



PLANTS PEOPLE
POSSIBILITIES



***Artemisia* L. (Asteraceae): entenent la seva evolució mitjançant l'ús d'eines citogenètiques i moleculars**

Jaume Pellicer, Teresa Garnatje i Joan Vallès

Seminaris de Recerca
Facultat de Farmàcia
Universitat de Barcelona
30 de novembre de 2010

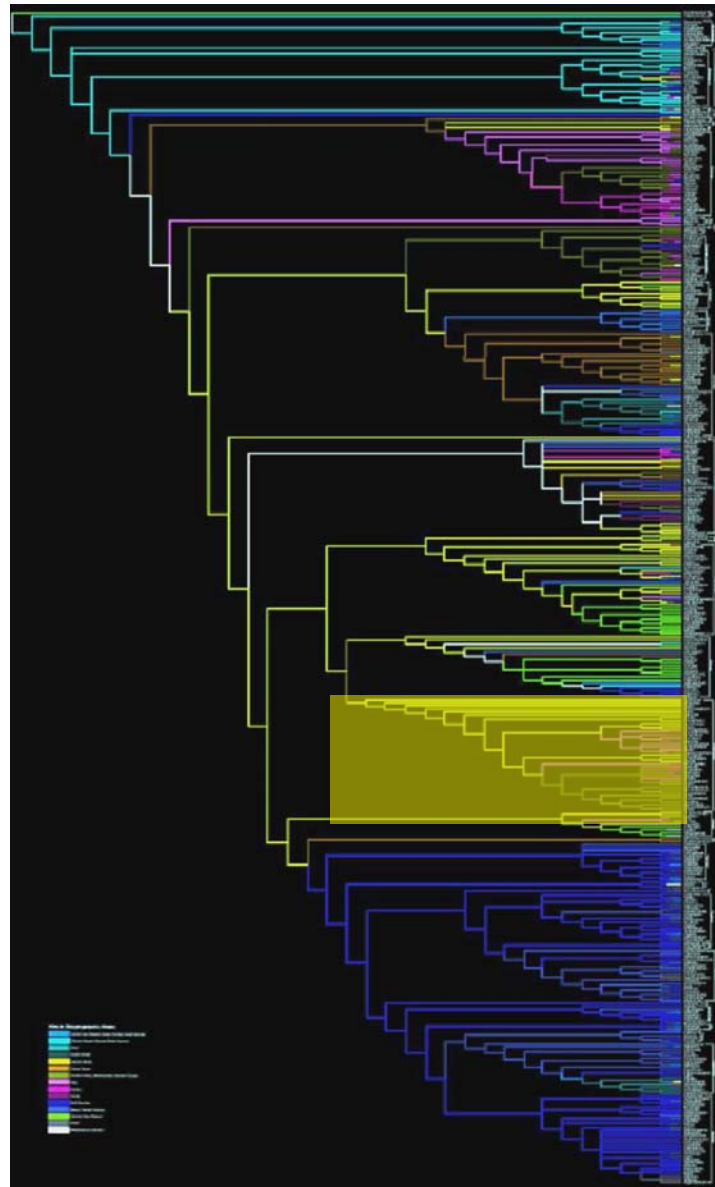
Marc taxonòmic

Família: *Asteraceae*

Tribu: *Anthemideae*

Subtribu: *Artemisiinae*

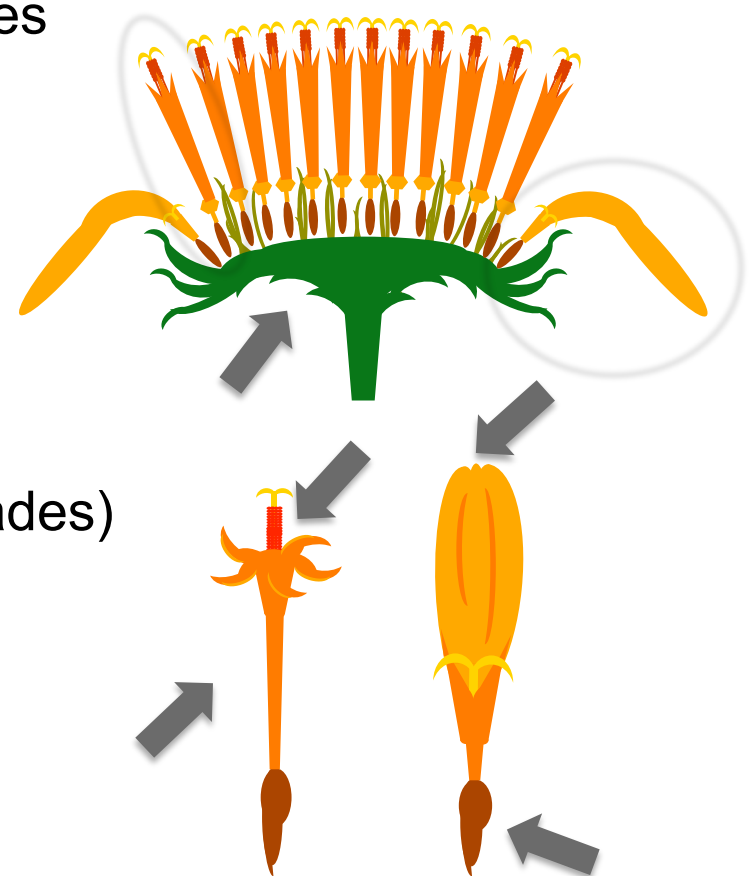
Gènere: *Artemisia*



La família *Asteraceae*



- Aproximadament 23000 espècies i 1600 gèneres
- Distribució mundial, excepte a l'Antàrtida
- Origen Sud Americà (≈ 50 M.a.): registre fòssil
 - Inflorescència: capítol
 - Involucre bracteal
 - Flors: centrals (flòsculs) i les radials (ligulades)
 - Pètals soldats
 - Sèpals modificats: papus
 - Singenèsia (fusió de les anteres)
 - Ovaris ínfers [fruit: aqueni (cipsel·la)]



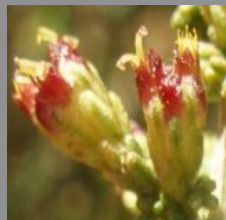
El gènere *Artemisia*



- Distribució mundial, principalment a l'hemisferi Nord, amb un centre important de diversificació i especiació a l'Àsia
- Majoritàriament perennes (aprox. 20 anuals), elevada tolerància a condicions ecològiques i ambientals molts diverses



- Presenta dos nombres cromosòmics bàsics; $x=9$ i $x=8$, essent el primer de gran incidència. La poliploidia és un fenomen molt freqüent
- Tradicionalment usades en medicina (antihelmíntiques, antitumorals, antimalàriques), com a condiments culinaris i en la preparació de licors, així com a ornamentals

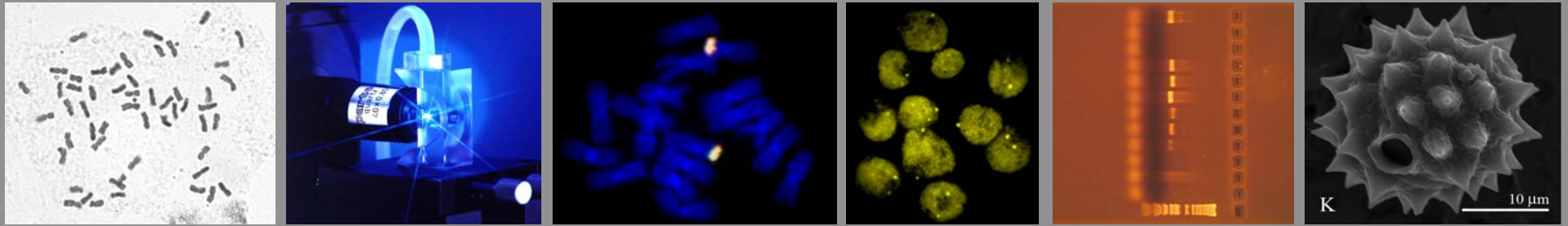


- És el gènere més gran de les *Anthemideae* (aprox. 530 espècies)

- Dividit en 5 grups taxonòmics reconeguts com a seccions o subgèneres en base a l'estructura dels capítols

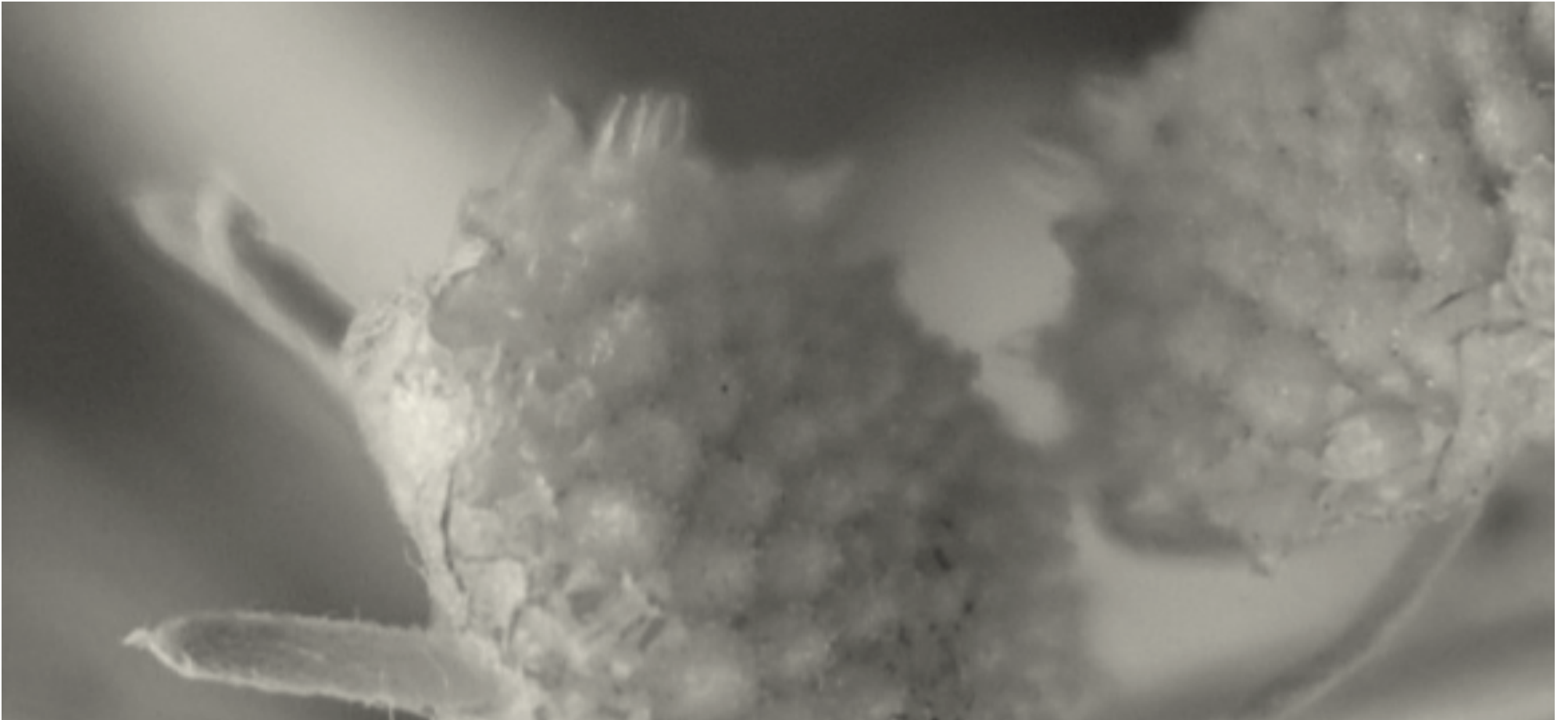
- Presenta una elevada diversitat morfològica entre i dintre de cadascun dels subgèneres

- Aquesta classificació tradicional no sempre es correspon amb les classificacions basades en l'anàlisi de seqüències del DNA

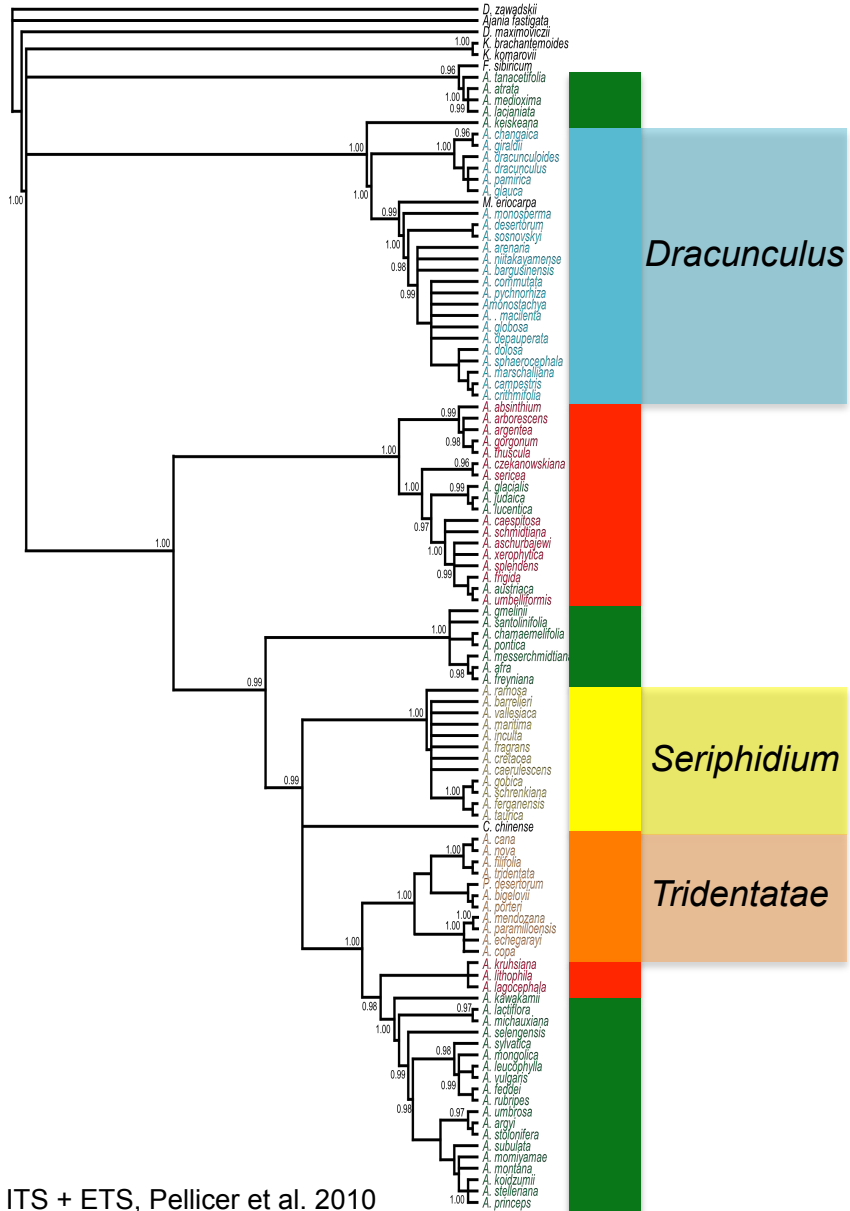


- Relacions filogenètiques
- Nombres cromosòmics i poliploïdia
- La mida del genoma: implicacions biològiques
- Evolució i canvis en els *loci* DNA ribosòmic
- Els tipus pol·línics

