

DIVERSITAT GENÈTICA I FILOGEOGRAFIA EN *CARDUNCELLUS DIANIUS*



Sergi Massó i Alemán

Directors

Dra. Roser Vilatersana i Lluch
Institut Botànic de Barcelona

Dr. Jordi López i Pujol
Institut Botànic de Barcelona

Tutor

Dr. Cèsar Blanché i Vergés
Laboratori de Botànica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

Màster de Biodiversitat
Setembre de 2011

Diversitat genètica i filogeografia en *Carduncellus danius*

Sergi Massó i Alemán

Finalitzat el 6 de setembre de 2011.

Resum

Carduncellus danius Webb (= *Lamottea diania* (Webb) G. López) (*Cardueae*, *Compositae*) ($2n = 24$) és un endemisme de la comarca alacantina de la Marina Alta (territori diànic), el nord d'Eivissa i l'illot proper de S'Espartar. Es tracta d'una espècie amenaçada, llistada com a vulnerable (VU) a la *Lista Roja 2008 de la Flora Vascular Espanyola*. El seu hàbitat són roquissars calcaris principalment litorals i, secundàriament, pot trobar-se en matollars. El nombre de poblacions d'aquesta espècie és escàs, trobant-se la majoria d'elles a la zona del massís del Montgó. En el present estudi s'han estudiat un total de 9 poblacions de la Marina Alta, 6 poblacions d'Eivissa i una població de l'illot de S'Espartar amb els següents objectius: (i) estudiar la diversitat genètica a nivell de cpDNA d'una espècie amenaçada i d'àrea restringida com és *Carduncellus danius*; (ii) esbrinar l'estructura geogràfica d'aquesta diversitat genètica per tal de determinar l'origen de les poblacions i (iii) interpretar els resultats d'una manera que permeti comprendre l'història filogeogràfica d'aquesta espècie. Aquest treball recull els resultats obtinguts amb els marcadors de cpDNA (els espaiadors intergènics *rp132-trnL*, *trnK^{UUU}-rps16* i *ycf3-trnS*) de 3 individus de cada població.

Paraules clau: *Carduncellus danius*, cpDNA, diversitat genètica, espècie amenaçada, filogeografia.

Abstract

Carduncellus danius Webb (= *Lamottea diania* (Webb) G. López) (*Cardueae*, *Compositae*) ($2n = 24$) is an endemism that grows in La Marina Alta a region from Alacant (Dènia surrounding territory), the north of Eivissa and an islet in close proximity to S'Espartar. This threatened species receives the category of vulnerable (VU) in the *Red List of Threatened Plant Species of Spain from 2008*. Calcareous rocky places mainly nearby the sea are its habitat, although secondarily it could grow in bushes. The number of populations is quite low, inhabiting most of them in the area of El Montgó Range. 9 populations from La Marina Alta, 6 populations from Eivissa and another one from S'Espartar Islet, in order to attain the following goals: (i) study the genetic diversity of cpDNA in a threatened species that grows in a restricted area such as *Carduncellus danius*; (ii) find out the geographic structure of this genetic diversity in order to determine the origin of the populations and (iii) interpret the results so they provide an explanation about the phylogeographic history of this species. This work collects the results obtained with cpDNA markers (*rp132-trnL*, *trnK^{UUU}-rps16* and *ycf3-trnS* intergenic spacers) obtained from 3 individuals of each one of the populations.

Keyword: *Carduncellus danius*, cpDNA, genetic diversity, endangered species, phylogeography.

INTRODUCCIÓ

La regió mediterrània és un dels centres d'endemicitat vegetal més importants del món (Hawksworth & Kalin-Arroyo, 1995; Myers *et al.*, 2000). Els alts nivells d'endemicitat a l'est i a l'oest de la Mediterrània indiquen que massissos litorals i les àrees costaneres no es van glaçar durant el Quaternari. Molts tàxons endèmics estan restringits a àrees amb penya-segats, barrancs i massissos rocallosos on la topografia va propiciar tot un seguit de microclimes locals que va protegir aquestes àrees dels grans canvis macroclimàtics dels darrers 3 milions d'anys (Gómez-Campo & Malato-Beliz, 1985; Hewitt, 2001; Thompson, 2005; Médail & Diadema, 2009).

L'arxipèlag balear està format per dos grups d'illes (les Gimnèsies, amb Mallorca, Menorca, Cabrera i els illots adjacents, i les Pitiüses, amb Eivissa i Formentera i els illots adjacents) d'origen continental, és a dir, connectades amb el continent des de la seva gènesi. Els endemismes de les Balears poden estar restringits a una sola illa (com per exemple *Femeniasia balearica* (J.J.Rodr.) Susanna a Menorca o *Globularia cambessedesii* Willk. a Mallorca), a un dels dos sub-arxipèlags (*Thymelaea velutina* (Pourr. ex Camb.) Endl. a les Gimnèsies), a les Gimnèsies i una part de la microplaca original (com *Arenaria balearica* L., present a les Gimnèsies, Còrsega, Sardenya i la Toscana) o bé a les Pitiüses i l'est de la península Ibèrica (com ara *Silene cambessedesii* Boiss. & Reut. o l'espècie que ens ocupa, *Carduncellus dianius* Webb). Aquests patrons de distribució il·lustren molt bé les diferents afinitats biogeogràfiques dels tàxons de les Gimnèsies i les Pitiüses (Figura 1). La forta afinitat de les Gimnèsies amb l'antiga microplaca fa que els tàxons paleoendèmics siguin presents principalment a Mallorca i Menorca i rarament es trobin a les Pitiüses (Thompson, 2005).

En el Messinià (6 Ma, època en que Greuter (1994) ha suggerit l'origen de la flora de les Illes Balears) l'arxipèlag balear estava connectat amb el continent, permetent el pas de flora i fauna. Després de l'obertura de l'estret de Gibraltar (vora 5,3 Ma) les Gimnèsies i les Pitiüses es van aïllar degut a l'augment del nivell del mar (Gautier *et al.*, 1994).

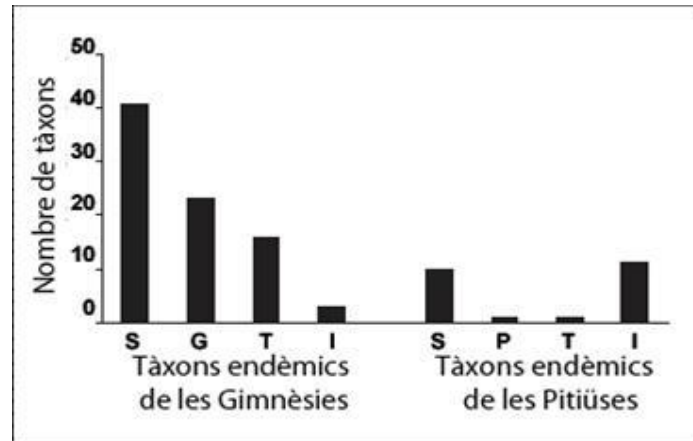


Figura 1: Patrons de distribució dels endemismes a les illes Balears. S: endemismes d'una sola illa; G: endemismes de dues o més illes gimnèsiques; P: endemismes de dues o més illes pitiüses; T: tàxons on la distribució s'estén fins les illes tirrèniques o els continents del voltant; I: tàxons on la distribució s'estén fins la península Ibèrica. No s'han inclòs els tàxons on la distribució abasta les Gimnèsies i les Pitiüses conjuntament (extret de Thompson, 2005).

Durant el Quaternari les Balears van seguir aïllades i sense connexions ni amb el continent ni amb altres arxipèlags fins i tot durant els períodes de regressió marina. El que sí van provocar els canvis en el nivell del mar, causats per oscil·lacions eustàtiques, fou una variació substancial de la forma i la mida de les Balears (Hillaire-Marcel *et al.*, 1996; Vesica *et al.*, 2000). El nivell del mar a l'àrea de les Balears va oscil·lar dins un rang de +90/-180 metres respecte el nivell actual (Cuerda, 1975; Gràcia *et al.*, 2001). Això va fer que en l'època en que les aigües estaven més baixes (sobretot al Plistocè Superior) Mallorca i Menorca quedessin unides i que els illots propers estiguessin units a les illes principals. A més, la distància que separava Eivissa de la península Ibèrica es reduí, aproximadament, a la meitat i passà a ser d'una cinquantena de quilòmetres. Aquesta reducció va afavorir, de ben segur, el pas d'espècies d'una banda a l'altra.

