



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
LABORATORI DE BOTÀNICA

**Estudis sobre biologia de la reproducció de la tribu *Delphineae*
Warming (*Ranunculaceae*) a la Mediterrània occidental.**

Memòria presentada per Maria Bosch i Daniel per a optar al grau de Doctora en Farmàcia, realitzada sota la direcció dels Drs. Cèsar Blanché i Vergés i Joan Simon i Pallisé, Professor Titular i Professor Associat, respectivament, de la Unitat de Botànica del Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal Sanitària i Edafologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Vist-i-plau
Els Directors

Dr. C. Blanché

Dr. J. Simon

Signat.

Maria Bosch i Daniel
Barcelona, març de 1996

5.2.4.2. MECANISMES D'AÏLLAMENT REPRODUCTIU

Pel que fa a l'existència d'híbrids, l'única estimació global que hem trobat a la bibliografia consultada, la va reportar KNOBLOCH (1972) amb la xifra de 23.675 híbrids dins les angiospermes i 620 en pteridòfits, encara que cal tenir present que molts d'aquests eren obtinguts de manera artificial (STACE, 1989). A la natura, la freqüència d'híbrids és més baixa, tot i que hi ha zones florísticament molt riques que encara han estat poc estudiades (com ara els tròpics). No obstant això, l'hibridació no és un fenomen rar o anormal en el món vegetal i el seu potencial sembla gran, encara que repartit de manera desigual en els diversos grups de plantes. Tot i així, a la natura hi ha diversos mecanismes o barreres que n'impedeixen la formació. Els híbrids intergenèrics són molt menys freqüents i, a escala mundial, s'estimen en uns 2.930 (STACE, *loc. cit.*).

Aquestes barreres o mecanismes d'aïllament permeten que els tàxons mantinguin la seva identitat com a espècies, tot i que sovint és difícil delimitar aquestes entitats de manera objectiva. Les barreres poden ser de diversos tipus, tal com va descriure STACE (*loc. cit.*): genètiques, geogràfiques, ecològiques, fenològiques, etològiques (diferent comportament dels vectors pol·linitzadors), mecàniques, del comportament reproductor (predomini de l'autogàmia o reproducció vegetativa), aïllament gametofític (el pol·len arriba a l'estigma però no germina), aïllament gamètic (el pol·len germina però no té lloc la fecundació), grans incompatibles (el zigot no es desenvolupa), inviabilitat o esterilitat dels híbrids, entre d'altres.

Les qüestions del possible origen híbrid d'algunes espècies de *Delphineae* ja es plantejaven des de l'època de Linné. Aquest autor (LINNÉ, 1753) creia que *D. hybridum* L. (avui *D. cuneatum* Stev. ex DC.) era un híbrid entre *D. elatum* x *A. napellus* (cf. CHOWDURI *et al.*, 1958). Actualment no es té notícia de cap híbrid intergenèric dins d'aquesta tribu. Ell, com altres botànics, tenien certa tendència a resoldre qüestions taxonòmiques difícils atorgant possibles orígens híbrids, ja que sovint l'aparició d'híbrids desdibuixen els límits entre els tàxons. De fet, són relativament poques les espècies a les quals se'ls ha reconegut un possible origen híbrid: *D. gypsophylum* Ewan (LEWIS & EPLING, 1959), *D. belladonna* Hort. ex Bergm. (LAWRENCE, 1936; GAGE, 1953), *D. ruysii* Hort. ex Ruys (LAWRENCE, *loc. cit.*) i *D. kotulae* Pawl. (JANKUN, 1970), que podrien ser exemples d'híbrids poc discutits. Cap d'ells, però, pertany a l'àrea on s'emmarca aquesta memòria. D'altra banda, les formes híbrides i varietats de cultiu deriven de poques espècies com poden ser: *D. grandiflorum*, *D. elatum*, *D. tatsiense* Franch., *D. cardinale* i *D. nudicaule* (GAGE, *loc. cit.*; BASSET, 1990). Aquest fet pot ser ocasionat perquè aquestes espècies han funcionat prou bé i gaudeixen d'una relativa plasticitat, mentre que les altres, o bé no s'han provat o bé s'hibriden pitjor.

Les dades dels encreuaments interespecífics dels tàxons assajats (cf. figura 5.7. i 5.8.) indiquen que la hibridació en les *Delphineae* de la Mediterrània occidental funciona força bé entre les espècies filogenèticament properes, fins i tot entre tàxons que presenten nombres cromosòmics diferents (cf. capítol 6). Per tant, una conseqüència important d'aquests resultats és que les barreres genètiques tenen un paper poc important en l'aïllament reproductiu. En aquest sentit, LEWIS & EPLING (1946, 1959) reporten que la fertilitat interespecífica és força

elevada en *Delphinium* i que pot ser la responsable de la creació de nous tàxons a la natura. WARNOCK (1981, 1989) i WASER *et al.* (1987) opinen que la hibridació en *Delphineae* té lloc entre individus genèticament molt similars. En la nostra recerca, les hibridacions experimentals entre tàxons més allunyats (a partir de nivell de subgènere) pràcticament no produeixen granes. També sembla bastant clar que les barreres genètiques són més fortes en el gènere *Consolida* que en *Delphinium*, encara que en aquest primer gènere hem assajat pocs tàxons i filogenèticament són més allunyats.

Sèrie Fissa

Els encreuaments interespecífics entre *D. bolosii* i les dues subespècies de *D. fissum*, tot i posseir nombres cromosòmics diferents, produeixen un percentatge de granes desenvolupades força alts, cosa que denota un alt grau de parentiu entre ambdues espècies (cf. taula 5.31.). No observem cap tendència a encreuar-se millor amb una o l'altra subespècie.

Taula 5.31. ENCREUAMENTS INTERPOBLACIONALS I INTERESPECÍFICS ENTRE *D. BOLOSII* I *D. FISSUM*.

♂ ↓ ♀ →	BOL1	BOL2	FIS1	FIS2	FIS3	FIS4
BOL1	62,99	73,84	56,30	47,45	61,77	48,43
BOL2	60,70	70,90	57,28	46,39	43,17	42,73
FIS1	57,64	63,69	72,73	59,31	52,17	68,97
FIS2	45,02	57,87	61,93	70,75	58,51	64,89
FIS3	58,65	51,01	43,72	56,96	72,09	45,23
FIS4	63,77	55,05	45,29	56,19	58,10	62,84

(Percentatge de granes desenvolupades produïdes en cada cas).

Els híbrids entre *D. bolosii* i *D. fissum* mostren unes taxes de germinació (cf. taula 5.30.) molt baixes que segueixen la tònica del grup (cf. capítol 3). Els costa molt de germinar i, curiosament, han germinat millor alguns híbrids que les granes produïdes en els diversos tractaments dels sistemes reproductius dins la mateixa espècie. Aquest fet reforça la idea de la gran proximitat entre aquestes espècies, tot i que presenten nombres cromosòmics diferents ($2n=18$ i $2n=16$, respectivament). Han germinat millor els híbrids entre *D. bolosii* i *D. fissum* subsp. *fissum* que no *D. bolosii* amb la subespècie *sordidum*. En les poblacions naturals, l'aïllament és fonamentalment geogràfic, cosa que probablement és un dels causants de la diferenciació de *D. bolosii*, a part del nombre cromosòmic. A nivell isoenzimàtic tampoc hi ha diferències notables (cf. capítol 7).

Sèrie *Pentagyna*

Aquest grup de perennes presenta taxes molt elevades d'encreuament interespècific amb espècies filogenèticament properes, produint moltes grans viables. És remarcable la baixa existència de barreres genètiques entre les espècies i, en canvi, sí que posseeixen barreres d'autoincompatibilitat molt marcades. En altres paraules, accepten millor el pol·len d'espècies afins que el seu propi pol·len. S'hibriden força bé amb espècies properes, fins i tot a nivell de sèrie amb *D. bolosii* o *D. fissum* (tot i que poden presentar nombres cromosòmics diferents). En canvi, pràcticament no s'encreuen amb les espècies anuals.

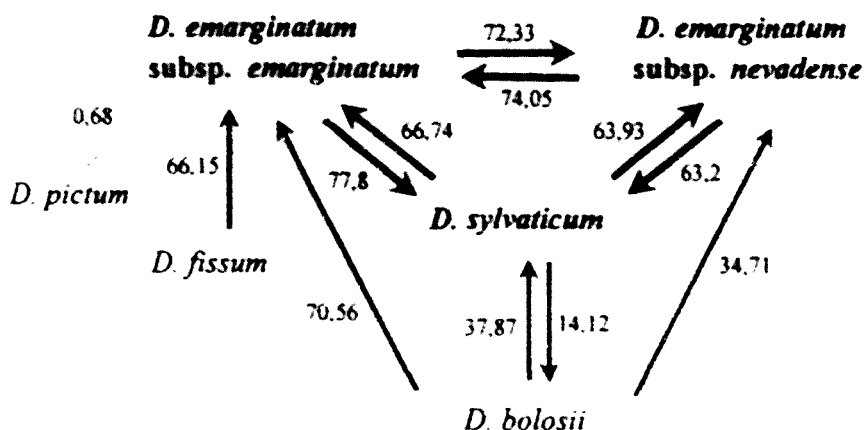


Figura 5.11. Encreuaments interespècifics en la sèrie *Pentagyna*.

Les espècies d'aquesta sèrie mostren uns alts percentatges de germinació tant dels híbrids com d'alguns encreuaments assajats (cf. taules 5.29. i 5.30.), tot i ser espècies perennes. Aquests resultats reflecteixen un alt grau de viabilitat dels híbrids, alguns dels quals han arribat a florir el primer any. Aquesta dada corrobora que l'existència de barreres genètiques interespècífiques en aquest grup és molt petita.

A la natura, l'aïllament també serà bàsicament de tipus geogràfic, encara que algunes espècies poden tenir localitats properes. Per exemple, entre *D. emarginatum* subsp. *emarginatum* var. *africanum* i *D. sylvaticum* a Tunísia hi ha cert encavalcament de les seves àrees de distribució, però hi ha aïllament ecològic (*D. emarginatum* està a la màquia sobre calcàries, mentre que *D. sylvaticum* creix en suredes acidòfiles montanes relativament humides) i fenològic (quan *D. emarginatum* està en flor, *D. sylvaticum* està en poncelles no obertes, observacions que també hem detectat en condicions d'hivernacle (cf. apartat 3.5.)).

El fet que siguin més ramificades, adaptades a un clima més mediterrani i mostrin un patró de comportament reproductiu més semblant a les anuals del subgènere *Delphinium*, fa pensar que s'han adaptat millor a les condicions ambientals mediterrànies que no pas les plantes de la sèrie *Fissa*, d'origen estèpic. Aquests alts percentatges de germinació també anirien en la mateixa línia.

Subgènere *Staphisagria*

El punt de partida era el coneixement dels resultats d'hibridació entre *D. pictum* i *D. staphisagria* a l'Institut Botànic de Barcelona (ALÍAS & BLANCHÉ, inèd.). Tot i el nombre cromosòmic diferent de *D. staphisagria* ($2n=18$) (cf. capítol 6), s'encreua interespecíficament amb *D. pictum* ($2n=16$). La producció de granes és més alta quan *D. staphisagria* és la receptora del pol·len, cosa que reforça la idea que la transmissió de l'aneuploidia és millor per gàmetes femenins. Aquest fet va en la mateixa línia que l'obtenció de millors resultats en els encreuaments interpoblacionals dins d'aquesta espècie, com si requerís una aportació de variació genètica externa. En la població de *D. pictum* en què la pol·linització encreuada interpoblacional és més alta (PIC1), també s'obté un millor resultat en hibridar amb *D. staphisagria* (cf. taules 5.16. i 5.17.), cosa que dona suport a la idea de certa depressió genètica en la població PIC2.

Aquestes dades també demostren que cal algun tipus de barreres per la proximitat o coexistència entre aquestes dues espècies en hàbitats molt propers. Aquestes barreres semblen fonamentalment fenològiques. A Ieras, REQUIEN (in litt. a Candolle, BLANCHÉ, 1991) reporta l'existència d'un mes de diferència en la floració de *D. staphisagria* respecte a *D. pictum* subsp. *requieni*. La mateixa diferència ha estat reportada a Mallorca, a la localitat de Sa Calobra (BLANCHÉ, loc. cit.).

La viabilitat de les granes híbrides entre *D. pictum* i *D. staphisagria* ha estat molt baixa comparativament a les taxes de germinació de les espècies parentals provinents de les poblacions naturals (cf. capítol 3). En aquest cas, les anomalies cromosòmiques podrien ser les responsables d'aquesta baixa germinabilitat.

Subgènere *Delphinium*

Tots els encreuaments interespecífics que hem assajat dins d'aquest grup han donat una producció de granes molt alta (60-75 %), que ens indueix a pensar en una gran proximitat genètica entre tots aquests tàxons, mentre que l'encreuament amb altres subgèneres no han prosperat. Tot i això, cal destacar que presenta més afinitat pel subgènere *Staphisagria* (arriba a produir alguna grana desenvolupada, en els dos sentits), que amb els tàxons perennes. La gran similitud de cariotips (cf. capítol 6), que també es reflecteix en una gran semblança morfològica (BLANCHÉ *et al.*, 1990; BLANCHÉ, 1990, 1991) podria explicar aquesta elevada capacitat d'encreuament. A la natura, les barreres són majoritàriament de tipus geogràfic o

fenològic (cf. taula 5.32.). En *D. verdunense* té lloc un comportament semblant al de la sèrie *Pentagyna*, és a dir, es produeix una major autoincompatibilitat que no pas una incompatibilitat interespecífica.

L'absència de barreres genètiques incrementa la probabilitat de flux gènic entre espècies simpàtriques o que se situen en àrees contínues. La presència de formes intermèdies és fàcilment predible d'acord amb el model d'especiació clinal peripàtrica (WHITE, 1978) com té lloc en el grup *D. verdunense*-*D. gracile* a la península Ibèrica (BLANCHÈ, 1991). En el grup de *D. macropetalum*-*D. obcordatum* es produeix un model semblant. Hem detectat nombroses formes intermèdies tant al camp, com en material d'herbari.

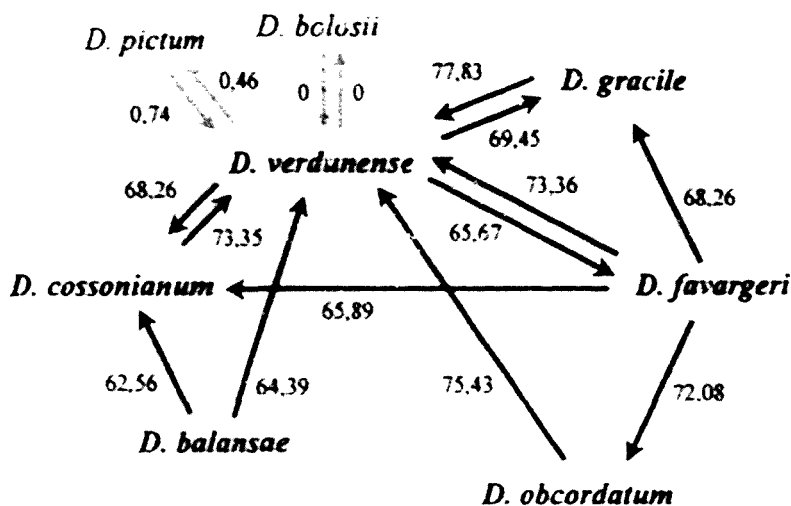


Figura 5.12. Encreuaments interespecífics en el subgènere *Delphinium*.

Consolida

Les barreres d'aïllament genètic semblen més fortes en aquest gènere que en *Delphinium*, tot i que les espècies més properes, és a dir, les que pertanyen a la mateixa secció (*C. pubescens* i *C. mauritanica*) s'encreuen millor entre elles, que entre seccions diferents (aquestes amb *C. ajacis*). HONG DE-YUAN (1986) va obtenir granes viables hibridant dues subespècies de *C. regalis* i va obtenir granes que no li van germinar encreuant *Aconitella stenocarpa* i *A. scleroclada*. Cal remarcar, però, que aquestes darreres presenten nombres cromosòmics diferents ($2n=16$ i $2n=18$). Per tant, les barreres entre nombres diferents, també semblen més fortes que entre els displòides de *Delphinium* (*D. fissum* x *D. bolosii* o *D. pictum* x *D. staphisagria*), en què sí han germinat algunes granes.

En aquest gènere s'inverteix el patró de comportament respecte a la sèrie *Pentagyna* o el subgènere *Delphinium*, atès que existeixen més barreres d'incompatibilitat interespecífica que d'autoincompatibilitat, tot i que el millor sistema és clarament l'al·logàmia. D'altres

Consolida, com *C. regalis*, però, han estat descrites com a autoincompatibles (MÜLLER, 1883; SVENSSON & WRIGEN, 1986). Si li afegim les dades de HONG DE-YUAN (1986), aquests resultats demostren que hi ha models molt diferents en un mateix gènere.

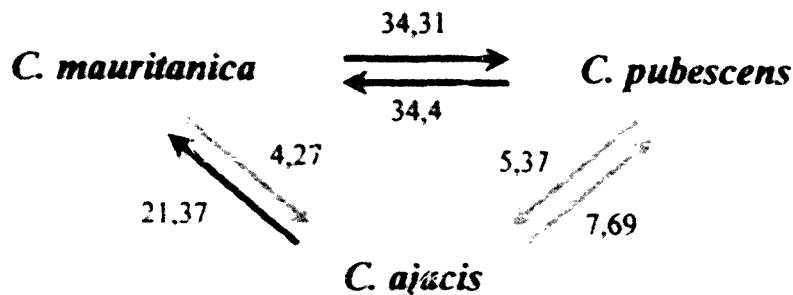


Figura 5.13. Encreuaments interespecífics en *Consolida*.

BARRERES I MECANISMES D'AÏLLAMENT EN DELPHINEAE A LA MEDITERRÀNIA OCCIDENTAL

Pel que hem vist fins ara, les barreres genètiques entre tàxons filogenèticament propers dins d'aquest grup són bastant febles. Per tant, les barreres probablement són d'una altra mena.

Els tipus de mecanismes d'aïllaments reproductiu més freqüent en els tàxons estudiats són bàsicament geogràfics. En algunes espècies simpàtriques, hem detectat barreres de tipus fenològic, però no sempre són completes. La taula 5.32. recull exemples de dades sobre *Delphineae* simpàtriques, algunes de les quals presenten aïllament fenològic. Són la recopilació d'observacions de les espècies estudiades pel nostre equip, a més d'algunes que reporta la bibliografia i d'altres realitzades per C. Blanché, J. Molero & G. de la Fuente durant una campanya de recol·lecció de material a Turquia.

L'aïllament ecològic és menys freqüent però també es dona (un exemple seria *D. emarginatum* i *D. sylvaticum* a Tunísia). En canvi, no té lloc un aïllament de tipus reproductiu (és a dir, plantes exclusivament autògames o apomíctiques).

D'altra banda, segons la bibliografia consultada, tampoc sembla que el comportament dels insectes afavoreixi els encreuaments interespecífics en aquesta tribu. CLEMENTS & LONG

(1923) van demostrar que els abellots eren capaços de distingir flors normals d'alterades en morfologia, color o olor. WASER & PRICE (1981, 1983, 1985b) també van detectar que els abellots eren capaços de discernir entre individus normals i albins. En aquest sentit, l'absència d'hibridació entre tres espècies americanes simpàtriques de *Delphinium*: *D. hesperium* Gray, *D. parryi* Gray i *D. variegatum* Torr. et Gray, reproductivament compatibles (EPLING, 1947), va suggerir a GRANT (1949) la possibilitat de cert aïllament etològic a flors adaptades a la pol·linització per *Bombus*. No obstant això, en les nostres espècies, sobretot en *Aconitum*, vam observar que el mateix abellot podia visitar consecutivament flors d'espècies diferents (amb colors diferents) (cf. capítol 4). A la vall d'Eina, on conviuen simpàtricament tres espècies d'acònit, no hem detectat l'existència d'híbrids, probablement perquè les barreres genètiques són prou fortes. Tot i això, sí que vam detectar un presumpte híbrid entre *A. napellus* i *A. lycoctonum* a la Vall de Llosas (Osca), que presentava característiques morfològiques intermèdies. S'haurien de dur a terme més estudis (citogenètica, isoenzims, etc.) per tal de verificar la seva existència real. Dins d'aquest gènere, però, no és rara l'existència d'híbrids naturals (KARTASHOVA & MALAKHOVA, 1973; KRZAKOWA & SZWEYKOWSKI, 1976; ZIELINSKY, 1982a, 1982b).

Taula 5.32. EXEMPLES D'ESPÈCIES SIMPÀTRIQÜES EN DELPHINEAE.

