



**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

Departament de Productes Naturals,

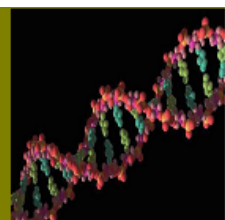
Biologia Vegetal i Edafologia

SECCIÓ DE BOTÀNICA

**UNA APROXIMACIÓ A L'ESTUDI DE  
L'EVOLUCIÓ I LA SISTEMÀTICA  
D'ARTEMISIA I GÈNERES AFINS  
en els àmbits de la citogenètica  
i filogènia moleculars**

**Sònia Marta Garcia Giménez  
Barcelona, 2007**

SÍNTESI



## SÍNTESI

A continuació es presenta un resum dels resultats més destacables que s'han obtingut durant la realització d'aquest treball de tesi, així com la seva discussió, i un petit apartat sobre les perspectives de futur que s'obren a partir d'aquí.

### 1. Estudis sobre la variació de la quantitat de DNA

En conjunt, aquest treball ha aportat dades inèdites de quantitat de DNA en 57 espècies i 133 poblacions del gènere *Artemisia* (*Artemisiinae*, *Anthemideae*) i gèneres afins, que són inclosos o propers a la subtribu *Artemisiinae* (*Brachanthemum*, *Dendranthema*, *Filifolium*, *Hippolytia*, *Kaschgaria*, *Lepidolopsis*, *Mausolea*, *Neopallasia*, *Nipponanthemum*, *Picrothamnus* i *Tanacetopsis*), i també dades que cobreixen aproximadament el 20% de les espècies del gènere *Tripleurospermum* (*Matricariinae*, *Anthemideae*). S'ha contribuït, doncs, que la tribu *Anthemideae* sigui de les més ben estudiades dins de la família *Asteraceae* des d'aquest punt de vista (Garcia *et al.*, en preparació –vegeu annex 1).

#### a. *Artemisia* i gèneres relacionats

En aquest treball, que representa una segona aproximació més o menys àmplia a l'estudi de la quantitat de DNA en *Artemisia* (a partir de Torrell i Vallès, 2001; abans s'havia determinat la mida del genoma en només set espècies d'aquest gènere: Nagl i Ehrendorfer, 1974; Geber i Hasibeder, 1980; Greilhuber, 1988; Bennett i Smith, 1991) s'ha ampliat el mostreig per a incloure representants de diversos gèneres que han aparegut estretament relacionats amb *Artemisia* en treballs recents de filogènia molecular (Torrell *et al.*, 1999; Vallès *et al.*, 2003). En molts casos s'han aportat dades noves de gèneres que no havien estat estudiats des d'aquest punt de vista (*Brachanthemum*, *Dendranthema*, *Filifolium*, *Hippolytia*, *Kaschgaria*, *Lepidolopsis*, *Neopallasia* i *Tanacetopsis*). Com a resultats remarcables, s'ha trobat una correlació positiva entre la quantitat de DNA, el nivell de ploïdia i el nombre de cromosomes d'una espècie en tots els grups estudiats, malgrat que hi ha algunes excepcions (per exemple, el cas d'*Artemisia leucodes*, una espècie diploide però amb una quantitat de DNA sorprenentment elevada, relacionada amb una

mida excepcionalment gran dels seus cromosomes). S'ha vist també que la quantitat de DNA per genoma haploide (coneguda com a valor  $1Cx$ , Greilhuber *et al.*, 2005) disminueix en augmentar el nivell de ploïdia, confirmant el que altres autors han trobat en molts altres grups (Leitch i Bennett, 2004). A més a més, hem pogut avaluar l'abast de la variació intraespecífica, ja que s'han pogut estudiar diferents poblacions de la mateixa espècie, i es constata que en la majoria de casos hi ha una lleugera variabilitat. Aquest és un tema controvertit, perquè, com es diu en la introducció, es considera que la quantitat de DNA és constant per a una espècie. No obstant, és molt possible que existeixi un cert grau de variació intraespecífica genuïna, ja que es coneixen causes o mecanismes que poden propiciar-la, i que ja s'han detectat en aquest grup, com l'existència de cromosomes B (Torrell *et al.*, 2003) poblacions aneusòmiques (Kreitschitz i Vallès, 2003), i molts altres com duplicacions de segments cromosòmics, delecions o l'actuació d'elements transposables (Greilhuber, 1998; Małuszyńska, 1999).