La dispersió a llarga distància (LDD) ha estat considerada des de sempre una dispersió passiva (Carlquist, 1981), però per a cada diàspora dispersada passivament ha d'haver-hi un vector i, depenent del vector, cada diàspora anirà a parar a un lloc diferent (Nathan, 2006). La LDD pot jugar un paper important en la formació de tot un seguit de processos ecològics i evolutius (Nathan, 2006) com pot ser la colonització d'illes des del continent (o a l'inversa). Un clar exemple va ser la ràpida colonització posterior a l'erupció del volcà Krakatau (Indonèsia) el 1883, que 50 anys després ja estava del tot vegetada (Docters van Leeuwen, 1936) o l'illa de Surtsey, on la primera planta vascular va aparèixer el 1965, dos anys més tard de l'emergència d'aquesta illa

a 32 km d'Islàndia (Fridriksson, 1992) i que el 2008 comptava amb 69 espècies de plantes vasculares (Blask, 2008).

Carduncellus dianius (= *Lamottea diania* (Webb) G. López) (*Cardueae*, *Compositae*) ($2n = 24$; Vilatersana *et al.*, 2000a) (Figura 2) és un endemisme de la comarca alacantina de la Marina Alta (territori diànic), el nord d'Eivissa i l'illot proper de S'Espartar. Es tracta d'una planta perenne de fins un metre d'alçada, amb fulles basals grans, peciolades i profundament partides, i capítols terminals grans amb flors tubulars de color blanquinós que es formen entre abril i juliol. Els aquenis són obovoides de 7-7,5 mm, amb contorns poc angulosos i amb una petita cresta apical de color groc pàl·lid tacat de negre a vegades (Vilatersana, 2008). Presenta una elevada capacitat de germinació *ex situ* (R. Vilatersana, com. pers.).

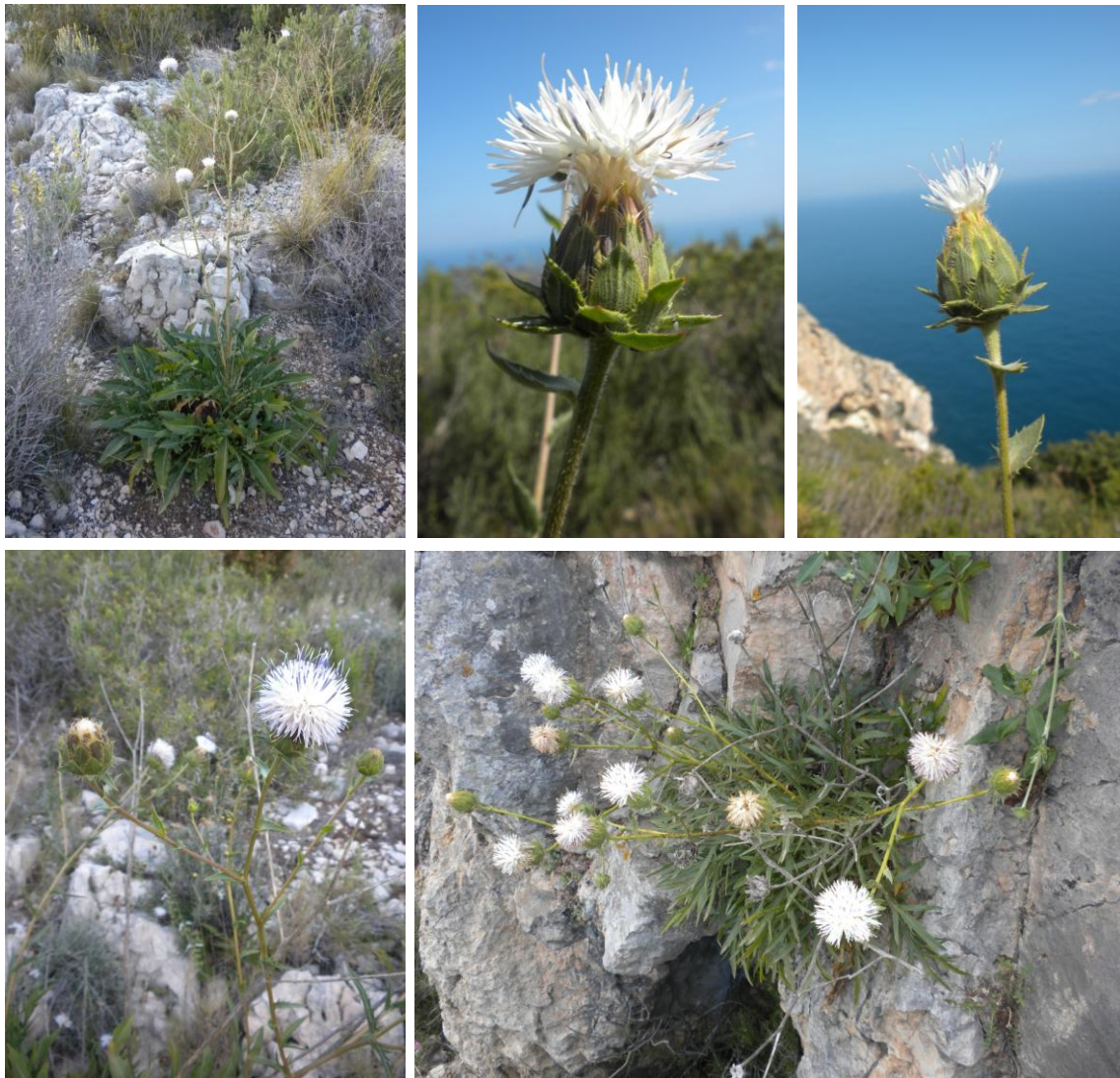


Figura 2: Aspecte d'alguns individus de *Carduncellus dianius* a la comarca alacantina de la Marina Alta

[Fotografies: J. López-Pujol]

No es coneix amb detall els pol·linitzadors de *C. dianius*, però es pot suposar que, com ocorre a la resta de compostes, es pol·linitza per mitjà d'himenòpters i dípters (Jeffrey, 2009). De fet, estudis en gèneres propers com *Femeniasia* (Conesa *et al.*, 2003) i *Carthamus* (Pandey & Kumari, 2008) es destaca el paper dels himenòpters i dípters com a pol·linitzadors.

Habita en roquissars calcaris en una alçada d'entre 0 i 500 m snm (Figura 3), principalment litorals, i acompanyat per *Scabiosa saxatilis* Cav., *Teucrium buxifolium* Schreb. subsp. *hifacense* (Pau) Fern. Casas, *Asperula pau* Font Quer subsp. *dianensis* (Font Quer) Romo, *Melica minuta* L. i *Chiladenus glutinosus* (L.) Fourr. entre d'altres. Secundàriament es pot trobar en matollars interiors amb *Teucrium flavum* L. subsp. *glaucum* (Jord. & Fourr.) Ronninger, *Pistacia terebinthus* L., *P. lentiscus* L., *Rhamnus alaternus* L. i *Coronilla juncea* L. entre d'altres. El nombre d'efectius de les poblacions és escàs, trobant-se la majoria d'ells a la zona del massís del Montgó (Marina Alta).



Figura 3: Diverses poblacions de *Carduncellus dianius* a la comarca alacantina de la Marina Alta. A l'esquerra, individus en una paret calcària a la pedrera de Gata de Gorgos. A dalt a la dreta, parets de la serra de Bèrnia on es troba *C. dianius*. A baix a la dreta, individu de *C. dianius* a la vessant sud del Montgó. [Fotografies: J. López-Pujol]

Es tracta d'una espècie llistada com a vulnerable (VU) a la *Lista Roja 2008 de la Flora Vasculat Española* (Moreno, 2008). A nivell legal, les poblacions de les Balears apareixen al *Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial* (Real Decreto 139/2011), mentre que les poblacions alacantines han perdut la protecció que proporcionava l'antic *Catálogo Nacional de Especies Amenazadas* (BOE, 2011).

Els objectius d'aquest treball són: (1) estudiar la diversitat genètica a nivell de cpDNA d'una espècie amenaçada i d'àrea restringida com és *Carduncellus dianius*; (2) esbrinar l'estructura geogràfica d'aquesta diversitat genètica per tal de determinar l'origen de les poblacions i (3) interpretar els resultats d'una manera que permeti comprendre l'història filogeogràfica d'aquesta espècie.