LOCALITAT, ALTITUD, DATA	TÀXONS (estadi fenològic)	REFERÈNCIA
Hs: Osca, Vedat de Fraga, 300 m, 29/6/94	<i>C. pubescens</i> (fruit) i <i>D. gracile</i> (flor)	observació pròpia
Hr: Lleida, Rubió de Baix, 290 m, 15/7/95	<i>D. bolosii</i> (fruit) i <i>D. verdunense</i> (flors)	observació pròpia
Ga: Pirineus orientals, vall d'Eina, 1980 m, 6/8/93	<i>A. lycoctonum</i> (flors) i <i>A. anthora</i> (poncelles)	observació pròpia
Ma: Fès, 500 m, 23/6/94	<i>D. cossonianum</i> (últimes flors, fruit) i <i>D. favargeri</i> (floració)	observació pròpia
Ma: Kenifra, 1.650 m, 21/6/94	<i>C. mauritanica</i> (flors) i <i>D. favargeri</i> (poncelles i flors)	observació pròpia
Bl: Mallorca, Sa Calobra, 100 m, 6/84	<i>D. staphisagria</i> (flors i fruits) i <i>D. pictum</i> (primeres flors)	BLANCHE, 1990
Hs: Salamanca, Las Hontorias, 1.100 m, 7/84	<i>D. fissum</i> subsp. <i>sordidum</i> (poncelles) i <i>D. gracile</i> (flors)	BLANCHE, 1990
Ma: Marràquetx, Touama, 5/85	<i>D. pentagynum</i> (flors i fruit) i <i>D. obcordatum</i> (poncelles)	BLANCHE, 1990
An: Ankara, Çobuk, 1.020 m, 8/6/89	<i>Consolida paniculata</i> (poncelles petites) i <i>C. hellespontica</i> (Boiss.) Chater (flors)	Campanya Turquia
An: Malatya, Karapınar, 1.050 m, 14/6/89	<i>Aconitella scleroclada</i> (Boiss.) Soják (poncelles) i <i>C. oliveriana</i> (DC.) Schröd (flors i fruits)	Campanya Turquia
An: Adıyaman, Gölbaşı, 980 m, 15/6/89	<i>C. acilliflora</i> (DC.) Schröd i <i>C. oliveriana</i> (idèntica fenologia, flors i fruit)	Campanya Turquia
An: Niğde, Pozanti cap a Çamardı, 1.350 m, 17/6/89	<i>C. hellespontica</i> i <i>C. ravyi</i> (Boiss.) Schröd (idèntica fenologia, flors)	Campanya Turquia
An: Konya, pr. Kızıören, 1.350 m, 18/6/89	<i>C. paniculata</i> (poncelles i flors), <i>C. orientalis</i> Gray (flors i fruits), <i>C. hellespontica</i> (poncelles) i <i>A. stenocarpa</i> (Hossain & Davis) Soják (poncelles)	Campanya Turquia

6. ESTUDIS CITOGENÈTICS

6.1. INTRODUCCIÓ

El notable creixement de dades sobre recomptes cromosòmics apareguts en els darrers trenta anys (cf. ORNDUFF, 1968, 1969a; FEDOROV, 1969; MOORE, 1970, 1971, 1972, 1973, 1974, 1977; GOLDBLATT, 1981; MOORE, 1982; GOLDBLATT & JOHNSON, 1983, 1985, 1988, 1990, 1991) demostren que la citogenètica ha assolit una gran transcendència, tot i que en la majoria d'ocasions s'ha tractat com una ciència auxiliar d'altres. Avui en dia, és sobradament conegut que la citogenètica forneix una sèrie de dades comparatives que permeten postular, entre d'altres, moltes qüestions de tipus filogenètic i evolutiu (LEWIS, 1957; STEBBINS, 1971; RAVEN, 1975; MOORE, 1978; GRANT, 1981; STUESSY, 1990). El coneixement, doncs, dels aspectes cariològics és important en diversos camps com ara la genètica, la sistemàtica, l'evolució, i també en la biologia de la reproducció.

En aquest sentit, la delimitació de les espècies basada en la taxonomia clàssica i les seves relacions ha estat verificada o posada en dubte per evidències citogenètiques com ara el recompte cromosòmic, l'anàlisi del cariotip, el percentatge d'encreuaments, la viabilitat dels híbrids i l'aparellament de cromosomes meiótics (SINGH, 1993).

Potser la relació més directa de la citogenètica amb la biologia de la reproducció i, més concretament, amb l'estudi dels sistemes reproductius és, en gran part, l'estudi de la morfologia cromosòmica, tant dels parentals que intervenen en els encreuaments interespecífics, com de la primera generació filial. El nombre cromosòmic i el grau d'homologia determinen el comportament de l'aparellament dels cromosomes en la meiosi, el qual en part regeix el nivell de fertilitat dels híbrids, l'herència del comportament reproductiu i el model de variació de les poblacions (STACE, 1989).

L'encreuament de plantes, entès com a activitat de manipulació de genotips, requereix tècniques i informació que poden ser proporcionades per la citogenètica (SYBENGA, 1993). La informació que proveeix aquesta ciència, que pot ser general o més específica, s'obté a partir del nombre i estructura dels cromosomes (cariotip) i del seu comportament durant les divisions somàtiques o generatives, tant del material de partida, com de l'intermedi o dels productes resultants (SYBENGA, 1983).

El nostre objectiu ha estat, fonamentalment, realitzar un estudi mitòtic dels parentals emprats per dur a terme les experiències dels sistemes reproductius. En un primer estadi, aquesta recerca ens permetrà assegurar si els exemplars usats presenten o no anomalies genètiques i, per tant, atribuir a altres causes la interpretació de l'èxit o el fracàs de la viabilitat dels encreuaments. Es tracta, doncs, en aquesta primera fase, d'un estudi-control de les poblacions que no havien estat prèviament revisades des del punt de vista citogenètic. Aquesta tasca, que pot semblar, en un primer moment, repetitiva, no ho ha estat gens, ja que ens ha permès detectar anomalies cromosòmiques inèdites en plantes presumptament estudiades com ara *D. staphisagria*. Hem extrapolat els resultats a nivell poblacional i no els hem efectuat de manera individual, d'una banda, perquè hauria portat massa temps (no era l'objectiu de la tesi) i, a més, altres investigacions fetes al nostre Laboratori han demostrat que les diferències intrapoblacionals són mínimes i sovint atribuïbles a factors aleatoris no controlables de la mateixa tècnica emprada (BLANCHÉ *et al.*, 1987, 1990; MARGELÍ, 1995).

A part del recompte cromosòmic, també s'ha dut a terme una anàlisi detallada del cariotip, amb el corresponent idiograma. Els resultats obtinguts han servit per intentar establir possibles relacions entre la similitud cromosòmica entre poblacions i/o espècies i l'èxit dels encreuaments interespecífics mesurat a partir de la producció de grans desenvolupades (*cf.* capítol 5).

6.1.1. ESTAT DE CONEIXEMENTS CITOGÈNÈTICS PREVIS A LES DELPHINEAE

La tribu *Delphineae* conté aproximadament unes 670 espècies d'acord amb el criteri ampli reconegut per TAMURA (1995). No obstant això, segons les referències de la base de dades del nostre equip, recull unes 830 espècies, de les quals, fins al moment actual, s'han comptat unes 275, que representen un 33 % dels tàxons (BLANCHÉ *et al.*, en premsa, a). La trentena d'espècies que pertanyen a la nostra àrea d'estudi han estat comptades en alguna ocasió, pràcticament en la seva totalitat. Les taules 6.1., 6.2. i 6.3. ens mostren tots els recomptes previs d'aquests tàxons, agrupats per gèneres, obtinguts a partir dels índexs anteriorment citats.

Durant força temps, la tribu havia estat considerada molt estable des del punt de vista citogenètic, ja que pràcticament totes les espècies que havien estat sotmeses a un control cariològic presentaven un nombre de base de $x=8$ (LANGLET, 1932; GREGORY, 1941; KURITA, 1955, 1956, 1957, 1958, 1965; AL-KELIDAR & RICHARDS, 1981; BLANCHÉ *et al.* 1987, 1990). A partir dels anys 80 s'han trobat escadusserament alguns nombres diferents (*cf.* taula 6.4.), més freqüents en els gèneres *Consolida* i *Aconitella* que són presumptament més evolucionats (TRIFONOVA, 1990). Del total de recomptes dins la tribu (MOLERO *et al.*, inèd.) (sense comptar els que es presenten en aquesta memòria), un 58 % correspon a un nivell diploide ($2n=16$), un 37 % al tetraploide ($2n=32$) i un 2 % al hexaploide ($2n=48$); de les espècies que pertanyen a la zona estudiada, els diploides representen un 64 %, els triploides, un 5 % i els tetraploides, un 30 %; no hi ha cap hexaploide i fins al moment d'aquesta memòria només s'ha detectat un dispoloide amb $2n=18$ (*D. bolosii*) (BLANCHÉ & MOLERO, 1983; BLANCHÉ, 1991).

Taula 6.1. NOMBRES CROMOSÒMICS PRÈVIAMENT CONEGUTS EN
ESPÈCIES D'*ACONITUM* DE LA MEDITERRÀNIA OCCIDENTAL.

Tàxon	n	2n	Autor i any
<i>A. lycoctonum</i>	8	16	LANGLET (1927)
		16	DARLINGTON (1932)
		16	AFIFY (1933)
		16	SCHAFER & LA COUR (1934)
		16	KURITA (1955)
	8	16	TSCHERMARK-WOESS (1956)
			MEUSEL <i>et al.</i> (1965)
		16	HESS <i>et al.</i> (1970)
	8	16	LOVKA <i>et al.</i> (1971)
			MEHRA & RAMANANDAN (1972)
		16	SUSNIK <i>et al.</i> (1972)
		16	SUSNIK & LOVKA (1973)
		16	KÜPFER (1974)
		16	LÖVE & KJELLQUIST (1974)
		16	HINDAKOVA (1976)
		16	MICIETA (1981)
		16	SOPOVA & SEKOVSKY (1982)
		16	PUIG (1987)
		16	GALLAND (1988)
<i>A. anthora</i>		24	DELAY (1947)
		32	LEWITSKY (1931)
		32	LANGLET (1932)
		32	SCHAFER & LA COUR (1934)
		32	SEITZ <i>et al.</i> (1972)
		32	SUSNIK & LOVKA (1973)
		32	KÜPFER (1974)
		32	MURIN (1978)
		32	DIEZ <i>et al.</i> (1984)
		32	PUIG (1987)
<i>A. napellus</i>		24	OVERTON (1893)
		24	OSTERWALDER (1898)
		24	DARLINGTON (1932)
		32	LANGLET (1927)
		32	DARLINGTON (1932)
		32	SCHAFER & LA COUR (1934)
		32	TISCHLER (1934)
		32	GREGORY (1941)
		32	TSCHERMARK-WOESS (1956)
		32	CONTANDRIPOULUS (1957a, 1957b)
		32	PUIG (1987)

Taula 6.2. NOMBRES CROMOSÒMICS PRÈVIAMENT CONEGUTS EN ESPÈCIES DE *DELPHINIUM* DE LA MEDITERRÀNIA OCCIDENTAL.

Tàxon	n	2n	Autor i any
<i>D. elatum</i>		24	KRASNIKOV & SCHAULO (1986)
		32	30 recomptes, en MOLERO <i>et al.</i> (inéd.)
<i>D. montanum</i>	16	32	JANKUN (1973)
		32	BLANCHÉ (1991)
<i>D. dubium</i>		32	JANKUN (1973)
<i>D. fissum</i>		16	TISCHLER (1927)
		16	WILDE (1931)
		16	SOPOVA & SEKOVSKY (1981)
		16	ALTAMURA <i>et al.</i> (1984)
		16	KOEVA-TODOROVSKA (1985)
		32	HOCQUETTE (1922)
		32	PROPACH (1940)
<i>D. fissum</i> subsp. <i>sordidum</i>		16	RICO <i>et al.</i> (1981)
	8	16	BLANCHÉ (1991)
<i>D. bolosii</i>		18	BLANCHÉ & MOLERO (1983)
	9	18	BLANCHÉ (1991)
<i>D. pentagynum</i>	8		RUIZ DE CLAVIJO & UBERA (1982)
	8		BLANCHÉ <i>et al.</i> (1985)
		16	QUEIRÓS (1990, 1991)
	8	16	BLANCHÉ (1991)
<i>D. emarginatum</i> subsp. <i>emarginatum</i>		16	OTTONELLO <i>et al.</i> (1985)
<i>D. emarginatum</i> subsp. <i>nevadense</i>	8		BLANCHÉ <i>et al.</i> (1985)
	8	16	BLANCHÉ (1991)
<i>D. staphisagria</i>		16	HOCQUETTE (1922)
		16	LEWITSKY (1931)
		16	GREGORY (1941)
	8		MAIRE (1964)
	8	16	BLANCHÉ (1991)
		32	LANGLET (1927)
		32	GREGORY (1941)
	16		MAIRE (1964)
<i>D. pictum</i> subsp. <i>pictum</i>		16	GREGORY (1941)
		16	CONTANDRIOPOULOS & CARDONA (1984)
		16	VERLAQUE <i>et al.</i> (1991)
	8		BLANCHÉ (1991)
<i>D. pictum</i> subsp. <i>requienii</i>		16	KURITA (1957)
		16	AL-KELIDAR & RICHARDS (1981)
		16	CONTANDRIOPOULOS & CARDONA (1984)
		16	VERLAQUE <i>et al.</i> (1991)
<i>D. peregrinum</i>		16	GREGORY (1941)
		16	DEMIRIZ (1980)
		16	KOEVA-TODOROVSKA (1985)
<i>D. halteratum</i>		16	CAMPO & ROMANO (1995)
<i>D. verdunense</i>	8		TJEBBES (1928)
		16	LEWITSKY (1931)
	8		MEHRA & RAMANANDAN (1972)
		16	AL-KELIDAR & RICHARDS (1981)
	8		BLANCHÉ <i>et al.</i> (1985)
		16	QUEIRÓS (1990)
	8	16	BLANCHÉ (1991)
<i>D. gracile</i>	8		PASTOR <i>et al.</i> (1984)
	8		GALLEGO & APARICIO (1990)
	8	16	BLANCHÉ (1991)
<i>D. cassonianum</i>	8	16	BLANCHÉ <i>et al.</i> (1990)
<i>D. balansae</i>		16	QUÉZEL (1957)
	8		GALLAND (1990 <i>in litt.</i>)
	8	15	BLANCHÉ <i>et al.</i> (1990)
<i>D. macropetalum</i>	8	16	BLANCHÉ <i>et al.</i> (1990)
<i>D. nanum</i>	8		BLANCHÉ <i>et al.</i> (1985)
<i>D. obcordatum</i>	8	16	BLANCHÉ <i>et al.</i> (1990)
<i>D. favargeri</i>	8	16	BLANCHÉ <i>et al.</i> (1990)

Taula 6.3. NOMBRES CROMOSÒMICS PRÈVIAMENT CONEGUTS EN ESPÈCIES DE *CONSOLIDA* DE LA MEDITERRÀNIA OCCIDENTAL.

Tàxon	n	2n	Autor i any
<i>C. regalis</i>		16	HOCQUETTE (1922)
		16	LANGLET (1927)
		16	TIEBES (1927, 1928)
		16	TSCHLER (1927, 1934)
		16	LEWITSKY (1931)
		16	GREGORY (1941)
		16	LÖVE & LÖVE (1942)
		16	KURITA (1965)
		16	BOLKHOVSKIKH <i>et al.</i> (1969)
		16	SKALINSKA & POGAL (1971)
		16	TRIFONOVA (1973)
		16	HINDAKOVA (1974)
		16	DVORAK & DADAKOVA (1977)
		16	POPOVA & CESCIMEDJEIV (1978)
		16	DVORAK & GRULL (1978)
		16	LOON & SNELDERS (1979)
		16	AL-KELIDAR & RICHARDS (1981)
		15	SOPOVA & SEKOVSKY (1981)
		16	HONG DE-YUAN (1986)
		16	ERTUGRUL & BEYAZOGLU (1989)
		16	GIMÉNEZ (1995)
<i>C. mauritanica</i>	8	16	BLANCHÉ <i>et al.</i> (1987)
<i>C. pubescens</i>	8	16	BLANCHÉ <i>et al.</i> (1987)
<i>C. ajacis</i>		16	GUIGNARD (1889)
		16	OSTERWALDER (1898)
		16	LANGLET (1927)
		16	TIEBES (1927, 1928)
		16	GREGORY (1941)
		16	KURITA (1955, 1957)
		16	LEGRO (1961)
	8	16	BASAK & JAIN (1963)
	8		MAIRE (1964)
	8		MEHRA & RAMANANDAN (1972)
		16	KOUL & GOHIL (1973)
		16	MANDAL & BASU (1977)
	8		SINGH & JAIN (1979)
		16	LOON (1980)
	8		SINGH (1982)
		16	SUBRAMANIAN (1985)
	8	16	BLANCHÉ <i>et al.</i> (1987)
	8		BIR <i>et al.</i> (1987)
		24	BÖNICKE (1911)
<i>C. orientalis</i>	12		MAIRE (1964)
		24	MANDAL & BASU (1978)
		16	BECKMAN (1928)
		16	GREGORY (1941)
	8		MAIRE (1964)
		16	BOLKHOVSKIKH <i>et al.</i> (1969)
		16	TRIFONOVA (1973)
		16	KOEVA-TODOROVSKA & NENOVA (1977)
		16	DEMIRIZ (1980)
		16	AL-KELIDAR & RICHARDS (1981)
	8	16	BLANCHÉ <i>et al.</i> (1987)
		16	ERTUGRUL & BEYAZOGLU (1989)
	8		BALTISBERGER & CHARPIN (1989)

Taula 6.4. NOMBRES DE BASE I CROMOSÒMICS EN LES *DELPHINEAE*
(segons MOLERO *et al.*, inèd.).

Gènere	Nombre de base: x	Dotació cromosòmica: 2n
<i>Aconitum</i>	8,9*,10*,13*	16,18*,24*,26*,30*,32,34*,40*,46*,48,52*,64*
<i>Delphinium</i>	8,9*,10*	16,18*,20*,24*,32,48*
<i>Consolida</i>	7*,8,9*	14*,16,18*,24*
<i>Aconitella</i>	6*,8,9*	12*,16,18*

* nombres poc freqüents

Les alteracions del nombre cromosòmic han seguit, dins el conjunt de la tribu, dues vies diferents segons el caràcter anual o perenne dels gèneres. En els tàxons perennes pren molta importància la poliploïdia com a via de diversificació, mentre que la dispoloïdia ha jugat un paper molt secundari. En els gèneres o subgèneres anuals s'invertirien els papers, de manera que la poliploïdia és pràcticament nul·la, mentre que adquireix més importància la dispoloïdia com a possible mecanisme d'especiació (GIMÉNEZ, 1995). Dins la dispoloïdia, també s'intueixen dues tendències que divergeixen lentament; mentre que en *Aconitum* i *Delphinium* la dispoloïdia fins al moment actual ha estat exclusivament ascendent, en *Consolida* i *Aconitella*, en presenten tanta d'ascendent com de descendent.

Pel que fa a la morfologia dels cromosomes, en general es tracta d'un grup de plantes amb una considerable similitud de cariotips, que es caracteritzen per una gran asimetria, la majoria pertanyen a les classes 3B i 3C d'Stebbins. El cariotip model de les *Delphineae* està constituït per dues parelles de cromosomes llargs força simètrics (metacèntrics o submetacèntrics) i 6 de progressivament més curts, molt més asimètrics (acrocèntrics, subacrocèntrics o telocèntrics) (LANGLET, 1932; GREGORY, 1941; KURITA, 1955; STEBBINS, 1971; BLANCHÉ *et al.*, 1987; TRIFONOVA, 1990; BLANCHÉ *et al.*, 1987, 1990; BLANCHÉ, 1991; etc.). Aquests cariotips, on es distingeixen clarament dos tipus de cromosomes per la seva mida, han estat anomenats *bimodals* (STEBBINS, 1971). La tendència evolutiva dins la tribu apuntada per TRIFONOVA (1990) és el canvi de nombre cromosòmic, l'augment de la asimetria del cariotip i la reducció de la seva mida.

6.2. MATERIAL I MÈTODES

6.2.1. MATERIAL

El material vegetal emprat per fer els estudis citogenètics ha estat exclusivament meristemes radiculars. Segons el cicle vital de la planta, s'han obtingut meristemes, bé a partir de plàntules procedents de germinació de granes en el cas de les espècies anuals (*cf.* capítol 3), bé d'individus trasplantats a testos, recollits en les seves poblacions naturals, en els tàxons perennes. Aquests individus, s'han transportat vius a l'hivernacle en torretes, procurant

conservar el seu pa de terra original. Hem comprovat empíricament que l'estrès hídric (dos o tres dies sense regar), afavoreix notablement l'increment d'arrels joves, susceptibles de presentar divisions mitòtiques.