En el gènere *Artemisia* hem detectat que la quantitat de DNA varia significativament depenent del subgènere al qual pertanyi l'espècie, essent el subgènere *Tridentatae* el que té una quantitat de DNA més elevada per genoma haploide (valor  $1Cx$ ) i el subgènere *Dracunculus* el que la té més baixa. A més a més, l'heterogeneïtat en valors  $C$  dins d'un subgènere també és reflex del suport que té en la filogènia, i el cas del subgènere *Artemisia* (el més divers pel que fa a quantitats de DNA) és il·lustratiu en aquest sentit: aquest subgènere és el més heterogeni morfològicament, químicament, en la seva ecologia i en les dades cariològiques (Ehrendorfer, 1964; Torrell *et al.*, 1999); en un treball recent de filogènia molecular (Vallès *et al.*, 2003), cinc de les deu espècies que no s'inclouen en cap clada amb suport pertanyen a aquest subgènere, i membres d'aquest grup també apareixen distribuïts en quatre de les vuit clades principals. Contràriament, el subgènere *Dracunculus*, un dels més ben definits en la filogènia molecular i des del punt de vista morfològic (Vallès *et al.*, 2003) és el que presenta valors més similars de quantitat de DNA entre les seves espècies (al mateix nivell de ploïdia). Tot això posa de manifest el valor de la quantitat de DNA com a eina útil en sistemàtica, particularment, en l'avaluació d'espècies o grups d'emplaçament problemàtic.

### **b. Complex d'*Artemisia arborescens***

Amb aquest treball es pretenia avaluar l'abast de la variació intraespecífica (interpoblacional) en diferents poblacions de l'espècie mediterrània *Artemisia*

*arborescens*. Per a aquest estudi, a més de poblacions silvestres, s'han considerat també espècimens cultivats com a ornamentals i algunes de les seves cultivars més conegudes. Es detecta un 8,8% de variació entre les poblacions silvestres, un 7,8% entre les cultivades i un 14% entre les cultivars. A més a més, trobem diferències estadísticament significatives entre aquests tres grups, essent les poblacions silvestres les que mostren una quantitat de DNA més elevada. Per tant, sembla que la domesticació d'aquesta espècie ha comportat una progressiva disminució del genoma, acompanyada també d'una diferenciació morfològica considerable (les cultivars són, generalment, de mida més petita, més compactes, d'un fullatge més platejat i amb una fragància lleugerament diferent). No obstant, és possible que l'origen híbrid d'algunes d'aquestes cultivars (possiblement provinents d'encreuaments amb *A. absinthium*, una espècie estretament relacionada amb *A. arborescens*) expliqui les diferències entre aquests tres grups, particularment en el cas de la cultivar 'Powis Castle', la quantitat de DNA de la qual és propera a la mitjana obtinguda a partir dels valors d'*A. arborescens* i *A. absinthium*, i les seves característiques morfològiques també són intermèdies entre aquestes dues espècies.

D'altra banda, i considerant que moltes de les poblacions d'*A. arborescens* de les quals es disposa són d'origen insular, es mira de trobar alguna relació significativa entre aquest caràcter i la quantitat de DNA. Es creu que les pressions de selecció, especialment actives en les illes, poden propiciar una disminució del genoma, com estudis previs semblen apuntar (Suda et al., 2003, 2005; Garnatje et al., 2007). No obstant, no hem trobat relació entre aquests dos paràmetres per a aquesta espècie. D'altra banda, també hem mesurat la quantitat de DNA per a altres espècies estretament relacionades amb aquesta i endèmiques de la Macaronèsia, *Artemisia canariensis*, *A. argentea* i *A. gorgonum*, que es poden considerar les vicariants d'*A. arborescens* en aquestes illes, per la seva similitud morfològica i cariològica i perquè ocupen el mateix nínxol ecològic que aquesta espècie i, a més a més, apareixen estretament relacionades en filogènies moleculars recents (Vallès et al., 2003; Sanz et al., sotmès). En tots els casos, aquestes espècies mostren quantitats de DNA més baixes que *A. arborescens*, fet que podria estar relacionat, ara sí, amb l'especiació i la pressió de selecció més activa en arxipèlags que en el continent.

### c. Subgènere *Tridentatae* d'*Artemisia*

Aquest subgènere és el més ben cobert del gènere *Artemisia*, ja que s'ha analitzat exhaustivament des d'aquest punt de vista, amb representants de totes les seves espècies i subespècies, així com d'altres artemísies estretament relacionades (i també endèmiques d'Amèrica del Nord) com *A. californica*, *A. filifolia*, *A. pedatifida* i *A. palmeri*, per citar-ne algunes. Hem obtingut valors 2C similars per a la majoria de tàxons del subgènere (al voltant de 9 pg, per al nivell diploide), amb l'excepció de tres espècies taxonòmicament conflictives, que en dos casos presenten valors inferiors a la mitjana (*A. bigelovii* i *A. rigida*) mentre que la tercera (*A. pygmaea*) mostra un valor significativament més alt. Aquestes diferències en la quantitat de DNA podrien ser un reflex de les particularitats morfològiques i ecològiques (mida reduïda, adaptació a un hàbitat especialment àrid o diferències en la morfologia floral, entre d'altres) que haurien propiciat que fossin catalogades com a problemàtiques dins del grup, la qual cosa posa de manifest una vegada més la utilitat de les dades sobre mida del genoma en l'avaluació de la posició sistemàtica d'espècies de difícil emplaçament. S'ha analitzat la variació de la quantitat de DNA en un context filogenètic (obtingut a partir de les seqüències de l'espaiador transcrit intern, ITS) i considerant altres dades relacionades amb el seu hàbitat, ecologia o morfologia. En base als resultats obtinguts d'aquestes anàlisis, fem la hipòtesi que les artemísies presents a l'àrea nord-americana mostren un continu d'una estratègia vital (tipus *r*, o, a grans trets, plantes de creixement ràpid, amb cicles vitals curts i amb una elevada producció de llavors) a l'altra (tipus *K*, plantes de creixement lent, cicles vitals llargs i una producció de llavors baixa), i que aquest procés és acompanyat d'un augment considerable en la quantitat de DNA. S'analitza aquest augment, també, en base a les hipòtesis actuals sobre l'origen del subgènere *Tridentatae* a Amèrica del Nord, i aquesta mida del genoma més gran seria relacionada amb la posició filogenèticament derivada d'aquest grup en *Artemisia*, i amb el fet que l'evolució d'aquestes espècies hauria anat acompanyada d'una acumulació de DNA. Com molts altres treballs ja han demostrat, es detecta, a més, un descens en la quantitat de DNA per genoma haploide en incrementar el nivell de ploïdia. Aquest treball serveix per a confirmar que el subgènere *Tridentatae* (l'únic dels subgèneres d'*Artemisia* exclusivament endèmic d'Amèrica del Nord) té una quantitat de DNA mitjana significativament més elevada que la resta de subgèneres, com ja s'apuntava en un treball anterior. No obstant,