MATERIAL I MÈTODES

Mostreig

S'ha mostrejat tota l'àrea coneguda de l'espècie seguint d'Arellano & Torres (1981) per a Eivissa i S'Espartar i seguint J. Soler (com. pers) i Soler *et al.* (1999) per a la Marina Alta. En total s'han recol·lectat 16 poblacions (9 a la Marina Alta, 6 a Eivissa i 1 a l'illa de S'Espartar; Taula 1; Figura 4). El material recol·lectat s'ha conservat en gel de sílice a temperatura ambient. De cada població s'han estudiat 2-4 individus, amb un total de 48 individus analitzats. A més, seguint la filogènia de Vilatersana *et al.* (2000b) s'han usat com grups externs (*outgroups*) dos individus de *Femeniasia balearica* de Menorca (Capifort).

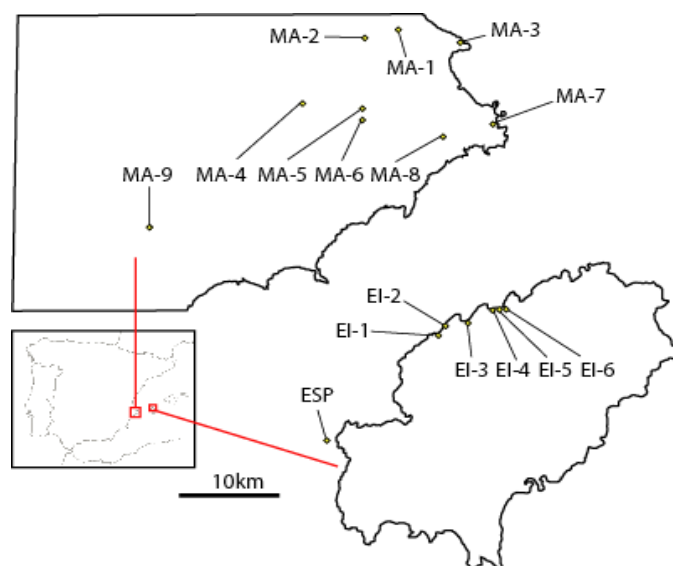


Figura 4: Localització de les poblacions estudiades de *Carduncellus dianius*.

Codi	Localitat	Latitud	Longitud	N	Recol·lectors
MA-1	Montgó - Pare Pere	38°49'01.5" N	0°06'21.4" E	3	Garnatje & Vilatersana
MA-2	Montgó - Jesús Pobre	38°48'45.9" N	0°05'19.5" E	3	López-Pujol, Massó, Soler & Vilatersana
MA-3	Cap de Sant Antoni	38°48'16.3" N	0°11'31.4" E	3	Garnatje & Vilatersana
MA-4	Llosa de Camatxo	38°46'07.5" N	0°00'02.3" W	3	López-Pujol, Massó, Soler & Vilatersana
MA-5	Gata de Gorgos	38°45'52.4" N	0°04'03.9" E	3	López-Pujol, Massó, Soler & Vilatersana
MA-6	Pedrera de Gata de Gorgos	38°44'53.6" N	0°06'28.6" E	3	López-Pujol, Massó, Soler & Vilatersana
MA-7	Xàbia - La Falzia	38°44'52.7" N	0°13'24.8" E	3	López-Pujol, Massó, Soler & Vilatersana
MA-8	Xàbia - Barranc d'Orxella	38°44'10.7" N	0°10'21.9" E	3	López-Pujol, Massó, Soler & Vilatersana
MA-9	Serra de Bèrnia	38°39'55.5" N	0°04'51.7" W	3	López-Pujol, Massó, Soler & Vilatersana
EI-1	Punta ses Torretes	39°03'44.2" N	1°20'46.4" E	2	Garnatje & Vilatersana
EI-2	Penyals de Cala Sardina	39°03'11.2" N	1°20'21.1" E	3	Garnatje & Vilatersana
EI-3	Entre Cala Aubarca i Racó Sa Punta	39°03'46.6" N	1°22'06.7" E	3	Garnatje & Vilatersana
EI-4	S'Àguila	39°04'38.0" N	1°24'36.0" E	3	Garnatje & Vilatersana
EI-5	Penyal s'Àguila	39°04'37.5" N	1°24'42.1" E	3	Garnatje & Vilatersana
EI-6	Cala Ximena	39°04'34.6" N	1°24'55.7" E	3	Garnatje & Vilatersana
ESP	Illa s'Espartar	38°57'30.7" N	1°11'40.2" E	4	Blanché & Sáez

Taula 1: Taula de localitats de les poblacions estudiades de *Carduncellus dianius*, codis, coordenades geogràfiques, nombre d'individus estudiats i recol·lectors.

Extracció, amplificació i seqüenciació del DNA

Per a l'extracció de DNA del material estudiat s'ha seguit el mètode de CTAB descrit per Doyle & Dickson (1987) modificat per Cullings (1992) amb tres rentats previs amb tampó de sorbitol (Tel-Zur *et al.*, 1999).

S'ha realitzat un estudi preliminar amb 8 individus de diferents poblacions i s'ha fet un *screening* per saber quines són les regions cloroplàstiques més bones pel seu estudi, és a dir, les que presenten més canvis nucleotídics i són fàcilment amplificables. En total s'han provat tretze regions i se n'han escollit tres: els espaiadors intergènics *rpl32-trnL^{UAG}*, *trnK^{UUU}-rps16* i *ycf3-trnS* (Taula 2).

Regió	Primer: seqüència nucleòtids	Referència
<i>rpl32-trnL^{UAG}</i>	rpl32-F: 5' CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT 3'	Shaw <i>et al.</i> (2005)
	trnL ^{UAG} : 5' CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT 3'	Shaw <i>et al.</i> (2005)
<i>trnK^{UUU}-rps16</i>	rps16x2F2: 5' AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC 3'	Shaw <i>et al.</i> (2007)
	trnK ^{UUU} x1: 5' TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC 3'	Shaw <i>et al.</i> (2007)
<i>ycf3-trnS</i>	SP43122F: 5' ATT GGC YAC AAY TGA AAA GG 3'	Hershkovitz (2006)
	SP44097R: 5' ATT CGA ACC CTC GGT AAA CA 3'	Hershkovitz (2006)

Taula 2: Seqüències dels primers usats per a l'amplificació i la seqüenciació de *Carduncellus dianius*.

La PCR s'ha realitzat en un volum de 25 µL, amb el següent contingut: 10% 10x AmpliTaq buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 10% 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 10% 2 mM dNTPs mix (Applied Biosystems), 4% d'albumina sèrica bovina (BSA, New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA), 4% de cada *primer* a 5 µM, 1 U AmpliTaq DNA polimerasa (Applied Biosystems). Fins arribar al volum de 25 µL s'ha completat amb aigua destil·lada esterilitzada.

Les condicions de la PCR han estat diferents segons la regió a estudiar. Per a les regions *rpl32-trnL^{UAG}* i *ycf3-trnS* s'ha fet un preescalfament de 3 min a 95°C seguit de 30 cicles amb els següents passos: 40 s a 95°C, 40 s a 54°C i 1 min 40 s a 72°C. S'ha finalitzat amb una fase final d'extensió de 5 min a 72°C i refredament fins a 12°C. Per a la regió *trnK^{UUU}-rps16* s'ha fet un preescalfament de 4 min a 80°C seguit de 30 cicles amb els següents passos: 1 min a 95°C, 1 min s a 50°C i 2 min 30 s a 65°C. S'ha finalitzat amb una fase final d'extensió de 5 min a 65°C i refredament fins a 12°C.

El producte de la PCR ha estat purificat amb ExoSAP-IT (USB Corp., Cleveland, OH, EUA) i seqüenciat amb els mateixos primers a la University of Florida ICBR Core Facility usant un ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems).

Alineament de seqüències i anàlisis filogeogràfiques

Les seqüències s'han alineat visualment usant BioEdit ver. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Les seqüències de les tres regions cloroplàstiques s'han concatenat. Les insercions i delecions han estat codificades com a presència/absència (1/0) i s'ha eliminat una base ambigua així com dues *Poly A* per no tenir senyal filogenètica.