Aquests meristemes radiculars han servit per cercar mitosis somàtiques que, si la qualitat de les plaques obtingudes era l'adient, han permès dur a terme el recompte del nombre cromosòmic i l'estudi detallat del cariotip.

S'han estudiat citogenèticament totes les poblacions consignades a la taula 6.7. Les úniques espècies que no hem considerat perquè les seves poblacions ja han estat prèviament revisades són: *A. lycoctonum*, *A. anthora* i *A. napellus* (MOLERO *et al.*, 1995), *D. montanum* (BLANCHÉ, 1991), *D. fissum* subsp. *sordidum* (RICO *et al.*, 1981; BLANCHÉ, 1991), *D. gracile* (BLANCHÉ, 1991), *D. cossonianum* (BLANCHÉ *et al.*, 1990), *D. balansae* (BLANCHÉ *et al.*, 1990), *C. pubescens* (BLANCHÉ *et al.*, 1987).

6.2.2. METODOLOGIA

PRESA DE MOSTRA I ESCURÇAMENT

Per prendre les arrels, es tomben els testos amb molta cura per no desmuntar excessivament el pa de terra i malmetre la planta. Les puntes d'arrel cal que siguin ben joves i blanques per assegurar-nos que estiguin en creixement i, conseqüentment, que hi hagi divisions mitòtiques. És recomanable abans d'iniciar els tractaments que les arrels romanguin submergides uns minuts en aigua destil·lada per eliminar les restes de terra que pugin portar. Per tal d'evitar al màxim superposicions i recargolaments entre els cromosomes (especialment llargs en aquesta tribu) i facilitar, dins del possible, les tasques de recompte i confecció del cariotip, s'ha fet un pretractament amb un agent antimitòtic abans de la fixació, amb la finalitat d'escurçar-los. Per a aquest efecte s'ha usat la 8-hidroxiquinoleïna 0,002 M (TJIO & LEVAN, 1950) durant dues hores a 4°C. Per eliminar l'hidroxiquinoleïna, es renten les mostres submergint-les en aigua destil·lada durant 5 minuts.

FIXACIÓ

Es traspasa les radicles a vials que continguin el fixador, és a dir, la mescla etanol absolut-àcid acètic glacial (3:1 V/V), anomenat *reactiu de Farmer*. Es manté en aquest líquid, com a mínim, durant un període de 24 hores al refrigerador; en aquestes condicions, el material es pot conservar durant força temps.

ESTOVAMENT

La mateixa constitució de l'arrel i els tractaments als quals ha estat sotmesa, sovint fan que les mostres restin força endurides i sigui menester un estovament, que tindrà dues

finalitats. D'una banda, facilita l'aixafament o *squash* i, de l'altra, millora la penetració del colorant. Aquest estovament s'assoleix mitjançant una hidròlisi àcida amb àcid clorhídric 1N, a una temperatura de 60°C (en una placa calefactora model 156 SELECTA), durant un període de 5 a 8 minuts. De nou, el procés s'atura submergint les mostres en aigua destil·lada durant uns 5 minuts.

TINCIÓ

La tinció de les radícules es realitza mitjançant la immersió en orceïna acètica al 2 %, a temperatura ambiental. Es deixa en maceració un període de 24 hores (KAWANO, 1965) per facilitar la penetració del colorant, tot i que la seva acció és gairebé immediata.

PREPARACIÓ I MUNTATGE

Amb l'ajut d'un estereoscopi binocular ZEISS model DRC es fragmenten les radícules i se selecciona la zona apical lleugerament per sota la còfia, que s'eliminarà, i abans de la zona de pèls absorbents. Es munten en un medi d'àcid acètic 45 %-glicerol (9:1), substància que ajudarà a clarificar el citoplasma, es tapa amb un cubreobjectes i es procedeix a realitzar l'aixafament. Si interessa conservar la preparació, es segella amb DPX, procurant que no entri aire. En aquestes condicions, es poden mantenir les preparacions sense perdre les seves característiques durant un període d'un a dos mesos al refrigerador (4°C).

OBSERVACIÓ

Les observacions han estat realitzades mitjançant un microscopi òptic ZEISS, a 100 augments per rastrejar la preparació, incrementant-ho fins a 1.000 a l'hora de seleccionar les plaques i estudiar-les. Quan s'han trobat cinc plaques de bona qualitat, hem procedit a dibuixar-ne la projecció mitjançant un microscopi ZEISS model AXIOSCOP equipat amb una càmera clara a 2.500 augments, per poder prendre, posteriorment, les mesures pertinents. De les millors plaques, se n'han pres fotografies a 1.000 augments. Sovint els cromosomes, es disposen en diferents plans i resulta impossible enfocar-los tots alhora, cosa que dificulta extraordinàriament l'obtenció de bones fotografies; en aquests casos, s'ha pogut comptar i dibuixar enfocant i desenfocant amb el cargol micromètric. Es conserven tots els dibuixos i negatius al Laboratori de Botànica.

6.2.3. PARÀMETRES I ÍNDEXS MESURATS

Les dimensions dels cromosomes han servit de base per a l'elaboració del cariotip, seguint els consells de BENTZER *et al.* (1971), LÖVE & LÖVE (1975) i FAVARGER (1978). Com és habitual en els treballs citogenètics, hem dibuixat l'idiograma haploide i hi hem indicat la

fórmula cromosòmica corresponent, segons la terminologia de LEVAN *et al.* (1964). Les dades que s'han reflectit en el cariotip han estat les següents: la mitjana i l'error estàndard de les longituds del braç llarg (L), del braç curt (C) i del total (L + C) de cada parell de cromosomes homòlegs, expressades en μm . També s'inclou la longitud cromosòmica mitjana del cariotip, així com la presència de satèl·lits i de constriccions secundàries.

Un altre paràmetre que permet relacionar les dades obtingudes amb altres cariotips és l'índex centromèric (IC), definit per SHINDO & KAMEMOTO (1963), que respon a la fórmula:

$$IC = 100 \times C / (L + C)$$

Indica el percentatge de cromosoma que representa el braç curt en relació a la seva llargada total.

La relació entre la llargada del braç llarg i el braç curt de cada parell homòleg (R de Levan), dona una idea de la posició del centròmer. LEVAN *et al.* (1964) estableixen unes categories segons els valors que pren R, que correspon a un tipus de cromosoma, com reflecteix la taula 6.5.

Taula 6.5. CLASSIFICACIÓ DELS CROMOSOMES SEGONS LEVAN *et al.* (1964).

R	Classe	Posició del centròmer	Tipus de cromosoma
$R = 1,0$	M	Punt medial	Metacèntric
$1,0 \leq R < 1,7$	m	Regió medial	Metacèntric
$1,7 \leq R < 3,0$	sm	Regió submedial	Submetacèntric
$3,0 \leq R < 7,0$	st	Regió subterminal	Subacrocentric
$7,0 \leq R < 39,0$	t	Regió terminal	Acrocèntric
$39,0 \leq R < \infty$	T	Punt terminal	Telocèntric

El grau de simetria dels cromosomes i del conjunt del cariotip queda reflectit pels següents índexs:

a) Índexs de asimetria de BAZZICHELLI (1967); indiquen el % de longitud que aporta cada braç al cariotip. Es calculen a partir de les següents fórmules:

$$\% L = 100 (L / \Sigma L + C)$$

$$\% C = 100 (C / \Sigma L + C)$$

b) Índex de asimetria d'STEBBINS (1971); estableix dotze classes a partir de la relació entre la longitud del cromosoma més gran i el més petit del cariotip i les freqüències dels quocients dels braços (cf. taula 6.6.).

Taula 6.6. CLASSES DE ASIMETRIA D'STEBBINS (1971).

Relació entre el cromosoma més llarg i el més curt	% de cromosomes amb R > 2:1			
	0	1 - 50	51 - 99	100
< 2:1	1A	2A	3A	4A
2:1 - 4:1	1B	2B	3B	4B
> 4:1	1C	2C	3C	4C

c) Índexs de asimetria de Romero-Zarco: proposats per ROMERO (1986) són dos paràmetres que mesuren:

$$A_1 = 1 - \{ \sum (C/L) \} / n \quad \text{l'índex de asimetria intracromosòmica}$$

$$A_2 = S / X \quad \text{l'índex de asimetria intercromosòmica}$$

on X expressa la mitjana de la longitud dels cromosomes i S, la desviació estàndard corresponent. A_2 també es coneix per *coeficient de dispersió de Pearson*. Aquests índexs presenten dos avantatges. D'una banda, permeten la representació gràfica en un sistema de coordenades (A_1 i A_2) que possibilita la comparació de cariotips i, de l'altra, discrimina millor que les classes d'Stebbins, a rangs taxonòmics infragenèrics (ROMERO, 1986; GIMÉNEZ, 1995).

Per agilitzar i facilitar les tasques d'elaboració del cariotip, tot el tractament estadístic bàsic de les dades, la conversió de les mesures, el càlcul dels índexs anteriorment descrits i la representació dels idiogrames haploides, s'han portat a terme a partir del programari (*software*) d'un full de càlcul LOTUS per Windows versió 4.1. A partir d'aquest programa, el nostre Laboratori ha creat un conjunt de macros incorporades al full de càlcul model amb les instruccions de programació adients que permeten automatitzar tots els procediments a realitzar, quan s'han entrat les mesures corresponents de cadascun dels braços dels cromosomes, i que constitueixen el programa CARIO, elaborat per J. Simon (inèd.). Ara bé, un aspecte de gran transcendència, com l'aparellament dels cromosomes, fonamental per la correcta elaboració del cariotip, no s'ha deixat al total arbitri de les macros programades a tal efecte, ja que alguns criteris d'aparellament són difícils d'informatitzar. Per tant, si bé s'han usat, sempre hem efectuat un examen posterior dels aparellaments suggerits per l'ordinador.

6.3. RESULTATS

S'han estudiat el nombre cromosòmic i el cariotip de 18 poblacions que corresponen a un total de 12 espècies diferents. A partir de les referències bibliogràfiques de què disposem, *D. sylvaticum* és l'única espècie que no ha estat mai comptada i tampoc s'havien dut a terme els cariotips de *D. verdunense* i *D. staphisagria*.

Els resultats dels recomptes dels nombres cromosòmics obtinguts a partir de l'anàlisi de les plaques mitòtiques s'indiquen, a títol comparatiu, a la taula 6.7., així com la seva fórmula i altres característiques: longitud cromosòmica mitjana, classe d'Stebbins, índexs de Romero-Zarco i nombre de cromosomes satel·litífers.

La dotació cromosòmica de la majoria de tàxons revisats en aquesta memòria és de $2n=16$ i confirma plenament $x=8$ com a nombre de base habitual i majoritari a la tribu, excepte en les dues poblacions de *D. bolosii* i les tres de *D. staphisagria*, que ha donat en tots els casos $2n=18$.

Totes les poblacions analitzades presenten un cariotip bimodal amb un o dos cromosomes llargs (fins a $17\ \mu\text{m}$, el més llarg) metacèntrics o submetacèntrics i la resta, majoritàriament acrocèntrics, són gradualment més petits (fins a $3\ \mu\text{m}$, el més petit). De fet, podríem agrupar aquests tàxons en tres grans grups segons la morfologia del seu cariotip: els de $2n=18$ (*D. bolosii* i *D. staphisagria*), amb una parella de llargs i 8 de més petits, i els de $2n=16$ que es poden subdividir alhora en 2 grups, els que només tenen una parella de llargs (el subgènere *Delphinium*) i els que presenten les dues parelles de llargs, que és el cariotip model de la tribu (la resta de tàxons). Són cromosomes en conjunt força llargs; l'interval de variació de la seva longitud cromosòmica mitjana és de $5,10$ a $9,69\ \mu\text{m}$. Els euploides pertanyen a la classe 3B d'Stebbins, mentre que els dispioides de $2n=18$ corresponen a la classe 3C. Els índexs de Romero-Zarco oscil·len entre $0,60$ - $0,76$ per A_1 i $0,27$ - $0,51$ per A_2 .

La presència de cromosomes satel·litífers en els tàxons estudiats és força elevada. S'observa una tendència important a presentar-se en els parells de cromosomes llargs. També ens adonem que es tracta d'un aspecte de gran variabilitat a nivell interpoblacional. Cal tenir en compte, però, que aquest element sembla molt inconstant, fins i tot entre plaques d'un mateix individu ja que en moltes ocasions es poden trencar en el procés d'aixafament i no detectar-se. No hem observat cromosomes B ni constriccions secundàries en cap de les poblacions estudiades.

Hem representat els índexs de Romero-Zarco en dos tipus de gràfics de dispersió de punts. El primer, bidimensional (figura 6.1.), és un sistema de coordenades on x correspon a l'índex de asimetria intracromosòmica (A_1) i y el de asimetria intercromosòmica (A_2). Aquest gràfic només dóna idea de la asimetria dels cariotips. El segon (figura 6.2.) és tridimensional i relaciona la asimetria amb la longitud total del complement cromosòmic. Tot i que el segon gràfic conté el primer i pot semblar informació redundant, incloem els dos perquè els punts representats a l'espai són més difícils d'agrupar i d'interpretar en un sistema tridimensional. A partir d'aquesta figura es pot observar que els punts que pertanyen a poblacions de les mateixes espècies o tàxons propers filogenèticament, s'agrupen força bé. Intracromosòmicament, les espècies anuals del subgènere *Delphinium* registren els valors de asimetria més alts, seguit pels tàxons de $2n=18$ i després la resta. Intercromosòmicament, els valors més grans es troben en les poblacions *D. staphisagria* i els més baixos en el subgènere *Delphinium*, que a la vegada són els que presenten els cromosomes més petits.

Taula 6.7. RESUM DE LES CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES.

Espècie	Població	2n	Fórmula	Long.	St.	A ₁	A ₂
<i>D. fissum</i> subsp. <i>fissum</i>	FIS3	16	1m + 1m ^{sat} + 6st	8.46	3B	0.67	0.37
	FIS4	16	1m + 1m ^{sat} + 5st + 1st ^{sat}	7.91	3B	0.64	0.38
<i>D. bolasi</i>	BOL1	18	1sm + 5st + 3s ^{sat}	7.10	3C	0.72	0.33
	BOL2	18	1m + 8st	8.42	3C	0.73	0.36
<i>D. emarginatum</i> subsp. <i>emarginatum</i>	EMA1	16	1m + 3sm + 4st	7.09	3B	0.61	0.39
<i>D. emarginatum</i> subsp. <i>nevadense</i>	NEV1	16	1m + 1sm + 5st + 1st ^{sat}	9.69	3B	0.68	0.41
<i>D. sylvaticum</i>	SYL1	16	1m + 2sm + 4st + 1st ^{sat}	7.71	3B	0.63	0.39
<i>D. staphisagria</i>	STA1	18	1m + 2sm + 6st	6.90	3C	0.69	0.48
	STA2	18	1m ^{sat} + 1sm ^{sat} + 6st + 1t	8.00	3C	0.71	0.51
	STA3	18	1m + 8st	7.60	3C	0.59	0.46
<i>D. pictum</i>	PIC1	16	2m + 1sm + 5st	8.54	3B	0.60	0.36
	PIC2	16	1m ^{sat} + 3sm + 4st	9.22	3B	0.61	0.38
<i>D. verdunense</i>	VER1	16	1sm + 7st	5.29	3B	0.74	0.29
	VER3	16	1sm + 1st + 1st ^{sat}	5.13	3B	0.76	0.27
<i>D. obcordatum</i>	OBC1	16	1sm + 7st	5.75	3B	0.75	0.30
<i>D. favargeri</i>	FAV3	16	1sm + 7st	5.10	3B	0.72	0.30
<i>C. mauritanica</i>	MAU1	16	2m + 5st + 1t	8.21	3B	0.65	0.38
<i>C. ajacis</i>	AJA1	16	1m + 1m ^{sat} + 6st	7.07	3B	0.60	0.47

Long. = Longitud cromosòmica mitjana expressada en μm . St. = Classe d'Stebbins. A₁ i A₂ = índexs de asimetria de Romero-Zarco: sat. = cromosomes satel·litzers (vegeu més explicacions en el text).

Els resultats detallats per a cadascuna de les poblacions estudiades, l'idiograma haploide —la representació tipus dels cromosomes en ordre decreixent de les seves longituds totals, amb els satèl·lits, en cas de presentar-ne—, la fotografia o dibuix d'una placa metafàsica i les dades numèriques, s'indiquen a les taules compreses entre la 6.8. i la 6.25.

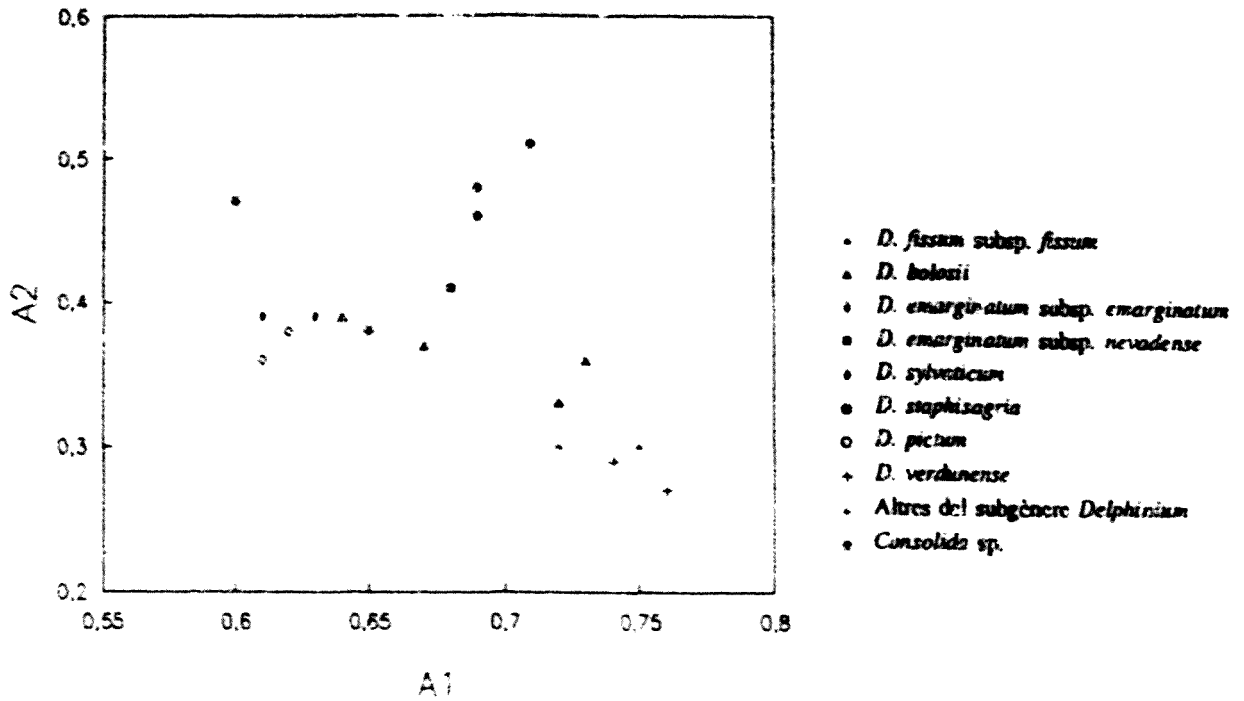


Figura 6.1. Representació dels índexs de Romero-Zarco (ROMERO, 1986).

