'al·lel més comú es igual o inferior a 0,95 (Nei, 1987). De vegades també s'empra el criteri de 0,99 (Berg & Hamrick, 1997).

2. **Nombre mitjà d'al·lells per *locus* ( $A$ ):** raó entre el nombre total d'al·lells observats entre tots els *loci* i el nombre total de *loci* analitzats.

3. **Nombre mitjà d'al·lells per *locus* polimòrfic ( $A_p$ ):** raó entre el nombre total d'al·lells observats en els *loci* polimòrfics i el nombre de *loci* polimòrfics analitzats.

4. **Riquesa al·lèlica dins els individus ( $A_i$ )\*:** nombre mitjà d'al·lells per individu en un *locus*.

5. **Riquesa genotípica ( $G$ )\*:** nombre de genotips (de quatre al·lells) per *locus*.

6. **Heterozigosi observada ( $H_o$ ):** quocient entre el nombre d'heterozigots per a un gen determinat i el total de genotips estudiats.

\*Per als autotetraploides, que tenen 5 tipus possibles de genotips, aquests són ponderats inversament a la probabilitat que dos dels seus al·lells siguin idèntics per descendència. D'aquesta manera, les heterozigosis ponderades que fem són AAAA = 0, AAAB = 0,5, AABB = 0,667, AABC = 0,833 i ABCD = 1 (Bever & Felber, 1992; Thrall & Young, 2000).

7. **Heterozigosi esperada ( $H_e$ ) sota equilibri de Hardy-Weinberg:** És una mesura funció de la proporció de *loci* polimòrfics, del nombre d'al·lells per *locus* polimòrfic i de la igualtat de les freqüències al·lèliques entre poblacions (Berg & Hamrick, 1997). Aquest paràmetre també rep el nom de "diversitat gènica" (Nei, 1973), i és la mesura de diversitat més àmpliament utilitzada en genètica. Aquest paràmetre es calcula per a cada *locus* a partir de la fórmula:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

on  $p_i$  és la freqüència de l'al·lel  $i$ . L'heterozigosi esperada d'una població serà la mitjana dels valors obtinguts per a cada *locus* dins aquella població. És el paràmetre més emprat en els estudis de diversitat genètica, donat que resumeix la variabilitat fonamental d'una població en un únic estadístic.

En els autotetraploides, poden distingir-se dos tipus d'heterozigosi esperada, **heterozigosi esperada sota segregació cromosòmica a l'atzar ( $H_e(Ce)$ )\*** i **heterozigosi esperada sota segregació cromatídica a l'atzar ( $H_e(Cd)$ )\***. Això és conseqüència que en la meiosi dels autopoliplòides, els *loci* poden sofrir segregació cromosòmica a l'atzar o segregació cromatídica a l'atzar (Bever & Felber, 1992, Ronfort *et al.*, 1998, Thrall & Young, 2000). Sota segregació cromosòmica a l'atzar, i assumint encreuaments a l'atzar, les freqüències genotípiques es poden estimar directament a partir de les freqüències gèniques poblacionals, tal com es fa en els diploides. En canvi, sota segregació cromatídica a l'atzar, les cromàtides germanes poden també segregar dins la mateixa gàmeta, procés conegut com "doble reducció", que és específic dels autopoliplòides (Ronfort *et al.*, 1998). La doble reducció augmenta la producció de gàmetes homozigots si es compara amb el que obtenim sota segregació cromosòmica a l'atzar i, per tant, l'heterozigosi serà menor. En aquest cas, les freqüències genotípiques es calculen a partir de les

frequències gamètiques (Geiringer, 1949). La probabilitat que es produeixi la doble reducció en un *locus* ( $\alpha$ ) depèn de la quantitat de quadrivalents que es formen i de la proximitat del *locus* respecte al centròmer, i pot oscil·lar des de  $\alpha = 0$  a  $\alpha = 1/7$ , que és el màxim teòric (Bever & Felber, 1992, Thrall & Young, 2000).

8. **Índex de fixació de Wright (F)** (Wright, 1951): Es tracta d'un paràmetre que ens compara l'heterozigosi esperada i l'observada segons la fórmula:

$$F = (H_e - H_o) / H_e$$

$F$  pren valors que oscil·len entre  $-1$  i  $1$ , de manera que els valors negatius d'aquest paràmetre indiquen un excés d'heterozigots, mentre que els valors positius n'indiquen un dèficit. Per a les espècies autotetraploides, es diferencien dos índexs de fixació diferents, l'**índex de fixació sota segregació cromosòmica ( $F(Ce)$ )**\* i l'**índex de fixació sota segregació cromatídica ( $F(Cd)$ )**\*.

**PARÀMETRES QUE MESUREN LA DISTRIBUCIÓ DE LA DIVERSITAT GENÈTICA (ESTADÍSTICS DE DIVERSITAT GÈNICA DE NEI (1973)):**

1. **Diversitat genètica total ( $H_T$ ) o heterozigosi total esperada:** És un paràmetre derivat de l'heterozigosi esperada ( $H_e$ ) i és una estimació de la distribució de la diversitat genètica, que alhora es divideix en dos components (Nei, 1973): **diversitat intrapoblacional ( $H_S$ )** i **diversitat interpoblacional ( $D_{ST}$ )**:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

2. **Coefficient de diferenciació gènica ( $G_{ST}$ ):** Ens descriu la divergència entre les diferents poblacions d'una espècie, i es calcula a partir de  $H_T$  i  $D_{ST}$ :

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

D'aquesta manera, un valor de  $G_{ST}$  de 0,05 significa que el 95% de la diversitat genètica total resideix dins les poblacions i que un 5% ho fa dins les poblacions.