Les anàlisis filogenètiques s'han realitzat usant màxima parsimònia (MP) amb PAUP* v.4.0b10 (Swofford, 2002) i amb inferència bayesiana usant Mr.Bayes ver. 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Per a màxima parsimònia, la recerca heurística s'ha fet usant 1000 rèpliques amb addició de tàxons a l'atzar (*random taxon addition*) i TBR *branch swapping*. S'han guardat tots els arbres més parsimoniósos i es resumeixen en l'arbre de consens estricte. Per examinar el nivell relatiu de suport dels clades s'ha utilitzat el mètode *bootstrap* (BS; Felsenstein, 1985) amb 100 processos de remostreig i recerca heurística amb addició simple de tàxons i el mètode TBR. També s'han computat els estadístics descriptius que quantifiquen la senyal filogenètica sota el criteri de MP: índexs de consistència (CI;

Kluge & Farris, 1969), de retenció (RI: Swofford, 2002) i d'homoplàsia (HI; Swofford, 2002).

El millor model evolutiu per a les anàlisis bayesianes s'ha buscat mitjançant Mr.Modeltest ver. 2.2 (Nylander, 2004), el resultat del qual va ser GTR+I usant l'estadistic *Akaike Information Criterion* (AIC). Han corregut dues anàlisis d'inferència bayesiana simultànies i independents, per a cada anàlisi, quatre cadenes de Markov han corregut simultàniament per 10 milions de generacions, de les quals s'ha mostrejat cada 1000 generacions. Posteriorment s'ha descartat els primers 2500 arbres (*burn-in* del 25%). L'arbre consens 50% i la probabilitat posterior (PP) s'ha calculat amb la resta dels arbres. Els nodes amb una probabilitat posterior ≥ 0.95 s'han considerat com suportats estadísticament.

La diversitat genètica s'ha calculat usant DnaSP ver. 5.10.00 (Librado & Rozas, 2009) aplicant l'índex de diversitat haplotípica (Hd) (Nei & Tajima, 1983) i l'estimació de la diversitat de parells de nucleòtids (π) (Jukes & Cantor, 1996). La distribució geogràfica dels haplotips s'ha analitzat mitjançant la comparació de dos índexs de fixació: G_{ST} (calculat únicament amb la freqüència d'haplotips) i N_{ST} (calculat a partir de la freqüència d'haplotips i la distància genètica entre ells). La neutralitat de la selecció per mutació s'ha testat mitjançant l'índex D de Tajima (Tajima, 1989) i els mètodes D^* i F^* de Fu i Li (Fu & Li, 1993). En aquestes anàlisis, les insercions i delecions s'han tractat com a *missing data*.

S'han construït *networks* d'haplotips amb el *software* TCS ver. 1.21 (Clement *et al.*, 2000) que utilitza la màxima parsimònia per tal d'elaborar sistemes no arrelats que mostrin les relacions entre seqüències no recombinants basant-se en l'algoritme de reconstrucció genealògica descrit per Templeton *et al.* (1992).

Les anàlisis de la varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) i les anàlisis espacials de la varianza molecular (SAMOVA; Dupanloup *et al.*, 2002) s'han realitzat amb els programes Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) i SAMOVA ver. 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002) respectivament. Realitzar una anàlisi AMOVA comporta la definició de grups poblacionals per als quals s'estimarà la diferenciació genètica. Per la seva banda, SAMOVA realitza un nombre determinat de clústers geogràfics definits per l'usuari (K) per tal de buscar que la variància genètica total entre els grups (F_{CT}) sigui màxima. SAMOVA s'ha realitzat amb valors de K entre 2 i 12 buscant el valor

òptim de F_{CT} . Per a cada K s'han realitzat 10000 iteracions amb 500 sets de condicions inicials.

RESULTATS

Variabilitat i diversitat d'haplotips

La primera regió (*trnK^{UUU}-rps16*) té una llargada d'entre 731 i 767 bp i s'ha alineat en una matriu de 769 bp. S'han trobat 4 canvis nucleotídics i 2 *gaps* de 14 i 22 bp. La llargada de la segona regió (*rpβ32-trnL^{UAG}*) és d'entre 833 i 870 bp i s'ha alineat en una matriu de 893 bp. En aquesta regió s'han detectat 5 canvis i 2 *gaps* de 15 i 21 bp. La tercera i darrera regió (*ycf3-trnS*) té una llargada d'entre 684 i 715 bp i s'ha alineat en una matriu de 716 bp. No s'han trobat canvis, però si dos *gaps* d'1 i 21 bp. La llargada de les tres regions concatenades és d'entre 2310 bp i 2358 bp en una matriu de 2378 bp.

Aquests canvis i *gaps* han permès determinar fins a tretze haplotips diferents (A-M) (Taula 3, Figura 5A-C). D'aquests tretze haplotips només un (E) el trobem a les tres zones estudiades (Marina Alta, Eivissa i S'Espartar). L'haplotip B està representat en tres poblacions de la Marina Alta (MA-1, MA-2 i MA-3, totes tres a la zona del Montgó i el cap de Sant Antoni). Els altres haplotips estan restringits a una sola població, bé sigui a la zona de la Marina Alta (A, C, D, H, K) o d'Eivissa (F, G, I, J, L, M) (Figura 5 A). Només 4 poblacions tenen més d'un haplotip (les 3 esmentades al Montgó i cap de Sant Antoni més EI-2, a Eivissa).

Paràmetre	Valor
Nombre de poblacions	16
Nombre d'individus	48
Nombre d'haplotips	13
Nombre de canvis	9
Nombre de <i>gaps</i>	6
Nombre d'arbres amb <i>outgroup</i>	35 arbres, 29 passos
Nombre d'arbres sense <i>outgroup</i>	159 arbres, 13 passos
Índex de consistència (CI)	0,897
Índex d'homoplàsia (HI)	0,103
Índex de retenció (RI)	0,925
Índex de consistència reescalada (RC)	0,829
Model evolutiu de Bayes	GTR+I

Taula 3: Característiques de les anàlisis filogenètiques i filogeogràfiques.