Relacions filogenètiques en *Artemisia*



Relacions filogenètiques en *Artemisia*



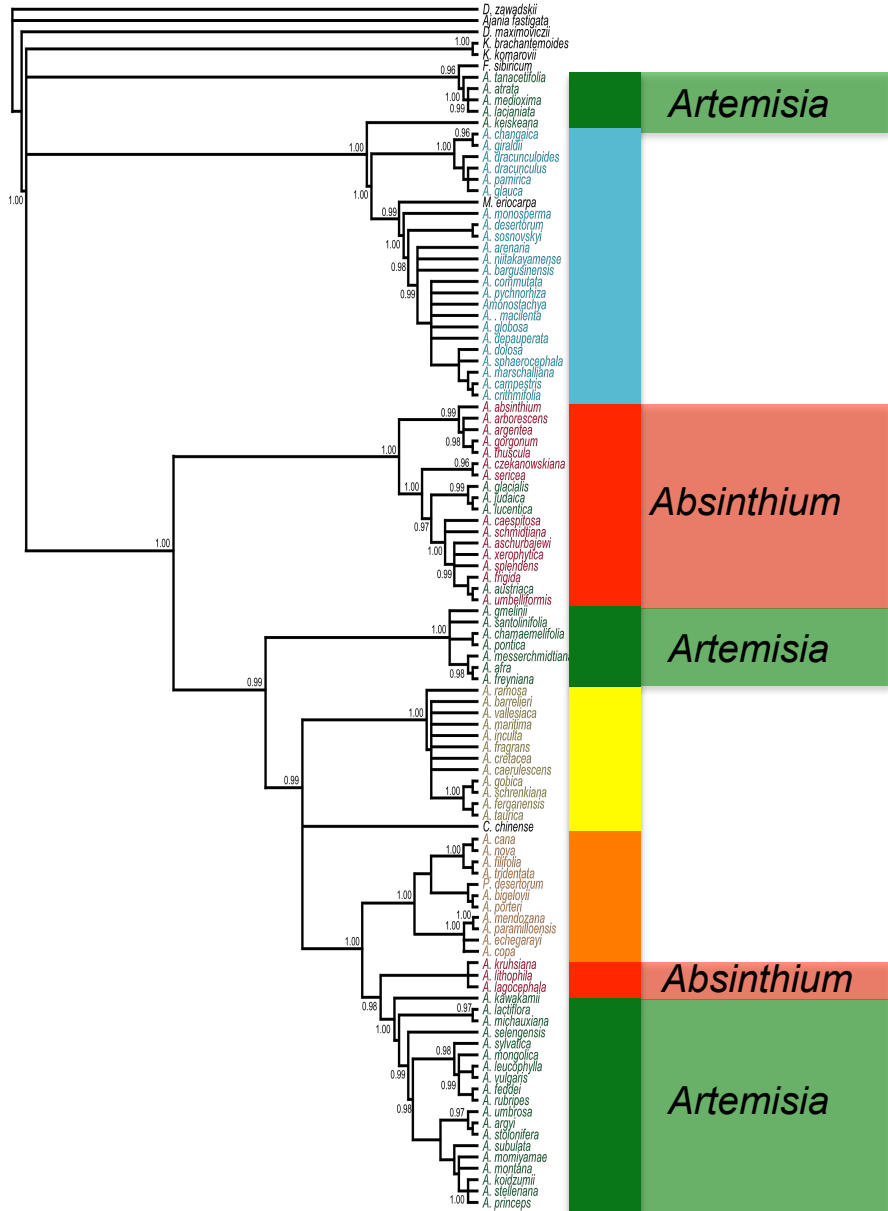
- Capítols heterògams amb flòsculs centrals funcionalment masculins
- Llinatge homogeni subdividit en 2 clades principals: el complex d'*A. dracunculus* i la clada eurasiàtica.



- Capítols homògams
- Llinatge homogeni des dels punts de vista filogenètic (0-0,13%), citogenètic i morfològic

- Capítols homògams i heterògams
- Clada americana: Agrupació filogenètica que s'entén bàsicament sota criteris geogràfics (inclou la major part dels endemismes del continent americà)

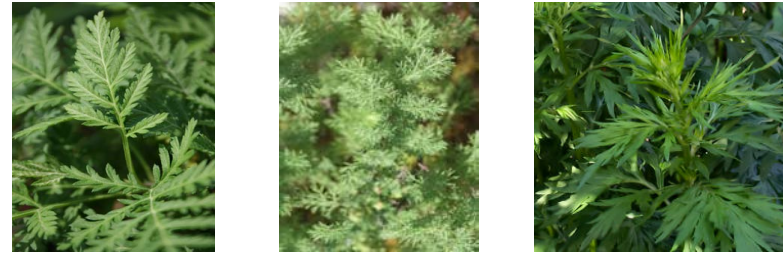
Relacions filogenètiques en *Artemisia*



- Subgèneres *Absinthium* i *Artemisia* són parafilètics
- El subgènere *Absinthium*: 2 clades



- El subgènere *Artemisia*: 3 clades principals molt diverses morfològicament
- Alguns representants apareixen inclosos a la clada principal del subgènere *Absinthium*



- ## ■Nexe d'unió entre Àsia i Amèrica del Nord

Els gèneres segregats...

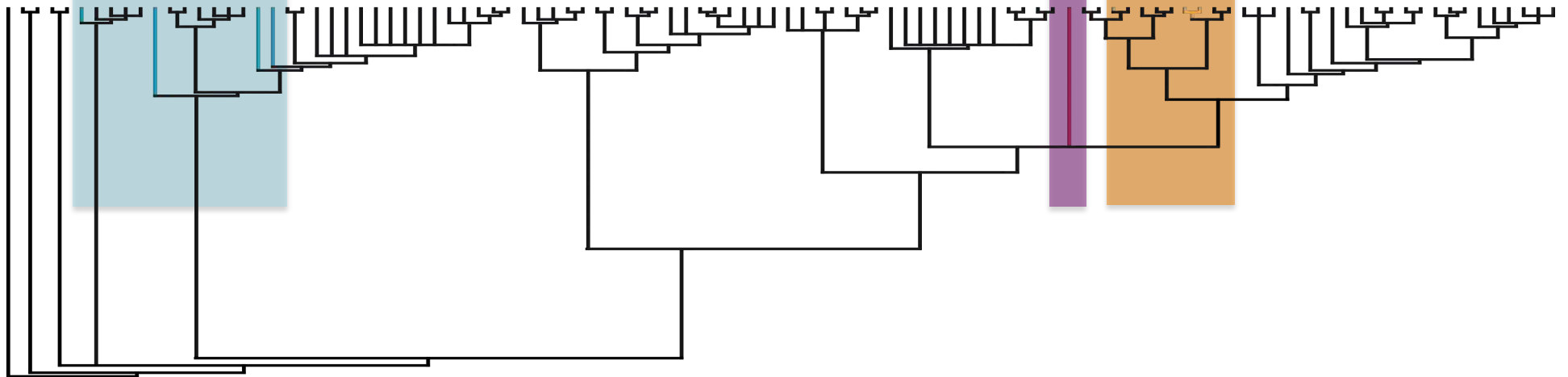
- *Filifolium sibiricum* (= *Tanacetum sibiricum*)
- *Neopallasia* (= *A. pectinata*)
- *Mausolea eriocarpa* (= *A. eriocarpa*)
- *Turaniphytum* (= *A. eranthema*)



- *Crossostephium* (= *A. chinensis*)

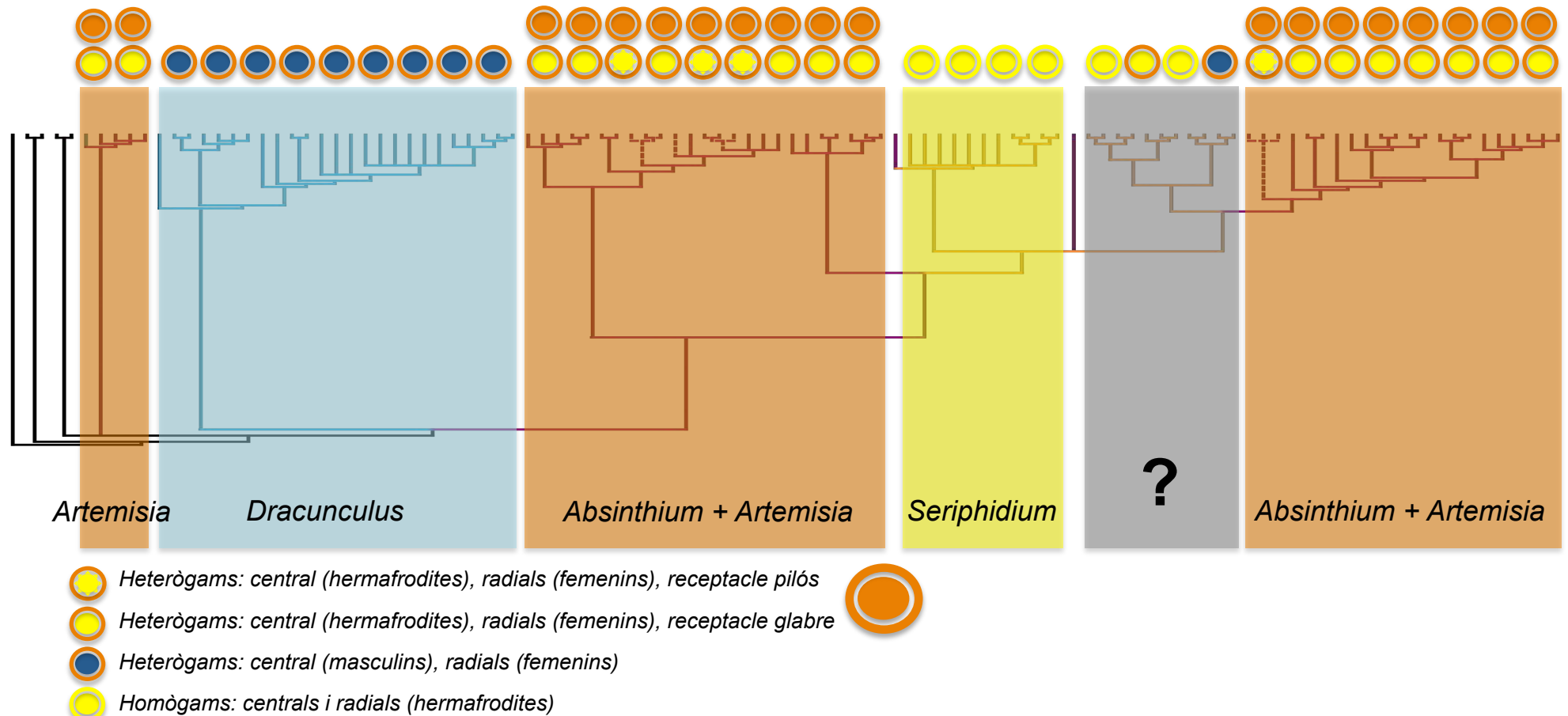


- *Sphaeromeria* (= *A. capitata*)
- *Picrothamnus desertorum* (= *A. spinescens*)



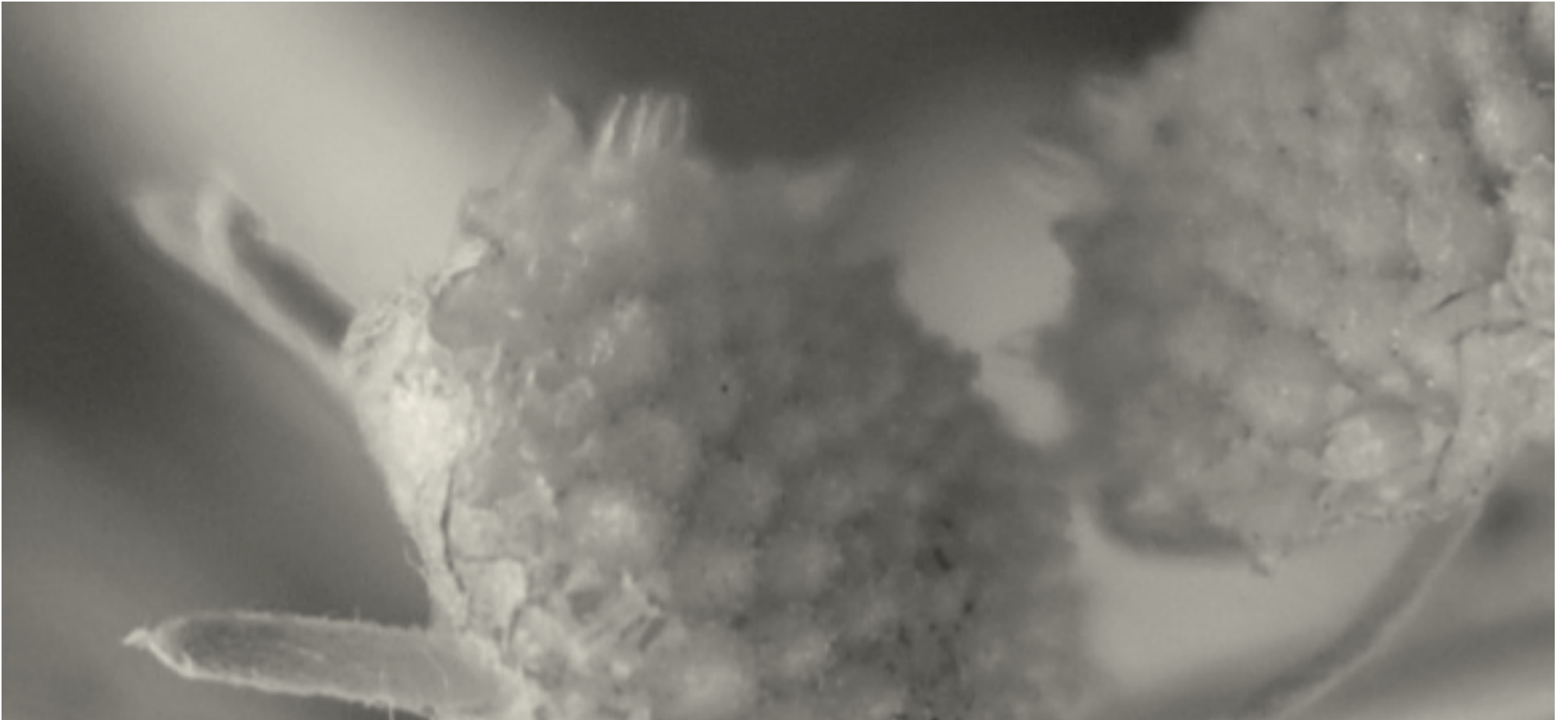
Relacions filogenètiques en *Artemisia*

- L'estructura del capítol com a marcador sistemàtic



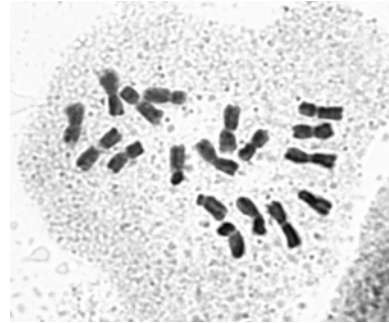
- L'estructura bàsica dels capítols defineix majoritàriament els diferents subgèneres, tot i que falla a l'hora de discriminar entre llinatges

Nombres cromosòmics i poliploidia

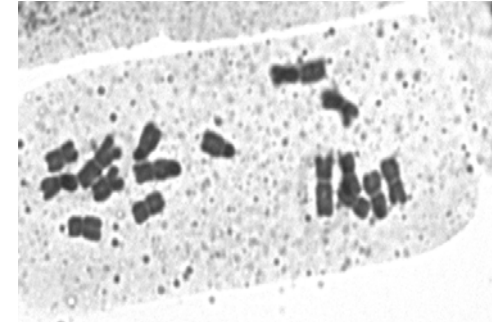


Nombres cromosòmics i poliploïdia

- El gènere presenta dos nombres cromosòmics bàsics: $x=9$ i $x=8$ (fusió robertsoniana)



A. sphaerocephala



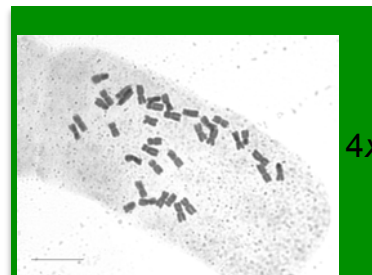
A. sylvatica

- Elevada incidència de la poliploïdia:

- $4x-16x$ ($x=9$) i $4x-6x$ ($x=8$)