**PARÀMETRES QUE ENS DÓNEN L'ESTADÍSTICA DE LA F DE WRIGHT (1951):**

Wright (1951) va desenvolupar una sèrie d'estadístics per a estimar l'estructura genètica d'una població i de les seves subpoblacions, i fonamentalment són mesures de la fixació d'al·lels en els diferents nivells d'organització (individual, subpoblacional<sup>a</sup> i poblacional<sup>b</sup>; Berg & Hamrick, 1997). Reformulats per Nei (1977), usen els conceptes més intuïtius de l'heterozigosi observada ( $H_o$ ) i esperada ( $H_e$ ), i mesuren la deficiència d'heterozigots que hi ha dins una determinada població<sup>a</sup>, que pot produir-se per dues raons: endogàmia dins de la població<sup>a</sup>, i migració limitada entre subpoblacions<sup>a</sup> (efecte Wahlund). És per aquesta raó que hom sol referir-se als "coeficients d'endogàmia de Wright".

1. **Coefficient d'endogàmia ( $F_{IS}$ ):** És un paràmetre que mesura la desviació de la llei de Hardy-Weinberg (l'efecte d'encreuaments no a l'atzar) dins els individus de cada subpoblació<sup>a</sup>, és a dir, mesura la desviació l'heterozigosi observada respecte a l'esperada. Aquest paràmetre dóna un valor positiu quan hi ha deficiència d'heterozigots i un valor negatiu quan hi ha excés (entre -1 i 1). Si  $F = 0$ , la subpoblació<sup>a</sup> està en equilibri, i es comporta com una unitat panmíctica. Es tracta d'un paràmetre que se sol interpretar com la mesura de l'endogàmia que hi ha dins una població, en el cas que no hi hagi cap altra font que contribueixi al dèficit d'heterozigots (Berg & Hamrick, 1997).

2. **Índex de fixació ( $F_{ST}$ ):** Mesura la proporció de la desviació de l'equilibri de Hardy-Weinberg que és deu a un flux genètic limitat entre subpoblacions<sup>a</sup>, és a dir, fruit de la divisió en subpoblacions<sup>a</sup>. Segons el concepte original de Wright (1951),  $F_{ST}$  representaria la varianza en les freqüències al·lèliques entre les poblacions, de manera que si pren un valor de 0 significa que les freqüències al·lèliques són idèntiques en les poblacions analitzades, mentre que si pren un valor de 1, les freqüències estaran fixades i són completament diferents en les poblacions analitzades.  $F_{ST}$  és un paràmetre que s'usa com a indicador de divergència genètica entre poblacions, com una funció de la varianza en les freqüències al·lèliques entre poblacions. Els seus valors oscil·len entre 0, que indica no-divergència, i 1, que indica la màxima divergència (Weir, 1990). És doncs un paràmetre equiparable al coeficient de diferenciació gènica ( $G_{ST}$ ). Els dos paràmetres conceptualment són diferents, i el segon no pren en consideració les freqüències genotípiques ni l'heterozigosi observada (Finkeldey & Murillo, 1999). Tot i això, tenen el mateix valor quan només hi ha dos al·lèls per *locus* (Hartl & Clark, 1989; Berg & Hamrick, 1997).

3. **Coefficient d'endogàmia total ( $F_{IT}$ ):** Mesura la desviació de l'equilibri de Hardy-Weinberg dels individus considerant totes les subpoblacions<sup>a</sup> (combinant totes les poblacions). Dóna un valor positiu quan hi ha deficiència d'heterozigots, i un valor negatiu quan hi ha excés.

<sup>a</sup>En la terminologia de genètica de poblacions, de vegades s'empra el terme "subpoblació" com a sinònim per al que ens referim habitualment com a població. Per tant, "subpoblació" cal entendre-ho com una població, i "població" cal entendre-ho com a tot el conjunt de poblacions que estem estudiant d'una determinada espècie.

#### FLUX DE GENS O NOMBRE ESTIMAT DE MIGRANTS PER GENERACIÓ ( $Nm$ ):

És un paràmetre que calculem a partir de l'índex de fixació ( $F_{ST}$ ) o del coeficient de diferenciació gènica ( $G_{ST}$ ). Segons la fórmula de Wright (1951):

$$Nm = 1 - F_{ST} / 4F_{ST}$$

Hi ha una modificació de la equació de Wright, realitzada per Crow & Aoki (1984):

$$Nm = 1/4\alpha [(1/F_{ST}) - 1]$$

on  $\alpha = [n/(n-1)]^2$ ,  $n$  és el nombre de subpoblacions i  $Nm$  és el nombre mitjà de migrants intercanviats per generació.

Una segona estimació del flux genètic està basada en la freqüència dels al·lèls privats (aquells que es troben en una única població), suggerida per Slatkin (1985):

$$\ln(\bar{p}(1)) = a \ln(Nm) + b$$

on  $\bar{p}(1)$  és la freqüència mitjana d'al·lels privats, i  $a$  i  $b$  són constants determinades a partir de simulacions desenvolupades per a una mida mostral de 25 (Slatkin 1985), amb un valor de  $-0.505$  i  $-2.440$ , respectivament.