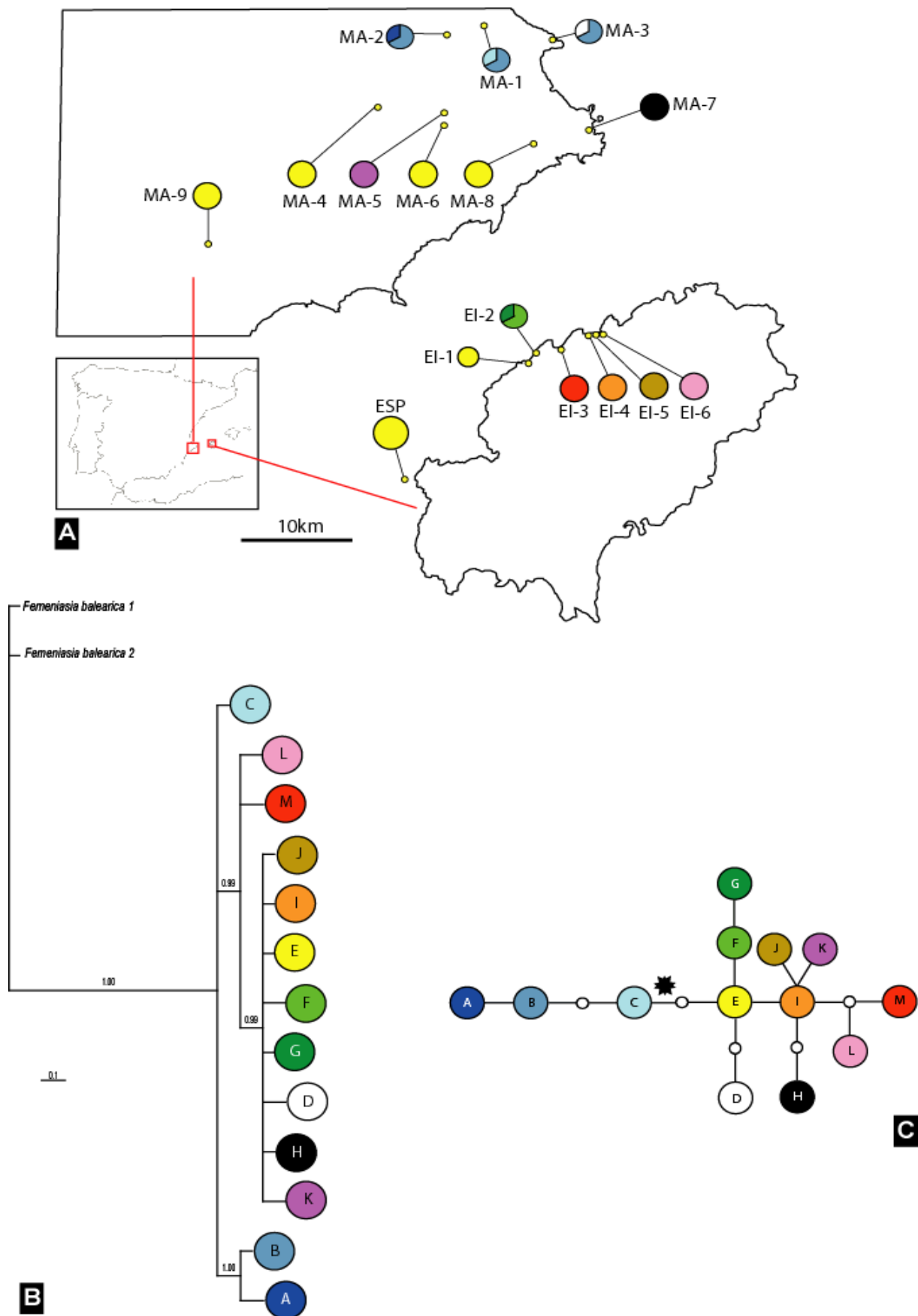


Figura 5: Distribució geogràfica (A), filograma consens bayesià amb el suport de la posterior probabilitat de les branques (B) i *network* d'haplotips (C, on l'estrella representa el punt d'unió amb l'*outgroup* i el cercle blanc petit representa un canvi no trobat) dels tretze haplotips trobats de *Carduncellus dianius*. Pels codis de població veure Taula 1. La mida dels cercles al mapa (A) és proporcional al nombre d'individus analitzats.

La diversitat nucleotídica (π) en les 16 poblacions té un rang d'entre 0,000 i 0,00116, amb un valor de 0,00120 per a l'espècie. El nivell més alt de diversitat nucleotídica es troba en una de les poblacions del Montgó (MA-3, $\pi = 0,00116$). Les altres dues poblacions del Montgó tenen nivells elevats de diversitat nucleotídica (MA-1, $\pi = 0,00058$; MA-2, $\pi = 0,00029$). A Eivissa, la població d'EI-2 és qui presenta un valor de diversitat nucleotídica més elevat ($\pi = 0,00029$) (Taula 4). Per regions geogràfiques, l'àrea que presenta un valor de π més elevat és la Marina Alta (Taula 4).

El valor mitjà de diversitat haplotípica (Hd) per a *C. dianius* és de 0,836. Les tres poblacions del Montgó (MA-1, MA-2, MA-3), juntament amb la població eivissenca EI-2, són les que mostren un nivell més elevat de diversitat d'haplotips ($Hd = 0,667$). Eivissa com a conjunt és la regió amb més diversitat haplotípica (Taula 4).

Pel que fa als diferents tests de neutralitat emprats, tots han resultat no significatius tant a nivell de població com de regió i d'espècie (Taula 4).

Paràmetres de diversitat i tests estadístics	Total	Marina Alta	Montgó	Eivissa + Espartar	Eivissa
Hd (sd)	0,836 (0,002)	0,752 (0,065)	0,583 (0,183)	0,876 (0,043)	0,912 (0,035)
π (sd)	0,00120 (0,00012)	0,00117 (0,00013)	0,00065 (0,00028)	0,00097 (0,00012)	0,00108 (0,00013)
Nº haplotips	13	7	4	7	7
D Tajima	-0,599 ns	0,476 ns	-1,398 ns	0,035 ns	0,200 ns
D* Fu & Li	0,205 ns	0,240 ns	-1,390 ns	0,766 ns	0,814 ns
F* Fu & Li	-0,078 ns	0,362 ns	-1,551 ns	0,644 ns	0,741 ns
G_{ST}	0,747	0,696	0,697	0,774	0,730
N_{ST}	0,867	0,819	0,819	0,923	0,919
$N_{ST} - G_{ST}$	0,120	0,123	0,122	0,149	0,189

Taula 4: Paràmetres de diversitat i tests de neutralitat per a 16 poblacions de *Carduncellus dianius* basat en tres regions de cpDNA. sd = desviació estàndard; ns = no significatiu.

Relacions filogenètiques entre haplotips

Les anàlisis de màxima parsimònia (MP) han donat un *network* amb els tretze haplotips (Figura 5C) on s'observa que l'haplotip C és el més proper a l'outgroup (assenyalat amb una estrella negra). Des de l'haplotip C es forma un grup d'haplotips que es queden al Montgó (A, B) i un altre grup d'haplotips que engloba els deu restants i que es reparteixen entre la Marina Alta i Eivissa. Tots tretze haplotips

divergeixen molt poc l'un de l'altre, tenint, la majoria, un sol canvi amb el més proper o estant, com a molt, a dos canvis de l'haplotip genèticament més pròxim.

L'estadística bayesiana amb el suport de la posterior probabilitat (Figura 5B) revela que els haplotips de *Carduncellus dianius* són monofilètics (BS = 100%; PP = 1,00). Les anàlisis bayesianes i de parsimònia identifiquen els haplotips exclusius del Montgó (A, B, C) com a germans i basals a la resta d'haplotips (BS < 75%, PP = 0,99). La topologia de les dues anàlisis és coincident, excepte en la subdivisió que fa l'anàlisi bayesiana de dos dels haplotips eivissencs (L, M), que en l'anàlisi de parsimònia no es troba. Els estadístics de les anàlisis filogenètiques es troben a la Taula 3.

Estructura genètica de les poblacions

En l'AMOVA amb dos nivells jeràrquics, el 88,05% de la variabilitat genètica es troba entre les poblacions (Taula 5). Les anàlisis niades són totes significatives amb l'excepció del percentatge de variabilitat genètica entre poblacions de la Marina Alta i Eivissa (Taula 5).

	g.l.	Suma quadrats	Components variància	% variabilitat		F_{ST}
Dos nivells jeràrquics						0,881
Entre poblacions	15	57,708	1,228	88,05	**	
Dins les poblacions	32	5,33	0,167	11,95	**	
Anàlisis niades						
<i>Marina Alta i Eivissa</i>						0,885
Entre grups	1	6,629	0,123	8,48	ns	
Entre poblacions	14	51,079	1,163	80,05	**	
Dins les poblacions	32	5,333	0,167	11,47	**	
<i>Montgó i la resta</i>						0,926
Entre grups	1	20,990	1,255	56,00	*	
Entre poblacions	14	36,718	0,820	36,57	**	
Dins les poblacions	32	5,333	0,167	7,44	**	
<i>Montgó, Marina Alta i Eivissa</i>						0,896
Entre grups	2	24,018	0,618	38,76	*	
Entre poblacions	13	33,690	0,810	50,79	**	
Dins les poblacions	32	5,333	0,167	10,45	**	

Taula 5: Anàlisis de variància molecular (AMOVA) basats en tres regions de cpDNA de *Carduncellus dianius*.

** $P < 0,0001$ (significatiu després de 10100 permutacions), * $P < 0,01$ (significatiu després de 10100 permutacions),

ns: no significatiu

SAMOVA no permet identificar amb claredat un valor adient de K , ja que els valors de F_{CT} van incrementant progressivament a mesura que incrementa el valor de K (Figura 6). Els valors de F_{CT} es situen en un rang d'entre 0,531 i 0,933 sense arribar a establir-se (Figura 6). El primer nivell de divergència ($K = 2$) revela un grup ben definit al massís del Montgó i el cap de Sant Antoni i un altre grup amb la resta de poblacions. Amb $K = 5$ i $K = 6$ s'observa un grup repartit entre la Marina Alta, Eivissa i S'Espartar (1), dos grups exclusius de la Marina Alta (2 i 5) i dos més exclusius d'Eivissa (3 i 4) (Figures 7 i 8).

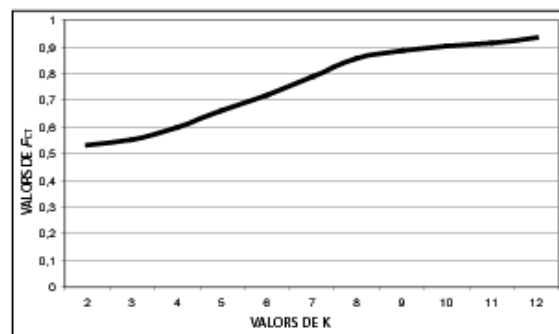


Figura 6: Valors de K en relació a F_{CT} .