- Múltiples episodis de poliploïdització

- Aberracions cromosòmiques: poblacions aneuploides



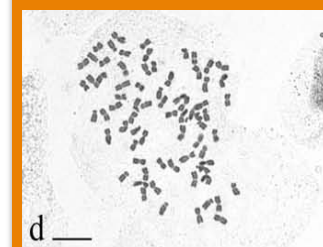
4x

A. subdigitata



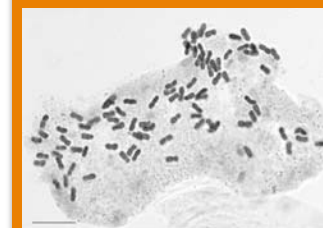
6x

A. mendozana var.
paramilloensis



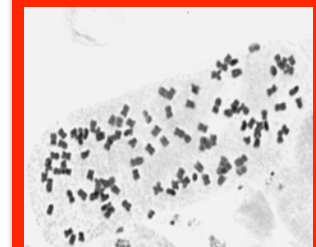
8x

A. echegararyi



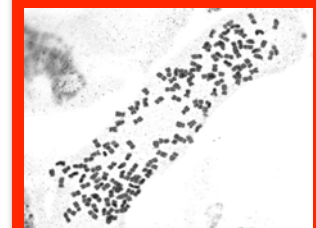
10x

A. sericea



12x

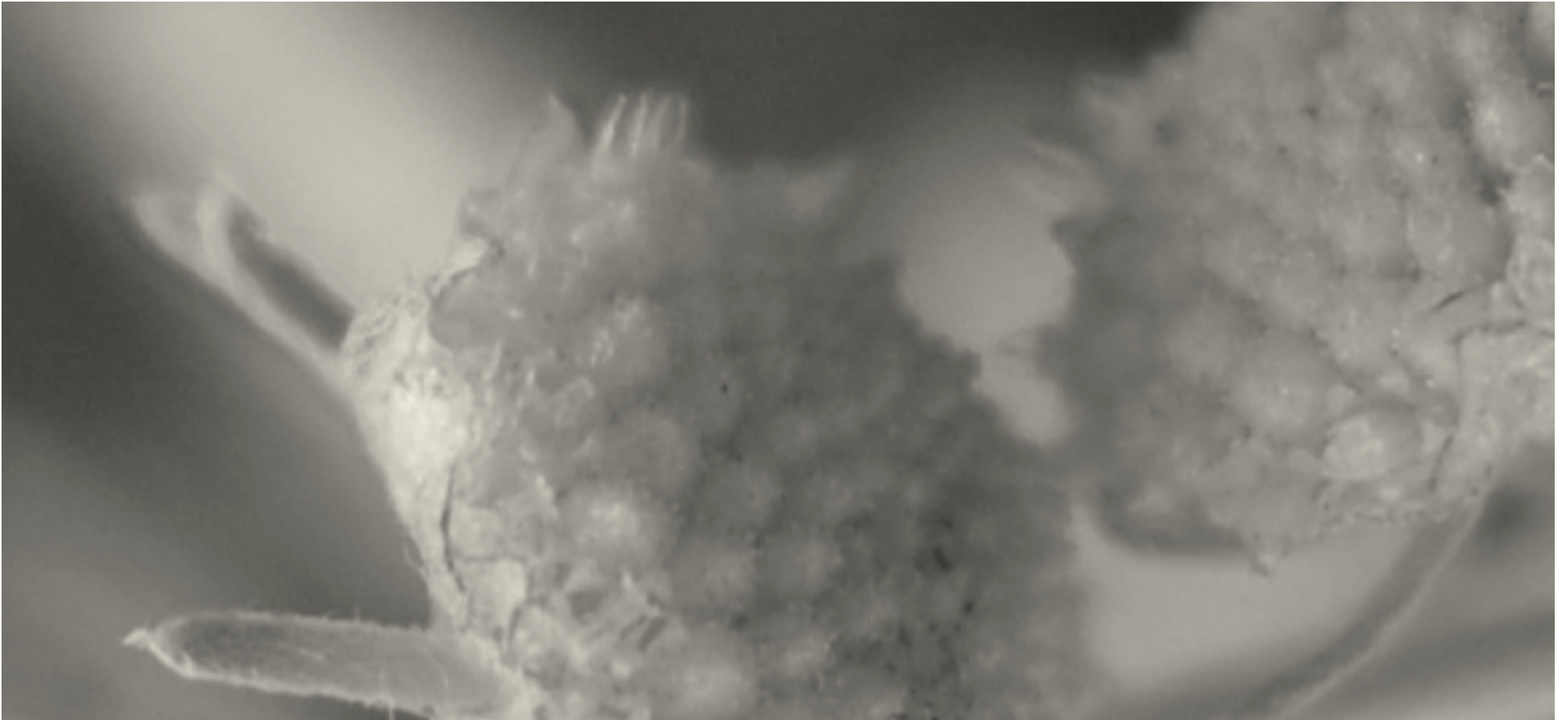
A. macrantha



16x

A. medioxima

Evolució de la mida del genoma en *Artemisia*

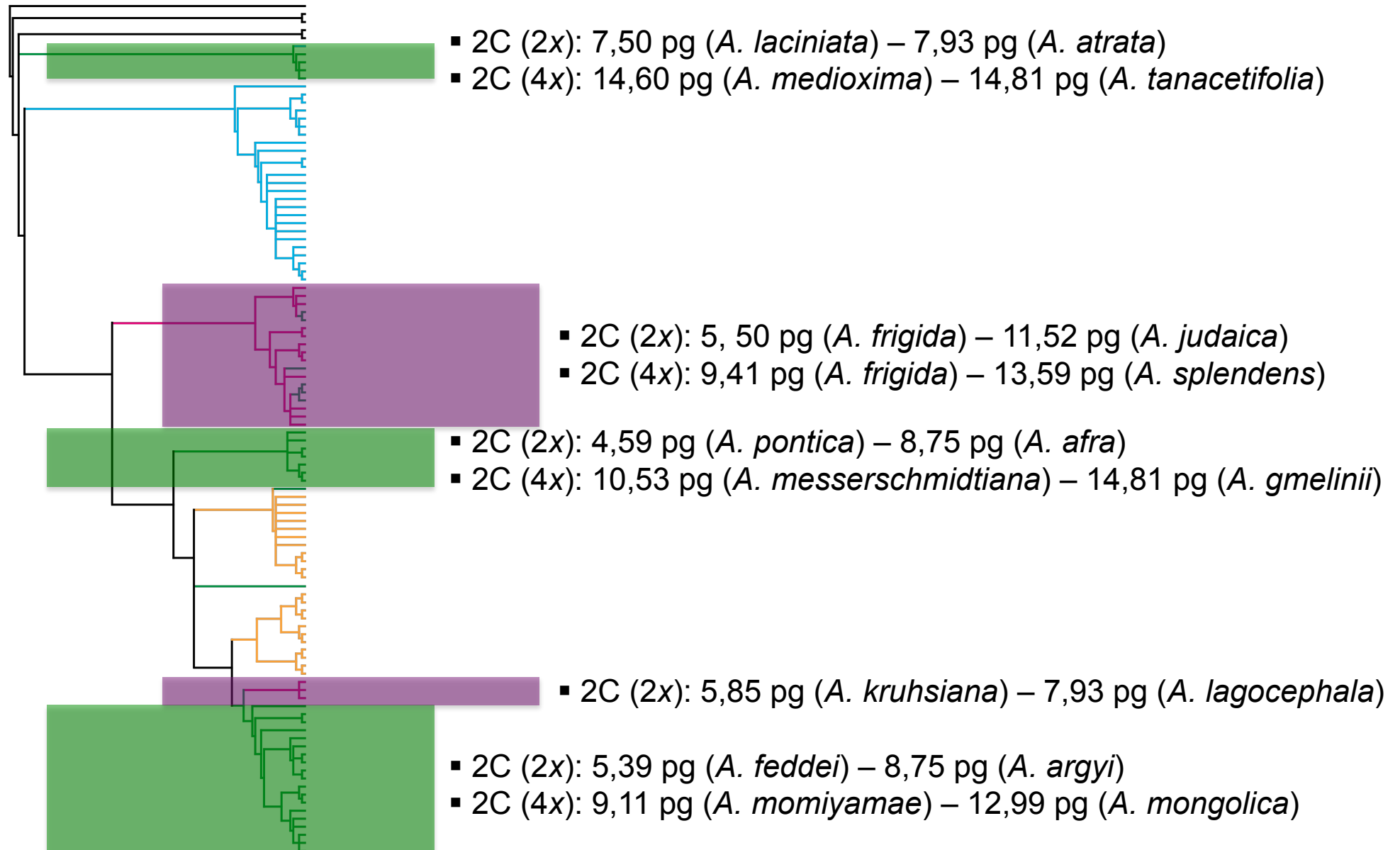


Evolució de la mida del genoma en *Artemisia*

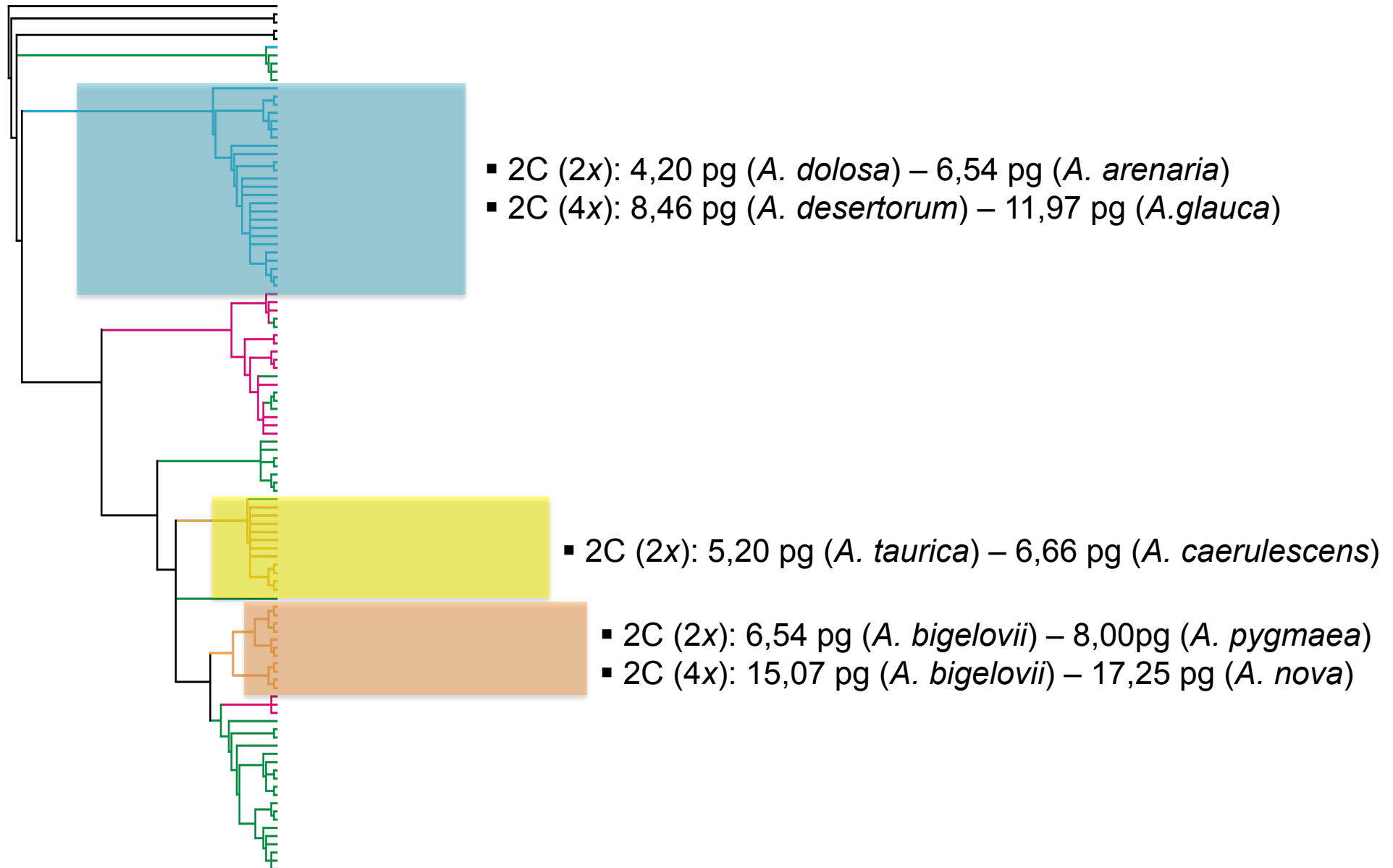
- Valor C (Swift 1950): contingut de DNA d'un gàmeta (n)
 - Valor 2C: contingut de DNA nuclear d'una cèl·lula somàtica ($2n$)
 - Valor 1Cx: contingut de DNA d'un joc bàsic de cromosomes d'una cèl·lula somàtica
- Paràmetre molt variable: 2400 vegades (angiospermes), >66000 vegades (eucariotes)
- Correlacions i implicacions biològiques:
 - Volum dels grans de pol·len (Bennett et al. 1972)
 - Massa de les llavors (Bennett et al. 1972)
 - Mida de les cèl·lules estomàtiques (Beaulieu et al. 2008)
 - Distribució de les espècies (Price et al. 2005, Garnatje et al. 2007)
 - Taxa d'extinció de les espècies (Vinogradov 2003)
 - Perennitat obligada
 - Menor plasticitat ecològica i reduïda capacitat colonitzadora
 - Major susceptibilitat a la pol·lució i a la radiació

Implicacions filogenètiques: subgèneres *Absinthium* i *Artemisia*

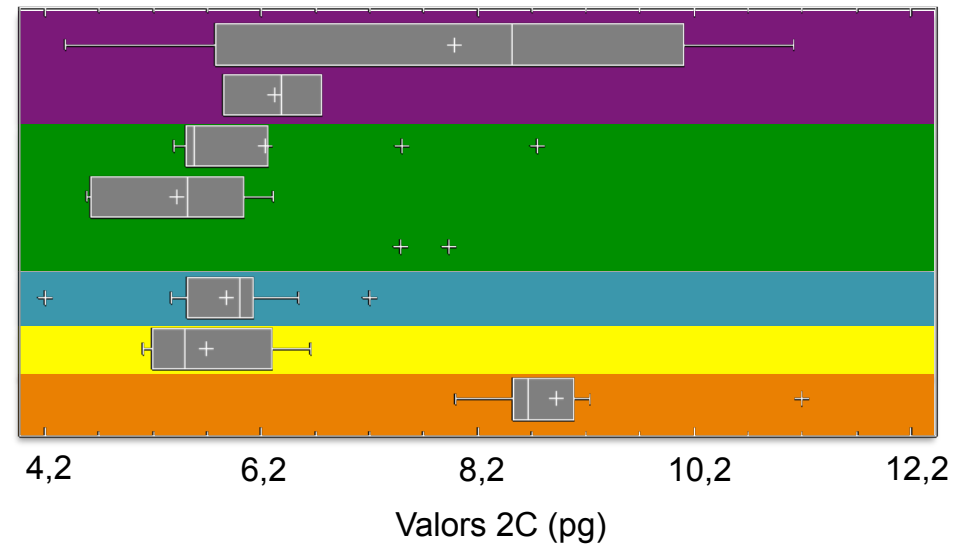
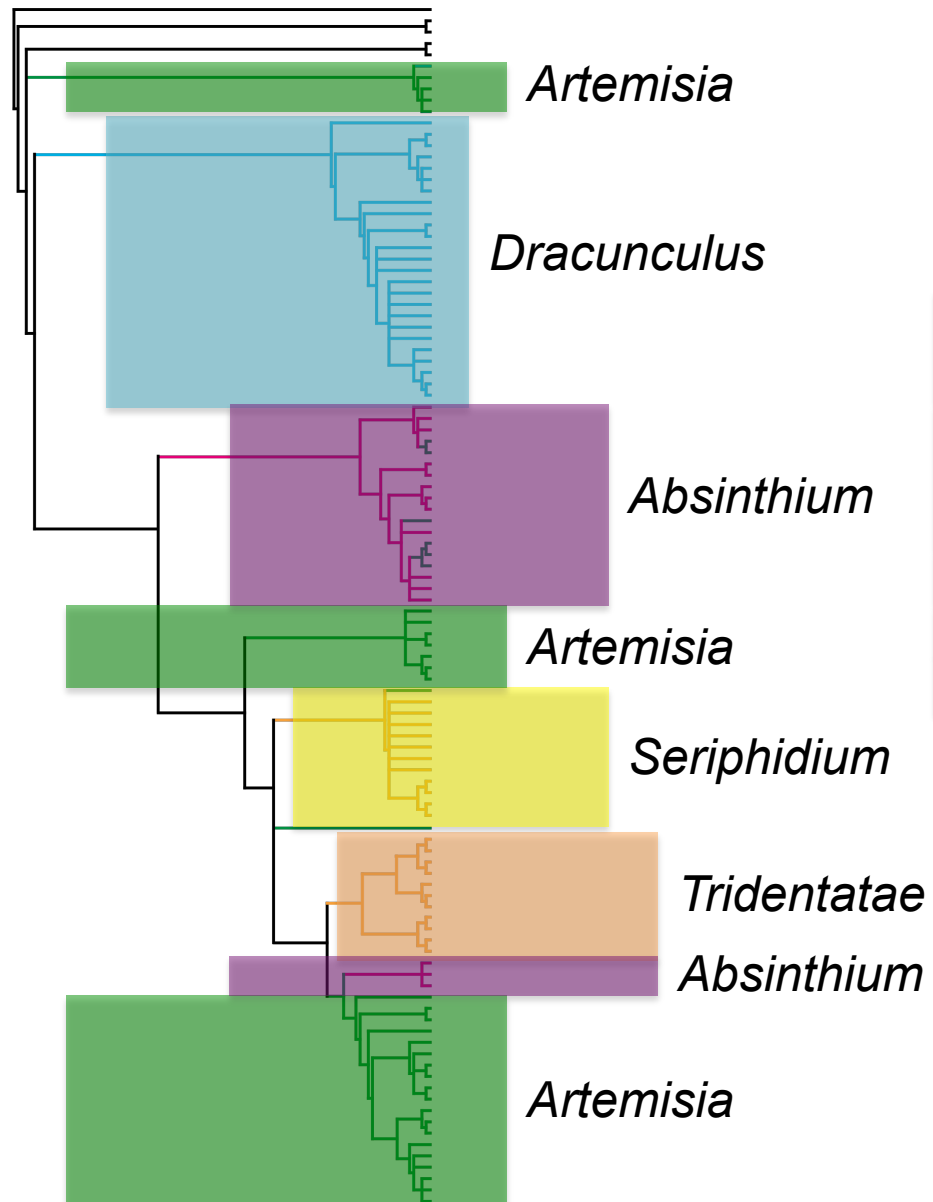
Pellicer et al. 2010