#### IDENTITATS I DISTÀNCIES GENÈTIQUES:

Les identitats i les distàncies genètiques són paràmetres que també ens permeten quantificar la divergència genètica entre poblacions, mitjançant la comparació de les freqüències al·lèliques entre parells de poblacions, en forma de matrius. A diferència però de  $F_{ST}$  o  $G_{ST}$ , que es basen només en els *loci* variables, les identitats i les distàncies genètiques usen tant els *loci* monomòrfics com els polimòrfics. A partir d'aquests paràmetres es poden obtenir dendrogrames de poblacions.

1. **Identitat genètica de Nei ( $I$ )** (Nei, 1978): Es calcula amb la fórmula següent:

$$I = \sum x_i y_i / (\sum x_i^2 \sum y_i^2)^{0.5}$$

on  $x_i$  i  $y_i$  són les freqüències de l'al·lel *i*èssim a les poblacions  $x$  i  $y$ . El valor de  $I$  oscil·la entre 0 i 1, i ens proporciona una estimació del grau de semblança genètica existent entre dues poblacions.  $I$  tindria un valor de 1 en poblacions amb freqüències al·lèliques idèntiques.

2. **Distància genètica de Nei ( $D$ )** (Nei, 1972), varia de 0 fins a infinit i és defineix com:

$$D = -\log_e I$$

#### PARÀMETRES ÚTILS PER A LA CONSERVACIÓ *IN SITU* I *EX SITU*:

Les mesures de conservació que poden proposar-se per a una espècie es classifiquen en dos tipus, mesures *in situ* i mesures *ex situ*. Respecte tant a les primeres (quan cal seleccionar una sèrie de poblacions que cal conservar; per exemple aquelles que poden incloure's dins una micro-reserva de flora), com respecte a les segones (a l'hora de recol·lectar granes per emmagatzemar-les en un banc de germoplasma), el coneixement dels nivells i la distribució de la diversitat genètica resulten essencials de cara als objectius de maximització de recursos i representativitat del què es conserva. En absència de dades genètiques, el nombre de poblacions a conservar per a retenir una variabilitat adequada és molt més elevat que si disposem d'aquestes dades (Neel & Cummings, 2003). Hamrick *et al.* (1991) proposaren un mètode de selecció de poblacions mitjançant el paràmetre  $G_{ST}$ :

$$n = \ln(1-P) / \ln F_{ST}$$

on  $n$  és el nombre de poblacions a conservar (o mostrejar) i  $P$  és el percentatge de diversitat genètica (en termes de variació isoenzimàtica interpoblacional) que es vol conservar. Hamrick

(1983) dona una xifra del 99% de diversitat com a l'objectiu ideal a assolir en un pla de mostatge. Per espècies amb alts valors de  $G_{ST}$ , caldrà preservar (o mostrejar) més poblacions per tal d'asegurar que retenim la seva diversitat genètica, atès que aquesta té un fort component interpoblacional. Quan l'interval de variació de  $G_{ST}$  entre els diferents *loci* és important, caldria utilitzar però el valor màxim de  $G_{ST}$  per a no infraestimar el nombre de poblacions que cal conservar (o mostrejar) (Ceska *et al.*, 1997).

Aquesta fórmula ens dona un nombre de poblacions en funció del percentatge de diversitat que volem conservar i/o capturar, però és un mètode assumeix igual diversitat en totes les poblacions, fet que rarament succeeix. Per tant, cal decidir en quins criteris ens basarem a l'hora d'escollir-les. En primer lloc, sembla lògic escollir aquelles que tinguin una major diversitat genètica tant en termes de riquesa al·lèlica com d'heterozigosi, que garantiran millor la seva viabilitat tant a curt com a llarg termini (Brown & Briggs, 1991; Ceska *et al.*, 1997). La riquesa al·lèlica s'ha postulat com una eina més adequada per a la selecció de poblacions que no pas l'heterozigosi, atès que és una mesura més sensible a les diferències de mida poblacional (es veu afectada ràpidament si hi ha una disminució de la mida, degut a la pèrdua en primera instància dels al·lèls rars) i del nombre de poblacions (la pèrdua d'alguna població pot significar la pèrdua d'un nombre significatiu d'al·lèls). L'heterozigosi esperada, en canvi, depèn més aviat d'aquells al·lèls que es troben en freqüències intermèdies o altes, i no es veu tant afectada si es produeix la extinció local d'alguna població (Neel & Cummings, 2003). Per a Petit *et al.* (1998), cal prioritzar la conservació del màxim nombre d'al·lèls possible per sobre de la seva freqüència, atès que aquests actuarien de marcadors de diversitat de *loci* amb efectes directes sobre components que confereixen adaptabilitat, i remarquen la importància dels al·lèls rars a efectes de conservació (poden conferir resistència a malalties o adaptació a les condicions ambientals locals). La utilització de l'heterozigosi esperada en la selecció de poblacions sembla però també una eina prou adequada, atesa la seva demostrada correlació amb diversos components del *fitness* i amb el risc d'extinció (Spielman *et al.*, 2004) i una menor afectació per l'efecte de mostatge (Caujapé-Castells & Pedrola-Monfort, 2004).

Cal tal tenir en compte, però, altres consideracions, com ara la mida de les poblacions. S'haurà de prioritzar, lògicament, les de mida més gran, que tindran una afectació menor dels efectes de la deriva genètica; les poblacions que tenen una mida poblacional molt petita (<100 individus), fàcilment sofreixen una pèrdua d'al·lèls per deriva genètica i presenten una major tendència a la consanguinitat (Barret & Kohn, 1991). Si el que volem és mantenir uns nivells adequats de  $H_e$ , ens interessarà conservar les poblacions amb el màxim d'al·lèls que es trobin en freqüències intermèdies (prop de 0,5), atès que els al·lèls que es trobin en proporcions molt petites probablement es perdin en molt poques generacions (Martínez-Palacios *et al.*, 1999).