no només les *Tridentatae*, sinó totes les altres artemísies nord-americanes no pertanyents a aquest subgènere també mostren una quantitat de DNA notablement més elevada que la mitjana dels subgèneres als quals pertanyen. D'altra banda, espècies catalogades com a invasores o males herbes mostren quantitats de DNA considerablement més baixes que les seves congèneres que no tenen aquest comportament, i podrien ser clarament catalogades com a estratègies *r*.

En aquest treball s'analitza també la quantitat de DNA de diversos tàxons d'origen híbrid i es comparen les seves dades amb les dels presumptes progenitors d'aquests; es troba que en el cas d'híbrids homoploides (i diploides) la quantitat de DNA trobada no s'allunya gaire de la mitjana esperada de les dades dels seus progenitors, mentre que en al·lopoliploides sí que es detecta un descens en la quantitat de DNA per genoma haploide.

#### **d. Gènere *Tripleurospermum***

L'estudi dut a terme en alguns representants del gènere *Tripleurospermum*, tot i que no permet extreure'n conclusions sobre l'evolució de la variació de la quantitat de DNA en aquest grup, sí que constitueix una primera aproximació a l'estudi del gènere sota aquesta perspectiva. Com es veurà més endavant (en l'apartat "perspectives de futur"), aquest estudi es completarà amb la inclusió de més espècies i amb l'anàlisi d'aquests resultats en un marc filogenètic adequat, fins ara inexistent per al gènere.

Els resultats més remarcables d'aquest treball mostren que les espècies anuals tenen significativament menys quantitat de DNA que les perennes, que la mida del genoma haploide és més petita en poliploides que en diploides (ambdós resultats confirmen el que altres autors ja han trobat en altres grups de plantes, i el que nosaltres mateixos hem confirmat en el gènere *Artemisia* i particularment en el subgènere *Tridentatae*) i que l'altitud i la presència de rizoma també tenen alguna relació amb la quantitat de DNA. En el primer cas, espècies que viuen en zones elevades mostren també una quantitat de DNA més elevada, i això confirma el que altres autors han detectat en altres grups (Laurie i Bennett, 1985; Godelle *et al.*, 1993; Cerbah *et al.*, 1999) tot i que altres han trobat el contrari (Suda *et al.*, 2003); així doncs, el lligam entre aquestes dades no té perquè tenir una relació causal, i pot ser diferent segons el grup de plantes estudiades (o amb una ampliació del mostreig). Pel que fa a la presència de rizoma, hem trobat que espècies que en posseeixen solen tenir més DNA que les que no

es poden reproduir vegetativament; tot i que caldria comprovar també aquesta troballa amb un nombre més gran de dades (assolint una representació més considerable del grup), aquest resultat coincideix amb el que hem trobat en el treball anterior en el subgènere *Tridentatae*, i existeix una explicació biològica per a aquest fenomen (en no ser essencial la meiosi per a la reproducció d'aquestes espècies, es poden tolerar més fàcilment duplicacions, actuació d'elements transposables o d'altres aberracions cromosòmiques que incrementessin la quantitat de DNA).