Implicacions filogenètiques: subgèneres *Dracunculus*, *Seriphidium* i *Tridentatae*

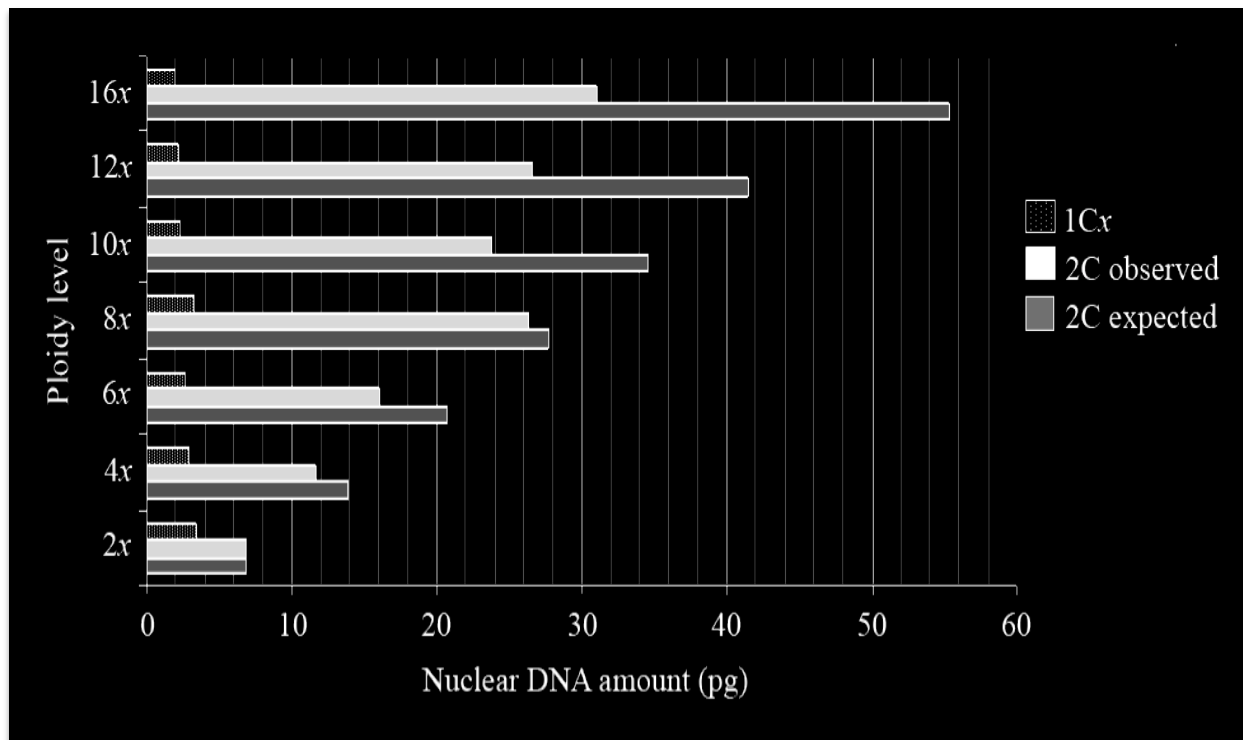


Implicacions filogenètiques...



Implicacions biològiques: poliploïdia

- No hi ha diferències entre els valors 2C de les espècies amb diferents nombres cromosòmics bàsics ($x=8, 9$)
- Hi ha diferències significatives dels valors 2C entre les espècies estrictament poliploides ($4x$ i $6x$) i aquelles per a les quals a més es coneixen citotips diploides



- S'ha observat un increment de la quantitat de DNA nuclear però no de forma proporcional al nivell de ploïdia

Implicacions biològiques: poliploïdia

Existeix un límit superior per a la quantitat de DNA nuclear en el gènere *Artemisia*?

Funció quadràtica:

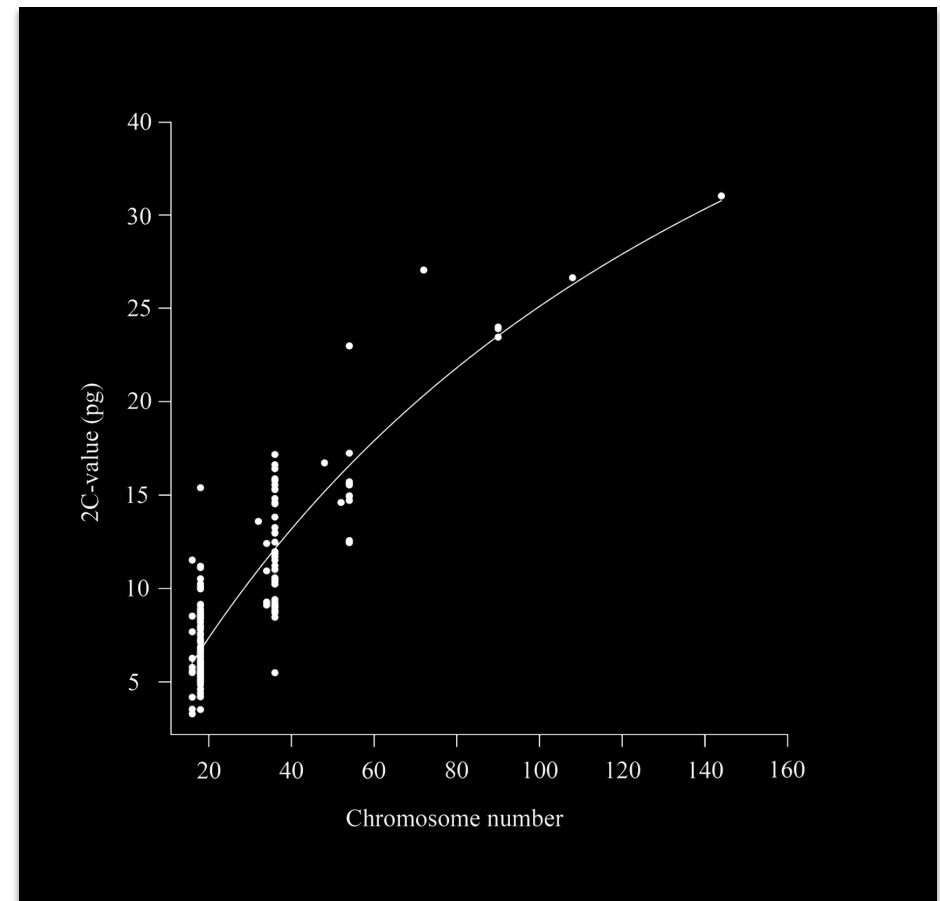
$$y = (1,512 + 0,314x - 0,0007x^2);$$

$$P = 0,002$$

Funció Michaelis-Menten:

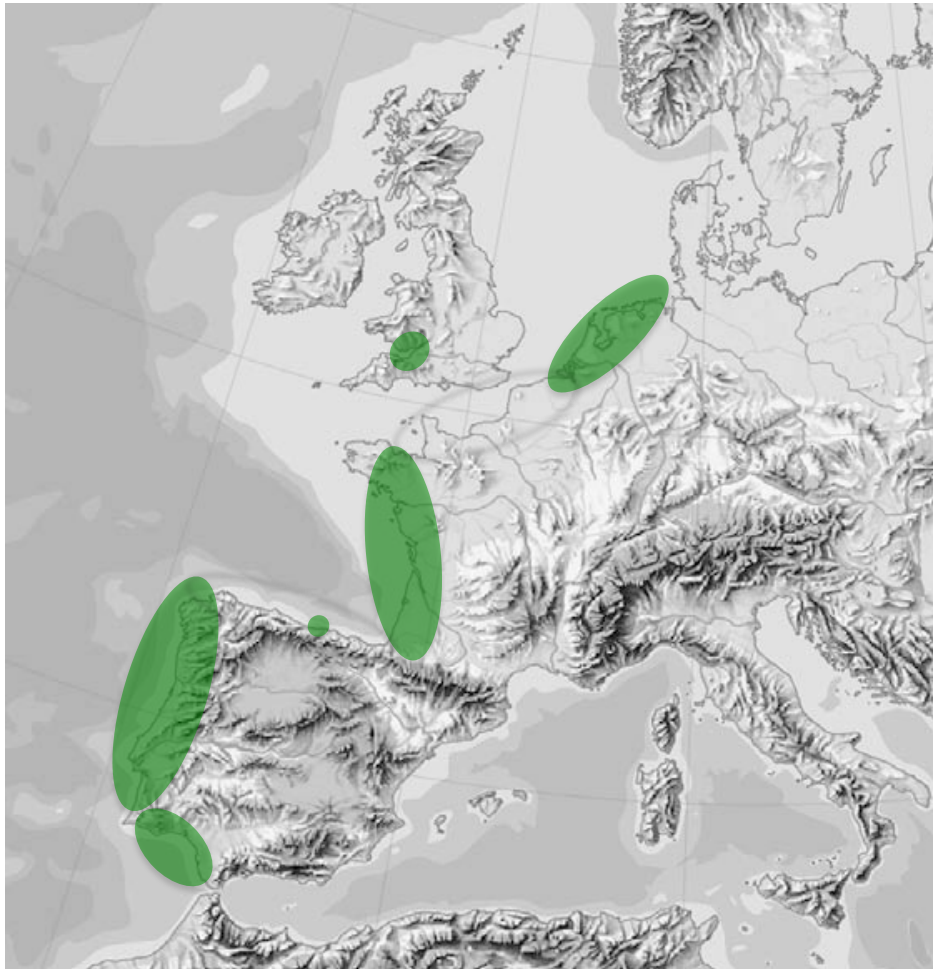
$$y = 64,106x / (151,494 + x);$$

$$P < 0,001$$



Implicacions biològiques: el cas d'*A. crithmifolia*

Pellicer et al. 2009



- Distribució restringida a les dunes de la façana atlàntica europea, des del sud de la península Ibèrica fins als Països Baixos, arribant a les Illes Britàniques
- Dues disjuncions importants: nord de la península Ibèrica i nord de França

Implicacions ecològiques: el cas d'*A. crithmifolia*



▪Diferències significatives entre els valors 2C ($P=0,0054$)

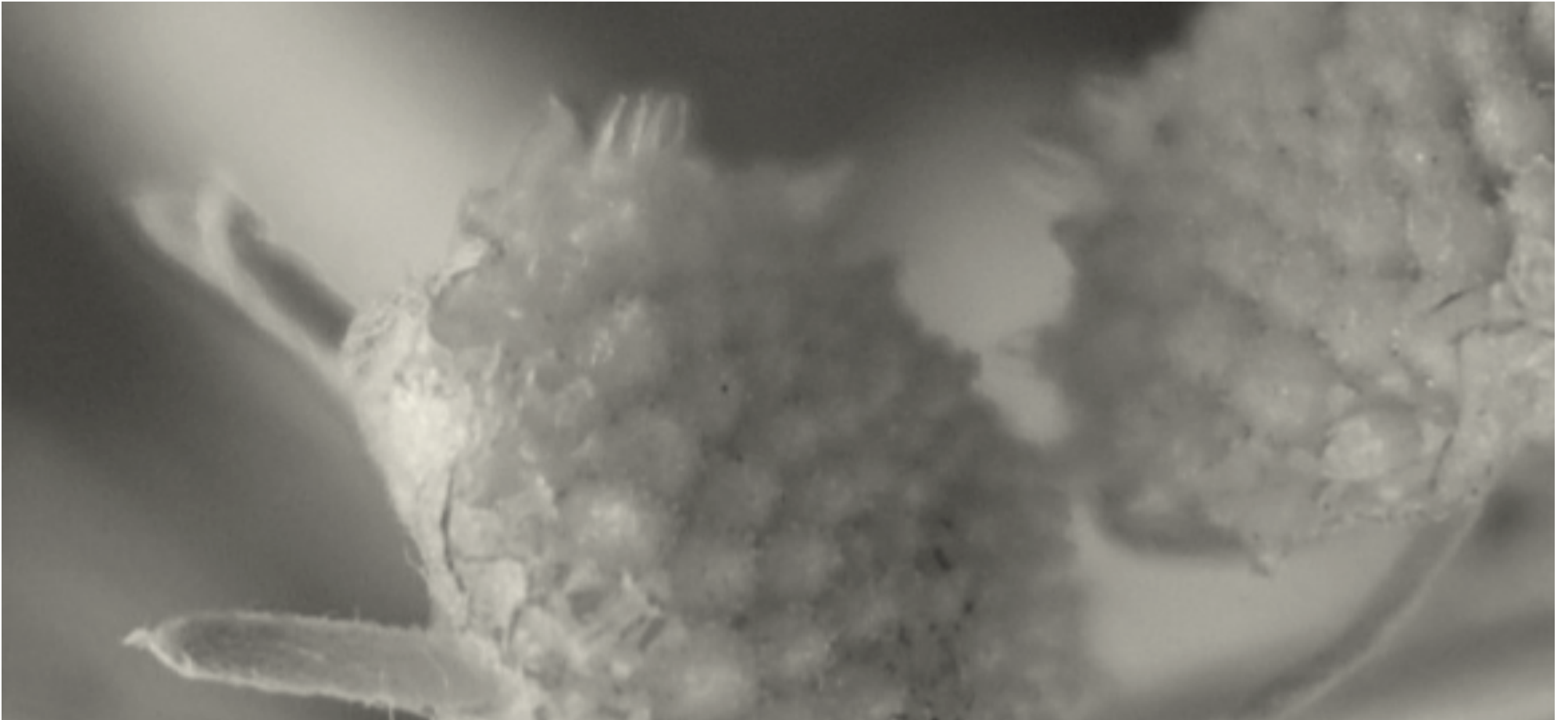


▪Diferències significatives entre els valors 2C ($P=0,0022$)*

▪Efecte latitudinal ($r=-0,32$; $P=0,03$), sembla que la tendència observada no es correspon amb dades d'altres espècies on s'apunta cap a un increment de la quantitat de DNA en ambients mésics (Garnatje et al. 2009, Price et al. 1981, 1986)

▪Les poblacions de les illes presenten els valors 2C més elevats

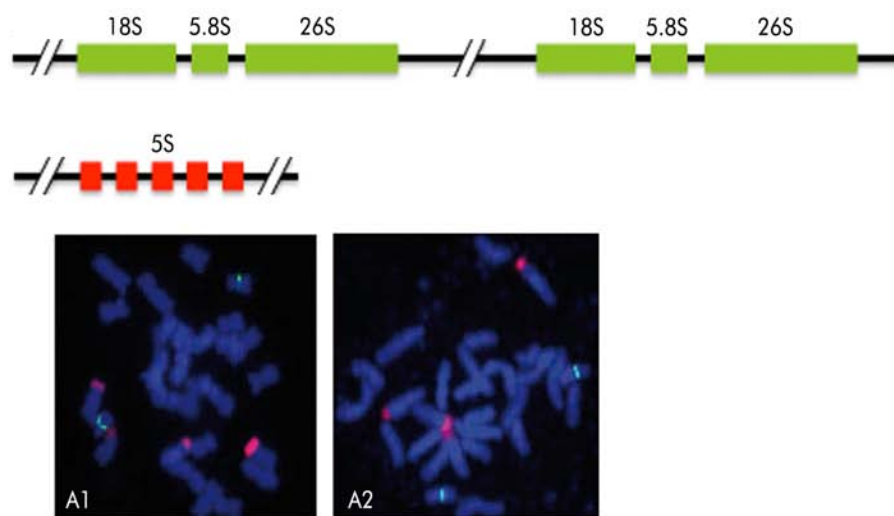
Distribució dels *loci* de DNA ribosòmic en *Artemisia*