Els isoenzims generalment infraestimen els nivells de diferenciació interpoblacional per a característiques adaptatives que poden ésser crítiques per a la supervivència i la reproducció dels individus (Furnier *et al.*, 1991; Hamrick *et al.*, 1991; Martínez-Palacios *et al.*, 1999). Cada població per separat pot representar un ecotip diferent o una unitat independent evolutiva i per tant ser mereixedora de conservació i/o mostatge. Per tant, un darrer criteri pot ésser el de prioritzar les poblacions que presentin al·lèls privats, exclusius d'aquestes, i, sempre que sigui possible, escollir el màxim nombre de poblacions d'aquella espècie que es pretén conservar. El CPC (*Center for Plant Conservation*) de Sant Louis (Missouri, EUA) proposa que es mostregin almenys 5 poblacions per a cada espècie (CPC, 1991), xifra també aconsellada per Brown & Briggs (1991). El mostreig d'un nombre addicional de poblacions no augmenta significativament la diversitat genètica



d'una espècie i en canvi suposa una despesa addicional enorme que potser cal invertir en d'altres espècies amenaçades (Brown & Briggs, 1991; CPC, 1991; Falk, 1991; Gray, 1996).

Un cop hem seleccionat les poblacions, en el cas de que ens haguem plantejat una recol·lecció de granes, caldrà decidir el nombre de plantes per població a mostrejar i el nombre de granes de cada planta que cal recol·lectar. En aquest punt però, les recomanacions varien molt segons els autors. Per a Yonezawa (1985), recol·leccions de 10 individus per població són suficients per acomplir amb els criteris de suficiència i eficiència. Per a Bengtsson *et al.* (1995), mostres no superiors als 25 individus ja són suficients per representar la variabilitat genètica en una població, en canvi Marshall & Brown (1975) proposen una mida mostral de 50-100 individus, mentre que per a Brown & Briggs (1991) com per al CPC (1991) una mostra de 10-50 individus és suficient per a la majoria de casos. Segons Hamrick *et al.* (1991), cal recol·lectar un mínim de 50 granes per població si l'objectiu és preservar les freqüències al·lèliques i genotípiques en els mateixos valors que a les poblacions naturals.

L'abundància d'al·lells rars en una determinada població, però, fa necessari un mostratge més ampli d'aquesta, per tal de preservar la capacitat d'evolució d'una espècie (Templeton, 1997). Ara bé, segons Brown & Briggs (1991) i Lawrence *et al.* (1995) l'esforç que suposa mantenir els al·lells rars en un banc de germoplasma és major que el benefici que proporcionen aquests al potencial evolutiu de l'espècie; per a aquests autors, els al·lells rars poden jugar un paper important en l'àmbit de l'agronomia però no pas en la conservació d'espècies amenaçades. Per a Holsinger & Gottlieb (1991) i Lawrence *et al.* (1995), donat que els al·lells rars poden ser deleteris i per tant perdre's en poques generacions, només cal conservar els al·lells amb una freqüència  $\geq 0,05$ . Segons aquest criteri, una mostra de 172 llavors seria suficient per conservar, amb una probabilitat de 0,9999, els al·lells que es troben amb freqüències  $\geq 0,05$  (Taula 2.6) en una espècie, suposant un percentatge de germinació i supervivència de les plàntules del 100 %. Com que aquest percentatge habitualment és inferior a les espècies vegetals, el CPC (1991) proposa una fórmula per calcular el nombre de llavors a recol·lectar:

$$C_p = I (1/T)$$

on  $C_p$  és el nombre de llavors a recol·lectar,  $I$  és el nombre de granes que volem conservar suposant una taxa de supervivència de plàntules del 100 % i  $T$  és la taxa de germinació i supervivència de plàntules fins a l'edat adulta. Així, per exemple si la taxa de supervivència d'una espècie es del 20%, això implica que caldrà recollir 5 granes per cada individu, donat que per qüestions de probabilitat només en sobreviurà una. El CPC recomana la recol·lecció, en cas de desconeixement de la taxa de supervivència de plàntules, de 10 llavors per individu.

**TAULA 2.6.** MIDA MOSTRAL NECESSÀRIA PER A CONSERVAR ALMENYS UNA CÒPIA DE L'AL·LEL, AMB DIFERENTS PROBABILITATS, SEGONS LAWRENCE *ET AL.* (1995).

P (Probabilitat)	Freqüència al·lèlica						
	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,01
0,95	6	7	9	14	29	59	299
0,99	5	10	13	21	44	90	459
0,999	11	14	20	31	66	135	688
0,9999	14	18	25	40	84	172	877

### 2.2.10. *Processament de les dades*

A partir dels genotips de tots els individus analitzats, el programa BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989) ens dona les freqüències al·lèliques per a tots els *loci* que analitzem i permet calcular els paràmetres descriptors bàsics de diversitat genètica a les espècies diploides ( $P$ ,  $A$ ,  $A_p$ ,  $H_o$ ,  $H_e$  i  $F$ ). Aquest mateix programa també ens calcula els coeficients d'endogàmia de Wright ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  i  $F_{IT}$ ) i ens realitza el test xi-quadrat ( $\chi^2$ ) per avaluar les diferències estadístiques dels valors de  $F$  respecte el 0 per tots els *loci* polimòrfics analitzats. Per últim, BIOSYS-1 ens calcula tota una sèrie d'identitats i distàncies genètiques, de les que nosaltres habitualment fem la identitat genètica de Nei ( $I$ ) i la distància genètica de Nei ( $D$ ). El programa també ens construeix dendrogrames o anàlisis *cluster* usant el mètode d'agrupament UPGMA (*unweighted pair group method with averaging*) en base a les dades de  $I$ .