Amb $K = 8$ es mantenen els grups de $K = 6$ però el grup 1 es divideix en dos grups (1 i 8) i el grup 3 es divideix en dos grups (3 i 7) (Figures 7 i 8). En el cas de $K = 9$ es divideix encara més el grup 3 (de tal manera que el grup 3 es queda tan sols amb una població i l'altra que hi havia amb $K = 8$ passa a formar el grup 9; Figures 7 i 8). Amb $K = 10$ es divideix el grup del massís del Montgó, separant-se la població del cap de Sant Antoni per formar el grup 10 (Figura 8).

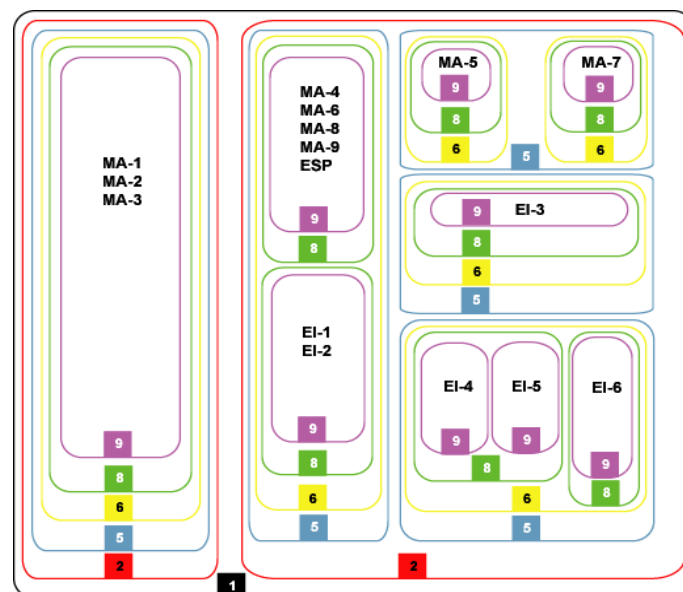


Figura 7: Clústers derivats de les anàlisis SAMOVA a *Carduncellus dianius*. Els agrupaments inconsistents (aquells on desapareix un grup quan s'afegeix un nivell de separació) no s'han representat.

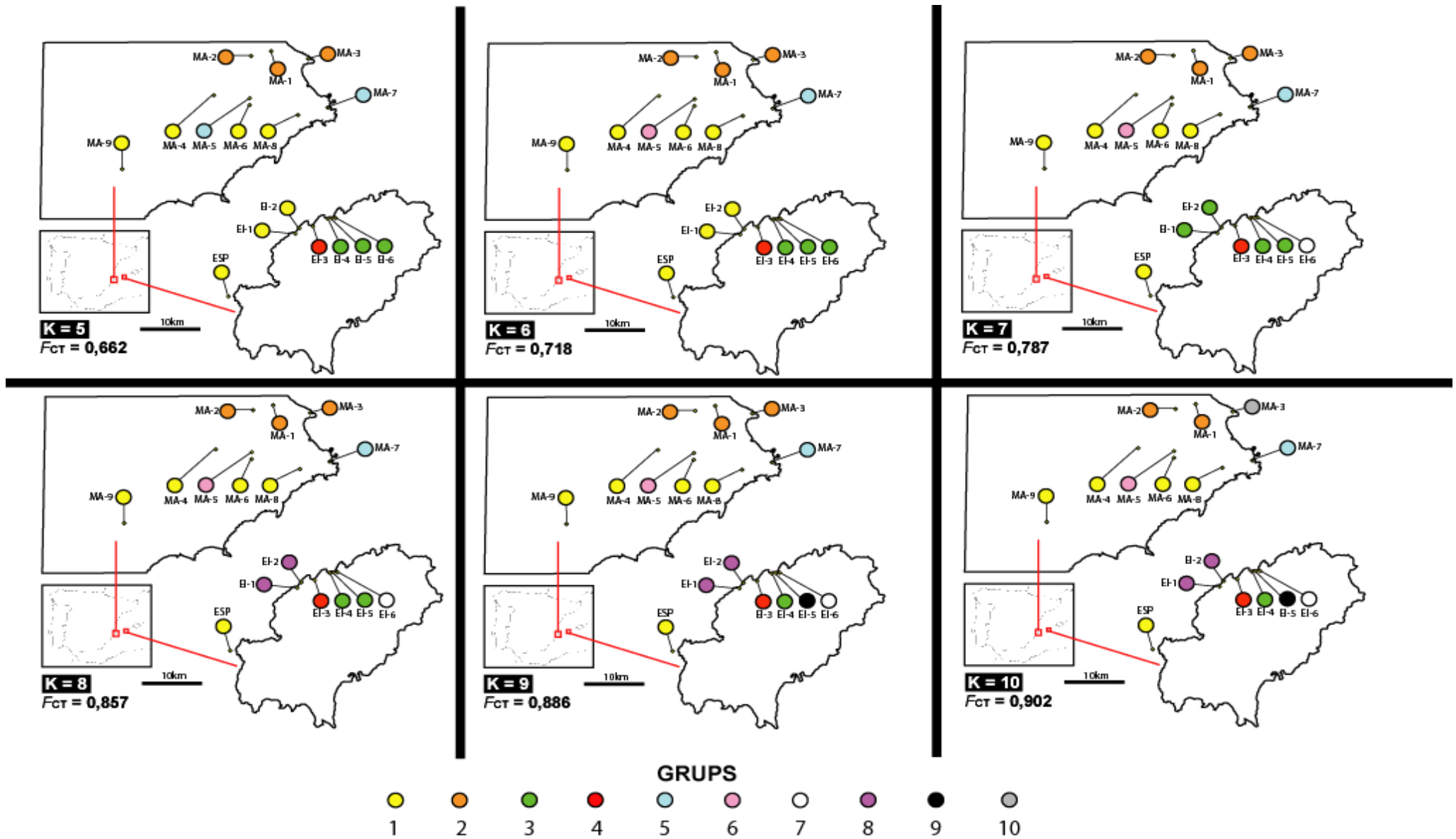


Figura 8: Grups de *Carduncellus dianius* definits per SAMOVA. Els valors de F_{CT} es van incrementant a mesura que s'incrementa el valor de K (Figura 7).

DISCUSSIÓ

Malgrat la variabilitat del cpDNA acostuma a ser baixa (Soltis *et al.*, 1998), el *network* d'haplotips (Figura 5C) de *Carduncellus dianius* conté fins a 13 haplotips (amb un màxim de 8 canvis entre tots), amb un valor de diversitat haplotípica per a l'espècie que pot considerar-se elevat ($Hd = 0,00120$) (Taula 4). Tot i això, cal tenir present que és difícil comparar resultats amb altres estudis a l'haver-se treballat amb diferent nombre i tipus de marcadors així com tenir una mida mostral diferent. A més, hi ha molt pocs els estudis de variabilitat intraespecífica del cpDNA en plantes d'àrea restringida a la conca mediterrània (Molins *et al.*, 2009). Teòricament, les espècies d'àrea restringida i les que són de vida llarga (cas de l'espècie que ens ocupa) tenen, de mitjana, un baix nivell de diversitat genètica (Hamrick & Godt, 1989) com és el cas de *Silene hifacensis* Rouy ex Willk. (Prentice *et al.*, 2003). No obstant, s'han detectat casos en que això no és així (*Femeniasia balearica*, Vilatersana *et al.*, 2007; *Senecio rodriguezii* Willk. ex J.J. Rodr., Molins *et al.*, 2009; o el present estudi sobre *Carduncellus dianius*). De fet, els nivells i la distribució de la diversitat genètica d'una espècie no només respon a característiques ecològiques (e.g. sistema reproductiu, especificitat d'hàbitat) i àrea de distribució, sinó que també està molt influenciada per la seva història evolutiva (colls d'ampolla poblacionals, migracions i canvis substancials de l'àrea de distribució, etc.) (Gray, 1996; Booy *et al.*, 2000).

Donat els estudis de datació de la tribu *Cardueae* (L. Barres *et al.*, in prep.) que situen la formació del gènere *Carduncellus* fa entre 5 i 6 Ma, és a dir, durant el Messinià, i veient aquest màxim de 8 canvis entre haplotips es pot aventurar un origen recent d'aquesta espècie o, com a mínim, de la seva expansió geogràfica. Molt probablement, aquest procés es va produir durant el Quaternari, quan les oscil·lacions del nivell del mar causades per les glaciacions (regressions marines) van afavorir el pas d'espècies entre les illes Balears i la península Ibèrica. De fet, els fenòmens de diferenciació i especiació no haurien estat estranys al llarg del Quaternari a la conca mediterrània, com, per exemple, els que s'han descrit en el gènere *Senecio* (Comes & Abbott, 2001).