## 2. Estudis de citogenètica clàssica i molecular

### e. Recomptes cromosòmics

Els resultats obtinguts en aquest punt mostren un altre cop l'existència dels dos nombres cromosòmics bàsics d'*Artemisia* (Vallès i Garnatje, 2005). Tots els tàxons estudiats excepte tres presenten  $x=9$ , el nombre bàsic més comú per al gènere, la subtribu, la tribu i inclús per a la família (Solbrig, 1977; Schweizer i Ehrendorfer, 1983; Oliva i Vallès, 1994; Vallès i Siljak-Yakovlev, 1997); els altres tenen  $x=8$ , probablement derivat de l'anterior per dispoloidia descendent, mecanisme que ja s'ha detectat en altres gèneres de les compostes (Fernández-Casas i Susanna, 1986; Garcia-Jacas *et al.*, 1996; Siljak-Yakovlev, 1996; Vallès *et al.*, 2001a, 2001b) i que es considera un dels mecanismes evolutius més importants en aquest grup. Un altre dels mecanismes evolutius més importants en plantes és la poliploïdia, i aquest estudi il·lustra també que és especialment activa en la subtribu *Artemisiinae*. De les espècies estudiades, 10 dels 19 tàxons són poliploides, dels quals nou són tetraploides i un hexaploide. En el gènere *Artemisia* s'ha vist que moltes de les espècies que poblen hàbitats extremadament àrids són poliploides, donant suport a les hipòtesis que connecten la tolerància ecològica amb la poliploïdia (Otto i Witton, 2000). Finalment, l'abundància de poliploides i l'existència d'espècies amb els dos nombres cromosòmics bàsics trobades en aquest treball i en d'altres de previs, conjuntament amb el gran nombre d'espècies d'aquest gènere i d'aquesta subtribu que habiten l'àrea d'Àsia central, confirmen que aquesta representa un centre d'especiació i diversificació principal per al gènere i, més globalment, per a la subtribu *Artemisiinae*.



### **f. Hibridació *in situ* fluorescent (FISH) i bandatge amb fluorocroms en espècies del subgènere *Tridentatae***

S'ha dut a terme la descripció citogenètica de diverses espècies pertanyents al subgènere *Tridentatae* i s'ha trobat un patró general que el caracteritza i que és coincident amb el que treballs previs semblaven apuntar (Torrell *et al.*, 2003). Resumidament, el cariotip típic del grup *Tridentatae* consta de cromosomes principalment metacèntrics i submetacèntrics, és molt simètric i homogeni i té tres *loci* cromosòmics positius per a cromomicina i per als dos tipus de DNA ribosòmic, 5S i 18S-5.8S-26S, colocalitzats, i sempre en posicions telomèriques. La hibridació *in situ* fluorescent ha demostrat també, per primera vegada en aquest gènere, que la seqüència telomèrica tipus *Arabidopsis* (TTTAGGG)<sup>n</sup> és present a les regions terminals. La presència de cromosomes B hi és relativament abundant, confirmant treballs anteriors (McArthur i Sanderson, 1999) i sembla que n'hi ha de diferents tipus. Les dades de longitud del cariotip, a més, es correlacionen bé amb les dades de quantitat de DNA. Tres espècies conflictives des del punt de vista sistemàtic han mostrat patrons de marcatge diferents del típic. D'una banda, *A. rigida*, clàssicament considerada membre de les tridentates (de manera una mica marginal per les seves diferències morfològiques notables amb la resta del grup i per la seva particular ecologia) presenta un *locus* addicional respecte a la resta de tridentates analitzades, tot i que molt feble; de l'altra, *A. bigelovii* (considerada també estranya dins del grup, especialment per la seva particular morfologia floral que la diferencia de la resta del subgènere; treballs de filogènia molecular l'han situada també fora de la clada del subgènere *Tridentatae*; Kornkven *et al.*, 1999) presenta un *locus* de menys que les altres. També hem analitzat *Artemisia filifolia*, espècie típicament considerada membre del subgènere *Dracunculus* però que un treball d'anàlisi de fragments de restricció del DNA cloroplàstic col·loca dins de la clada de les *Tridentatae* amb un elevat suport (Kornkven *et al.*, 1999); aquesta espècie també ha resultat ser citològicament diferent de la resta del grup, ja que només hi ha dos *loci* marcats. Aquests tres casos exemplifiquen el valor que els treballs de citogenètica poden aportar en l'avaluació de la posició sistemàtica d'espècies conflictives, s'afegeixen a l'evidència que també han aportat els treballs de determinació de la quantitat de DNA i seran completats i corroborats per les dades que ofereix la filogènia molecular d'aquest treball.

D'altra banda, també hem estudiat quins canvis es produeixen en el DNA ribosòmic i heterocromàtic amb la poliploidia, atès que és un mecanisme evolutiu

especialment present en aquest subgènere. A grans trets, es troben diferents resultats depenent de l'espècie analitzada. Per una banda, algunes espècies mostren el doble de *loci* de DNA ribosòmic que els seus diploides, que seria el resultat esperat de l'addició dels dos genomes (els casos d' *A. bigelovii* i *A. nova*), tot i que es veu que determinats *loci* són més febles; en altres, no obstant, es detecta una pèrdua en el nombre de *loci* respecte de l'esperat (*A. argillosa*, *A. nova ssp. duchesnicola* i *A. tripartita*), la qual cosa fa pensar que processos de pèrdua o conversió gènica, lligats a la diploïdització del seu cariotip, hi estiguin tenint lloc. És possible, també, que l'edat dels poliploides tingui relació amb els tipus de canvis que observem, i potser els primers casos corresponen a poliploides més recents (i per tant, no hi ha hagut temps de diferenciar molt el cariotip respecte els progenitors diploides) i els segons són més antics; tot i així, ja han estat observats canvis dràstics en poliploides des de les primeres generacions en altres grups de plantes (Levy i Feldman, 2002; Leitch and Bennett, 2004). D'altra banda, sembla que també hi ha canvis en l'heterocromatina lligats a la poliploïdització en algunes espècies; particularment, els tetraploides *A. argillosa*, *A. tridentata*, i *A. nova* mostren una elevada presència de bandes riques en G-C, i en *A. argillosa* i *A. nova ssp. duchesnicola*, a més, hi ha moltes bandes riques en A-T (sempre situades al final dels cromosomes; alguns dels quals, a més, apareixen marcats en els dos extrems). El significat d'aquest augment de DNA heterocromàtic està per veure, i possiblement estigui relacionat amb la diploïdització (i diferenciació del cariotip per a facilitar l'aïllament reproductiu del nou tàxon), tot i que també podria estar-ho amb una funció protectora de les regions telomèriques (Hidalgo, 2006).