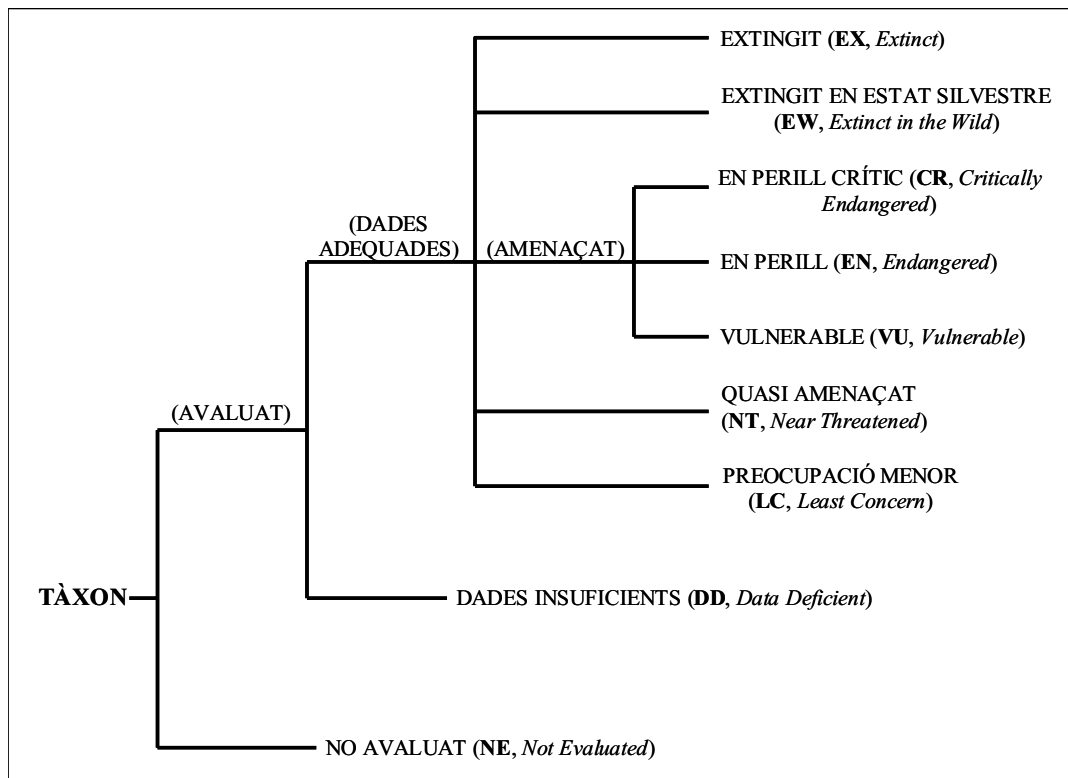
En el cas que estudiem una espècie autoploiploide, les freqüències al·lèliques no es poden calcular amb el BIOSYS-1 (Swofford & Selander, 1989), sinó que s'ha d'utilitzar un programari alternatiu, com ara el programa AUTOTET (Thrall & Young, 2000). L'AUTOTET és un programa específic per a espècies autotetraploides que, a banda de les freqüències al·lèliques, ens calcula els paràmetres  $A$ ,  $A_i$ ,  $G$ ,  $H_o$ ,  $H_e(Ce)$ ,  $H_e(Cd)$ ,  $F(Ce)$  i  $F(Cd)$ . Aquest programa també ens fa el test xi-quadrat ( $\chi^2$ ) per calcular els nivells de significació dels valors de  $F$  pels *loci* analitzats. El BIOSYS-1 també pot emprar-se per a espècies tetraploides amb les opcions adequades del programa, però caldrà introduir directament les freqüències al·lèliques, que podem calcular manualment.

Les freqüències al·lèliques obtingudes amb el programa BIOSYS-1 o amb l'AUTOTET ens permeten calcular els estadístics de diversitat genètica de Nei ( $H_s$ ,  $D_{ST}$ ,  $H_T$  i  $G_{ST}$ ) mitjançant el programa GENESTAT-PC, versió 3.31 (Whitkus, 1988). El flux de gens ( $Nm$ ) és un paràmetre que, donada la seva senzillesa, es calcula manualment. El programa GeneStat-PC també ens calcula els paràmetres  $A$ ,  $A_p$ ,  $P$  i  $H_o$ . Les comparacions entre les matrius d'identitat genètica ( $I$ ) i les de distància geogràfica es realitzen mitjançant el test de Mantel (1967), utilitzant l'opció de distància taxonòmica en el programa NTSYS-PC (Rohlf, 1994). El test de Mantel determina si els elements de dues matrius simètriques presenten o no correlació.

A banda d'aquest programari, que és el que fem en el nostre laboratori, hi ha tot un corpus de *software* addicional que es pot emprar en genètica de poblacions: GDA (Lewis & Zaykin, 1996), GENEPOP 3.1 (Raymond & Rousset, 1995), FSTAT (Goudet, 1995), DISPAN (Ota, 1993) i SAAP (Wartenberg, 1989), entre d'altres. En els darrers mesos, mentre es redactava aquesta Memòria, ens ha estat tramès el paquet TRANSFORMER-1 (Caujapé-Castells, 2001) per part del seu autor, que és un programa que ens permet obtenir els formats necessaris per a la implementació de les dades genotípiques individuals en els programes habitualment emprats per a l'estimació dels paràmetres de diversitat genètica.