Els patrons de diversitat de cpDNA reflecteixen processos poblacionals associats amb la dispersió de llavors degut a la seva herència habitualment materna (Ennos, 1994; Comes & Kadereit, 1998) i diferents estudis han demostrat la idoneïtat dels haplotips de cpDNA per a la reconstrucció de les rutes migratòries i la història poblacional de les espècies vegetals (Comes & Kadereit, 1998; Weiss & Ferrand, 2007). Els elevats

nivells de G_{ST} (Taula 4) indiquen que existeix una clara estructura geogràfica en la distribució dels haplotips de *Carduncellus dianius*. A més, com que el valor de N_{ST} és superior al de G_{ST} , es pot dir que existeix també una estructura filogeogràfica.

El *network* d'haplotips (Figura 5C) defineix dos grups a partir de la unió de l'*outgroup*. Un grup estaria restringit al massís del Montgó (haplotips A-C) i l'altre estaria repartit entre les altres poblacions de la Marina Alta i Eivissa (haplotips D-M). Aquesta aparent similitud genètica entre la Marina Alta i Eivissa vindria corroborada pels valors obtinguts en el percentatge de variabilitat de l'anàlisi niada de l'AMOVA entre aquestes dues regions geogràfiques (Taula 5).

A l'hora d'interpretar els resultats genètics obtinguts per al Montgó, cal tenir en compte que el aquest massís calcari probablement allotgi una gran població més o menys contínua de *C. dianius*. En primer lloc, convé tenir present que el cap de Sant Antoni forma part geològicament del massís del Montgó. D'altra banda, és en aquest massís és on es troben les poblacions amb un major nombre d'individus, i la continuïtat d'hàbitat potencial (parets de roca) garanteix el contacte entre els diferents nuclis poblacionals. En realitat, doncs, d'aquesta gran població s'haurien mostrejat dues subpoblacions dels extrems (MA-2 i MA-3) i una de central (MA-1), fet que no faria descartar l'existència de nous haplotips en aquesta zona. Aquí es pot observar un dels dos patrons que presenta la diversitat genètica en aquesta espècie. El Montgó és genèticament ric i alhora diferent, amb una singularitat genètica important, com ho demostra els elevats nivells de π de cadascuna de les poblacions (Taula 4) i l'elevat valor de variabilitat del Montgó respecte la resta de poblacions de l'espècie (Taula 5). Dels quatre haplotips presents al Montgó, un és comú en totes tres poblacions (B) i existeix un haplotip propi per a cada població (C a MA-1, A a MA-2 i D a MA-3). La situació basal de 3 dels 4 haplotips presents al Montgó en el filograma (i dels quals l'haplotip C és el central en el *network*), juntament amb la separació que fa SAMOVA amb $K = 2$ (Figura 7) fa pensar que la població del Montgó és la més antiga i que des d'allà s'hauria estès per la Marina Alta i arribat durant les glaciacions a la zona occidental d'Eivissa, probablement a través de l'illot de S'Espartar (on segons d'Arellano & Torres (1981) hi ha una de les poblacions més grans d'aquesta espècie a les Pitiüses) o d'altres illots pròxims a Eivissa.

La resta de les poblacions de la Marina Alta presenten pràcticament totes el mateix haplotip (Figura 5A), degut molt probablement a l'expansió de l'espècie des del Montgó. Aquesta expansió s'hauria produït d'una manera relativament senzilla, al

tractar-se d'una zona continental on la dispersió és força més fàcil que no pas a les illes (on les poblacions sempre es troben a la costa, en penya-segats aïllats i separats per platges de sorra). Al continent, la major continuïtat d'hàbitat (els massissos rocallosos calcaris són freqüents al territori diànic), la major facilitat per a la planta de trobar zones de refugi en èpoques desfavorables (donada la major amplitud altitudinal dels massissos calcaris respecte els penya-segats litorals d'Eivissa), i també a la major presència tant de pol·linitzadors com de vectors que afavoreixen el flux genètic, expliquen el patró de diversitat genètica que caracteritza les poblacions alacantines (presència haplotips d'àmplia distribució geogràfica i nivells alts de diversitat nucleotídica).

Per contra, les poblacions més petites i fragmentades es troben a Eivissa, on la morfologia dels hàbitats de *Carduncellus danius* (penya-segats litorals aïllats) hauria fixat els haplotips (per un procés de deriva genètica), diferenciant-se així les poblacions encara que geogràficament estiguin molt properes (Figura 5A). A Eivissa es revela, doncs, un patró de diversitat genètica considerablement diferent del de la Marina Alta: a Eivissa la diversitat haplotípica (Hd) és la més alta de totes les zones geogràfiques, (Taula 4) fruit de la existència d'haplotips generalment exclusius per a cada una de les poblacions mentre que la diversitat nucleotídica és reduïda. El tipus de dispersió que presenta *C. danius* (barocòria, és a dir, que les diàspores madures es desprenen de la planta mare i cauen pel seu propi pes) hauria afavorit els colls d'ampolla responsables de la fixació haplotips. Tot i la presència de papus, la llavor pesa massa i la LDD es veu perjudicada. Al ser plantes de vida llarga, a més, tot fa pensar que les poblacions han resistit principalment gràcies a la longevitat dels individus i a la seva elevada germinabilitat. Sobta aquest comportament en una espècie rupícola, ja que seria un comportament més típic d'una espècie colonitzadora.

El fet que el *network* d'haplotips (Figura 5C) enllaci un haplotip d'Eivissa (I) amb haplotips de la Marina Alta (H, K) fa pensar que s'hauria produït com a mínim una onada de retorn a la península Ibèrica. Aquesta idea es basa en la possibilitat de que fos l'haplotip I qui retornés a la península i des d'allà originés els haplotips H i K en un procés de LDD.

De cara a la conservació d'aquesta espècie amenaçada, seria recomanable la preservació del màxim nombre de poblacions possibles, atès que la variabilitat genètica de *C. danius* és deu principalment a diferències entre les poblacions ($F_{ST} = 0,881$), i en especial a Eivissa (donat l'elevat nombre d'haplotips exclusius). A la

Marina Alta, caldria prioritzar la conservació del Montgó perquè conté les poblacions més grans, les més singulars genèticament i les que contenen nivells més elevats de diversitat nucleotídica.

CONCLUSIONS

- 1.- Al contrari del que es podria esperar al tractar-se d'una espècie d'àrea restringida, *Carduncellus danius* és una espècie genèticament molt diversa.
- 2.- *Carduncellus danius* que presenta un diferent patró de diversitat genètica segons l'àrea geogràfica (Marina Alta o Eivissa).
- 3.- *Carduncellus danius* es podria considerar originari del massís del Montgó i, des d'allà, s'hauria expandit cap a la Marina Alta i cap a Eivissa. Des d'Eivissa, a més, hauria retornat com a mínim una altra vegada a la península Ibèrica.
- 4.- Els elevats valors de F_{ST} que presenten les poblacions de *C. danius* indiquen que és important la conservació de totes les poblacions per tal de preservar la màxima variabilitat genètica d'aquesta espècie. De totes aquestes convé prioritzar les poblacions del Montgó degut a la seva singularitat genètica.

AGRAÏMENTS

Primer de tot cal agrair la feina dels meus co-directors, Roser Vilatersana i Jordi López-Pujol, sense els quals aquesta feina no hagués estat possible arribar fins aquí. Agraïment especial mereix Jaume Soler, qui ens va acollir durant la setmana que va durar el treball de camp a la Marina Alta, acompanyant-nos a les poblacions i fent-nos descobrir l'entrepà de sípia. Agrair també la feina a en Cèsar Blanché, el tutor d'aquest treball, que em va obrir les portes a la recerca en el món de la botànica l'any 2008. Gràcies també a tots els integrants del Camarot dels Germans Marx: Almudena Galián, Núria Garcia, Konstantin Romaschenko i Alfonso Susanna així com a la resta de gent de l'Institut Botànic que m'ha donat un cop de mà a l'hora de realitzar aquesta feina. I per acabar, moltes gràcies a la gent que més m'ha suportat aquest darrer any: els *floreros*. Andrea *Salvia*, Almu *Centaurea*, Carles *Funghi*, Cris *Myosotis* i Rosa *Cneorum* perquè sense ells aquest màster s'hagués fet més llarg que les obres de la Sagrada Família.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

BOE (Boletín Oficial del Estado). 2011. Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. *Boletín Oficial del Estado* 46: 20912-20951.