Distribució dels *loci* de DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: estructura

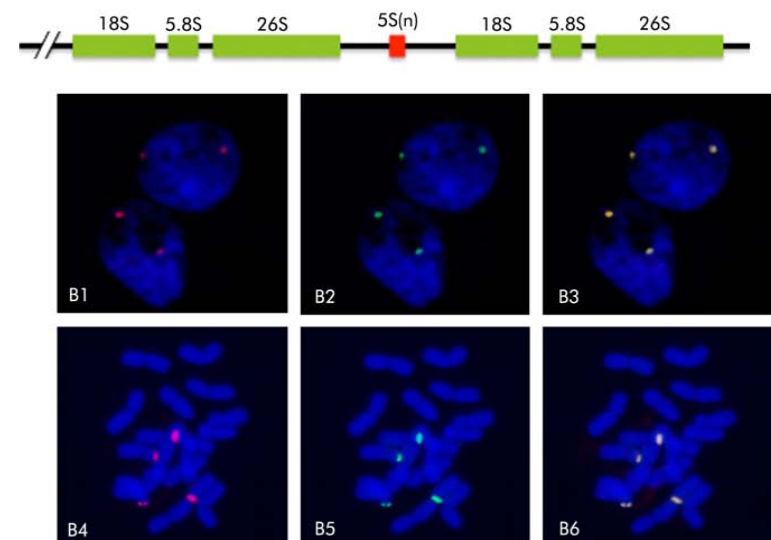
Garcia et al. 2009, 2010

- Gran part dels animals i plantes presenten les subunitats 5S i 45S del DNA ribosòmic estructurades de forma independent i situades en diferents llocs dels cromosomes



Myopordon ssp. (Hidalgo et al. 2006)

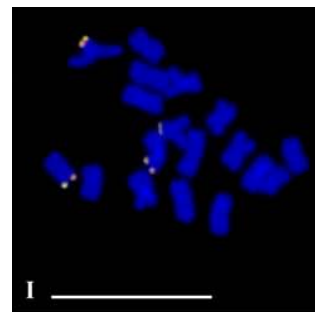
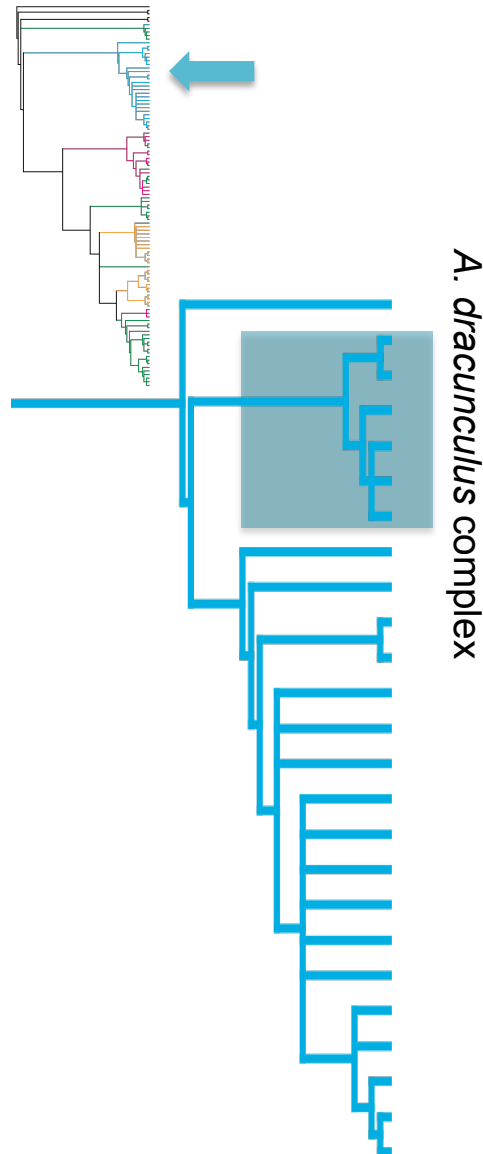
- En el gènere *Artemisia* així com en alguns llinatges de les *Astereae*, eucariotes primitius i briòfits, aquests DNA s'organitzen de forma lligada, és a dir, colocalitzats al mateix lloc del cromosoma



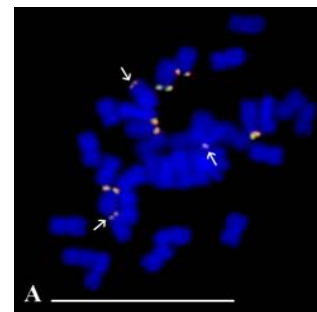
A. blepharolepis i *Filifolium sibiricum*

Distribució dels *loci* de DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: subgènere *Dracunculus*

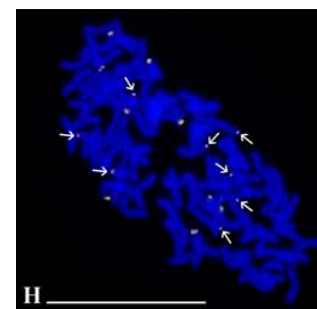
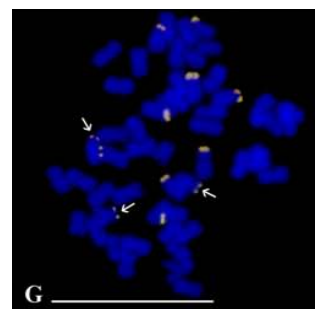
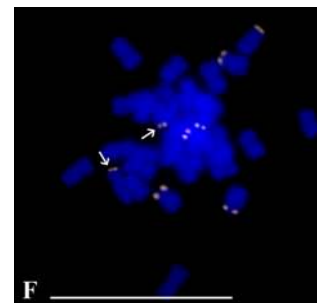
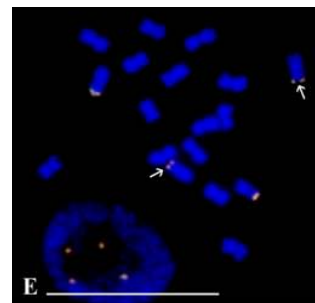
Torrell et al. 2001
Hoshi et al. 2007
Pellicer et al. en prep.



A. giraldii



A. changaica



A. dracunculus

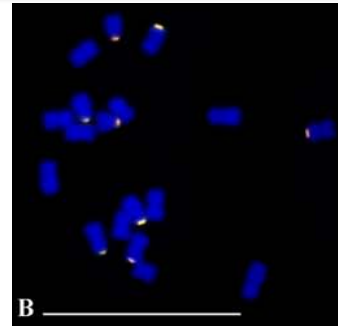
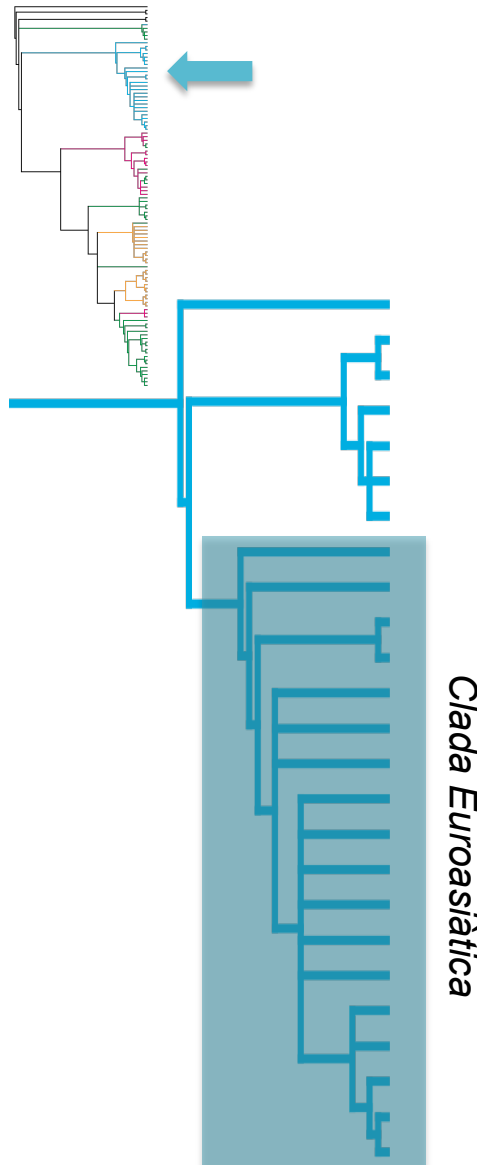
- Increment proporcional del nombre de *loci* en individus poliploides

- Pèrdua lleugera de DNA nuclear que es fa més patent en nivells de ploïdia alts

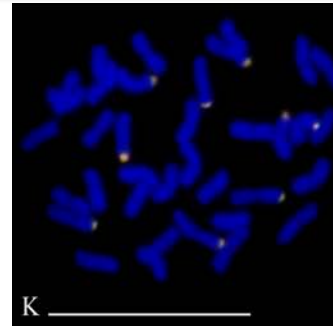
±

Ploidy level	Mean 1Cx (pg)	DNA loss (%)
2x	2.98	-
4x	2.94	1.34
6x	2.60	12.75
10x	2.38	20.13

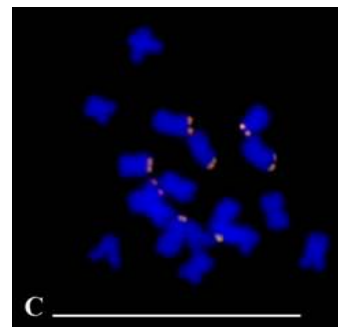
Distribució dels *loci* de DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: subgènere *Dracunculus*



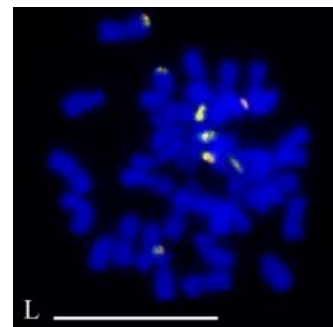
A. commutata



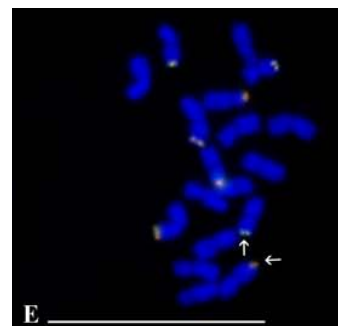
A. ledebouriana



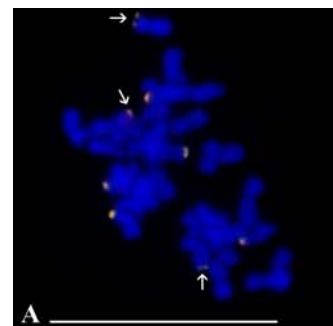
A. dolosa



A. littoricola



A. sphaerocephala



A. pycnorhiza

■ Patró heterogeni de la distribució de *loci* de rDNA:

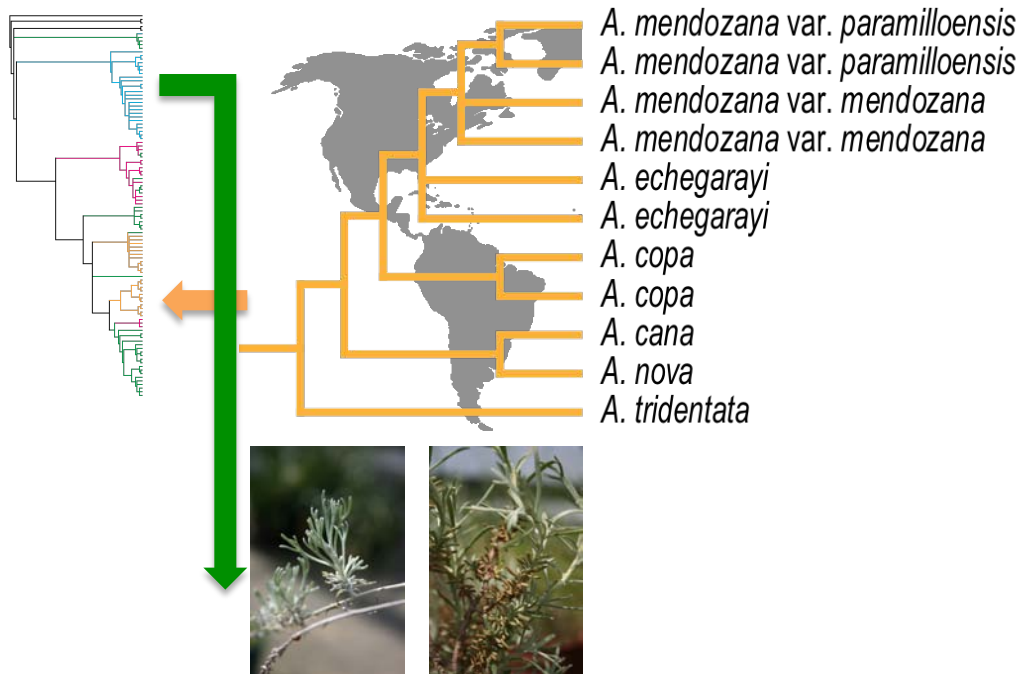
- 2x: 3-4-5 *loci*
- 4x: 3-4-5 *loci*

■ Eliminació significativa de *loci* en individus poliploides

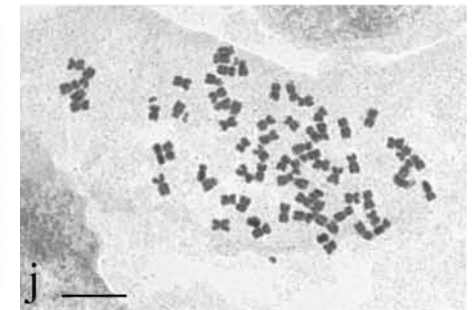
■ En molts casos l'increment de DNA entre diferents nivells de ploïdia és proporcional (2x-4x)

Evolució del DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: el complex sudamericà

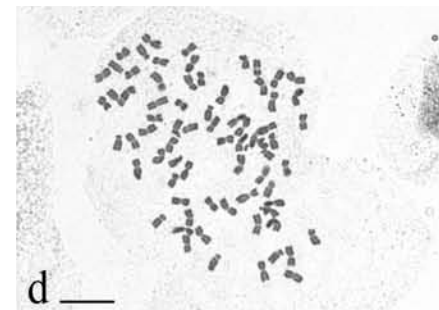
Pellicer et al. 2010



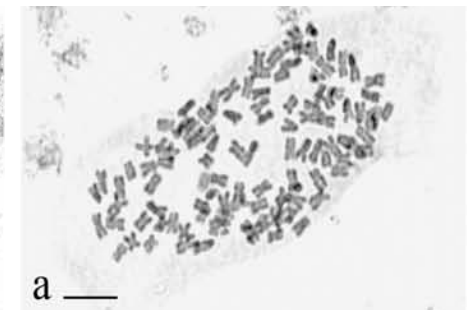
A. mendoza var. *paramilloensis*



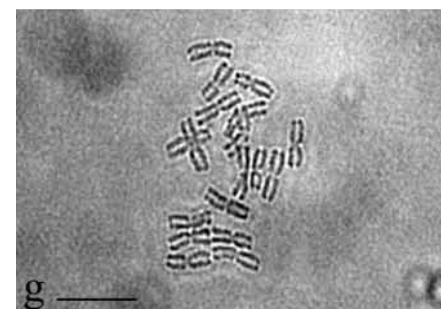
A. mendoza var. *mendoza*



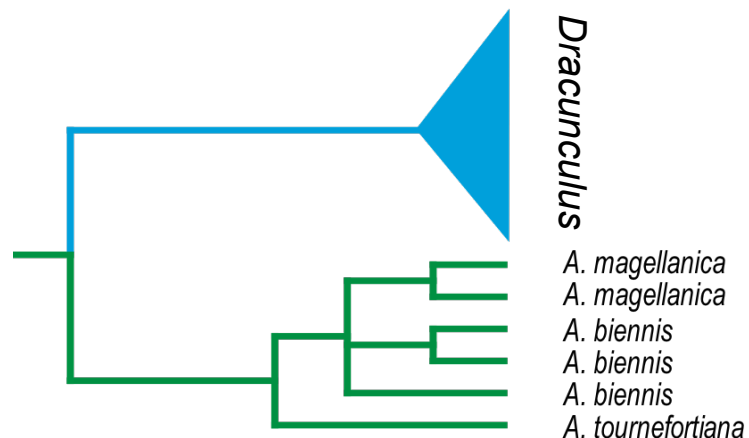
A. echegarayi



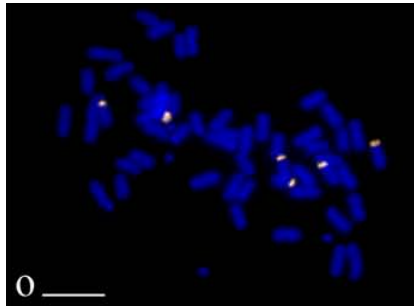
A. copa



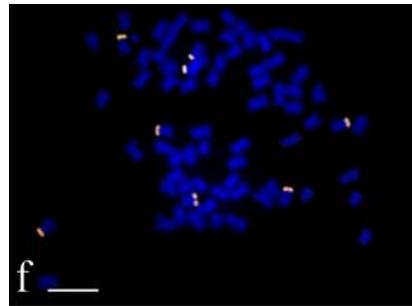
A. magellanica



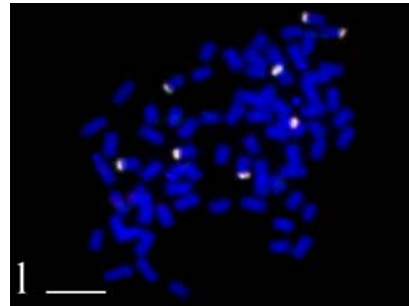
Evolució del DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: el complex sudamericà