### 2.3. Grau d'amenaça UICN

Les categories d'amenaça establertes per la Unió Internacional per la Conservació de la Natura (UICN) representen una eina útil i eficaç de determinació del risc d'extinció i amenaça de les espècies, tant animals com vegetals. De fet, ja han transcorregut més de 40 anys des de l'aparició el 1963 de la primera versió, i continuen essent els criteris més coneguts i respectats a nivell internacional. Tot i això, no fou fins el 1994 en que s'adoptaren uns criteris molt més objectius en l'adjudicació de les categories d'amenaça a les espècies amb la nova versió dels criteris UICN (Versió 2.3; UICN, 1994). Les "antigues" categories UICN emprades fins a la data es basaven en criteris subjectius i hi mancaven criteris numèrics per a l'assignació dels tàxons a alguna de les categories. La darrera versió data del 2001 (versió 3.1; UICN, 2001) i estructura les categories d'amenaça de la següent manera (Figura 2.4):



**FIGURA 2.4.** CATEGORIES D'AMENAÇA DE LA UNIÓ INTERNACIONAL PER A LA CONSERVACIÓ DE LA NATURA (UICN, 2001).

Les diferents categories d'amenaça es defineixen de la següent manera, segons la UICN (UICN, 2001):

**Extingit (EX):** Un tàxon està "extingit" quan no resta cap dubte raonable de que l'últim individu existent ha mort, i cal demostrar-ho amb prospeccions exhaustives dels seus hàbitats coneguts i potencials, i en els moments adequats i en els períodes de temps apropiats al cicle del vida del tàxon.

**Extingit en estat silvestre (EW):** Un tàxon està “extingit en estat silvestre” quan només sobreviu en cultiu, en captivitat o en forma de poblacions naturalitzades completament fora de la seva distribució original.

**En perill crític (CR):** Un tàxon està “en perill crític” quan la millor evidència disponible indica que compleix qualsevol dels criteris A-E (vegeu Taula 2.7), i per tant, s’enfronta a un risc extremadament elevat d’extinció en estat silvestre.

**En perill (EN):** Un tàxon està “en perill” quan la millor evidència disponible indica que compleix qualsevol dels criteris A-E (vegeu Taula 2.7), i per tant, s’enfronta a un risc molt elevat d’extinció en estat silvestre.

**Vulnerable (VU):** Un tàxon és “vulnerable” quan la millor evidència disponible indica que compleix qualsevol dels criteris A-E (vegeu Taula 2.7), i per tant, s’enfronta a un risc elevat d’extinció en estat silvestre.

**Quasi amenaçat (NT):** Un tàxon està “quasi amenaçat” quan ha estat avaluat segons els criteris i no satisfà, en el moment present, cap dels criteris per a estar “en perill crític”, “en perill” o “vulnerable”, però que està prop de satisfer-los o bé podria fer-ho en un futur proper.

**Preocupació menor (LC):** Un tàxon és de “preocupació menor” quan ha estat avaluat segons els criteris i no satisfà, en el moment present, cap dels criteris per a estar “en perill crític”, “en perill”, “vulnerable” o “quasi amenaçat”. S’inclouen en aquesta categoria els tàxons abundants i d’àmplia distribució.

**Dades insuficients (DD):** Un tàxon s’inclou en aquesta categoria quan la informació disponible no resulta adequada per avaluar el seu risc d’extinció basant-nos en la distribució i/o condició de la població. Un tàxon inclòs en aquesta categoria pot estar ben estudiat, amb una biologia coneguda, però poden mancar les dades apropiades sobre la seva abundància i/o distribució. No és considerada per tant una categoria d’amenaça, sinó que més aviat ens indica que cal més informació, no descartant que en el futur es pugui demostrar que compleix els criteris per pertànyer a alguna de les categories anteriors.

**No avaluat (NE):** Un tàxon es considera “no avaluat” quan encara no ha estat classificat en relació als criteris anteriorment esmentats.

Per tal que un tàxon qualifiqui per a qualsevol de les 3 categories d’amenaça principals de la UICN (CR, EN o VU) ha de complir amb qualsevol dels criteris A a E, però no tots demanen la mateixa quantitat d’informació ni tampoc de la mateixa naturalesa. En general, pot afirmar-se que per a emprar el criteri A (amb l’excepció del subcriteri A3) cal conèixer el nombre d’individus d’un tàxon en el passat, informació de la qual rarament es disposa. El criteri E és el més difícil d’aplicar atès que requereix d’una anàlisi quantitativa de la probabilitat d’extinció, que requereix d’un estudi demogràfic molt complet del tàxon en qüestió. Els criteris B, C i D són més fàcils d’emprar, atès que radiquen majoritàriament en l’ús de paràmetres numèrics relativament senzills d’obtenir, com ara censos poblacionals i estimacions de la superfície que ocupa una planta. Tot i això, per als criteris B i C també són necessàries certes dades sobre l’evolució demogràfica per a determinar si un tàxon està patint una “disminució continuada” o bé “fluctuacions extremes” (vegeu Taula 2.7). Un dels criteris més emprats històricament ha estat el D, donada la rapidesa i senzillesa amb la que pot classificar-se una planta en algun dels tres criteris d’amenaça. Tot i això, diversos autors han alertat del risc d’emprar amb massa lleugeresa el subcriteri D2 (Aymerich & Sáez, 2001), amb el conseqüent perill d’inflar artificialment els llistats d’espècies amenaçades. Aquest fet però s’ha esmenat parcialment en la darrera versió del