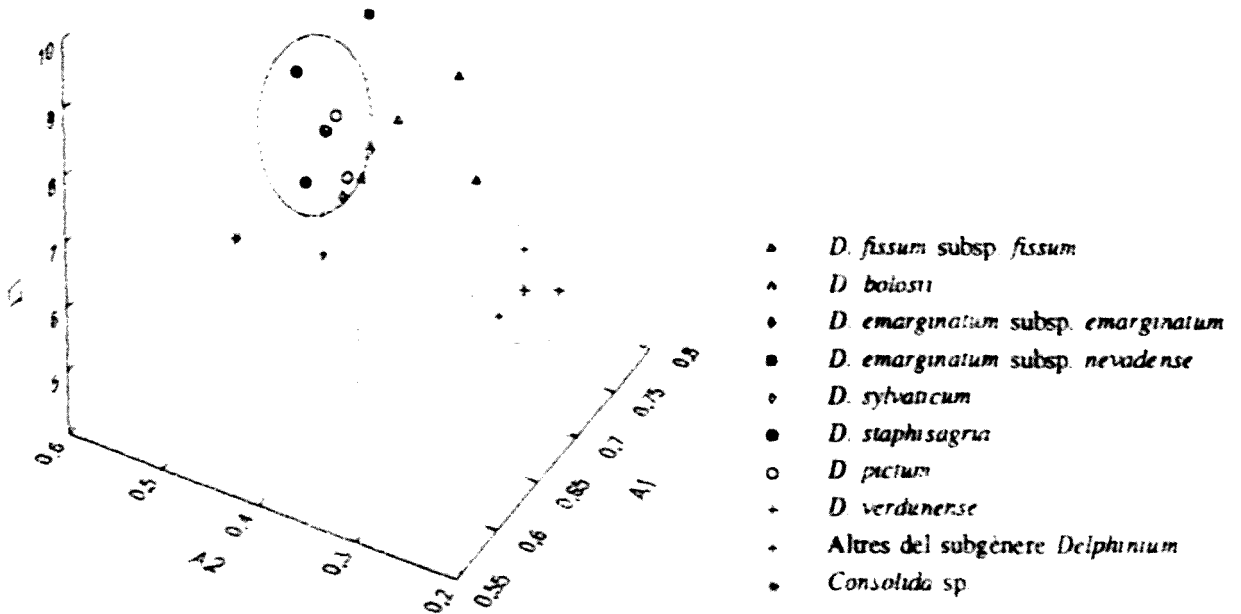
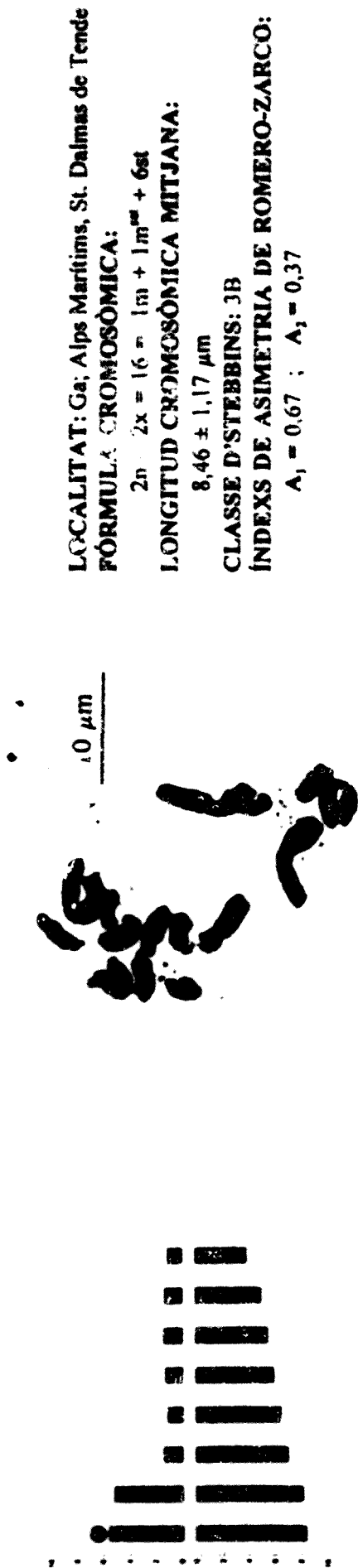


Figura 6.2. Representació dels índexs de Romero-Zarco (ROMERO, 1986), en relació a la longitud total del complement cromosòmic.

Punts encerclats per --- : subgènere *Staphisagria*

Punts encerclats per : subgènere *Delphinium*

Taula 6.8. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. FISSUM* SUBSP. *FISSUM* (FIS3).

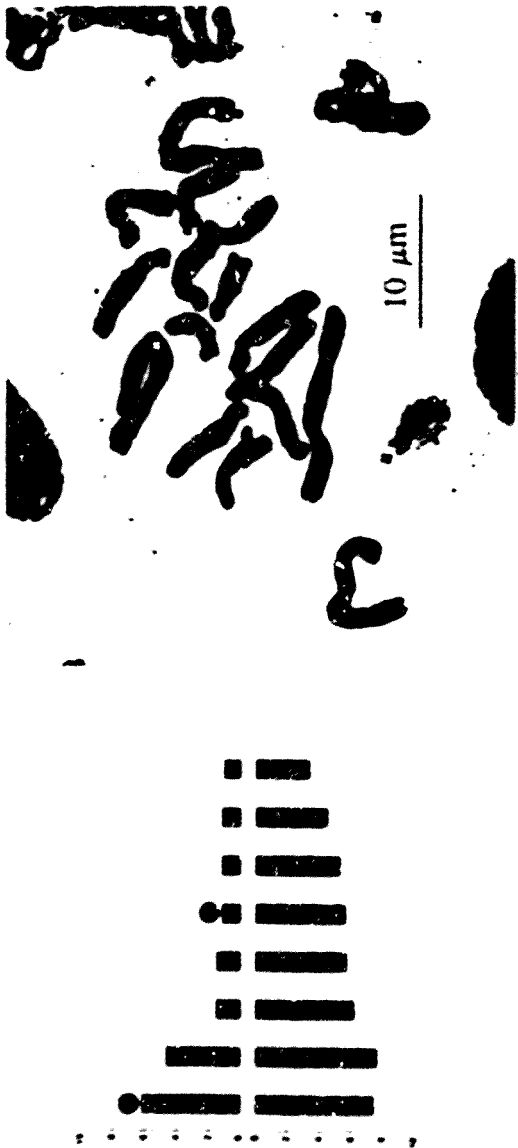


LOCALITAT: Ga; Alps Maritims, St. Dalmas de Tende
FÒRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 1m + 1m^{st} + 6st$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $8,46 \pm 1,17 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3B
ÍNDIXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,67$; $A_2 = 0,37$

Parell núm.	Long. braç llarg		Long. braç curt		Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan		Índexs de Bazzicbelli		IC	Sat.
	m ± ES	m ± ES	m ± ES	m ± ES					L%	C%		
I	8,32 ± 0,22		5,57 ± 0,28		13,89 ± 0,31	1,42	m		12,30	8,23	40,08	C
II	8,09 ± 0,22		5,16 ± 0,20		13,26 ± 0,31	1,57	m		11,96	7,63	38,95	-
III	6,95 ± 0,16		1,33 ± 0,05		8,29 ± 0,17	5,22	st		10,29	1,97	16,08	-
IV	6,38 ± 0,17		1,07 ± 0,06		7,45 ± 0,18	5,95	st		9,43	1,59	14,40	-
V	5,86 ± 0,17		1,22 ± 0,06		7,08 ± 0,16	4,81	st		8,66	1,80	17,21	-
VI	5,39 ± 0,11		1,33 ± 0,04		6,73 ± 0,13	4,04	st		7,97	1,97	19,83	-
VII	4,90 ± 0,13		1,25 ± 0,05		6,15 ± 0,13	3,93	st		7,24	1,84	20,28	-
VIII	3,80 ± 0,06		1,02 ± 0,04		4,81 ± 0,09	3,74	st		5,62	1,50	21,08	-
Σ 73,47 Σ 26,33												
Σ 67,66												

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.9. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. FISSUM* SUBSP. *FISSUM* (FIS4).



LOCALITAT: Ga; Alps Maritims, St. Valier de Thiey
FÓRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 1m + 1m^{sm} + 5st + 1st^{sm}$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $7,91 \pm 1,15 \mu m$
CLASSE D'STERBINS: 3B
ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,64$; $A_2 = 0,38$

Parell núm.	Long. braç llarg		Long. braç curt		Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan		Índexs de Bazzichelli		IC	Sat.
	m ± ES	m ± ES	m ± ES	m ± ES			L%	C%				
I	7,37 ± 0,30	6,15 ± 0,32	13,51 ± 0,61	1,20	m	11,64	9,72	45,49	C			
II	7,60 ± 0,36	4,64 ± 0,22	12,24 ± 0,56	1,64	m	12,01	7,33	37,91	--			
III	6,12 ± 0,33	1,51 ± 0,11	7,63 ± 0,29	4,06	st	9,67	2,38	19,77	--			
IV	5,63 ± 0,30	1,45 ± 0,06	7,08 ± 0,31	3,88	st	8,89	2,29	20,49	--			
V	5,54 ± 0,23	1,10 ± 0,07	6,64 ± 0,28	5,03	st	8,75	1,74	16,59	C			
VI	5,19 ± 0,26	1,13 ± 0,05	6,32 ± 0,29	4,59	st	8,20	1,79	17,89	--			
VII	4,44 ± 0,26	1,13 ± 0,05	5,57 ± 0,26	3,92	st	7,01	1,79	20,31	--			
VIII	3,31 ± 0,18	0,99 ± 0,05	4,29 ± 0,22	3,35	st	5,22	1,56	22,97	--			
										Σ 71,60	Σ 25,60	

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.10. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. BOLOSII* (BOL.).

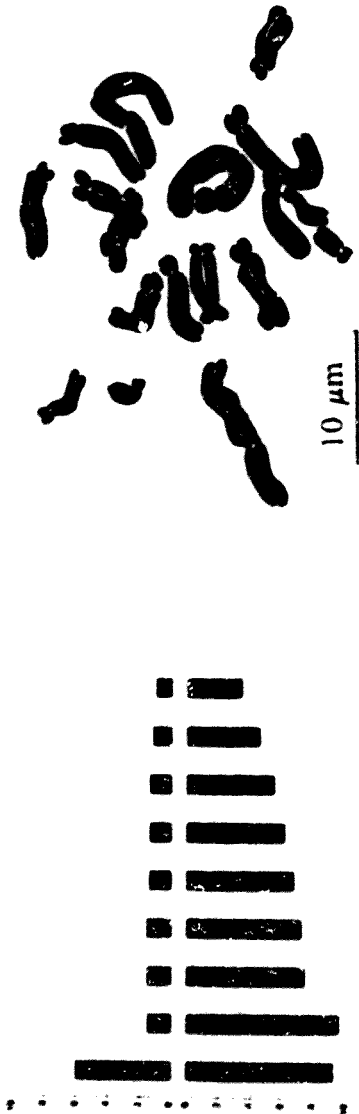


LOCALITAT: Hs; Lleida, Rubió de Baix
FÓRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 18 = m + 5st + 3st^{mc}$
LONGITUD CROMC MITJANA:
 $7,10 \pm 0,82 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3C
ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,72 ; A_2 = 0,33$

Parell nòm.	Long. braç llarg m ± ES	Long. braç curt m ± ES	Longitud total m ± ES	R = L/C	Índexs de Bozzichelli			Tipus de Levan	Sat.
					L%	C%	IC		
I	8,18 ± 0,53	4,47 ± 0,27	12,64 ± 0,66	1,83	12,80	6,99	35,32	sm	-
II	7,16 ± 0,39	1,22 ± 0,08	8,38 ± 0,42	5,88	11,21	1,91	14,53	st	C
III	6,24 ± 0,36	1,39 ± 0,07	7,63 ± 0,35	4,48	1,76	2,18	9,25	st	-
IV	5,92 ± 0,24	1,28 ± 0,07	7,19 ± 0,27	4,64	9,26	2,00	17,74	st	C
V	5,48 ± 0,19	1,19 ± 0,05	6,67 ± 0,19	4,61	8,58	1,86	17,83	st	-
Vi	5,10 ± 0,26	1,16 ± 0,09	6,26 ± 0,19	4,40	7,99	1,82	18,52	st	C
VII	4,76 ± 0,16	1,22 ± 0,04	5,97 ± 0,19	3,90	7,44	1,91	20,39	st	-
VIII	3,77 ± 0,14	1,22 ± 0,12	4,99 ± 0,18	3,10	5,90	1,91	24,42	st	-
IX	3,13 ± 0,12	1,02 ± 0,07	4,15 ± 0,11	3,09	4,90	1,59	24,48	st	-
					Σ 77,85	Σ 22,15			

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.11. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. BOLOSII* (BOL2).

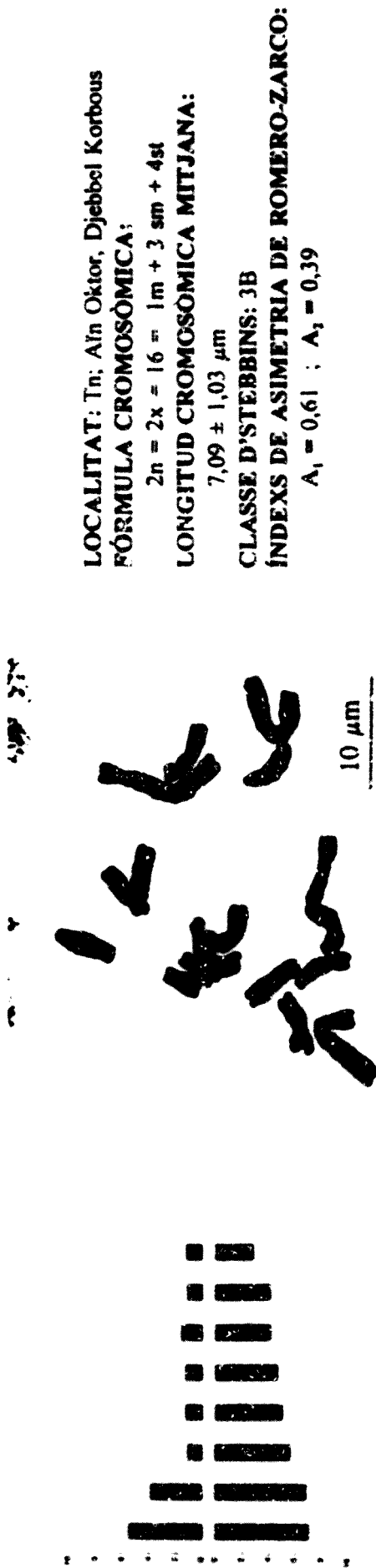


LOCALITAT: Hs; Tarragona, Ulldemolins
FÒRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 18 = 1m + 8st$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $8,42 \pm 1,07 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3C
ÍNDIXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,73$; $A_2 = 0,36$

Parell nòm.	Long. braç llarg m ± ES	Long. braç curt m ± ES	Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan	Índexs de Bazzichelli L% C%	°C	Sat.
I	9,22 ± 0,46	6,00 ± 0,38	15,23 ± 0,68	1,54	m	12,17 7,92	39,43	--
II	9,57 ± 0,41	1,42 ± 0,05	16,99 ± 0,44	6,73	st	12,62 1,87	12,93	--
III	7,40 ± 0,27	1,48 ± 0,17	8,87 ± 0,43	5,00	st	9,76 1,95	16,67	--
IV	7,16 ± 0,43	1,51 ± 0,10	8,67 ± 0,42	4,75	st	9,45 1,99	17,39	--
V	6,67 ± 0,43	1,33 ± 0,05	8,00 ± 0,42	5,00	st	8,80 1,76	16,67	--
VI	6,12 ± 0,41	1,31 ± 0,04	7,42 ± 0,38	4,69	st	8,07 1,72	17,58	--
VII	5,42 ± 0,40	1,31 ± 0,06	6,73 ± 0,42	4,16	st	7,15 1,72	19,40	--
VIII	4,50 ± 0,31	1,13 ± 0,08	5,63 ± 0,35	3,97	st	5,93 1,49	20,10	--
IX	3,34 ± 0,19	0,93 ± 0,05	4,26 ± 0,21	3,59	st	4,40 1,22	21,77	--
						Σ 78,35	Σ 21,65	

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.12. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. EMARGINATUM* SUBSP. *EMARGINATUM* (EMAI).

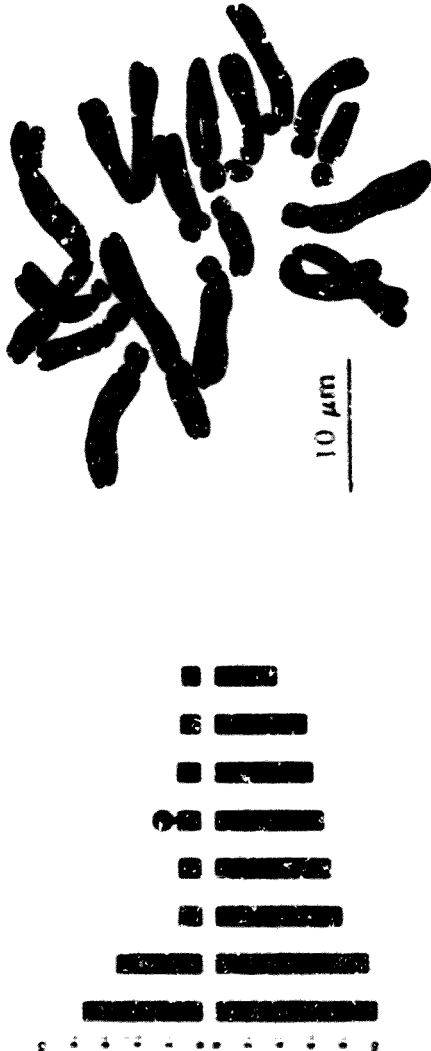


LOCALITAT: Tn; Ain Oktor, Djebbel Korbous
FÓRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 1m + 3 sm + 4st$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $7,09 \pm 1,03 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3B
ÍNDIXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,61$; $A_2 = 0,39$

Parell núm.	Long. braç llarg		Long. braç curt		Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan		Índexs de Bazzichelli		IC	Sat.
	m ± ES		m ± ES						L%	C%		
I	6,89 ± 0,17		5,51 ± 0,14		12,50 ± 0,25	1,27	m		12,32	9,71	44,08	-
II	6,82 ± 0,16		3,86 ± 0,20		10,67 ± 0,31	1,77	sm		12,01	6,80	36,14	-
III	5,60 ± 0,09		1,04 ± 0,04		6,64 ± 0,11	5,36	st		9,87	1,84	15,72	-
IV	4,99 ± 0,03		1,25 ± 0,05		6,24 ± 0,05	4,00	st		8,79	2,20	20,00	-
V	4,61 ± 0,05		1,25 ± 0,04		5,86 ± 0,06	3,70	s'		8,13	2,20	21,29	-
VI	4,09 ± 0,08		1,57 ± 0,06		5,66 ± 0,07	2,61	sm		7,21	2,76	27,69	-
VII	4,09 ± 0,15		1,10 ± 0,03		5,19 ± 0,14	3,71	st		7,21	1,94	21,23	-
VIII	2,78 ± 0,08		1,19 ± 0,04		3,97 ± 0,08	2,34	sm		4,91	2,10	29,93	-
										Σ 70,45	Σ 29,55	

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.13. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. EMARGINATUM* SUBSP. *NEVADENSE* (NEV1).

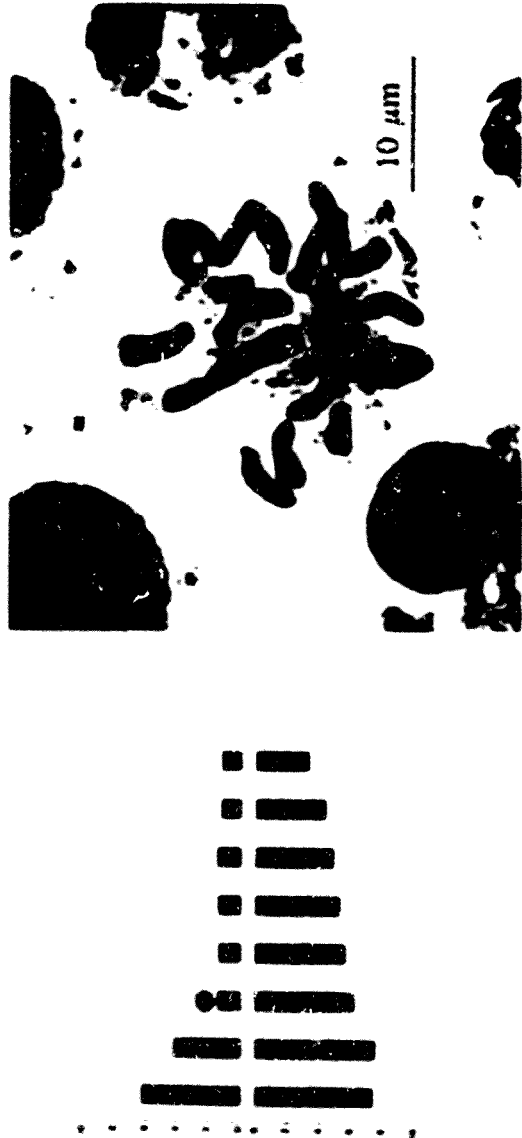


LOCALITAT: His; Granada, Vereda de la Estrella
FÒRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 1m + 1sm + 5st + 1st^{sm}$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $9,69 \pm 1,52 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3B
ÍNDIXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,68 ; A_2 = 0,41$

Parell núm.	Long. braç llarg m ± ES	Long. braç curt m ± ES	Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan	Índex de Barzichevli L%	C%	IC	Set.
I	10,24 ± 0,41	7,42 ± 0,33	17,66 ± 0,61	1,38	m	13,20	9,57	42,04	-
II	9,48 ± 0,29	5,31 ± 0,23	14,79 ± 0,32	1,79	sm	12,23	6,84	35,88	-
III	7,83 ± 0,31	1,36 ± 0,08	9,19 ± 0,37	5,74	st	10,10	1,76	14,63	-
IV	7,19 ± 0,28	1,33 ± 0,06	8,53 ± 0,27	5,39	st	9,27	1,72	15,65	-
V	6,73 ± 0,19	1,39 ± 0,05	8,12 ± 0,21	4,83	st	8,68	1,80	17,14	C
VI	6,06 ± 0,11	1,42 ± 0,06	7,48 ± 0,15	4,27	st	7,82	1,83	18,99	-
VII	5,66 ± 0,21	1,19 ± 0,05	6,84 ± 0,24	4,76	st	7,29	1,53	17,37	-
VIII	3,80 ± 0,14	1,13 ± 0,04	4,93 ± 0,15	3,36	st	4,96	1,46	22,94	-
						Σ 77,49	Σ 26,51		

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.14. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. SYLVATICUM* (SYL1).