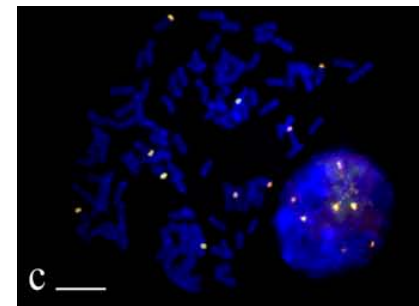
A. mendozana var.
paramilloensis



A. mendozana var.
mendoza



A. echegarayi



A. copa var. *copa*

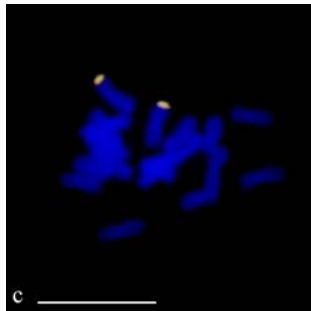
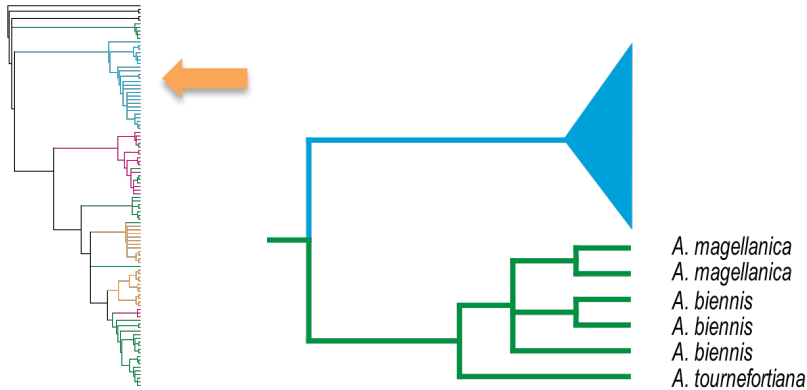


	2n	2C (pg)	1Cx (pg)	Mean 1Cx (pg)	45S -5S sites
<i>A. copa</i> var. <i>copa</i>	108 (12x)	31.51 (0.54)	2.63	2.63	10
<i>A. echegarayi</i>	72(8x)	21.13 (0.37)	2.64	2.61	
<i>A. echegarayi</i>	72(8x)	20.69 (0.30)	2.59		8
<i>A. mendozana</i> var. <i>mendoza</i>	72(8x)	20.56 (0.24)	2.57	2.52	8
<i>A. mendozana</i> var. <i>mendoza</i>	72(8x)	19.87 (0.42)	2.48		
<i>A. mendozana</i> var. <i>paramilloensis</i>	54(8x)	16.50 (0.32)	2.77		
<i>A. mendozana</i> var. <i>paramilloensis</i>	54(8x)	15.53 (0.15)	2.59	2.68	6

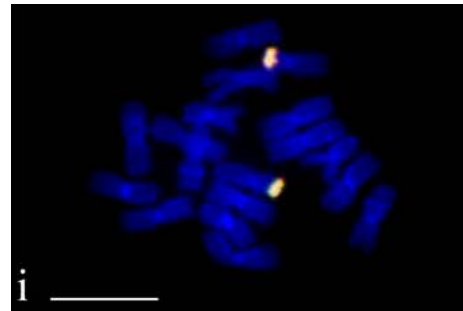
- Increment proporcional del nombre de *loci* de rDNA i de la quantitat de DNA nuclear (les diferències entre els valors 1Cx són mínimes) amb els nivells de ploïdia

Evolució del DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: el complex sudamericà

Artemisia magellanica: un origen diferent?



A. biennis



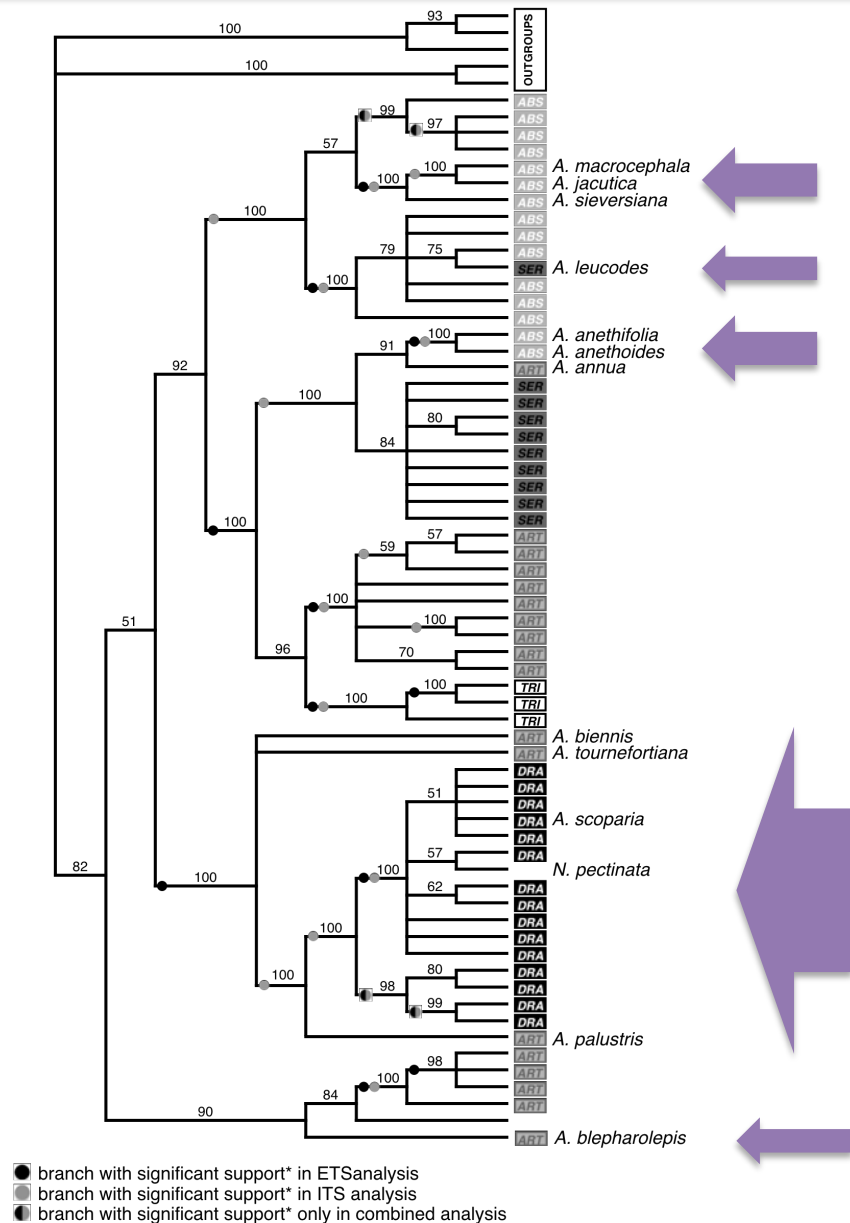
A. magellanica

▪ *A. magellanica* i *A. biennis*: sinònims (Ling 1995)

Taxa	2C (pg)	rDNA loci
<i>A. biennis</i>	6.37 (0.07)	1
<i>A. magellanica</i>	6.18 (0.26)	1

▪ L'espècie *A. biennis* podria haver migrat des d'Amèrica del Nord al Sud on, per aïllament geogràfic, s'hauria originat *A. magellanica*

Evolució del DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: les espècies anuals



■ Hi ha representants anuals a tot el gènere, tret dels tàxons endèmics del continent americà (amb l'excepció d'*A. magellanica*)

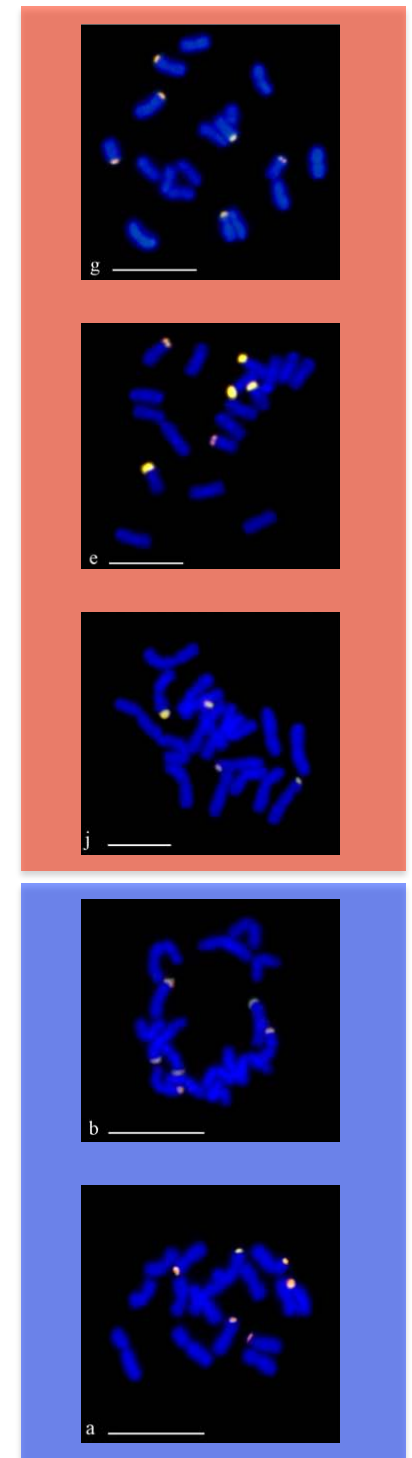
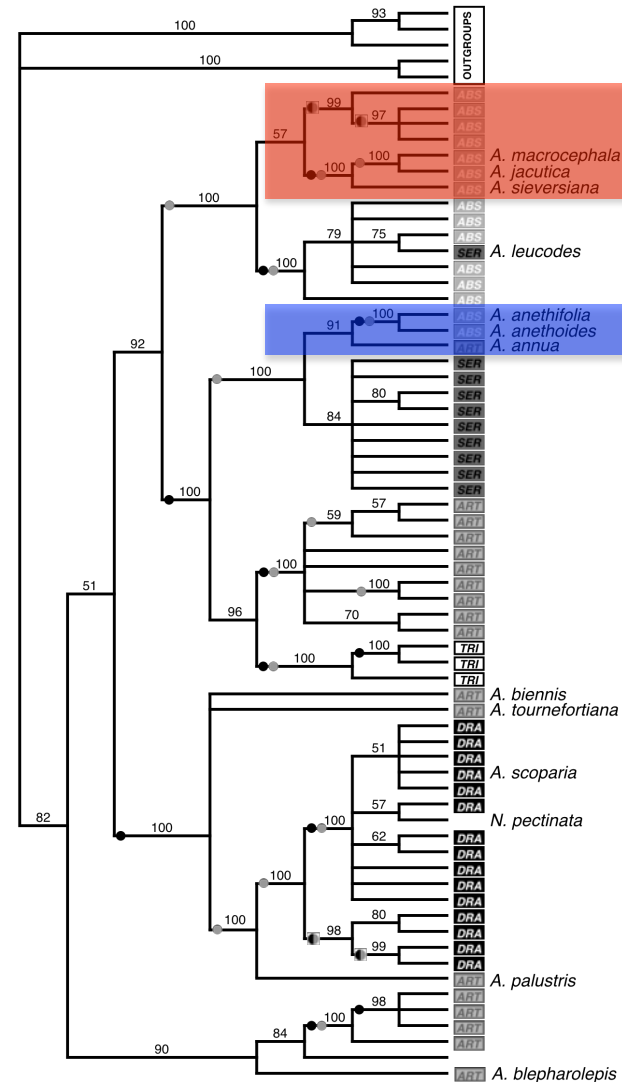
■ Les espècies anuals del gènere s'han originat en almenys 5 episodis independents

■ En alguns casos, la classificació tradicional i seva posició filogenètica no són congruents

Evolució del DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: les espècies anuals

Subg. <i>Absinthium</i>	2n	2C (SD)	1Cx (pg)	45S-5S sites
<i>A. anethifolia</i>	16	4.18(0.02)	2.09	6
<i>A. anethoides</i>	16	3.29(0.05)	1.64	6
<i>A. jacutica</i>	18	4.86(0.05)	2.43	6
<i>A. jacutica</i>	18	4.82(0.07)	2.41	-
<i>A. macrocephala</i>	18	5.04(0.06)	2.52	6
<i>A. sieversiana</i>	18	6.17(0.07)	3.08	-
<i>A. sieversiana</i>	18	6.12(0.03)	3.06	4

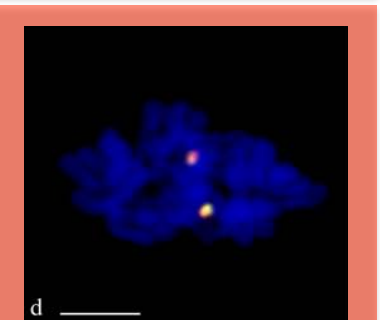
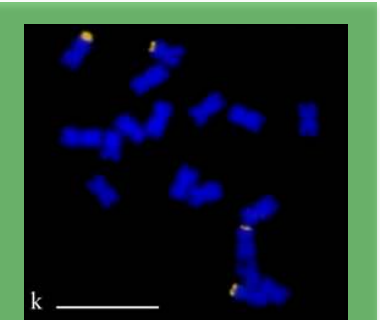
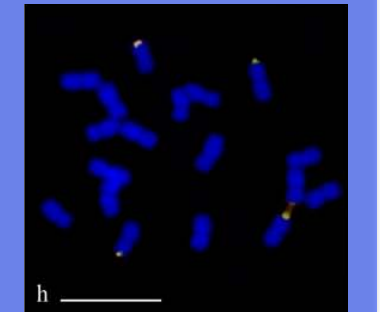
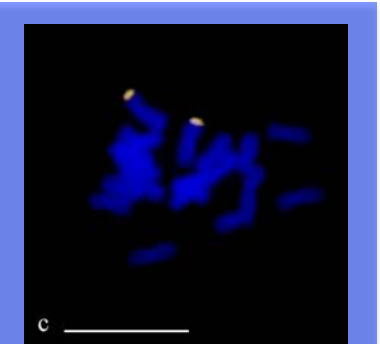
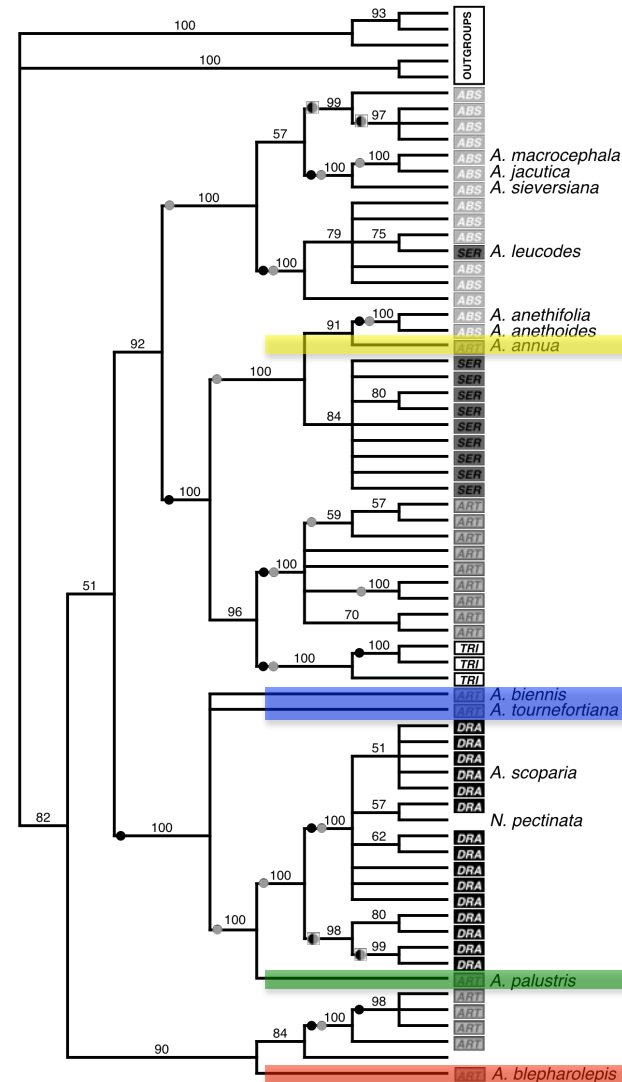
- *A. anethifolia* i *A. anethoides* apareixen segregades de la clada principal del subgènere
- Increment del nombre de *loci* independentment de la seva posició filogenètica (excepte en *A. sieversiana*)