S'ha intentat realitzar la hibridació *in situ* genòmica sobre *A. arbuscula ssp. longicaulis*, una espècie que es creu d'origen híbrid entre *A. arbuscula ssp. arbuscula* i *A. tridentata ssp. wyomingensis* (Winward i McArthur, 1995). Desafortunadament, no s'ha pogut discernir l'origen dels cromosomes d'aquest tàxon, possiblement per l'aparició recent, en temps evolutiu, d'aquest grup d'espècies, que no ha permès que els seus genomes siguin suficientment diferents entre ells per a ser distingits amb aquesta tècnica. Així doncs, les sondes d'ambdós presumptes progenitors apareixen barrejades en la placa metafàsica de l'híbrid, si bé sembla que un dels dos (*A. arbuscula ssp. arbuscula*) domini sobre l'altre en les regions de DNA ribosòmic, que queden més intensament tenyides per la sonda d'aquest que no pas per la de l'altre progenitor. En aquest sentit, alguns treballs descriuen processos de conversió gènica del DNA

ribosòmic d'una de les espècies progenitores a l'altra en tàxons híbrids (Matyasek *et al.*, 2003; Kovarik *et al.*, 2004).

Un dels resultats més interessants que aporta el treball de citogenètica a aquesta tesi és la confirmació de la colocalització d'ambdues regions del DNA ribosòmic. Un estudi anterior (Torrell *et al.*, 2003) ja mostrava aquest fenomen, i ara hem vist que aquesta colocalització s'estén a tots els *loci* cromosòmics marcats, és a dir, que sembla que ambdós tipus de DNA ribosòmic no existeixen independentment en aquest gènere, sinó que han evolucionat de manera concertada, i es podria tractar d'un cas d'evolució modular, tot i que aquest extrem està encara per confirmar. Aquest resultat, excepcional en el conjunt de les angiospermes, ja està essent motiu de més aprofundiment, tant per a veure fins on s'estén dins de la família de les *Asteraceae*, com per a elucidar-ne l'estructura molecular (vegeu annex 1). Un treball recent (Abd-el-Twab i Kondo, 2006) ha confirmat aquesta particularitat en una espècie d'un gènere proper a *Artemisia*, *Chrysanthemum zawadskii*.

### 3. Estudis de sistemàtica molecular en el subgènere *Tridentatae* d'*Artemisia*

Amb aquesta part del treball es pretén aconseguir un marc filogenètic adequat que reflecteixi la història evolutiva d'aquest grup d'espècies. Amb aquesta idea, s'han seqüenciat quatre regions de DNA, dues de nuclears (ITS i ETS) i dues de cloroplàstiques (*trnS-trnfM* i *trnC-trnS*) en una representació completa de totes les espècies i subespècies de *Tridentatae*, de la majoria d'espècies d'*Artemisia* endèmiques d'Amèrica del Nord d'altres subgèneres, i d'espècies de dos gèneres molt propers segons diversos estudis previs, *Sphaeromeria* i *Picrothamnus*. Com a grup extern hem escollit espècies d'*Artemisia* que representin cadascun dels seus subgèneres i que no siguin endèmiques d'Amèrica del Nord.

Els arbres filogenètics generats a partir de l'anàlisi de l'ITS i l'ETS per una banda i d'ambdues regions cloroplàstiques per l'altra han produït filogènies moleculars incongruents. Resultats similars han estat trobats en petits grups d'evolució molt recent i d'espècies estretament relacionades (com en *Cercocarpus*, Vanden Heuvel, 2002). Particularment, les reconstruccions proporcionades per ambdues regions nuclears estan més d'acord amb els caràcters morfològics o altres estudis previs (Holbo i Mozingo, 1965; Geissman i Irwin, 1974; Kornkven *et al.*, 1998, 1999; Vallès *et al.*, 2003), mentre que la filogènia procedent de l'anàlisi de les regions cloroplàstiques no es pot relacionar de cap

manera amb altres aproximacions al grup. Aquest darrer cas possiblement sigui un artefacte de la manca de caràcters filogenèticament informatius, que té com a conseqüència una baixa resolució de les clades (i per tant, agrupaments inexplicables); o de fenòmens de captura cloroplàstica, també descrits prèviament en el grup (Kornkven et al., 1999). La filogènia produïda per l'anàlisi de la regió ITS, tot i la baixa resolució, defineix clarament el que podríem considerar el grup *Tridentatae sensu stricto* (97% probabilitat posterior), dins del qual no hi ha cap espècie que no hagi estat prèviament tractada com a membre d'aquest subgènere. També agrupa coherentment espècies del subgènere *Artemisia*, i és remarcable que *A. palmeri* i *A. papposa* hi surtin associades (la seva posició dins d'aquests subgèneres també havia estat qüestionada; Kornkven et al., 1998; Shultz. 2005).