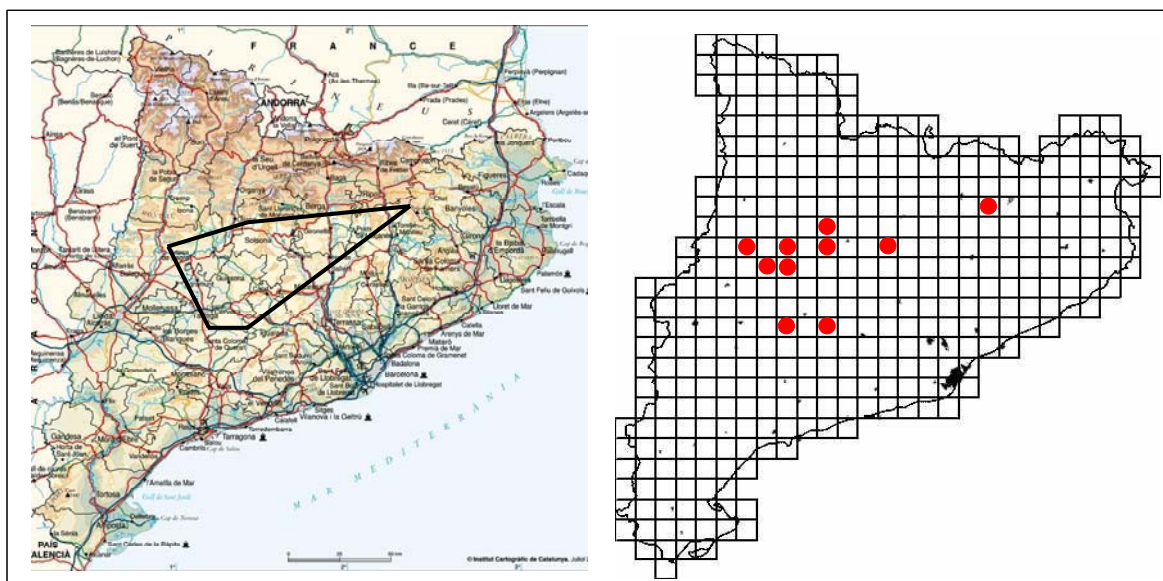
2001 dels criteris de la UICN respecte la del 1994, on per a qualificar com a VU s'ha passat d'un líndar de 100km<sup>2</sup> a 20 km<sup>2</sup> d'àrea d'ocupació.

**TAULA 2.7. CRITERIS I SUBCRITERIS EMPRATS PER A ADJUDICAR LES CATEGORIES D'AMENÇA UICN (UICN, 2001).**

CRITERIS (A-E) I SUBCRITERIS	EN PERILL CRÍTIC (CR)	EN PERILL (EN)	VULNERABLE (VU)
<b>A. Reducció de la mida poblacional (nombre total d'individus madurs) durant els últims 10 anys o 3 generacions (el període que sigui més llarg) basada en algun dels següents subcriteris:</b>			
1. Reducció observada, estimada, inferida o sospitada per causes reversibles, enteses i que ja hagin cessat	≥90%	≥70%	≥50%
2. Reducció observada, estimada, inferida o sospitada per causes irreversibles, o no enteses o que no hagin cessat	≥80%	≥50%	≥30%
3. Reducció projectada o sospitada	≥80%	≥50%	≥30%
4. Reducció observada, estimada, inferida o sospitada on el període de temps ha d'incloure tant el passat com el futur i per causes irreversibles, o no enteses o que no hagin cessat	≥80%	≥50%	≥30%
Aquesta reducció ha de basar-se en algun dels següents subcriteris: (a) observació directa; (b) un índex d'abundància apropiat per al tàxon; (c) una reducció de l'àrea d'ocupació, extensió de presència i/o qualitat de l'hàbitat; (d) nivells d'explotació actuals o potencials; (e) efectes de tàxons introduïts, hibridació, patògens, agents contaminants, competidors o paràsits			
<b>B. Distribució geogràfica en la forma B1, B2 o ambdues:</b>			
1. Extensió de presència	<100 km <sup>2</sup>	<5.000 km <sup>2</sup>	<20.000 km <sup>2</sup>
2. Àrea d'ocupació	<10 km <sup>2</sup>	<500 km <sup>2</sup>	<2.000 km <sup>2</sup>
I almenys dos dels següents subcriteris:			
(a) Fragmentació severa* o només existeix a...	Una sola localitat	No més de 5 localitats	No més de 10 localitats
(b) Disminució contínua, observada, inferida o projectada en algun dels següents subcriteris: (i) extensió de presència; (ii) àrea d'ocupació; (iii) àrea, extensió i/o qualitat de l'hàbitat; (iv) nombre de localitats o subpoblacions; (v) nombre d'individus madurs			
(c) Fluctuacions extremes en en algun dels següents subcriteris (i) extensió de presència; (ii) àrea d'ocupació; (iii) àrea, extensió i/o qualitat de l'hàbitat; (iv) nombre de localitats o subpoblacions; (v) nombre d'individus madurs			
* Seguint les recomanacions de Bañares <i>et al.</i> (2003), es pot considerar que un tàxon pateix una fragmentació severa quan més de la meitat dels individus es troben en poblacions de mida inferior a la MVP (població mínima viable)			
<b>C. Mida poblacional estimada en menys de... I complir un dels subcriteris següents:</b>			
1. Disminució continuada...	250 individus madurs	2.500 individus madurs	10.000 individus madurs
1. Disminució continuada...	del 25% durant 10 anys o 3 generacions (el que sigui més llarg)	del 20% durant 5 anys o 2 generacions (el que sigui més llarg)	del 10% durant 10 anys o 3 generacions (el que sigui més llarg)
2. Disminució continuada, observada, projectada o inferida, en el nombre d'individus madurs i complir un dels dos subcriteris següents:			
(a) Estructura de la població que compleixi amb algun dels subcriteris següents:			
(i) Cap subpoblació conté més de...	50 individus madurs	250 individus madurs	1.000 individus madurs
(ii) En alguna subpoblació hi ha com a mínim el...	90% dels individus madurs	95% dels individus madurs	100% dels individus madurs
(b) Fluctuacions extremes en el nombre d'individus madurs			
<b>D. Mida poblacional estimada inferior a...</b>			
	50 individus madurs	250 individus madurs	Molt petita o restringida complint un dels següents subcriteris: 1. Mida poblacional <1.000 individus madurs 2. Àrea d'ocupació <20 km <sup>2</sup> o menys de 5 localitats i propensa a amenaces naturals o antropològiques
<b>E. L'anàlisi quantitativa mostra que la probabilitat d'extinció en estat silvestre és de com a mínim un...</b>			
	50% durant 10 anys o 3 generacions (el que sigui més llarg)	20% durant 20 anys o 5 generacions (el que sigui més llarg)	10% durant 100 anys