Evolució del DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: les espècies anuals

Subg. <i>Artemisia</i>	2n	2C(SD)	1Cx (pg)	45S-5S sites
<i>A. biennis</i>	18	6.25(0.08)	3.12	-
<i>A. biennis</i>	18	6.50(0.06)	3.25	2
<i>A. blepharolepis</i>	18	9.98(0.14)	4.99	2
<i>A. palustris</i>	18	5.16(0.11)	2.58	4
<i>A. palustris</i>	18	5.25(0.07)	2.62	-
<i>A. tournefortiana</i>	18	6.69(0.12)	3.34	4

- Els representants anuals del subgènere apareixen segregats a la filogènia d'*Artemisia*
- No sembla existir cap relació entre el nombre de *loci* i la grandària del genoma



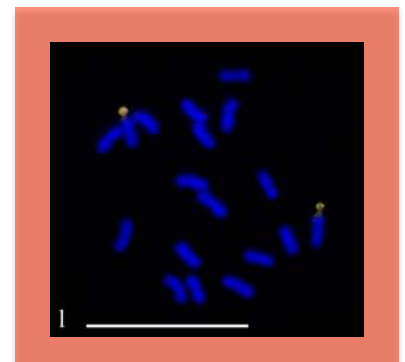
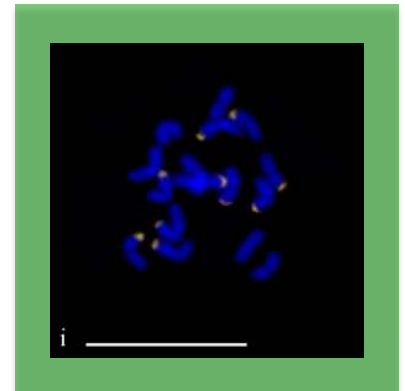
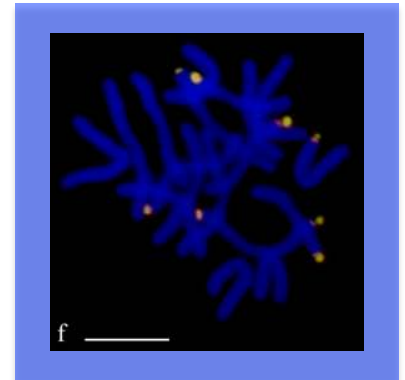
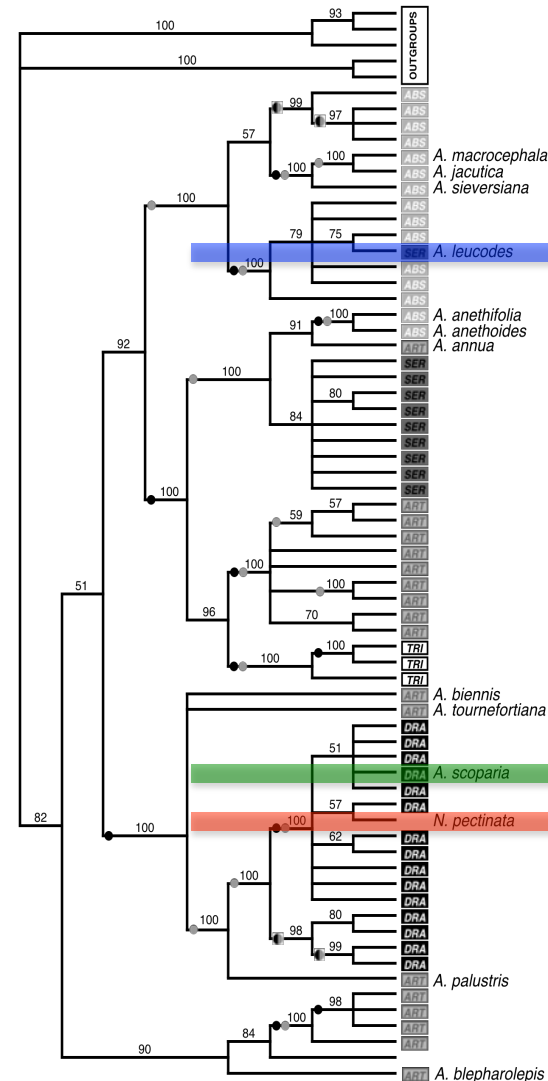
Evolució del DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: les espècies anuals

=

	2n	2C(SD)	1Cx (pg)	45S -5S sites
Subg. <i>Dracunculus</i>				
<i>A. scoparia</i>	16	3.54(0.05)	1.77	10
Subg. <i>Seriphidium</i>				
<i>A. leucodes</i>	18	15.39(0.43)	7.69	8
Genus <i>Neopallasia</i>				
<i>N. pectinata</i>	18	4.98(0.08)	2.49	-
<i>N. pectinata</i>	18	4.93(0.05)	2.46	2
<i>N. pectinata</i>	36	10.56(0.21)	2.64	-

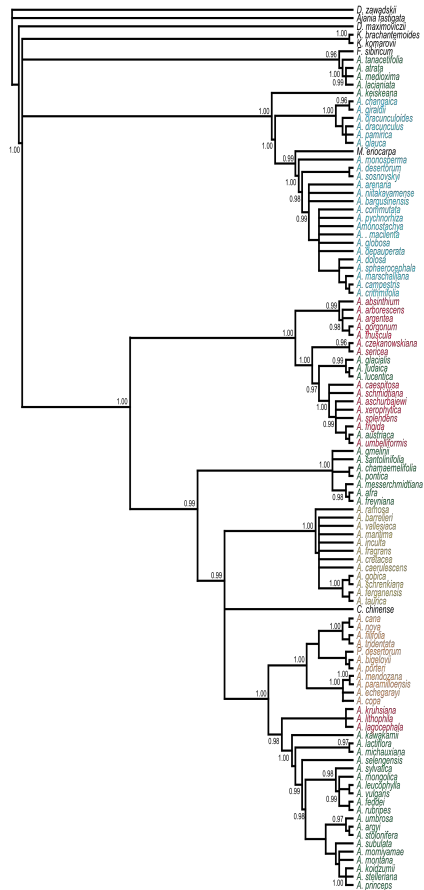
■ L'espècie *A. scoparia* presenta un patró de marcatges similar a alguns dels representants perennes del subgènere, en canvi, *N. pectinata* sols presenta 1 *locus*

■ *Artemisia leucodes* apareix segregada del subgènere *Seriphidium* i presenta un increment del nombre de *loci*



Evolució del DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: sèries poliploides

Pellicer et al. in press



- Subgènere *Absinthium*: *A. lagocephala*
- Mata perenne que creix a les rocalles (Àrtic i Sibèria)
- Nivells de ploïdia: 2x i 6x



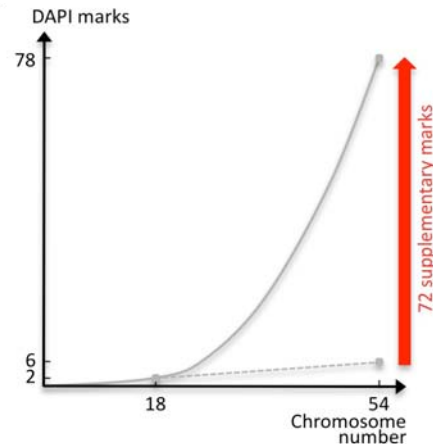
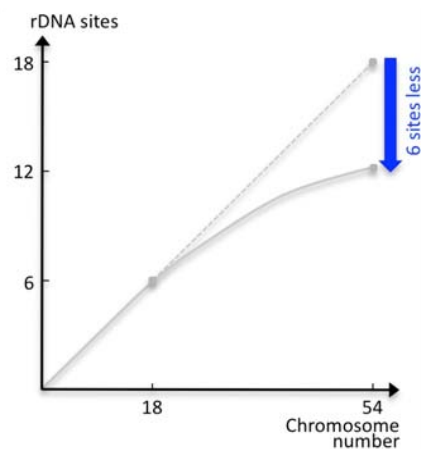
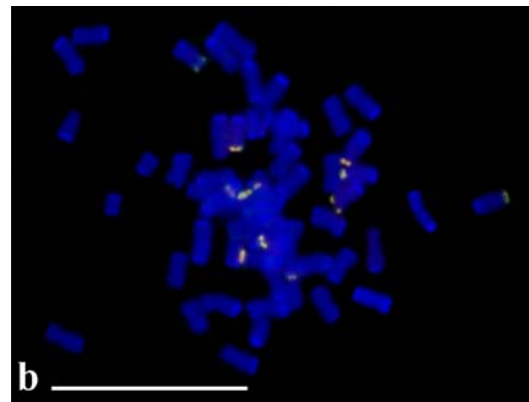
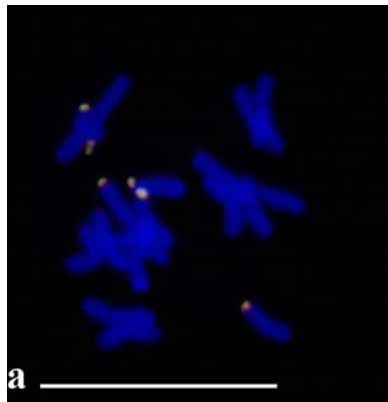
- Subgènere *Artemisia*: *A. medioxima*
- Herba perenne amb llargs rizomes i una alta taxa de reproducció asexual (est Rússia i nord Xina)
- Nivells de ploïdia: 2x, 4x i 16x



Evolució del DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: sèries poliploides

=

Species	Chromosome number (2n)	DAPI bands	18S-5.8S-26S sites	5S sites
Subg. <i>Absinthium</i>				
<i>A. lagocephala</i>	18	2	6	6
<i>A. lagocephala</i>	54	78	12	12

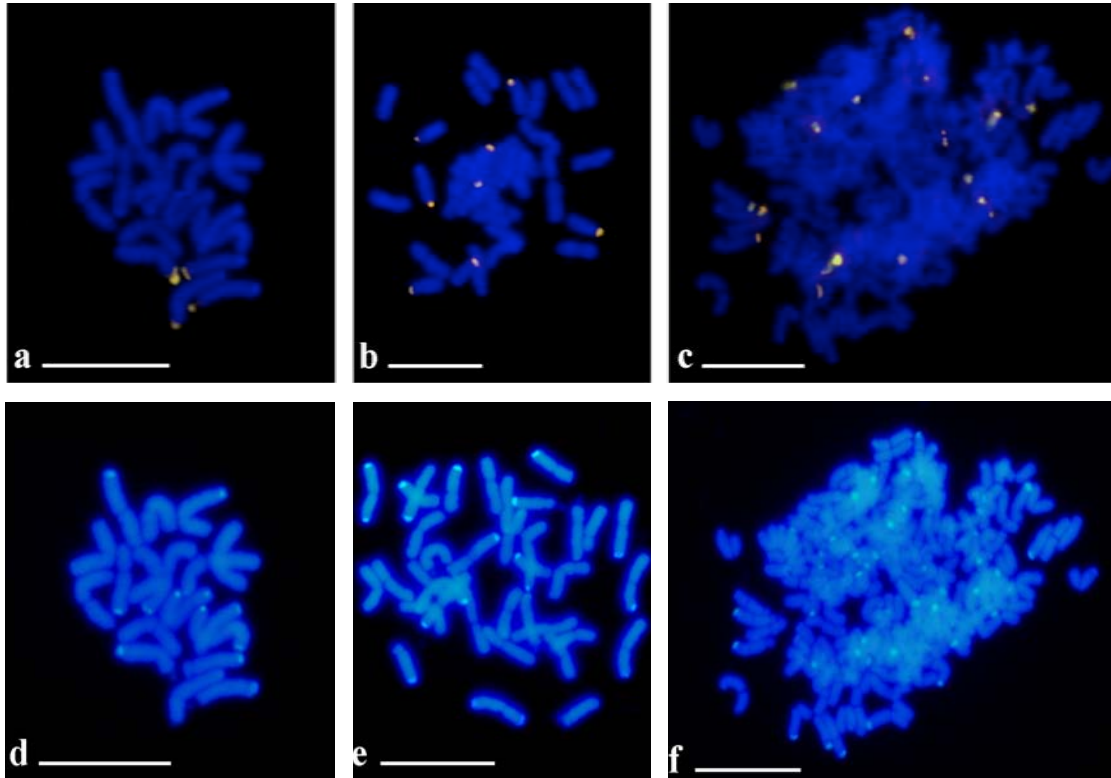


- No hi ha correspondència entre el nivell de ploïdia i el nombre de *loci* de rDNA
- La intensitat dels senyals en el poliploide és menor (reducció del nombre de còpies?)
- Increment del nombre de bandes d'heterocromatina constitutiva en la població poliploide (1) aparició de nous satèl·lits de DNA repetitiu, (2) funció reguladora

Evolució del DNA ribosòmic en el gènere *Artemisia*: sèries poliploides

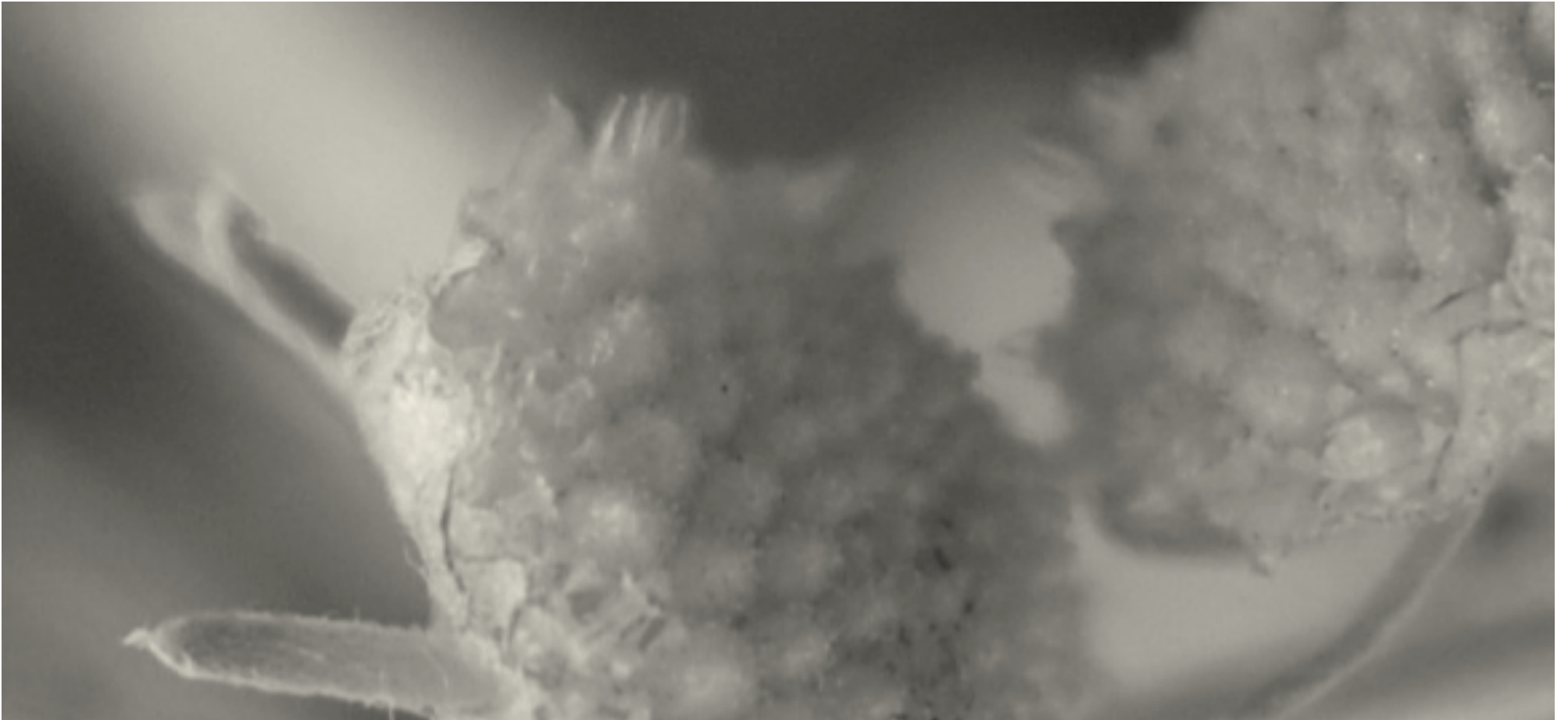
=

Species	Chromosome number (2n)	DAPI bands	18S-5.8S-26S sites	5S sites
Subg. <i>Artemisia</i>				
<i>A. medioxima</i>	18	12	4	4
<i>A. medioxima</i>	36	ca. 18	8	8
<i>A. medioxima</i>	144	≥ 34	ca. 20	ca. 20