La filogènia produïda per l'ETS coincideix amb la de l'ITS a treure del grup *Tridentatae s. s.* (que en el cas de l'ETS queda partit en diverses clades) espècies tradicionalment conflictives, però clàssicament considerades com a membres d'aquest grup, com *A. bigelovii*, *A. pygmaea*, i *A. rigida*, i això coincideix amb el que els nostres treballs previs de citogenètica molecular i la determinació de la quantitat de DNA semblaven apuntar. La filogènia provinent de l'anàlisi conjunta d'ambdues regions nuclears també suggereix el mateix resultat pel que fa a aquestes espècies. El fet que no es coneguin híbrids (ni entitats subespecífiques) en els quals aquest tàxon estiguin implicats, afavoreix també aquesta conclusió (mentre que de les altres espècies hi ha múltiples híbrids descrits, i en molts casos descrits com a subespècies; Beetle, 1960; Winward i McArthur, 1995). No obstant, tampoc no s'aclareix la posició d'aquestes tres espècies conflictives ni la seva relació amb *Tridentatae s. s.*, tot i que sembla que *A. bigelovii* i *A. rigida* estan més properes a espècies americanes del subgènere *Dracunculus*.

D'altra banda, aquesta filogènia suggereix agrupacions difícilment explicables amb el que actualment es coneix d'aquest grup. A més, espècies d'altres gèneres (*Picrothamnus* i *Sphaeromeria*) apareixen immerses en el gènere *Artemisia*, com també estudis previs havien mostrat (Vallès et al., 2003; Sanz et al., sotmès); com a nou resultat afegim que en el cas de *Sphaeromeria*, aquest gènere és clarament polifilètic. No obstant, no proposem de moment recombinacions nomenclaturals (ni en *Sphaeromeria* ni en *Picrothamnus*) a l'espera d'obtenir més dades sobre aquestes espècies. Finalment, les incongruències trobades a diferents nivells, ens fan pensar que la història evolutiva d'aquest grup és més semblant a una xarxa, amb relacions complexes entre els seus

membres (i en què estan implicats els fenòmens habituals de poliploidia, hibridació i particularment introgressió) que no pas a un arbre filogenètic. Aquest treball il·lustra els problemes que poden aparèixer en intentar abordar la reconstrucció filogenètica de tàxons tan estretament relacionats i d'evolució relativament recent. Una altra aproximació, probablement amb estudis poblacionals, o un altre tipus d'anàlisi de les dades (en xarxa) podrien ajudar a elucidar les veritables relacions interespecífiques en aquest grup.

#### 4. Perspectives de futur

Fem aquí un breu incís sobre alguns punts d'interès per a futures recerques que obre aquest treball.

1. La colocalització d'ambdues regions del DNA ribosòmic nuclear 5S i 18S-5.8S-26S, detectada mitjançant la hibridació *in situ* fluorescent, és una troballa excepcional que indica que en aquestes espècies existeix una ordenació alternativa a la majoria d'angiospermes pel que fa al DNA ribosòmic. Els resultats preliminars (en base a assaigs de PCR amb diferents combinacions d'encebadors, i hibridacions *Southern blot*) indiquen, a més, que la unitat 5S és immersa en l'espaiador intergènic (IGS) del DNA ribosòmic 18S-5.8S-26S. En aquest sentit, seria interessant elucidar l'estructura de l'espaiador intergènic d'*Artemisia* i mirar d'esbrinar els mecanismes que l'han propiciada, així com veure fins a on s'estén aquest tret en la tribu *Anthemideae* i en la família de les asteràcies i en quin moment de la seva evolució va aparèixer per primer cop aquesta característica (vegeu annex 1).
2. El treball de filogènia molecular dut a terme en el subgènere *Tridentatae* posa de manifest els problemes que poden aparèixer en intentar abordar una ordenació sistemàtica d'un complex d'espècies molt estretament relacionades i on els processos d'hibridació, introgressió i poliploidia són freqüents. En aquest sentit, l'estudi realitzat serveix de base per a estudis més aprofundits que incloguin tractaments de dades en què es consideri la xarxa de relacions que es dona en aquestes espècies. Creiem que algunes de les espècies/subespècies d'aquest complex són d'origen híbrid, i que es poden haver generat independentment

repetides vegades; per això, ens proveirem de diferents poblacions dels mateixos tàxons i un cop obtinguda una representació més àmplia del grup les analitzarem amb programes que tinguin en compte les possibles relacions reticulades. A més, s'intentarà determinar quan el grup *Tridentatae* va divergir de la resta d'*Artemisia* mitjançant l'aplicació de mètodes de datació tipus rellotge molecular.