LOCALITAT: Tn; Tabarka
 FÓRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 1m + 2sm + 4st + 1st^{sm}$
 LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $7,71 \pm 1,13 \mu m$
 CLASSE D'STEBBINS: 3B
 ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,63 \quad A_2 = 0,39$

Parell núm.	Long. braç llarg m ± ES	Long. braç curt m ± ES	Longitud total m ± ES	R = L/C	Índexs de Buzzicchi		Tipus de Levan	ÍC	Sat.
					L%	C%			
I	7,34 ± 0,19	6,24 ± 0,18	13,57 ± 0,34	1,18	11,89	10,10	m	45,94	-
II	7,45 ± 0,19	4,18 ± 0,28	11,63 ± 0,27	1,78	12,08	6,77	sm	35,91	-
III	6,12 ± 0,16	1,31 ± 0,06	7,42 ± 0,16	4,69	9,92	2,11	st	17,58	C
IV	5,54 ± 0,05	1,25 ± 0,06	6,79 ± 0,09	4,44	8,98	2,02	st	18,38	-
V	5,19 ± 0,07	1,31 ± 0,05	6,50 ± 0,08	3,98	8,41	2,11	st	20,09	-
VI	4,76 ± 0,04	1,36 ± 0,10	6,12 ± 0,11	3,49	7,71	2,21	st	22,27	-
VII	4,26 ± 0,10	1,13 ± 0,04	5,39 ± 0,09	3,77	6,91	1,83	st	20,97	-
VIII	3,19 ± 0,13	1,10 ± 0,05	4,29 ± 0,13	2,89	5,17	1,79	sm	25,68	-
					Σ 71,05		Σ 28,95		
					Σ 61,71				

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.15. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. STAPHISAGRIA* (STA1).



LOCALITAT: Hs; Alacant, Pedreguer

FÓRMULA CROMOSÒMICA:

$$2n = 2x = 18 = 1m + 2sm + 6st$$

LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:

$$6,90 \pm 1,17 \mu m$$

CLASSE D'STEBBINS: 3C

ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:

$$A_1 = 0,69 \quad ; \quad A_2 = 0,48$$

Porrell núm.	Long. braç llarg m ± ES	Long. braç curt m ± ES	Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan	Índexs de Bazzichelli L% C%	IC	Sat.
I	8,03 ± 0,33	7,11 ± 0,31	15,14 ± 0,59	1,13	m	12,94 11,44	46,93	--
II	6,50 ± 0,29	1,33 ± 0,07	7,83 ± 0,25	4,87	st	10,46 2,15	17,04	--
III	6,26 ± 0,25	1,04 ± 0,06	7,31 ± 0,28	6,00	st	10,09 1,68	14,29	--
IV	5,66 ± 0,16	1,28 ± 0,09	6,93 ± 0,23	4,43	st	9,11 2,06	18,41	--
V	5,60 ± 0,16	0,99 ± 0,06	6,58 ± 0,22	5,68	st	9,01 1,59	14,98	--
VI	5,05 ± 0,16	1,10 ± 0,04	6,15 ± 0,18	4,58	st	8,13 1,77	17,92	--
VII	4,55 ± 0,25	0,94 ± 0,05	5,51 ± 0,27	4,76	st	7,33 1,54	17,37	--
VIII	2,90 ± 0,15	0,99 ± 0,07	3,89 ± 0,14	2,94	sm	4,67 1,59	25,37	--
IX	2,06 ± 0,08	0,70 ± 0,06	2,76 ± 0,12	2,96	sm	3,32 1,12	25,26	--
						Σ 75,06 Σ 24,94		

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.16. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. STAPHISAGRIA* (STA2).



LOCALITAT: Ma; Rif occidental, p. Talambote
FÒRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 18 = 1m^{sm} + 1sm^{st} + 6st + 1t$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $8,63 \pm 1,45 \mu m$
CLASSE D'ETEBBINS: 3C
ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,71$; $A_2 = 0,51$

Parell núm.	Long. braç llarg m ± ES	Long. braç curt m ± ES	Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan	Índexs de Bazzichelli		IC	Sat.
						L%	C%		
I	9,63 ± 0,45	8,90 ± 0,30	18,53 ± 0,74	1,08	m	13,38	12,37	48,04	C
II	6,67 ± 0,21	2,64 ± 0,09	9,31 ± 0,22	2,53	sm	9,27	3,67	28,35	LI
III	6,93 ± 0,23	1,10 ± 0,05	8,03 ± 0,22	6,29	st	9,63	1,53	13,72	-
IV	6,73 ± 0,17	1,10 ± 0,05	7,83 ± 0,18	6,11	st	9,35	1,53	14,07	-
V	6,41 ± 0,19	0,96 ± 0,05	7,37 ± 0,18	6,70	st	8,90	1,33	12,99	-
VI	6,09 ± 0,17	0,78 ± 0,05	6,87 ± 0,19	7,78	t	8,46	1,09	11,39	-
VII	5,10 ± 0,18	1,07 ± 0,05	6,18 ± 0,18	4,76	st	7,09	1,49	17,37	-
VIII	3,74 ± 0,14	0,87 ± 0,05	4,61 ± 0,13	4,30	st	5,20	1,21	18,87	-
IX	2,55 ± 0,22	0,70 ± 0,07	3,25 ± 0,27	3,57	st	3,55	0,97	21,43	-
						Σ 74,92	Σ 25,18		

Les mesures s'expressen en µm.

Taula 6.17. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. STAPHISAGRIA* (STA3).



LOCALITAT: Hs, Eivissa, Benarràs
FÒRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 18 = 1m + 8st$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $7,60 \pm 1,24 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3C
ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,69 ; A_2 = 0,46$

Parell nòm.	Long. braç llarg m ± ES	Long. braç curt m ± ES	Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan	Índexs de Razzichelli L% C%	IC	Sat.
I	8,76 ± 0,42	7,54 ± 0,33	16,30 ± 0,74	1,16	m	12,8 11,02	46,26	--
II	6,87 ± 0,20	1,89 ± 0,12	8,76 ± 0,29	3,65	st	10,04 2,75	21,52	--
III	6,99 ± 0,29	1,28 ± 0,09	8,27 ± 0,28	5,48	st	10,21 1,86	15,44	--
IV	6,24 ± 0,23	1,54 ± 0,09	7,77 ± 0,28	4,06	st	9,11 2,25	19,78	--
V	5,83 ± 0,29	1,45 ± 0,07	7,28 ± 0,31	4,02	st	8,52 2,12	19,92	--
VI	5,51 ± 0,32	1,19 ± 0,08	6,70 ± 0,30	4,63	st	8,05 1,74	17,75	--
VII	4,64 ± 0,32	1,03 ± 0,08	5,67 ± 0,38	4,51	st	6,78 1,50	18,16	--
VIII	3,39 ± 0,19	0,90 ± 0,05	4,29 ± 0,23	3,77	st	4,96 1,31	20,95	--
IX	2,64 ± 0,10	0,75 ± 0,04	3,39 ± 0,12	3,50	st	3,86 1,10	22,22	--
							Σ 74,34	Σ 25,66
							Σ 68,43	

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.18. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. PICTUM* (PIC1).

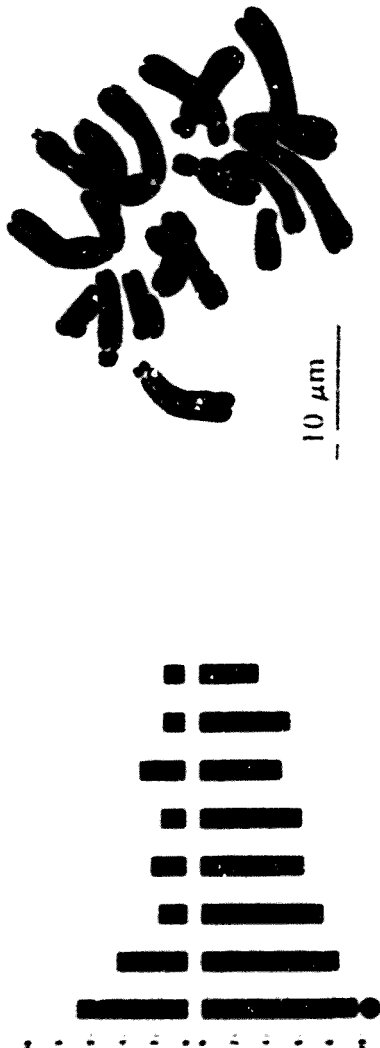


LOCALITAT: Bl; Mallorca, Cala Bóquer
FÒRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 2m + 1sm + 5st$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $8,54 \pm 1,18 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3B
ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,60$; $A_2 = 0,36$

Parell núm.	Long. braç llarg m ± ES	Long. braç curt m ± ES	Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan	Índexs de Bazzichelli L% C%	IC	Sat.
I	8,82 ± 0,55	6,21 ± 0,31	15,02 ± 0,68	1,42	m	12,90 9,08	41,31	--
II	8,93 ± 0,63	2,90 ± 0,18	11,83 ± 0,68	3,08	st	13,07 4,24	24,51	--
III	6,67 ± 0,37	2,12 ± 0,28	8,79 ± 0,54	3,15	st	9,76 3,10	24,09	--
IV	5,48 ± 0,47	1,68 ± 0,15	7,16 ± 0,55	3,26	st	8,02 2,46	23,48	--
V	6,12 ± 0,50	1,25 ± 0,08	7,37 ± 0,48	4,91	st	8,95 1,82	16,93	--
VI	4,83 ± 0,25	3,13 ± 0,26	6,96 ± 0,50	1,76	m	5,60 4,56	45,00	--
VII	5,37 ± 0,39	1,76 ± 0,08	6,53 ± 0,44	2,68	st	7,85 1,70	17,78	--
VIII	3,51 ± 0,29	1,19 ± 0,12	4,70 ± 0,30	2,95	sm	5,13 1,74	25,31	--
Σ 68,35						Σ 71,28	Σ 28,72	

Les mesures s'expressen en μm

Taula 6.19. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. PICIUM* (PIC2).



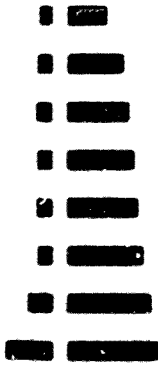
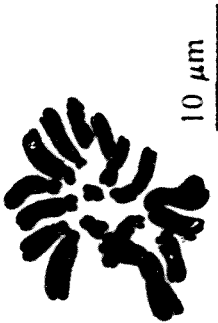
LOCALITAT: BI; Mallorca, Cala Tuent
FÓRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 1m^{ac} + 2sm + 5st$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $9,22 \pm 1,31 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3D
ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,61$; $A_2 = 0,38$

Parell núm.	Long. braç llarg		Long. braç curt		R = L/C	Tipus de Levan	Índexs de Bazzichelli		IC	Sat.
	m ± ES	m ± ES	m ± ES	L%			C%			
I	9,57 ± 0,44	6,84 ± 0,23	16,41 ± 0,58	1,40	m	12,98	9,28	41,70	LI	
II	8,53 ± 0,39	4,29 ± 0,45	12,82 ± 0,42	1,99	sm	11,56	5,82	33,48	--	
III	7,51 ± 0,31	1,65 ± 0,09	9,16 ± 0,29	4,54	st	10,18	2,24	18,04	--	
IV	6,32 ± 0,21	2,06 ± 0,15	8,38 ± 0,28	3,07	st	8,57	2,79	24,37	--	
V	6,21 ± 0,30	1,42 ± 0,18	7,63 ± 0,29	4,37	st	8,42	1,93	18,63	--	
VI	5,02 ± 0,23	2,76 ± 0,17	7,77 ± 0,21	1,82	sm	6,80	3,74	35,45	--	
VII	5,54 ± 0,35	1,25 ± 0,09	6,79 ± 0,33	4,44	st	7,51	1,69	18,38	--	
VIII	3,60 ± 0,17	1,19 ± 0,07	4,79 ± 0,18	3,02	st	4,88	1,61	24,85	--	
							Σ 70,90		Σ 29,10	

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.20. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. VERDUNENSE* (VERI).

LOCALITAT: Hs; Barcelona, Sant Llorenç d'Hortons
FÒRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 1sm + 7st$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $5,29 \pm 0,58 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3B
ÍNDIXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,74 ; A_2 = 0,29$



Parell núm.	Long. braç llarg		Long. braç curt		Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan		Índexs de Bazzichelli		IC	Sat.
	m ± ES		m ± ES						L%	C%		
I	5,60 ± 0,23		2,90 ± 0,14		8,50 ± 0,26	1,93	sm		13,22	6,85	34,13	--
II	5,13 ± 0,25		1,42 ± 0,09		6,55 ± 0,25	3,61	st		12,12	3,36	21,68	--
III	4,67 ± 0,14		0,75 ± 0,04		5,42 ± 0,15	6,19	st		11,03	1,78	13,90	--
IV	4,32 ± 0,13		0,84 ± 0,04		5,16 ± 0,12	5,14	st		10,21	1,99	16,29	--
V	4,09 ± 0,13		0,78 ± 0,05		4,87 ± 0,13	5,22	st		9,66	1,85	16,07	--
VI	3,77 ± 0,12		0,84 ± 0,06		4,61 ± 0,13	4,48	st		8,90	1,99	18,24	--
VII	3,39 ± 0,15		0,78 ± 0,04		4,18 ± 0,15	4,33	st		8,01	1,85	18,75	--
VIII	2,38 ± 0,30		0,67 ± 0,05		3,05 ± 0,31	3,57	st		5,62	1,58	21,90	--
										Σ 78,77	Σ 21,23	

Les mesures s'expressen en μm

Taula 6.21. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. VERDUNENSE* (VER3).



Parell núm.	Long. braç ilarg m ± ES	Long. braç curt m ± ES	Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan	Índexs de Bazzichelli		IC	Sat.
						L%	C%		
I	5,51 ± 0,18	2,87 ± 0,06	8,38 ± 0,16	1,92	sm	13,44	7,00	34,26	--
II	5,02 ± 0,14	1,10 ± 0,03	6,12 ± 0,16	4,55	st	12,23	2,69	18,01	C
III	4,35 ± 0,08	0,75 ± 0,04	5,10 ± 0,07	5,77	st	10,61	1,84	14,77	--
IV	3,94 ± 0,04	0,84 ± 0,05	4,79 ± 0,08	4,69	st	9,62	2,05	17,58	--
V	3,83 ± 0,08	0,70 ± 0,04	4,52 ± 0,09	5,50	st	9,34	1,70	15,38	--
VI	3,60 ± 0,07	0,64 ± 0,03	4,23 ± 0,10	5,64	st	8,77	1,56	15,07	--
VII	3,42 ± 0,07	0,67 ± 0,04	4,09 ± 0,07	5,13	st	8,35	1,63	16,31	--
VIII	3,10 ± 0,07	0,67 ± 0,04	3,77 ± 0,09	4,65	st	7,57	1,63	17,69	--
						Σ 79,92	Σ 20,08		

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.22. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *D. OBCORDATUM* (OBC1).



LOCALITAT: Ma, Tetuan, Asilah
FÓRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 1\text{ sm} + 7\text{ st}$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $5,75 \pm 0,66\text{ }\mu\text{m}$
CLASSE D'STEBBINS: 3B
ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,75$; $A_2 = 0,30$

Parell núm.	Long. braç llarg $m \pm ES$	Long. braç curt $m \pm ES$	Longitud total $m \pm ES$	R = L/C	Tipus de Levan	Índexs de Bazzichelli L% C%	IC	Sat.
I	$6,79 \pm 0,17$	$3,25 \pm 0,11$	$10,03 \pm 0,18$	2,09	sm	14,75 7,06	32,37	--
II	$5,22 \pm 0,15$	$0,87 \pm 0,05$	$6,09 \pm 0,15$	6,00	st	11,35 1,89	14,29	--
III	$4,81 \pm 0,13$	$0,90 \pm 0,04$	$5,71 \pm 0,13$	5,35	st	10,47 1,95	15,74	--
IV	$4,61 \pm 0,11$	$0,84 \pm 0,05$	$5,45 \pm 0,14$	5,48	st	10,03 1,83	15,43	--
V	$4,35 \pm 0,11$	$0,93 \pm 0,03$	$5,28 \pm 0,11$	4,69	st	9,46 2,02	17,58	--
VI	$4,09 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,05$	$5,05 \pm 0,14$	4,27	st	8,89 2,08	18,97	--
VII	$3,60 \pm 0,12$	$0,81 \pm 0,05$	$4,41 \pm 0,14$	4,43	st	7,82 1,77	18,42	--
VIII	$3,10 \pm 0,10$	$0,87 \pm 0,03$	$3,97 \pm 0,12$	3,57	st	6,75 1,89	21,90	--
						$\Sigma 79,51$	$\Sigma 25,49$	

Les mesures s'expressen en μm .

Taula 6.23. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE D. FAVARGERI (FAV3).



LOCALITAT: Ma; Essauira
FÒRMULA CROMOSÒMICA:
2n = 2x = 16 = 1sm + 7st
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
5,10 ± 0,59 µm
CLASSE D'STEBBINS: 3B
ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
A₁ = 0,72 ; A₂ = 0,30

Índex	nòm.	Long. braç llarg	Long. braç curt	Longitud total	R = L/C	Tipus de	Índexs de Barzicheili	IC	Sat.
		m ± ES	m ± ES	m ± ES		Levan	L%	C%	
I		5,77 ± 0,27	3,07 ± 0,10	8,85 ± 0,35	1,88	sm	14,14	7,53	34,75
II		4,76 ± 0,09	0,99 ± 0,07	5,74 ± 0,14	4,82	st	11,66	2,42	17,17
III		4,03 ± 0,07	0,99 ± 0,07	5,02 ± 0,08	4,09	st	9,88	2,42	19,65
IV		4,03 ± 0,10	0,78 ± 0,04	4,81 ± 0,09	5,15	st	9,88	1,92	16,27
V		3,80 ± 0,08	0,75 ± 0,04	4,55 ± 0,08	5,04	st	9,31	1,85	16,56
VI		3,48 ± 0,08	0,90 ± 0,04	4,38 ± 0,10	3,87	st	8,53	2,20	20,53
VII		3,02 ± 0,09	0,99 ± 0,05	4,00 ± 0,11	3,06	st	7,39	2,42	24,64
VIII		2,67 ± 0,12	0,78 ± 0,06	3,45 ± 0,12	3,41	st	6,54	1,92	22,69
Σ 40,80							Σ 77,53	Σ 22,67	

Les mesures s'expressen en µm.

Taula 6.24. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE *C. MAURITANICA* (MAUI).