- Increment proporcional del nombre de *loci* de rDNA entre els nivells 2x i 4x, però no amb el 16x
- Nombre de bandes de DAPI en els poliploides menor de l'esperat
- Comportament similar al reportat en altres complexos del gènere (*Absinthium*: *A. eriantha* - *A. umbelliformis*, *Dracunculus*: *A. campestris* - *A. monosperma*)

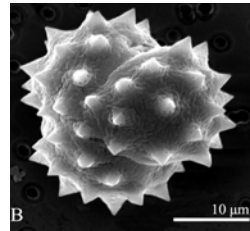
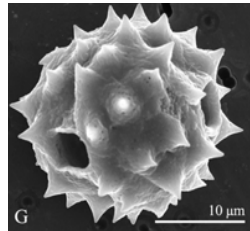
El tipus pol·línic com a marcador sistemàtic



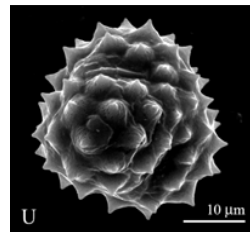
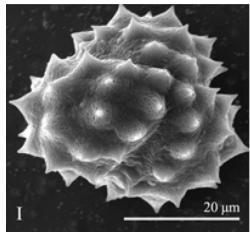
El tipus pol·línic com a marcador sistemàtic: *Artemisiinae*

Tipus *ANTHEMIS*

Ajanía

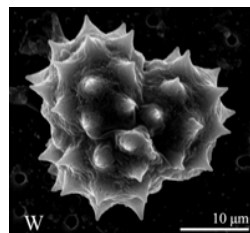
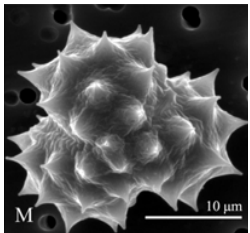


Brachanthemum



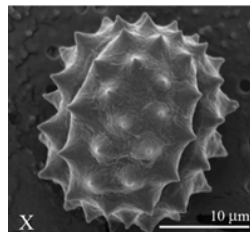
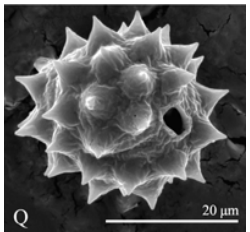
Hippolytia

Cancrinia



Poljakovia

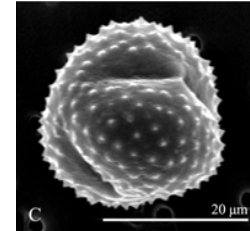
Dendranthema



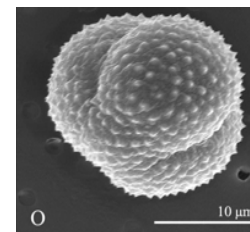
Stilpnolepis

Tipus *ARTEMISIA*

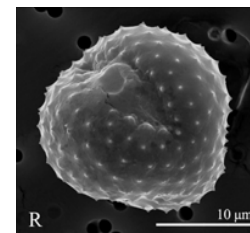
Artemisia



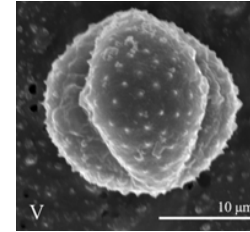
Crossostephium



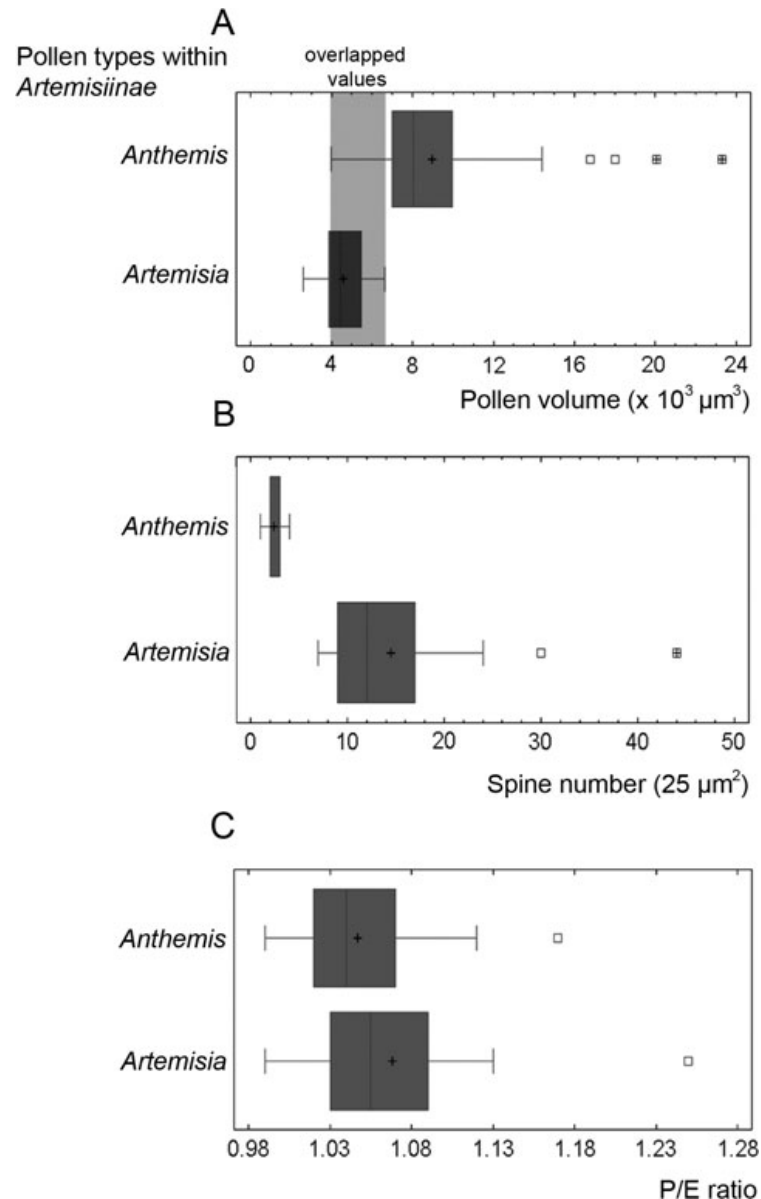
Elachanthemum



Kaschgaria



El tipus pol·línic com a marcador sistemàtic: *Artemisiinae*

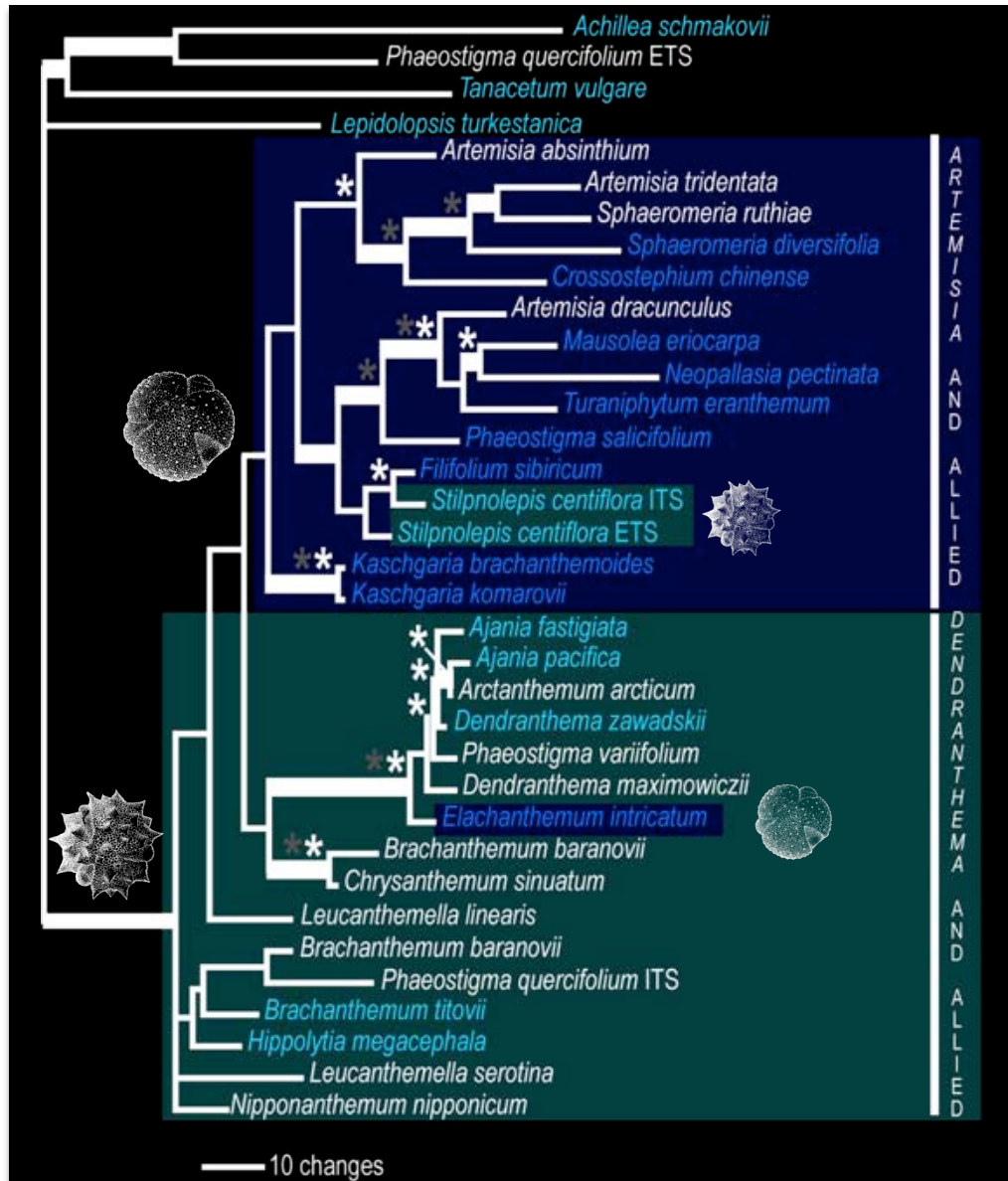


- El volum mitjà de cadascun dels tipus pol·línics és diferent ($P < 0,005$). *Anthemis* ($V = 8961,2 \mu\text{m}^3$), *Artemisia* ($V = 4574,6 \mu\text{m}^3$)

- L'ornamentació de l'exina discrimina clarament entre ambdós tipus pol·línics; *Artemisia* presenta elements ornamentals reduïts (espínules) i molt més abundants que el tipus *Anthemis*

- Ambdós tipus són esferoïdal i no existeixen diferències significatives ni en la ratio P/E ni en la seva forma

El tipus pol·línic com a marcador sistemàtic: *Artemisiinae*



■ Els tipus pol·línics apareixen segregats a la filogènia caracteritzant cadascuna de les dues grans clades de les *Artemisiinae* (*Artemisia* i *Dendranthema*).

■ Excepcions: *Elachanthemum* i *Stilpnolepis*. Reversió del tipus pol·línic?

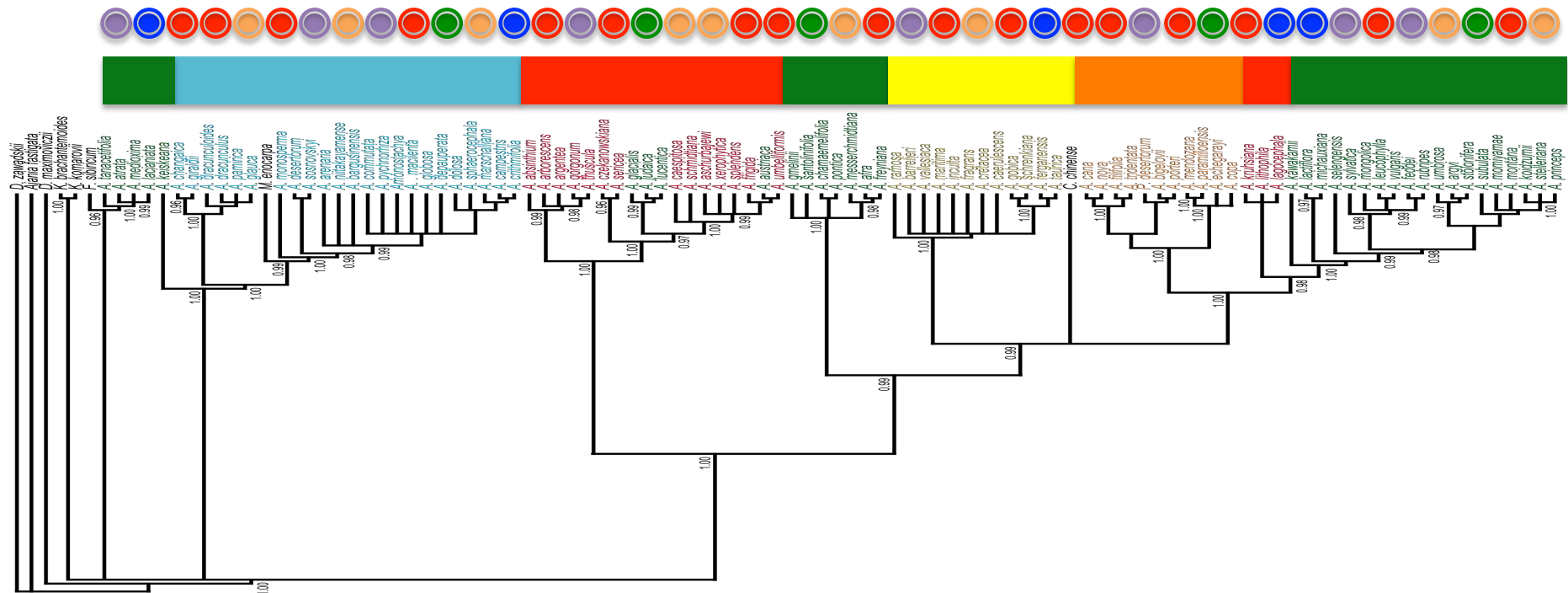
Descartar l'herència del tipus pol·línic a través de processos d'hibridació

El tipus pol·línic com a marcador sistemàtic: *Artemisia*

■ Segons Jiang et al. (2005):

- *Myriantha*
- *Mongolica*
- *Sacrorum*
- *Oligocarpa*
- *Lavandulaefolia*
- *Anomale*

■ Els diferents tipus i subtipus pol·línics descrits a dintre del gènere *Artemisia* no segueixen cap patró filogenètic





AGRAÏMENTS

- Membres d'EtnoBioFic
- Membres de la Universitat de Barcelona i de l'Institut Botànic de Barcelona
- Membres del GReB
- Dra. Sonja Siljak-Yakovlev (Université Paris-Sud, France)
- Dr. Katsuhiko Kondo (University of Tokyo, Japan)
- Dr. Aleksandr A. Korobkov (Komarova Insitute, Russia)