Blask, S. 2008, *Iceland's new island is an exclusive club – for scientists only*. The Christian Science Monitor, October 24, 2008. Disponible en línea a [<http://www.csmonitor.com/The-Culture/2008/1024/iceland-s-new-island-is-an-exclusive-club-for-scientists-only>]. Consulta el 30 d'agost de 2011.

Booy, G., Hendriks, R.J., Smulders, M.M., Van-Groenendaerl, J.M. & Vosman, B. 2000. Genetic diversity and the survival of populations. *Plant Biology* 2: 379-395.

Carlquist, S. 1981. Chance dispersal. *American Scientist* 69: 509-516.

Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1823-1833.

Comes, H.P. & Abbott, R.J. 2001. Molecular phylogeography, reticulation, and lineage sorting in Mediterranean *Senecio* sect. *Senecio* (Asteraceae). *Evolution* 55: 1943-1962.

Comes, H.P. & Kadereit, J.W. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science*. 11: 432-438.

Conesa, M.A., Cardona, X., Moragues, E., Rita, J. & Mus, M. (2003). Pla de gestió i conservació de l'espècie *Femeniasia balearica* (J.J.Rodr.) Susanna (inèdit).

Cuerda, J. 1975. *Los tiempos cuaternarios en Baleares*. Palma de Mallorca, Espanya: Instituto de Estudios Baleáricos.

Cullings, K.W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1: 233-240.

d'Arellano, G. & Torres, N. 1981. *Nova aportació al coneixement de les plantes d'Eivissa i Formentera*. Eivissa, Espanya: Institut d'Estudis Eivissencs.

Docters van Leewen, W.M. 1936. Krakatau, 1883-1933. *Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg* 46-47: 481-492.

Doyle, J.J. & Dickson, E.E. 1987. Preservation of plant-samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon* 36: 715-722.

Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.

Ennos, R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250-259.

Excoffier, L. & Lischer, H. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Excoffier, L., Smouse, P. & Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics* 131: 479-491.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Fridriksson, S. 1992. Vascular plants on Surtsey 1981-1990. *Surtsey Research Progress Report* 10: 17-30.

Fu, Y.X. & Li, W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.

Gautier, F., Caluzon, G., Suk, J.P. & Violanti, D. 1994. Age et durée de la crise de salinité Messinienne. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 318: 1103-1109.

Gómez-Campo, C. & Malato-Beliz, J. 1985. The Iberian Peninsula. In: *Plant Conservation in the Mediterranean Area* (ed. Gómez-Campo, C.), pp 47-70. Dordrecht, Països Baixos: Junk.

Gràcia, F. Clamor, B., Landreth, R., Vicens, D. & Watkinson, P. 2001. Evidències geomorfològiques dels canvis del nivell marí. *Monografies de la Societat d'Història Natural de les Balears* 9: 91-119.

Gray, A. 1996. Genetic diversity and its conservation in natural populations of plants. *Biodiversity Letters* 3: 71-80.

Greuter, W. 1995. Origin and peculiarities of Mediterranean island floras. *Ecologia Mediterranea* 21: 1-10.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, breeding, and genetic resources* (eds. Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. & Weir, B.S.), pp. 43-63. Sunderland, MA, EUA: Sinauer Associates.

Hawksworth, D.L. & Kalin-Arroyo, M.T. 1995. Magnitude and distribution of biodiversity. In: *Genetics and Conservation of rare Plants* (eds. Falk, D.A. & Holsinger, K.E.), pp. 75-86. Oxford, Regne Unit: Oxford University Press.

Hershkovitz, M.A. 2006. Ribosomal and chloroplast DNA evidence for diversification of Western American Portulacaceae in the Andean Region. *Gayana Botanica* 63: 13-74.

Hewit, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537-549.

Hillaire-Marcel, C., Gariépy, C., Ghaleb, B., Goy, J.L., Zazo, C. & Cuerda, J. 1996. U-series measurements in thyrrenian deposits from Mallorca. Further evidence for two last-interglacial high sea levels in the Balearic Islands. *Quaternary Science Review* 15: 53-62.

- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Kluge, A.G. & Farris, J.S.** 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18: 1-32.
- Jeffrey, C.** 2009. Evolution of Compositae flowers. In: *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae* (eds. Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F. & Bayer, R.J.), pp. 131-138. Wien, Àustria: International Association for Plant Taxonomy.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R.** 1996. Evolution of protein molecules. In: *Mammalian protein metabolism*. (ed. Munro, H.N.), pp. 31-132. New York, NY, EUA: Academy Press.
- Librado, P. & Rozas, J.** 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Médail, F. & Diadema, K.** 2009: Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography* 36: 1333-1345.
- Molins, A., Mayol, M. & Rosselló, J.A.** 2009. Phylogeographical structure in the coastal species *Senecio rodriguezii* (Asteraceae), a narrowly distributed endemic Mediterranean plant. *Journal of Biogeography* 36: 1372-1383.
- Moreno, J.C.** (coord). 2008. *Lista Roja de la Flora Vasculare Española 2008*. Madrid, Espanya: Dirección General de Conservación de la Naturaleza y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nathan, R.** 2006. Long-distance dispersal of plants. *Science* 313: 786-788.
- Nei, M. & Tajima, F.** 1983. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. *Genetics* 105: 207-217.

- Nylander, J.A.A.** 2004. *MrModeltest v2*. Program distributed by the author. Uppsala, Suècia: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Pandey, A.K. & Kumari, A.** 2008. Pollination ecology of safflower (*Carthamus tinctorius* Linn). In: *Safflower: Unexploited potential and world adaptability. Proceedings of the 7th International Safflower Conference* (eds. Knights, S.E. & Potter, T.D.). Wagga Wagga, New South Wales, Australia.
- Prentice, H.C., Malm, J.U., Mateu-Andrés, I. & Segarra-Moragues, J.G.** 2003. Allozyme and chloroplast DNA variation in island and mainland populations of the rare Spanish endemic, *Silene hifacensis* (Caryophyllaceae). *Conservation Genetics* 4: 543-555.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** 2003. MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W.S., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. & Small, R.L.** 2005. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E. & Small, R.L.** 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Soler, M.R., Cristóbal, J.C. & Crespo, M.B.** 1999. Nuevas localidades alicantinas de *Carduncellus dianius* Webb. *Acta Botanica Malacitana* 24: 195-197.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. & Doyle, J.J.** 1998. *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Dordrecht, Países Baixos: Kluwer.
- Swofford, D.L.** 2002. PAUP*: Phylogenetic análisis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sunderland, MA, EUA: Sinauer Associates.
- Tajima, F.** 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis. *Genetics* 123: 585-595.

Tel-Zur, N., Abbo, S., Mysladbodksi, D. & Mizrahi, Y. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 249-254.

Templeton, A.R., Crandall, K.A. & Sing, C.F. 1992. A cladistic–analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. 3. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.

Thompson, J.D. 2005. *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford, Regne Unit: Oxford University Press.

Vesica, P.L., Tuccimei, P., Turi, B., Fornós, J.J., Gines, A. & Ginés, J. 2000. Late Pleistocene paleoclimates and sea-level change in the Mediterranean as inferred from stable isotope and U-series Studies of overgrowths on speleothems, Mallorca, Spain. *Quaternary Science Reviews* 19: 865-879.

Vilatersana, R. 2008. Estudios morfoanatómicos de los aquenios en el complejo *Carduncellus-Carthamus* (Asteraceae: Cardueae): su utilidad para la clasificación filogenética. *Collectanea Botanica (Barcelona)* 27: 37-64.

Vilatersana, R., Susanna, A., Garcia-Jacas, N. & Garnatje, T. 2000a. Karyology, generic delineation and dysploidy in the genera *Carduncellus*, *Carthamus* and *Phonus* (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 134: 425-438.

Vilatersana, R., Susanna, A., Garcia-Jacas, N. & Garnatje, T. 2000b. Generic delimitation and phylogeny of the *Carduncellus-Carthamus* complex (Asteraceae) based on ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution* 221: 89-105.

Vilatersana, R. Susanna, A. & Brochman, C. 2007. Genetic variation in *Femeniasia* (Compositae, Cardueae), an endemic and endangered monotypic genus from the Balearic Islands (Spain). *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 97-107.

Weiss, S. & Ferrand, N. 2007. *Phylogeography of Southern European Refugia*. Dordrecht, Països Baixos: Springer.