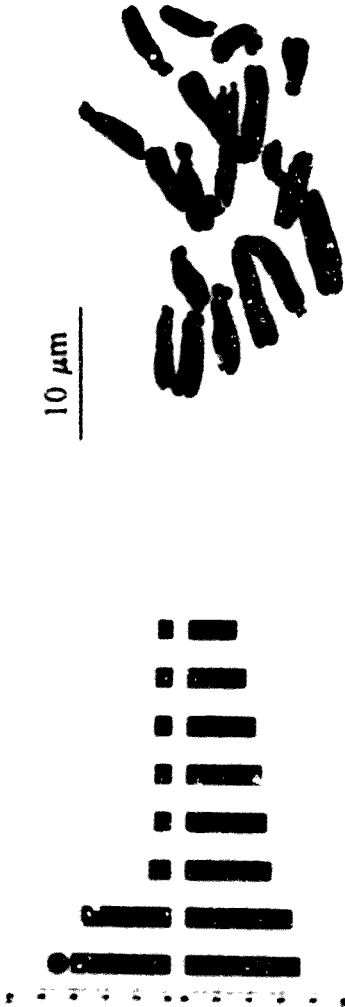


LOCALITAT: Ma; Khenifra, Ait-Mouli
FÒRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 2m + 5st + 1t$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $8,21 \pm 1,19 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3B
ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,65 ; A_2 = 0,38$

Parell núm.	Long. braç llarg		Long. braç curt		Longitud total m ± ES	R = L/C	Tipus de Levan		Índexs de Bazzichelli		IC	Sat.
	m ± ES	m ± ES	m ± ES	m ± ES					L%	C%		
I	7,63 ± 0,25	6,32 ± 0,27	13,95 ± 0,46	1,21	m	11,61	9,62	45,32	--	--		
II	6,90 ± 0,20	5,60 ± 0,27	12,50 ± 0,40	1,23	m	10,51	8,52	44,78	--	--		
III	7,25 ± 0,21	1,02 ± 0,05	8,27 ± 0,24	7,14	t	11,04	1,55	12,28	--	--		
IV	6,53 ± 0,17	0,99 ± 0,05	7,51 ± 0,14	6,62	st	9,93	1,50	13,13	--	--		
V	6,09 ± 0,16	1,07 ± 0,05	7,16 ± 0,19	5,68	st	9,27	1,63	14,98	--	--		
VI	5,60 ± 0,12	1,07 ± 0,06	6,67 ± 0,12	5,22	st	8,52	1,63	16,09	--	--		
VII	4,52 ± 0,24	1,04 ± 0,05	5,57 ± 0,24	4,33	st	6,89	1,59	18,75	--	--		
VIII	3,28 ± 0,11	0,78 ± 0,05	4,06 ± 0,10	4,19	st	4,99	1,19	19,29	--	--		
Σ 74,76										Σ 27,24		

Les mesures s'expressen en μm.

Taula 6.25. CARACTERÍSTIQUES CROMOSÒMIQUES DE C. AJACIS (AJA1).



LOCALITAT: Hs; Barcelona, Sant Llorenç d'Hortons
FÒRMULA CROMOSÒMICA:
 $2n = 2x = 16 = 1m + 1m^{sat} + 6st$
LONGITUD CROMOSÒMICA MITJANA:
 $7,07 \pm 1,26 \mu m$
CLASSE D'STEBBINS: 3B
ÍNDEXS DE ASIMETRIA DE ROMERO-ZARCO:
 $A_1 = 0,60 ; A_2 = 0,47$

Parell nòm.	Long. braç llarg		Long. braç curt		R = L/C	Tipus de		Índexs de Barricelli		IC	Sat.
	m ± ES		m ± ES			Levan		L%	C%		
I	7,02 ± 0,18		6,21 ± 0,17		1,13	m		12,41	10,97	46,93	C
II	6,53 ± 0,23		5,57 ± 0,13		1,17	m		11,54	9,85	46,04	--
III	5,22 ± 0,10		1,25 ± 0,05		4,19	st		9,23	2,21	19,28	--
IV	4,90 ± 0,11		0,96 ± 0,04		5,12	st		8,67	1,69	16,34	--
V	4,55 ± 0,12		0,96 ± 0,05		4,76	st		8,05	1,69	17,37	--
VI	4,15 ± 0,06		0,99 ± 0,04		4,21	st		7,33	1,74	19,21	--
VII	3,54 ± 0,11		0,96 ± 0,05		3,70	st		6,26	1,69	21,29	--
VIII	2,93 ± 0,12		0,84 ± 0,02		3,48	st		5,18	1,49	22,31	--
									Σ 68,67	Σ 31,33	

Les mesures s'expressen en µm.

6.4. DISCUSSIÓ

6.4.1. CONSIDERACIONS GENERALS

Els nostres resultats confirmen el nombre de base $x=8$, com a majoritari en la tribu. Durant molt de temps es va creure que aquest nombre era molt estable (GREGORY, 1941; KURITA, 1955; TAMURA, 1967, 1995; AL-KELIDAR & RICHARDS, 1981), però cal reconèixer, a partir dels recomptes dispoloides aïllats que han aparegut darrerament (GAGNIDZE & ZAKHARYEVA, 1977; HONG DE-YUAN, 1986; BLANCHÉ, 1991; GIMÉNEZ, 1995), més els d'aquesta memòria, que hi ha com a mínim cinc nombres de base secundaris dins la tribu. A la Mediterrània occidental, fins al moment actual només se n'han detectat dos: $x=8$ i $x=9$. Tots els dispoloides identificats responen a la dotació $2n=18$, per tant, es tracta d'una dispolòidia ascendent i, de moment, només detectada en el gènere *Delphinium*. Pel que fa a la poliploïdia en aquesta àrea, només té lloc en el gènere *Aconitum* i aïlladament en algunes espècies perennes del gènere *Delphinium* (*D. montanum*, *D. elatum*, *D. dubium* i *D. fissum*). Alguna espècie anual com *D. staphisagria* disposa també de dos recomptes (LANGLET, 1927; GREGORY, 1941) encara que són antics i amb origen silvestre discutible. En *Consolida*, s'ha trobat algun recompte triploide en *C. ajacis*, però cal tenir en compte que aquesta espècie, àmpliament emprada com a planta ornamental, ha estat molt manipulada des del punt de vista de millorament genètic (JAIN & BOSE, 1960; JAIN *et al.*, 1963; BASAK & JAIN, 1963; MANDAL & BASU, 1977, 1978).

El cariotip bàsic de la tribu és bimodal, normalment amb dues parelles de cromosomes llargs. S'han proposat dues hipòtesis per explicar la formació d'aquest tipus de cariotip:

- DARLINGTON (1963) suggereix que provenen de cariotips simètrics d'origen poliploide. Els cromosomes llargs poden contenir gens duplicats que es poden perdre sense que això afecti greument la planta. Els cromosomes més petits es podrien haver format a partir d'aquests fragments despresos. La interpretació de les primeres dades isoenzimàtiques en aquests tàxons amb alguns zimogrames amb nombroses bandes com el 6-PGD sembla suggerir que alguns gens podrien estar duplicats (*cf.* capítol 7).

- GIMÉNEZ (1995) recull l'opinió LEWISTKY (1931) que deriven de cariotips simètrics en els quals poden haver-se esdevingut translocacions i reorganitzacions del complement; per tant, mentre que alguns cromosomes s'allarguen, d'altres s'escurcen, però sense que el complement general es modifiqui. Els alts percentatges de producció de granes, aparentment viables, obtinguts en els encreuaments interespecífics entre espècies filogenèticament molt properes amb nombres diferents com ara entre *D. staphisagria* i *D. pictum*, *D. bolosii* i *D. fissum* o, fins i tot, entre *D. bolosii* (sèrie *Fissa*) i membres de la sèrie *Pentagyna*, del mateix subgènere *Oligophyllum* (*cf.* capítol 5), donarien suport a aquesta hipòtesi. En aquest sentit, cal remarcar que en la sèrie *Pentagyna* ($2n=16$) hem obtingut millors resultats encreuant les seves espècies amb *D. bolosii* ($2n=18$) que amb *D. pictum* ($2n=16$) (subgènere *Staphisagria*). Per tant, en els nostres tàxons la proximitat filogenètica i la similitud cariomorfològica tenen més pes en la producció de granes dels híbrids que les diferències de nombre cromosòmic.

Aquest model de cariotip, amb les dues parelles de cromosomes llargs, es manté en tots els cariotips estudiats excepte en dos casos: tots els recomptes de $2n=18$ (*D. bolosii* i *D. staphisagria*) i el subgènere *Delphinium*, amb $2n=16$. En tots aquests ha desaparegut una de les parelles de cromosomes llargs. Aquest fet ens permet suggerir la hipòtesi que en els disploides de $2n=18$ estudiats, el nou cromosoma probablement s'ha format per fragmentació del braç curt d'una de les parelles de cromosomes llargs i posterior reorganització del complement, fenomen conegut amb el terme de *translocació robertsoniana* (ROBERTSON, 1916). Els altres disploides de $2n=18$ descrits en la tribu manifesten el mateix model de cariotip (HONG DE-YUAN, 1986; GIMÉNEZ, 1995). En les anuals del subgènere *Delphinium*, s'observa una important tendència a disminuir la quantitat de material genètic, mostrant cromosomes de mida més petita (BLANCHÉ *et al.*, 1990). Aquesta pèrdua de DNA podria explicar la pèrdua d'un fragment de braç del segon parell, que sembla més propens a ruptures. Aquest fet incrementa notòriament la asimetria del cariotip, factor que, en canvi, no s'observa en *Consolida* (BLANCHÉ *et al.*, 1987; GIMÉNEZ, 1995), cosa que fa plantejar la possibilitat d'un origen diferent del gènere *Consolida*, no pas a partir del subgènere *Delphinium* com va suggerir MALYUTIN (1973).

L'evolució del cariotip dins el conjunt de la tribu segueix les dues tendències que van indicar STEBBINS (1971) i TRIFONOVA (1990): increment de la asimetria i reducció de la mida del cariotip. De fet, dins la subfamília *Helleboroidae*, la tribu *Delphineae* és la que presenta plantes amb flors zigomorfs, presumptament més evolucionades i és la que manifesta els cariotips més asimètrics, que ja aniria en aquest sentit (TAMURA, 1995). El parell més variable és el segon, com ja van intuir BLANCHÉ (1991) i posteriorment va confirmar GIMÉNEZ (1995) i pot resultar un bon marcador de l'evolució cariotípica dins la tribu.

6.4.2. ANÀLISI PER GRUPS

Aconitum

De les espècies d'*Aconitum* presents a la Mediterrània occidental, només *A. lycoctonum* és diploide amb $2n=16$, mentre que *A. napellus* i *A. anthora* són tetraploides amb $2n=32$ cromosomes cadascun. Les nostres poblacions han estat revisades en la seva majoria per MOLERO *et al.* (1995). Els recomptes obtinguts coincideixen amb els nombres descrits prèviament i no s'han detectat diferències importants en la morfologia del cariotip, respecte a resultats anteriors.

TRIFONOVA (1990) va suggerir que la tribu evolucionava lentament cap a la poliploidia i, per tant, els tàxons més primitius serien els que ja l'haguessin assolit, tot i que a nivell d'angiospermes no s'ha pogut demostrar aquesta premissa (STEBBINS, 1971). En aquest sentit, *A. lycoctonum* seria més modern que les altres dues espècies. Si aquesta tendència és certa, la desigualtat entre la proporció de poliploides entre els dos gèneres més grans de la tribu, indicaria que *Delphinium* s'hauria diferenciat molt posteriorment a *Aconitum*, i l'absència de poliploidia en *Consolida* i *Aconitella* les denota com a molt més evolucionades. El que si

sembla acceptat per molt autors és que la poliploidia està lligada a la latitud i a l'altitud (HANELT, 1966; STEBBINS, 1971; EHRENDORFER, 1980). Els poliploides semblen més ben adaptats a condicions i climes més extrems, com serien els hàbitats alpins, que els seus progenitors diploides. En l'àrea on s'emmarca aquesta memòria, això s'acompleix, ja que pràcticament totes les espècies tetraploides (*A. napellus*, *A. anthora*, *D. montanum*) viuen en aquest tipus d'ambients.

Pel que fa a la biologia de la reproducció, cal ressenyar com a dada interessant que l'única espècie diploide d'*Aconitum* —*A. lycoctonum*— és la que ha presentat taxes d'autogàmia més elevades en les proves d'embossament de flors (cf. capítol 5), realitzades per estudiar la capacitat de reproducció en absència d'insectes. De fet, és l'única d'aquestes espècies d'àmbit muntanyenc (incloent *D. montanum*, tetraploide) que ha produït granes desenvolupades en aquestes condicions, tot i que cal reconèixer que el seu millor sistema de reproducció és l'al·logàmia, si es comparen els resultats amb la producció de granes de la pol·linització lliure al camp, on hi han intervingut els insectes (cf. taula 5.25.). Amb tot, aquesta certa autogàmia en *A. lycoctonum* pot ser un recurs que asseguri producció de granes a una espècie on la seva morfologia floral peculiar dificulta la pol·linització, augmentant l'especificitat dels vectors i on hem detectat una major proporció de robadors de nèctar (cf. capítol 4). L'absència d'autogàmia en les altres espècies pot ser deguda a una major autoincompatibilitat o al fet que els mecanismes de proteràndria i hercogàmia són més efectius.

Sèrie *Montana*

D. montanum és una espècie tetraploide (JANKUN, 1973; BLANCHÉ, 1991) amb $2n=32$, encara que moltes característiques com el nombre d'estams (cf. apartat 2.3.1.), la mida del gra de pol·len o la densitat d'estomes entre d'altres (BLANCHÉ, 1991), no denotin aquest caràcter. És a dir, no es detecta un increment notori respecte a d'altres espècies diploides properes. Els altres membres de la sèrie *Montana*, *D. oxysepalum* i *D. dubium*, són vicariants endèmics de les grans serralades europees, dels Carpats i dels Alps, respectivament. A partir de l'estudi d'hibridacions i de l'endosperma (JANKUN, 1973), sembla que hi ha més afinitat entre aquests que no pas amb *D. elatum*, cosa que ha fet pensar que comparteixen un avantpassat pre-glacial comú, que es devia extingir durant el període glacial (BLANCHÉ, *loc. cit.*). Aquestes espècies s'haurien refugiat a les muntanyes, que haurien actuat com a barreres d'aïllament geogràfic, haurien permès la seva especiació. Tots presenten el mateix nombre, $2n=32$, que caracteritza prou bé aquest subgènere enfront del subgènere *Oligophyllum* i les anuals, almenys en aquesta àrea. Aquesta dotació cromosòmica denota, a més, un caràcter primitiu.

Sèrie *Fissa*

D. fissum inclou un conjunt de subespècies amb una àrea de distribució força àmplia (BLANCHÉ, 1991) que s'estén des de les estepes i muntanyes baixes d'Àsia central, per tot el

nord de la regió Mediterrània fins a la península Ibèrica, on té la posició més occidental amb la subespècie *sordidum*. Fins al moment actual, tots els recomptes reportats són de $2n=16$ i $2n=32$ (cf. taula 6.2.), en els quals sovint no s'ha precisat a nivell infraespecífic. Les poblacions dels Alps Maritims, descrites com a subespècie *fissum* varietat *narbonense* (HUB) Fiori (BLANCHÉ, loc. cit.), que no havien estat mai comptades ni el seu cariotip estudiat, presenten un complement de $2n=16$. Les dues poblacions de la subespècie *sordidum* de l'oest peninsular, on apareix formant poblacions molt aïllades, han estat revisades citogenèticament per RICO *et al.* (1981) i BLANCHÉ (1991), i també presenten una dotació cromosòmica de $2n=16$. La morfologia del cariotip és força similar entre ambdues subespècies, amb petites diferències en el braç curt del segon parell, lleugerament més curt en les poblacions franceses, en què també hem detectat la presència de cromosomes satel·litífers.

En el cas de *D. bolosii*, espècie filogenèticament molt propera a *D. fissum*, el nombre cromosòmic d'ambdues poblacions ha donat $2n=18$, un cas de dispolòidia ascendent per guany de dos cromosomes respecte al nombre habitual de la tribu. Es tracta d'una dispolòidia relativament moderna (si es té en compte la distribució de la sèrie) i molt localitzada. Aquest nombre és rar dins del gènere i només l'hem detectat en una altra espècie, els tres recomptes de *D. staphisagria* que aportem en aquesta memòria. A la bibliografia només hem trobat *D. denudatum* Wallich que també pertany a la mateix subgènere *Oligophyllum*, però d'una secció força més allunyada, que té un nombre dispoloide diferent $2n=20$ (SARKAR *et al.*, 1982). Dins la tribu s'han detectat altres casos de dispolòidia amb aquest nombre en els gèneres *Consolida* i *Aconitella* (HONG DE-YUAN, 1986; GIMÉNEZ, 1995).

La població de la Noguera que inicialment havia estat descrita com a *D. fissum* subsp. *fontqueri* Ascaso & Pedrol (ASCASO & PEDROL, 1991), el nombre de $2n=18$ cromosomes, junt amb altres dades morfològiques, ens va inclinar definitivament a situar taxonòmicament aquesta població dins l'espècie *D. bolosii* i separar-la clarament de *D. fissum*; la gran semblança entre els patrons de bandes isoenzimàtiques obtingudes d'ambdues poblacions donen suport a aquesta idea (cf. capítol 7).

Els cariotips d'ambdues poblacions són força similars, tot i que cal destacar l'elevada presència de satèl·lits en la població de la Noguera. Actualment encara es desconeix en bona part el paper que fan aquests fragments de DNA i si es tracta d'un caràcter residual o recent. En tot cas, és un caràcter cariomorfològic més a tenir en compte. La posició dels satèl·lits permet a GAGE (1953) treure conclusions sobre l'evolució del genoma en altres espècies de *Delphinium*. Com ja hem indicat, també hem detectat satèl·lits en les poblacions *D. fissum* dels Alps Maritims, amb una major tendència a situar-se sobre els parells llargs, mentre que en *D. bolosii* se situen en els parells curts.

Els cariotips obtinguts per a *D. bolosii* concorden prou bé amb els de *D. fissum*, si considerem l'hipòtesi de la fragmentació d'un dels cromosomes llargs que donaria lloc al novè cromosoma i la desaparició d'una de les parelles de llargs. Aquests fets podrien relacionar-se amb l'àrea de distribució de la sèrie *Fissa* i la dispersió d'aquests tàxons, tal com apunta BLANCHÉ (1991), seguint les línies de migració de les espècies durant la crisi de salinitat del

Messinià, que van proposar BOCQUET *et al.* (1978). *D. bolosii* establiria un pont d'enllaç entre la subespècie *fissum* varietat *narbonense* —que ocupa la zona dels Baixos Alps— i les escasses i aïllades localitats de la subespècie *sordidum* a l'oest peninsular. Per diverses circumstàncies podrien haver quedat aïllades geogràficament i haver patit un procés de diferenciació divergent que hagués donat lloc a una reorganització del material genètic. Els resultats dels encreuaments interespecífics donen suport a aquesta idea (cf. capítol 5), ja que sembla que no hi ha barreres d'incompatibilitat genètica entre ambdues espècies, cosa que ens reafirma la seva proximitat filogenètica.

Sèrie *Pentagyna*

Tant *D. sylvaticum* com les dues subespècies de *D. emarginatum* presenten una dotació cromosòmica de $2n=16$ i coincideixen amb els escassos recomptes previs i amb l'altra espècie del grup *D. pentagynum*. És el primer recompte de *D. sylvaticum* i la subespècie *emarginatum* tampoc havia estat comptada de terres africanes (es tracta de la varietat *africanum* Maire). Els tres taxons presenten un cariotip molt similar, amb dues parelles de cromosomes llargs, típic de la majoria de *Delphinium* perennes. Potser l'única diferència significativa a ressenyar seria que la subespècie *nevadense* mostra els cromosomes un xic més llargs que els altres dos, però a vegades pot ser degut al fet que s'hagin escurçat poc durant el pretractament. També hem detectat la presència de cromosomes satel·litífers en *D. sylvaticum* i en la subespècie *nevadense*.

Els resultats dels encreuaments interespecífics o hibridacions (cf. capítol 5) demostren que l'existència de barreres genètiques dins aquesta sèrie són pràcticament nul·les, fenomen també detectat en d'altres espècies perennes diploides de *Delphinium* (LEGRO, 1961). Aquest fet pot ser degut a aquesta gran similitud entre els cariotips.

Aquest grup es troba restringit a l'extrem oest de la Mediterrània, ocupant l'àrea ibero-sicilianomagrebina. Si es considera derivat de *D. fissum* —tal com insinua BLANCHÉ (1991)— pel fet de manifestar el segon parell una mica més curt, fet que corroborem amb els nostres resultats, ocuparia les posicions més extremes, seguint les línies de migració proposades per BOCQUET *et al.* (1978).

Pel que fa a aquest possible origen a partir de *D. fissum*, l'alt nombre de granes produïdes a partir d'hibridacions entre individus d'ambdues sèries que pertanyen al mateix subgènere *Oligophyllum* (cf. capítol 5) demostren que com a mínim són espècies molt emparentades o properes. Caldria un estudi més aprofundit de les granes (que són un bon caràcter taxonòmic dins aquest grup) per tenir més elements de judici per poder reafirmar aquesta hipòtesi, com ja va suggerir BLANCHÉ (1991). També caldria realitzar un estudi cariològic i encreuaments amb les espècies africanes tropicals de la subsecció *Macrocentra* secció *Albocoerulea* (*D. leroyi* Franch. i *D. macrocentron* Oliver) del mateix subgènere que proposà MUNZ (1967a) com a possibles avantpassats d'aquest grup, per esbrinar el grau de parentiu i, en tot cas, per poder descartar aquesta hipòtesi alternativa.