La UICN proposa per al càlcul de l'àrea de distribució d'un tàxon dos paràmetres numèrics ben diferenciats, l'**extensió de presència** (*extent of occurrence*) i la mencionada **àrea d'ocupació** (*area of occupancy*; UICN, 2001). La UICN defineix l'extensió de presència com l'àrea continguda dins els límits imaginaris continus més curts que puguin dibuixar-se per incloure tots els llocs coneguts, inferits o projectats en els que un tàxon es troba present, excloent els casos de vagareig. Aquesta mesura pot excloure les discontinuïtats o disjuncions en les distribucions generals dels tàxons (p. ex. grans àrees d'hàbitat òbviament inadequat). L'extensió de presència pot ser mesurada freqüentment per un polígon convex mínim (el polígon de menor superfície que contingui tots els llocs de presència, però que cap dels seus angles interns superi 180 graus).

L'**àrea d'ocupació** d'un tàxon es defineix com l'àrea dins la seva extensió de presència que es ocupada per un tàxon, excloent els casos d'activitats associades a la deambulació. Aquesta mesura reflecteix el fet que habitualment un tàxon no apareixerà en tota l'àrea de la seva extensió de presència, ja que pot contenir hàbitats no ocupats o inadequats. La mida de l'àrea d'ocupació serà una funció de l'escala amb la que aquesta es mesuri, i ha de donar-se a una escala apropiada per als aspectes biològics rellevants del tàxon, la naturalesa de les amenaces i la informació disponible (vegeu Figura 2.5).



**FIGURA 2.5.** ESTIMACIÓ DE L'EXTENSIÓ DE PRESÈNCIA (A L'ESQUERRA) I DE L'ÀREA D'OCUPACIÓ (A LA DRETA) D'UN TÀXON IMAGINARI. LA SUMA DE LES ÀREES DELS QUADRATS UTM  $10 \times 10\text{KM}$  ( $100 \text{KM}^2$ ) SERIA EL VALOR DE L'ÀREA D'OCUPACIÓ, MENTRE QUE EL CÀLCUL DE L'ÀREA FORMAT PEL POLÍGON ( $4.900 \text{KM}^2$ ) REPRESENTARIA L'EXTENSIÓ DE PRESÈNCIA.

Donat que les categories de la UICN es van desenvolupar per avaluar el risc d'extinció de les espècies a escala mundial, per tal d'estudiar una espècie a nivell regional o local la UICN va publicar, després de 7 anys de treball, les *Directrius per usar els criteris de la Llista Vermella de la UICN a nivell regional i nacional* (UICN, 2003). Quan les poblacions d'una espècie localitzades en la regió que volem avaluar estan aïllades respecte les poblacions conespècífiques de fora la regió,

podem emprar els criteris habituals (globals) de la Llista Vermella de la UICN, de la mateixa manera que si es tracta d'espècies endèmiques. Al contrari, si volem avaluar una sèrie de poblacions localitzades en una determinada regió que ocasionalment intercanvien individus amb poblacions localitzades a l'exterior d'aquesta regió, caldrà introduir algunes modificacions recollides en les citades directrius. En els tàxons estudiats en el marc d'aquest treball, s'han pogut emprar els criteris UICN sense modificació, donat que tots els tàxons són endèmics de l'àrea estudiada. Només en el cas d'*Stachys maritima*, que té una presència al llarg de les costes de diversos països de la conca mediterrània, l'avaluació podia presentar algun conflicte. No obstant, atès que les poblacions ibèriques d'aquesta espècie estan prou aïllades respecte les poblacions conespècifiques exteriors (les poblacions més properes, al sud de França, estan allunyades uns 50 km) i per tant un efecte de rescat es poc probable que es produeixi, l'aplicació dels criteris modificats per l'escala regional sembla no és en absolut necessària.