3. L'estudi de quantitat de DNA del gènere *Tripleurospermum* s'ampliarà amb una representació completa del gènere (que consta de 38 espècies) més una altra d'igualment completa del gènere *Matricaria* (que consta de 8 espècies, algunes de les quals han estat incloses en *Tripleurospermum*) i s'acompanyarà d'una filogènia molecular d'aquest grup en base a regions del DNA ribosòmic nuclear. L'anàlisi d'ambdós conjunts de dades (filogènia i quantitat de DNA) contribuirà a un millor coneixement d'aquests gèneres.

## 5. Bibliografia

- ABD EL-TWAB, M. H. AND K. KONDO. 2006. FISH physical mapping of 5S, 45S and *Arabidopsis*-type telomere sequence repeats in *Chrysanthemum zawadskii* showing intra-chromosomal variation and complexity in nature. *Chromosome Botany* 1: 1-5.
- BEETLE, A. A. 1960. A study of sagebrush, the section *Tridentatae* of *Artemisia*. In: Bulletin 368, University of Wyoming experiment station. Laramie, WY.
- BENNETT, M. D. AND J. B. SMITH. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Biological Sciences of London* 334: 309-345.
- CERBAH, M., J. COULAUD, S. C. BROWN AND S. SILJAK-YAKOVLEV. 1999. Evolutionary DNA variation in the genus *Hypochaeris*. *Heredity* 82: 261-266.
- EHRENDORFER, F. 1964. Notizen zur Cytotaxonomie und Evolution der Gattung *Artemisia*. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 111: 84-142.
- FERNÁNDEZ CASAS, J. AND A. SUSANNA. 1986. Monografía de la sección *Chamaecyanus* Willkomm del género *Centaurea* L. Treballs de l'Institut Botanic de Barcelona 10: 5-174.
- GARCIA-JACAS, N., A. SUSANNA AND R. ILARSLAN. 1996. Aneuploidy in Centaureinae (Compositae): is n=7 the end of the series? *Taxon* 45: 39-42.
- GARNATJE, T., S. GARCIA, AND M. A. CANELA. 2007. Genome size variation from a phylogenetic perspective in the genus *Cheirolophus* Cass. (Asteraceae): biogeographic implications. *Plant Systematics and Evolution* 264: 117-134.
- GEBER, G., AND G. HASIBEDER. 1980. Cytophotometrische Bestimmung von DNA Mengen: Vergleich einer neuen DAPI-Fluoreszenzmethode mit Feulgen Absorptionsphotometrie. *Microscopica Acta Supplement* 4: 31-35.
- GEISSMAN, T. A., AND M. A. IRWIN. 1974. Chemical constitution and botanical affinity in *Artemisia*. In: Bendz, G., and Santesson, J. (eds). Chemistry in botanical classification, p. 135-143. *Proceedings of the Twenty-fifth Nobel Symposium*. Academic Press. New York, 320 p.
- GODELLE, B., D. CARTIER, D. MARIE, S. C., BROWN, SILJAK-YAKOVLEV, S., 1993. Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry* 14, 618- 626.
- GREILHUBER, J. 1988. "Self-tanning"—a new and important source of stoichiometric error in cytophotometric determination of nuclear DNA content in plants. *Plant Systematics and Evolution* 158: 87-96.
- GREILHUBER, J. 1998. Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. *Annals of Botany* 82(Supplement A): 27-35.
- GREILHUBER, J., J. DOLEŽEL, M. A. LYSÁK, AND M. D. BENNETT. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms "genome size" and "C-value" to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* 95(1): 255-260.
- HIDALGO, O. 2006. El Grupo *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae, Centaureinae): delimitación y filogenia. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- HOLBO, H. R. AND H. N. MOZINGO, 1965. The chromatographic characterization of *Artemisia* section *Tridentatae*. *American Journal of Botany* 52: 970-978.