Subgènere *Staphisagria*

Les dues poblacions mallorquines de *D. pictum* mostren un complement de $2n=16$ i coincideixen amb tots el recomptes anteriors (cf. taula 6.2.). Els dos cariotips morfològicament són molt similars, fet força esperable *a priori* perquè ambdues poblacions són geogràficament molt properes. Pràcticament només es diferencien per la presència d'un satèl·lit en el braç llarg del primer cromosoma de la població de Cala Tuent (PIC2) que no trobem en l'altra població. Cal destacar com a tret remarcable, un augment de la simetria dels dos cariotips respecte al model de la tribu, perquè a part de les dues parelles de cromosomes llargs típiques, presenten una tercera parella (el sisè parell, en ambdós casos) de cromosomes gairebé metacèntrics. Aquest fet ja va ser detectat per VERLAQUE *et al.* (1991) en el cariotip de *D. pictum* subsp. *pictum* de Mallorca i en el de *D. pictum* subsp. *requieni* de les Illes Ieres. En canvi, no es va trobar en les poblacions de *D. pictum* subsp. *pictum* de Còrsega, que mostra un cariotip més asimètric. TRIFONOVA (1990) ja va descriure un increment de la simetria dins aquest subgènere.

L'altra espècie que integra aquest subgènere és *D. staphisagria*, en la qual cal remarcar la troballa realment sorprenent d'un nombre nou $2n=18$, mai descrit per aquesta espècie, en tres poblacions relativament allunyades geogràficament. Seria molt interessant poder estudiar altres poblacions per confirmar aquest nombre. En aquest sentit, KAMARI (1995, *in litt.*) ha comptat també aquest nombre en una població de Grècia, cosa que referma aquest nombre dispoloide. A la bibliografia fins al moment actual, només es recullen recomptes euploides de $2n=16$ i de $2n=32$ (cf. taula 6.2.), molts d'aquests són antics i sense cariotip. Els nombres poliploides podrien ser accidentals, ja que es tracta d'una planta força emprada pels seus usos medicinals i sovint en jardineria; podria ser que aquests tetraploides corresponguessin a formes de jardí, d'origen dubtós. El fet de no coincidir amb els recomptes previs podria tenir diverses explicacions. D'una banda, pot ser degut a certa inestabilitat cromosòmica dins aquest grup. Altres dades com la mida de l'esperó, la mida de les granes, la tendència a l'autogàmia (cf. capítol 5), etc. demostren que aquest grup ha seguit un model evolutiu ben diferenciat dins la tribu i això també pot haver afectat l'organització genòmica. Dins el marc de la tribu, s'ha detectat una notable inestabilitat especialment del segon parell, en el qual es produeixen freqüents ruptures o canvis morfològics, que en aquesta espècie poden haver tingut més transcendència. D'altra banda, donada la gran estabilitat del nombre cromosòmic en la tribu, considerat com a molt fixat, ha propiciat que molts autors davant d'e recomptes dubtosos erròniament optessin pel nombre més habitual.

Aquesta dispoloidia junt amb algunes característiques, com la considerable reducció de la mida de l'esperó o l'increment en la mida de les llavors, semblen indicar que *D. staphisagria* es troba al final de la cadena evolutiva d'aquest subgènere, ja que *D. pictum* manifesta caràcters més intermedis amb la resta d'espècies de *Delphinium*. El clar augment de la asimetria intercromosòmica i intracromosòmica del cariotip de *D. staphisagria* també és un caràcter més avançat segons TRIFONOVA (1990).

Els cariotips de les tres poblacions estudiades són molt similars, constituïts per un cromosoma molt llarg i molt simètric i vuit de molt més curts i molt asimètrics, més que els cromosomes curts de *D. pictum*. Pertanyen a la classe 3C d'Stebbins. Aquests cariotips presenten una gran similitud amb els de *D. bolosii*, probablement perquè l'origen del cromosoma suplementari ha estat semblant, per fissió d'un cromosoma llarg. La població del Marroc (STA2) presenta dos satèl·lits en els dos parells més llargs, mentre que les altres dues poblacions no en tenen. Aquest fet podria estar relacionat amb la relativa proximitat geogràfica entre Alacant (STA1) i Eivissa (STA3) (segueixen la mateixa línia orogràfica bètica), però donada la gran variabilitat d'aquest caràcter i el baix grau de coneixement que actualment es disposa dels satèl·lits no ens atrevim a fer conjectures.

Subgènere *Delphinium*

Tots els recomptes coneguts (cf. taula 6.2. i 6.7.), incloent els tàxons que no es troben a la regió estudiada (BLANCHÉ, 1990; BLANCHÉ *et al.*, 1990; GIMÉNEZ, 1995) donen $2n=16$, per tant, són estrictament diploides. Es tracta, doncs, d'un grup molt estable quant al nombre cromosòmic. L'absència de nivells de ploïdia més elevats dona suport a la idea d'un origen recent del subgènere i, per tant, es pot considerar més evolucionat respecte dels tàxons perennes. A nivell de les *Delphineae* en conjunt, com ja apuntàvem anteriorment, també s'observa l'absència de nivells de ploïdia més alts en els gèneres més avançats: *Consolida* i *Aconitella* (TRIFONOVA, 1990).

Aquest origen recent també es veu refermat pel fet de presentar el cariotip més asimètric de la tribu, com a mínim en la regió Mediterrània (cf. figura 6.1. i 6.2.). L'augment de la asimetria —considerat un caràcter evolutiu secundari (STEBBINS, 1971)— és degut, fonamentalment, a l'escurçament del braç curt del segon parell, cosa que provoca la desaparició d'una parella de cromosomes llargs, fet que es reflecteix en la fórmula $1m$ (o $1sm$) + $7st$. Aquest escurçament és el tret més característic del subgènere, junt amb una considerable reducció general de la mida dels cromosomes, causada per una pèrdua de DNA que AL-KELIDAR & RICHARDS (1981) van estimar en un 30 % respecte a les perennes, i que es correspon aproximadament a les diferències en les mesures obtingudes (cf. taula 6.7.). Aquests autors interpreten la pèrdua de material hereditari com un indicador de posicions filogenètiques derivades, en aquest cas lligat a l'hàbit anual. La pèrdua de material es pot produir durant inversions i translocacions de fragments de braços dels cromosomes, que a vegades tenen lloc, però sense modificar el nombre de centròmers, que no s'esdevé tant en els tàxons perennes ja que ocupen hàbitats més estables (BLANCHÉ *et al.*, 1990).

D'altra banda, hi ha una gran uniformitat de cariotips dins aquest grup. En algunes ocasions, fins i tot, s'han detectat més diferències intraespecífiques que interespecífiques (BLANCHÉ *et al.*, 1990). La gran semblança dels cariotips i la manca de barreres genètiques (cf. capítol 5) suggereix que es tracta d'un grup molt proper, de diferenciació molt recent, que podria ser considerat com un complex. Taxonòmicament, MAIRE (1964) el va considerar com un conjunt de tàxons supeditats a *D. peregrinum* L. amb un gran nombre de varietats i formes.

Pel que fa a la biogeografia de la secció *Delphinium*, distribuïda per tota la regió Mediterrània i Iranoturaniana, sembla que presenta dos centres de diversitat (BLANCHÉ, 1990). El primari és a la regió Mediterrània oriental (Grècia i Turquia), on s'observa un gran nombre d'endemismes, i el secundari, a la regió Mediterrània occidental (muntanyes de l'Atlas) on encara resten alguns endemismes com *D. balansae* o *D. cossonianum*. BLANCHÉ *et al.* (1990) interpreten el cariotip de *D. balansae* com a nexa d'unió entre aquest subgènere (tàxons anuals) i les espècies perennes. *D. balansae* és l'únic representant d'hàbit perenne del subgènere, encara que totes les característiques macromorfològiques i micromorfològiques corresponen clarament a una espècie anual. El seu cariotip es troba a mig camí, ja que ha reduït la seva mida i la segona parella s'ha començat a escurçar. Aquest fet suggereix la possibilitat de considerar aquesta espècie com a avantpassat relict de d'aquest subgènere.

Consolida

El nombre cromosòmic de les dues espècies estudiades és de $2n=16$, que coincideix amb els recomptes previs (*cf.* taula 6.3.). També hem recollit un recompte de $2n=12$ (BÖNCKE, 1911), però no s'ha tingut en compte perquè s'havien produït confusions nomenclurals i no es tenia una referència clara del material. S'han detectat alguns casos de dispolòdia en aquest gènere, tant ascendent, amb $2n=18$ (HONG DE-YUAN, 1986; GIMÉNEZ, 1995), com descendent amb $2n=14$ (HONG DE-YUAN, *loc. cit.*), però cap a la Mediterrània occidental. De fet, en aquesta zona arriben poques espècies i és la Mediterrània més oriental on hi ha la major diversitat del gènere.

El cariotip mostra les dues parelles de cromosomes llargs, típiques de les *Delphineae*, sense una reducció de la mida dels cromosomes com tenia lloc en el subgènere *Delphinium*. En ocasions s'han descrit constriccions secundàries en *C. mauritanica* (BLANCHÉ *et al.*, 1987), però no n'hem detectat en la població estudiada. Tampoc hem observat en aquesta espècie la tendència a presentar el quart parell més simètric detectada per aquests autors en diverses poblacions de *C. pubescens* i *C. mauritanica*, que sembla exclusiva de la sèrie *Pubescentes* (BLANCHÉ *et al.*, *loc. cit.*; GIMÉNEZ, 1995).

Pel que fa als resultats dels encreuaments interespecífics assajats (*cf.* capítol 5), les barreres genètiques en aquest gènere semblen més fortes que en *Delphinium*, mentre que les diferències entre la morfologia cromosòmica no són tan grans. Tot i aquesta baixa capacitat d'encreuament, les dues espècies de la mateixa secció i sèrie, s'hibriden millor (al voltant d'un 30 % de producció de granes) que entre les més allunyades. HONG DE-YUAN (1986) també va trobar una baixa capacitat d'encreuament a nivell interespecífic i intergenèric (entre *Consolida* i *Aconitella*). No obstant això, va obtenir granes desenvolupades, encara que amb baixa poder de germinació, hibridant dues *Aconitella* amb nombre cromosòmic diferent: *A. scleroclada* (Boiss.) Soják ($2n=18$) i *A. stenocarpa* (Hossain & Davis) Soják ($2n=16$), semblant als resultats obtinguts entre *D. bolosii* i *D. fissum*. En canvi, no va obtenir granes desenvolupades dels híbrids entre *A. teheranica* (Boiss.) Soják ($2n=14$) amb les altres dues aconitel·les, ni amb *C. regalis* ($2n=16$).

6.4.3. EFECTE DEL NOMBRE CROMOSÒMIC EN LA REPRODUCCIÓ

Les espècies estudiades són citogenèticament normals i equilibrades. A efectes de control, no s'ha detectat cap altra anomalia cromosòmica que la consolidació de $x=9$ com a nombre de base de *D. bolosii* i *D. staphisagria*.

Els encreuaments interpoblacionals assajats (BOL1 x BOL2; STA1 x STA2; PIC1 x PIC2; VER1 x VER2) (cf. capítol 5) han produït percentatges de granes molt alts en tots els casos, semblants als intrapoblacionals (les diferències no han estat significatives). La gran similitud entre poblacions dels cariotips pot explicar perfectament l'obtenció d'aquests resultats. Sovint, però, aquests encreuaments no es donen a la natura perquè les poblacions estan físicament separades les unes de les altres, però són indicadors de l'escassa divergència i diferenciació produïda amb el seu aïllament.

Pel que fa a les experiències d'hibridació interespecífica (cf. capítol 5), la proximitat filogenètica i la similitud cariomorfològica són els factors que pesen més en la producció de granes dels híbrids. Així, la diferència entre nombres cromosòmics, que sol ser determinant en la impossibilitat de donar híbrids, té un paper secundari en els nostres tàxons. Per tant, aquest darrer factor no actua com a barrera genètica —com havien postulat alguns autors (GOLBRIG, 1970; STACE, 1989)— entre tàxons molt propers de la tribu *Delphineae*, com a mínim a la Mediterrània occidental. Aquest fenomen també s'ha detectat en altres tàxons com per exemple en el gènere *Thymus* L. (MORALES, 1995) o en un bon nombre de *Carduinae* i de *Centaureinae* a les compostes (GARCÍA JACAS, 1996). En les nostres experiències hem assajat encreuaments amb èxit entre tàxons euploides i disploides de $2n=16$ i $2n=18$. A part de les nostres dades, donen suport a aquesta idea els encreuaments entre *D. pictum* subsp. *requienii* ($2n=16$) i *D. staphisagria* ($2n=18$), que va donar llavors híbrides viables (ALÍAS & BLANCHÉ, inèd.) o els resultats en *Aconitella* de HONG DE-YUAN (1986). Segons STACE (1989), els híbrids entre espècies amb nombres cromosòmics diferents, sovint donen un nombre intermedi. En les meiosis quedaria un cromosoma desaparellat, que probablement s'acabaria perdent. Vam intentar fer un seguiment citogenètic dels híbrids a fi de comprovar aquesta hipòtesi, però el material no s'estava dividint. Sigui com sigui, la descendència híbrida té una gran vitalitat.

Pel que fa als encreuaments interespecífics entre tàxons amb diferent nivell de ploïdia, tot i que no n'hem assajat cap, la bibliografia reporta alguns casos en què actua com a barrera genètica. LEGRO (1961) obté produccions de granes molt baixes o nul·les encreuant *D. elatum* ($2n=32$) amb les espècies diploides *D. nudicaule*, *D. cardinale* o *D. salil* ($2n=16$), mentre que els resultats són més elevats entre les espècies amb el mateix nivell de ploïdia. D'altra banda, altres treballs demostren que aquest tipus de barreres són poc importants. Per exemple, *D. ruysii* Hort. ($2n=32$) prové de *D. elatum* ($2n=32$) x *D. nudicaule* ($2n=16$) (LAWRENCE, 1936) o *Delphinium* x *belladonna* ($2n=48$) és un al·lopoliploide híbrid de *D. grandiflorum* L. ($2n=16$) x *D. elatum* ($2n=32$) (GAGE, 1953). JANKUN (1974) va assajar encreuaments entre *D. grandiflorum* ($2n=16$) com a donador de pol·len i *D. elatum* ($2n=32$) o *D. oxysepalum* ($2n=32$) com a receptors, en els que només es va desenvolupar un 30-35 % de les granes. Aquestes

degeneren o avorten perquè hi ha una tendència a la γ oliplotidització del nucli de l'endosperma i de l'embrió com a conseqüència de la hibridació (JANKUN, *loc. cit.*). Algunes granes es desenvolupen, encara que l'endosperma no sigui viable.

En el gènere *Aconitum* també trobem un exemple d'hibridació entre dues espècies amb diferent nivell de ploïdia: *A. napellus* subsp. *skerisorae* ($2n=32$) i *A. variegatum* ($2n=16$), (ZIELINSKY, 1982a, 1982b). En aquest sentit, el presumpte híbrid entre *A. lycoctonum* i *A. napellus*, trobat a la localitat de la Vall de Liosas (Osca), en cas de ser-ho, provindria de parentals amb diferent nivell de ploïdia, però cal una investigació més acurada per assegurar-ne l'existència real.

LEGRO (1961) va intentar encreuar *C. ajacis* ($2n=16$) amb *D. elatum* ($2n=32$) sense cap mena d'èxit. En aquest cas, a part del diferent nivell de ploïdia, es tracta d'un encreuament intergenèric de dos tàxons molt allunyats filogenèticament, en què les barreres genètiques han de ser importants.

Aquestes dades adquireixen una gran transcendència perquè demostren que les mutacions cromosòmiques estructurals no són per si mateixes suficients per explicar l'especiació en aquest grup de plantes, excepte algun cas com seria *D. bolosii*. Els mecanismes de selecció són els únics capaços de produir combinacions i recombinacions de diferents gens que impliquin barreres citogenètiques i, conseqüentment, reproductives (BEADLE, 1963).

7. ELECTROFORESI D'ISOENZIMS

7.1. INTRODUCCIÓ

L'electroforesi d'isoenzims ha tingut un paper important en diferents disciplines de la biologia que ha permès donar nous enfocaments, entre d'altres, a la sistèmàtica (GOTTLIEB, 1977; CRAWFORD, 1989), als processos evolutius i les relacions filogenètiques (GOTTLIEB, 1971; CRAWFORD, 1983), a la genètica de poblacions (HAMRICK, 1989) i també s'està convertint en una eina important dins el camp de la biologia reproductiva (RITLAND & JAIN, 1981; RITLAND, 1983; LOVETT DOUST & LOVETT DOUST, 1988; BROWN *et al.*, 1989, 1990).

Aquesta tècnica es fonamenta en l'existència, en tots els éssers vius, d'isoenzims (MARKERT & MOLLER, 1959), és a dir, enzims que posseeixen la mateixa funció puix que actuen sobre el mateix substrat, però que són estructuralment una mica diferents. Aquest fet implica una diferent mobilitat electroforètica, propietat descoberta per HUNTER & MARKERT (1957), que possibilita la seva separació histoquímica en un substrat adequat. En els darrers anys s'ha produït una gran extensió de treballs de recerca en aquest camp que ha comportat un bagatge molt consolidat d'aquesta tècnica (SOLTIS *et al.*, 1983; WENDEL & WEDEN, 1989; KEPHART, 1990) i un corpus científic de prou gruix per a la seva interpretació (SOLTIS & SOLTIS, 1989; HAMRICK & GODT, 1989).

L'aplicació de la tècnica isoenzimàtica a la botànica ha proporcionat un ampli ventall o espectre de marcadors genètics que reporten avantatges respecte als marcadors morfològics emprats tradicionalment (BROWN & WEIR, 1983; HAMRICK, 1989). D'una banda, es tracta d'una font de dades molt abundants per a l'anàlisi de la diversitat genètica de les poblacions naturals, sense estar subjectes o influïdes pels factors externs mediambientals. Tampoc depèn de la mida de l'individu ni, en principi, de l'estadi fenològic, ja que molts d'aquests enzims s'expressen durant tot el cicle de la planta. D'altra banda, l'especificitat isoenzimàtica permet atribuir al·lels a *loci* concrets, que fan possible la comparació entre individus o poblacions en base a pocs *loci*, alguns dels quals són molt polimòrfics per a la majoria de poblacions. Les diferències al·lèliques es detecten com a diferències de mobilitat, independentment del paper funcional o del grau de variabilitat de l'enzim. S'expressen codominantment i possibiliten el coneixement de les proporcions de segregació mendeliana eludint el problema d'aïllar els

parentals i realitzar els encreuaments corresponents. A part, també reporten informació sobre l'origen híbrid, la duplicació dels gens o la poliploidia (WEEDEN & WENDEL, 1989). Amb tot, cal tenir present que la molècula de DNA és molt gran i que la informació que s'obté de l'electroferesi d'isoenzims correspon a una part del DNA total que és proporcionalment molt petita i, per tant, parcial, però no per això menys valuosa. A més, com que el codi genètic és degenerat (diferents triplets de nucleòtids poden codificar el mateix aminoàcid), una mateixa mobilitat electroforètica pot estar associada a variants diferents del gen analitzat. Per les dues raons, les estimacions de variabilitat en base als isoenzims són sempre per defecte.

Els valors dels paràmetres de variabilitat genètica obtinguts a partir d'aquesta tècnica permeten fer comparacions entre tàxons. El darrer recull de dades de diversitat isoenzimàtica de què actualment es disposa el portaren a terme HAMRICK & GODT (1989) amb un total de 449 espècies que corresponen a 165 gèneres (dades publicades durant el període 1968-1988).

Fel que fa a la biologia de la reproducció, els isoenzims són marcadors que proporcionen evidències directes sobre el tipus de reproducció i les seves conseqüències genètiques. Una anàlisi precisa i profunda d'aquests sistemes reproductius pot donar una estimació de la seva transcendència en la determinació de l'estructura de la població i la seva evolució potencial. Temps enrere, hom pensava que les anàlisis genètiques requerien una revisió directa de les interferències amb la morfologia i l'anatomia reproductiva. Ara cal reconèixer que els sistemes reproductius prenen lloc en un context ecològic i estan subjectes a factors demogràfics i de selecció natural. El mode de pol·linització, la dinàmica de producció de flors, la densitat, el ritme de floració i tota l'ordenació en veïnatges en l'espai interaccionen amb els sistemes reproductius de manera que la progènie pot haver estat organitzada en una adaptació gens aleatòria. Aquests models determinen l'extensió de la selecció i troben esdeveniments que condueixen a canvis microevolutius dels sistemes de reproducció (BROWN *et al.*, 1989).