- KORNKVEN, A. B., L. WATSON, AND J. ESTES. 1998. Phylogenetic analysis of *Artemisia* section *Tridentatae* (Asteraceae) based on sequences from the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 85 (12): 1787-1795.
- KORNKVEN, A. B., L. WATSON, AND J. ESTES. 1999. A molecular phylogeny of *Artemisia* sect. *Tridentatae* (Asteraceae) based on chloroplast DNA restriction site variation. *Systematic Botany* 24: 69-84.
- KOVARIK, A., R. MATYASEK, K. Y. LIM, K. SKALICKÁ, B. KOUKALOVÁ, S. KNAPP, M. CHASE AND A. R. LEITCH. 2004. Concerted evolution of 18–5.8–26S rDNA repeats in *Nicotiana* allotetraploids. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 615-625.
- KREITSCHITZ, A., AND J. VALLÈS. 2003. New or rare data on chromosome numbers in several taxa of the genus *Artemisia* (Asteraceae) in Poland. *Folia Geobotanica* 38: 333-343.
- LAURIE, D. A. AND M. D. BENNETT. 1985. Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation. - *Heredity* 55: 307-313.
- LEITCH, I. J. AND M. D. BENNETT. 2004. Genome downsizing in polyploidy plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 651-663.
- LEVY, A. A. AND M. FELDMAN. 2002. The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant Physiology* 130: 1587-1593.
- MATYASEK, R., K. Y. LIM, A. KOVARIK AND A. R. LEITCH. 2003. Ribosomal DNA evolution and gene conversion in *Nicotiana rustica*. *Heredity* 91:268-275.
- MCCARTHER, E.D. AND S. C. SANDERSON. 1999. Cyto geography and chromosome evolution of subgenus *Tridentatae* of *Artemisia* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 86: 1754-1775.
- NAGL, W. AND F. EHRENDORFER 1974. DNA content, heterochromatin, mitotic index, and growth in perennial and annual Anthemideae (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 123: 737-740.
- OLIVA, M. AND J. VALLÈS. 1994. Karyological studies in some taxa of the genus *Artemisia* (Asteraceae). *Canadian Journal of Botany* 72: 1126-1135.
- OTTO S. P. AND J. WHITTON. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34: 401-437.
- SANZ, M., T. GARNATJE, O. HIDALGO, N. GARCIA-JACAS, A. SUSANNA, AND J. VALLÈS. Molecular phylogeny of subtribe Artemisiinae and allies (Anthemideae, Asteraceae) with special reference to *Artemisia*: evidence from nrDNA 3'ETS and ITS sequences. *Taxon*, submitted.
- SCHWEIZER D. AND F. EHRENDORFER. 1983. Evolution of C-band patterns in Asteraceae-Anthemideae. *Biologisches Zentralblatt* 102: 637-655.
- SHULTZ, L. M. 2005. Re-examination of subgeneric concepts in *Artemisia* p. 36-44 in Y. R. Ling, ed. International Symposium on *Artemisia* and its allies. South China Institute of Botany, Guangzhou.
- SILJAK-YAKOVLEV, S. 1996. La dysploïdie et l'évolution du caryotype. *Boccone* 5: 211-220.
- SOLBRIG, O. T. 1977. Chromosomal cytology and evolution in the family Compositae. In: Heywood VH, Harborne JB, Turner BL, eds. *The biology and chemistry of the Compositae*, Vol. I. London: Academic Press, 269-281.
- SUDA, J., T. KYNCL, AND R. FREIOVÁ, 2003. Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. *Annals of Botany* 92: 153-164.
- TORRELL, M. AND J. VALLÈS. 2001. Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary and ecological implications. *Genome* 44: 231-238.



- TORRELL, M., N. GARCIA-JACAS, A. SUSANNA AND J. VALLÈS. 1999. Infrageneric phylogeny of the genus *Artemisia* L. (Asteraceae, Anthemideae) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *Taxon* 48: 721-736.
- TORRELL, M., M. CERBAH, S. SILJAK-YAKOVLEV AND J. VALLÈS. 2003. Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescence *in situ* hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant Systematics and Evolution* 239: 141-153.
- VALLÈS J. AND T. GARNATJE. 2005. *Artemisia* and its allies: genome organization and evolution and their biosystematic, taxonomic, and phylogenetic implications in the *Artemisiinae* and related subtribes (Asteraceae, Anthemideae). In: *Plant genome: biodiversity and evolution* (eds. Sharma AK, Sharma A). Vol 1 part B. pp 255-285.
- VALLÈS J. AND S. SILJAK-YAKOVLEV. 1997. Cytogenetic studies in the genus *Artemisia* L. fluorochrome banded karyotypes of five taxa, including the Iberian endemic species *Artemisia barrelieri* Besser. *Canadian Journal of Botany* 75: 595-606.
- VALLÈS, J., M. TORRELL AND N. GARCIA-JACAS. 2001a. New or rare chromosome counts in *Artemisia* L. (Asteraceae, Anthemideae) and related genera from Kazakhstan. *Botanical Journal of the Linnean Society* 137: 399-407.
- VALLÈS, J., M. TORRELL, N. GARCIA-JACAS AND L. A. KAPUSTINA. 2001b. New or rare chromosome counts in the genera *Artemisia* L., and *Mausolea* Bunge (Asteraceae, Anthemideae) from Uzbekistan. *Botanical Journal of the Linnean Society* 135: 391-400.
- VALLÈS, J., M. TORRELL, T. GARNATJE, N. GARCIA-JACAS, R. VILATERSANA AND A. SUSANNA. 2003. The genus *Artemisia* and its allies: phylogeny of the subtribe *Artemisiinae* (Asteraceae, Anthemideae) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *Plant Biology* 5: 274-284.
- VANDEN HEUVEL B. D. 2002. Molecular systematics of *Cercocarpus* H.B.K. (Rosaceae) [electronic resource]. Tesi doctoral. University of Texas at Austin. <http://hdl.handle.net/2152/654>.
- WINWARD, A. H. AND E. D. MCARTHUR. 1995. Lahontan sagebrush (*Artemisia arbuscula* ssp. *longicaulis*): a new taxon. *Great Basin Naturalist* 55: 151-157.