Aquest tipus d'estudis es poden realitzar a dos grans nivells: l'intra i l'interpoblacional. Segons el nivell que considerem, la filosofia és diferent. En els estudis intrapoblacionals, s'obté una gran precisió en la informació genètica de cada individu perquè es procura treballar amb el màxim nombre de *loci*, però sempre a costa de la mida de la mostra. En canvi, a nivell interpoblacional es consideren pocs *loci* ben seleccionats, però cal maximitzar el nombre d'individus emprats per l'estudi (SHAW & BROWN, 1982). Sempre es pot completar o validar aquest tipus d'informació amb observacions de la seva història natural com, per exemple, el comportament dels pol·linitzadors.

BROWN *et al.* (1989) van assenyalar alguns aspectes de la biologia de la reproducció que es poden intuir mitjançant aquesta tècnica:

- a) Si l'autogàmia és completa o parcial en cada individu.
- b) Si l'apomixi és obligada o facultativa, és a dir, si també hi ha reproducció asexual.
- c) en plantes entomòfiles, si l'al·logàmia és completa o parcial i si les visites són efectives.
- d) Si les granes d'un fruit provenen del mateix parental (estudis de progènie).

- e) Si els sistemes reproductius estan correlacionats amb la distribució espacial.
- f) Percentatges d'autogàmia en plantes cleistògames o casmògames.
- g) Si hi ha autoincompatibilitat críptica o competència gametofítica.

En el conjunt de les *Delphinaceae*, per les referències que disposem, són escassos els treballs d'electroforesi d'isoenzims que s'han dut a terme. JENSEN (1968) realitza un estudi electroforètic pioner en gels d'acrilamida per separar isoesterases, isopolifenoloxidasas i isoperoxidasas d'*Aconitum paniculatum* Lam. En gels de midó, ZIELINSKY (1982a, 1982b), mitjançant l'electroforesi i la citogenètica, evidencia hibridacions entre *A. napellus* i *A. variegatum* L., dues espècies amb nombres cromosòmics diferents. WASER (1987) analitza la variació genètica espacial en una població de *D. nelsonii* Greene. Finalment, RICHTER *et al.* (1994) estudien la variabilitat genètica interpoblacional d'una espècie endèmica nord-americana, *D. viridescens* Leiberg.

En la nostra àrea d'estudi, aquesta tècnica ha estat emprada per a la identificació de varietats comercials, com per exemple de clavells (MESSEGUER, 1987) o d'avellaners (ROVIRA, 1993), o per dur a terme estudis taxonòmics i evolutius en el gènere *Androcymbium* Willd. (PEDROLA, 1993; CAUJAPÉ, 1995) o en *Cheirolophus* Cass. (GARNATJE, 1995).

L'objectiu d'aquest capítol ha estat doble. D'una banda, posar a punt la tècnica d'electroforesi d'isoenzims al nostre laboratori per a les espècies de la triou *Delphineae* (veure quins enzims es resolen millor en aquests tàxons i en quin tipus de gel, pH, condicions elèctriques, etc.). D'altra banda, i com a primera aproximació, fer una estimació de la variabilitat genètica d'aquestes espècies, que serviran per poder argumentar o donar força a d'altres resultats obtinguts en anteriors capítols. Atès l'elevat nombre d'espècies que conformen aquesta memòria, ens ha semblat més interessant centrar-nos en tres exemples del gènere *Delphinium*: el subgènere *Delphinium* com a anual, citogenèticament molt semblant i amb escasses barreres genètiques, i en dues espècies perennes: *D. bolosii* (espècie dispoloide) i *D. montanum* (espècie tetraploide), que manifesten un interès especial pel fet de ser endèmiques d'àrees molt restringides.

7.2. MATERIAL I MÈTODES

7.2.1. MATERIAL

El material vegetal emprat per preparar els extractes de les mostres que s'han d'analitzar pot ser, en principi, qualsevol teixit que presenti prou activitat enzimàtica. Diversos autors han assajat mostres d'origen ben divers com ara fulles, tiges, puntes d'arrels, llavors, plàntules, pol·len, parts del fruit i, fins i tot, algun espècimen d'herbari (WENDEL & WEEDEN, 1989). Només hem assajat fulles joves i llavors. Les granes, malgrat que alguns enzims com ara l'ADH resolen molt bé i són un material molt idoni i còmode perquè ens estalvia tota la problemàtica de mantenir els individus vius, presenten, malauradament, dos inconvenients importants. D'una banda, les granes d'algunes espècies anuals són massa petites, cosa que

comporta assolir poca quantitat de mostra, que pot implicar que la tinció també esdevingui més fivixa. D'altra banda, la irrepitibilitat de l'experiència, ja que l'obtenció d'extracte pressuposa la destrucció de l'individu potencial. També vam realitzar algunes proves amb pol·len, però alguns enzims com l'MDH mostraven zimogrames amb més bandes que els obtinguts a partir de fulles, cosa que dificultava la interpretació, fenomen que ja va descriure GARNATJE (1995) en *Cheirolophus*.

Finalment, doncs, hem treballat majoritàriament amb fragments de fulles que provenen de germinació (cf. capítol 3) en les espècies anuals o bé de recol·lecció directa al camp, en les perennes. Prèviament es van dur a terme diversos assaigs per tal de comprovar que les fulles recollides 24-48 hores abans de l'extracció i mantingudes a temperatura ambiental no perdien la seva activitat enzimàtica. La recol·lecció de fulles en les seves poblacions naturals té l'avantatge de ser un mètode conservatiu, ja que no malmet en absolut la població, molt important en el cas de plantes endèmiques que poden tenir problemes de preservació com són *D. bolosii* o *D. montanum*. A part, és més còmode perquè evita les tasques de trasplantament d'individus del camp a testos. Les granes de les espècies anuals utilitzades en els experiments isoenzimàtics han estat recol·lectades i sembrades aleatòriament, mentre que les fulles de les espècies perennes del mostratge fet al camp, es van recollir fent un transecte, tot procurant abraçar la màxima variabilitat.

Hem estudiat isoenzimàticament dues poblacions de *D. bolosii* (BOL1 i BOL2), dues de *D. montanum* (MON1 i MON2) i quinze poblacions d'anuals que corresponen a un total de deu espècies del subgènere *Delphinium* (FAV1, FAV2, FAV3, MAC1, OBC1, COS1, BAL1, VER1, VER3, GRA1, GRA2, GRA3, DAV1, PER1 i VIR1) les característiques de les quals i la seva situació geogràfica es detallen a la taula 7.1. i la figura 1.1., respectivament, excepte les 3 darreres. Hem inclòs dades de tres espècies de Turquia, tot i que no pertanyen a l'àrea d'estudi. Les hem usat com a grup de referència extern o *outgroup*. Les granes han estat proporcionades pel Dr. Ilarslan de la Universitat d'Ankara i la referència es troba a la taula 7.1.

Taula 7.1. REFERÈNCIES DE LES LOCALITATS ESTUDIADAES DE TURQUIA.

TÀXON	CODI	LOCALITAT	DATA	PLEC	TESTIMONI	RECOL·LECTOR
<i>D. davisi</i> Munz	DAV1	An: Zonguldak, Güyenören	7-8-84	ANK	I-1618	Ilarslan
<i>D. peregrinum</i> L.	PER1	An: Mardin, Bikirkiri	4-7-85	ANK	I-1637	Ilarslan
<i>D. virgatum</i> Poir.	VIR1	An: Antalya, Termessos	8-7-87	ANK	I-1645	Ilarslan

7.2.2. METODOLOGIA

ELABORACIÓ DEL GEL I DELS TAMPONS DE GEL I D'ELÈCTRODE

Per a la separació electroforètica de mescles complexes de proteïnes hi ha diversos tipus de suports: gels de midó, de poliacrilamida, d'agarosa i membranes d'acetat de cel·lulosa, tot i que els dos darrers no s'usen per separar isoenzims. De fet, els gels de midó, desenvolupats per SMITHIES (1955), són els emprats més usualment per diversos motius: baixa toxicitat, la preparació és senzilla, permet una càrrega fàcil de mostres i les despeses són relativament baixes, malgrat que els de poliacrilamida presenten un poder de resolució i una flexibilitat superior (WENDEL & WEEDEN, 1989). En el nostre estudi hem utilitzat gels de midó.

Durant un període de proves (sis mesos) hem assajat, de manera força empírica encara que seguint les recomanacions d'altres autors (SOLTIS *et al.*, 1983; WASER, 1987; MASSEGUER, 1987; SOLTIS & SOLTIS, 1989; PEDROLA, 1993; CAUJAPÉ, 1995), les diverses combinacions de tampons i gels amb modificacions del pH per trobar els paràmetres adients que possibilitin la millor resolució dels enzims. Les condicions òptimes establertes per al nostre material s'indiquen a la taula 7.2.

Cada gel s'ha preparat a partir de 27 g de midó —quantitat acordada empíricament que assegura una consistència suficientment bona—, que equival a una concentració del 10-11 %. La solució de tampó de gel corresponent a cada enzim s'ha elaborat seguint el protocol de la taula 7.2 per un volum final de 250 ml.

Taula 7.2. CARACTERÍSTIQUES DELS DIVERSOS GELS.

ENZIM	GEL	pH	TAMPÓ DE GEL	TAMPÓ D'ELÈCTRODE	CONDICIONS ELÈCTRIQUES
ACC	Tris-citrat	7.0	3.12 ml d'àcid cítric 0.3 M ajustat a pH 7.0 amb Tris 0.61 M	àcid bòric 0.3 M ajustat a pH 8.2 amb NaOH	1 fase: 150 V, 40 mA, 0.3 h 2 fase: 300 V, 40 mA, 4 h
6PGD	Morfolina citrat	6.1	àcid cítric 0.3 M ajustat a pH 6.1 amb morfolina	àcid cítric 0.3 M ajustat a pH 6.1 amb morfolina	1 fase: 150 V, 20 mA, 0.3 h 2 fase: 200 V, 30 mA, 3.5 h
AAT/GOT PGI	Borat de liti	8.2	Tris 0.33 M, àcid cítric anhidre 0.005 M, àcid bòric 0.03 M, ajustar a pH 8.2 amb LiOH 0.04 M	LiOH 0.039 M, àcid bòric 0.263 M ajustar a pH 8.0 amb LiOH o àcid bòric	1 fase: 150 V, 30 mA, 0.4 h 2 fase: 300 V, 40 mA, 4-5 h
PGM MDH ADH	Histidina-citrat	5.7	L-histidina (base lliure) ajustat a pH 5.7 amb àcid cítric 0.3 M	Tris-citrat 0.1 M ajustar a pH 5.7	1 fase: 150 V, 40 mA, 0.3 h 2 fase: 200 V, 40 mA, 3 h
ME	Tris-citrat	8.2	6.25 ml de Tris 0.61 M ajustat a pH 8.2 amb àcid cítric 0.3 M	àcid bòric 0.3 M ajustat a pH 8.2 amb NaOH	1 fase: 150 V, 40 mA, 0.3 h 2 fase: 200 V, 40 mA, 4 h

Per últim, es preparen uns 400 ml del tampó d'electrode adient al gel utilitzat (cf. taula 7.2.) i es reparteix entre les cubetes del càtode i de l'ànode.

EXTRACCIÓ, CÀRREGA DE MOSTRES I ELECTROFORESI

El tampó d'extracció, preparat amb una antelació mínima de dotze hores (cf. taula 7.3.), s'ha elaborat seguint les recomanacions de PEDROLA (1993) i CAUJAPÉ (1995).

Taula 7.3. COMPOSICIÓ DEL TAMPÓ D'EXTRACCIÓ.

Per 50 ml de solució Tris 0.05 M i àcid cítric 0.07 M
0.05 g de cisteïna HCl
0.05 g d'àcid ascòrbic
4.0 g de polivinil-pirolidona (PVP-40)
30 µl de 2-mercaptoetanol

Empíricament, hem comprovat com les fulles més joves oferien una major activitat enzimàtica enfront de les més velles. És per aquest motiu que la nostra tria s'ha fet amb aquest criteri, utilitzant, fins i tot, fulles cotiledonars. S'afegeix a la mostra un volum de 100-200 µl de tampó d'extracció i s'homogeneïtza la mescla amb una mà de morter fins a la total alliberació dels enzims. Aquests enzims són força termolàbils i, per això, cal agilitzar al màxim tot el procés i es realitza en condicions de fred. Si convé, es guarden momentàniament les mostres al congelador fins al moment de la càrrega del gel.

Submergim fragments rectangulars de paper de filtre Whatman núm. 3 d'una mida de 8 x 3 mm, a fi que s'impregnin totalment de l'extracte. Els extractes no emprats es conserven durant força temps al congelador a -40°C, amb l'excepció dels utilitzats per a l'estudi de l'ACO, molt sensible al fred. A temperatura ambiental es deterioren ràpidament.

Amb l'ajut d'unes pinces i de paper absorbent, se sequen els rectangles de paper de filtre per eliminar l'excedent d'extracte (fet que aporta una millor definició final) i es dispositen verticalment en el gel. A un extrem del gel es col·loca un rectangle de paper impregnat d'una solució de blau de bromofenol, que actuarà com a indicador de la mobilitat del front.

Un cop disposat el gel en la unitat d'electroforesi corresponent, es regula la font d'alimentació (cf. taula 7.2.) a una primera fase en què les proteïnes es desprenen dels suports de paper i s'incorporen al gel. Transcorregut aquest període, s'atura l'electroforesi, s'eliminen els rectangles de paper, es neteja la zona de tall i es fan migrar els enzims en una segona fase en les condicions elèctriques adients (cf. taula 7.2.) en funció dels tipus de tampó.

TALLAT DEL GEL I TINCIÓ

Una vegada ha finalitzat l'electroforesi, es talla el gel transversalment en capes d'entre 1 i 1,5 mm per poder fer el màxim de tincions possibles. Preparem de manera extemporània 100 ml de les solucions de tinció segons els enzims que ens interressi revelar, seguint els protocols de la taula 7.4., basats en les recomanacions de SHIELDS *et al.* (1983), VALLEJOS (1983) i WENDEL & WEEDEN (1989). Hem indicat el nom de l'enzim segons l'Enzyme Commission (EC) així com el nom emprat habitualment. Hem comprovat empíricament com en el seu recorregut en el gel, els enzims mostren una trajectòria curvilínia lleugerament descendent i, per això, gairebé sempre resulten més adequades les capes inferiors. Posteriorment, es tapa la cubeta amb paper de plata per evitar l'evaporació de les solucions de tinció i es col·loca a l'estufa, a la foscor o a temperatura ambiental segons indiqui el protocol de la tinció. Es deixa incubar un temps mínim de 30 minuts, perquè reaccionin amb el substrat. Posteriorment, es renta amb aigua de l'aixeta per deturar les reaccions que hi tenen lloc. Finalment, el zimograma obtingut es disposa sobre un vidre blanc per realitzar la fotografia corresponent o dibuixar-ne la interpretació. Totes les fitxes i negatius es conserven al Laboratori de Botànica de la Facultat de Farmàcia.

Dels 17 enzims assajats: ACO, AAT/GOT, ME, MDH, PGM, 6PGD, PGI, ADH, SDH, EST, PRX, CAT, FDH, LDH, LAP, GDH i IDH, només s'han resolt satisfactòriament els 8 primers, i l'ADH exclusivament per a les granes. D'una banda, les esterases (EST) sortien patinades (alguns autors recomanen eliminar el mercaptoetanol del tampó d'extracció per aquest enzim), cosa que dificultava l'assignació correcta dels al·lels. De l'altra, la resolució dels enzims GDH, IDH i SDH era massa fluixa per poder ser interpretada amb seguretat i la resta d'enzims (CAT, PRX, LAP, LDH i FDH) no es tenien gens. A la taula 7.4. només hem inclòs els protocols per preparar les tincions dels enzims que s'han considerat.

7.2.3. PARÀMETRES MESURATS

A partir de la interpretació dels zimogrames obtindrem els genotips individuals, que permetran calcular les freqüències al·leliques de cada població. Aquestes, a la vegada, s'usaran per determinar els paràmetres poblacionals, descrits per GOTTLIEB (1981), que possibiliten la comparació de la variabilitat genètica interpoblacional i interespecífica. Els paràmetres descriptors que hem considerat bàsics per quantificar la variabilitat genètica d'acord amb els paràmetres isoenzimàtics de les nostres mostres són:

a) *Nombre mitjà d'al·lels per locus (A)*: s'obté a partir de la raó entre el nombre total d'al·lels de tots els loci d'una població i el nombre de loci.

b) *Proporció de gens polimòrfics (P)*: és el percentatge de loci polimòrfics respecte al total de loci estudiats. En principi, un locus és polimòrfic quan presenta més d'un al·lel. En el nostre cas, hem pres el criteri de considerar un locus polimòrfic quan la freqüència de l'al·lel més comú és inferior a 0,95, que és el més usat (SWOFFORD & SELANDER, 1989).

c) *Heterozigosi observada (Ho)*: és el quocient entre el nombre d'heterozigots per a un gen determinat en la població i el total de genotips estudiats.

d) *Heterozigosi esperada (He)*: paràmetre que es calcula a partir de la fórmula:

$$He = 1 - \sum X_i^2$$

on X_i és la freqüència de l'al·lel i .

Aquests dos últims paràmetres són molt usats per donar una estimació dels sistemes reproductius (RITLAND, 1983; BROWN, 1990; BARRET & KOHN, 1991). Per comprovar si les diferències detectades entre l'heterozigosi esperada i l'observada poden ser degudes a diferents nivells de consanguinitat, vam calcular l'*Índex de fixació de Wright (F)* (WRIGHT, 1933, 1951) per a cadascuna de les poblacions. Aquest índex compara l'heterozigosi esperada i l'observada segons la fórmula:

$$F = (He - Ho) / He$$

F pren valors que oscil·len entre -1 i 1. Els valors positius d'aquest paràmetre indiquen un excés d'homozigots (nivells més alts d'autogàmia), mentre que els valors negatius representen un excés d'heterozigots.

A partir dels valors de F es pot calcular el *coeficient de reproducció encreuada o al·logàmia (t)* (WEIR, 1990) segons la fórmula:

$$t = (1 - F) / (1 + F)$$

Aquest índex permet estimar el sistema reproductiu. Els valors propers a 1 indiquen aparellaments a l'atzar o panmixi.

Paral·lelament es pot calcular el *coeficient d'autogàmia (s)* (CLEGG, 1980), que és la proporció de sistemes reproductius que són causats per autogàmia, a partir de la següent fórmula:

$$s = 1 - t$$

Generalment, les espècies autògames mantenen més la seva diversitat genètica entre poblacions que intrapoblacionalment que en les espècies al·logames (BROWN, 1979). L'estadística de l'índex de fixació de Wright ens permetrà comparar aquest paràmetre a diferents nivells: F_R representa la desviació de la llei de Hardy-Weinberg dins cada població, F_{ST} mesura la fixació interpoblacional i F_{IT} és la fixació total, considerant totes les poblacions en el seu conjunt.

Taula 7.4. PROTOCOL DE TINCIÓ.

ACO: E.C.4.2.3.1. ACONITASA

Tris 0.1 M	100 ml
MTT	20 mg
NADP	8 mg
PMS	5 mg
MgCl ₂	5 ml
Àcid cis-aconític	60 mg
IDH	70 U

Cal escalfar la tinció; l'extracte ha de ser extemporani

6PGD: E.C.1.1.1.49 6-FOSFOGLUCONAT DESHIDROGENASA

Tris 0.1 M	100 ml
MTT	20 mg
NADP	8 mg
PMS	6 mg
Àcid fosfogluconic	30 mg

Cal escalfar la solució de tinció

AAT/GOT: E.C.2.6.1.1. ASPARTAT AMINOTRANSFERASA (GLUTAMAT OXALACETAT TRANSAMINASA)

Tampó AAT/GOT	100 ml
Piridoxal	10 mg
Fast Blue	200 mg

(TAMPÓ AAT/GOT: Tris 0.1 M, àcid cetoglutàric, àcid aspàrtic, ajustar a pH 8.0 amb HCl)

La solució de tinció és fotosensible, s'ha de preparar ràpid i col·locar la cubeta de tinció a la foscor

PGI: E.C.5.3.1.9. FOSFOGLUCOISOMERASA

Tris 0.1 M	100 ml
MTT	20 mg
NADP	8 mg
PMS	6 mg
Fructosa-6P	20 mg
G6PDH	30 U

PGM: E.C.5.4.2.2. FOSFOGLUCOMUTASA

Tris 0.1 M	100 ml
MTT	20 mg
NADP	8 mg
PMS	6 mg
MgCl ₂	2 ml
Glucosa-1P	25 mg
G6PDH	30 U

Cal escalfar la solució de tinció

MDH: E.C.1.1.1.37 MALAT DESHIDROGENASA

Tris 0.1 M	75 ml
MTT	15 mg
NAD	15 mg
PMS	4 mg
Solució malat 0.1 M	25 ml (ajustada a pH 7.5 amb Na ₂ CO ₃)

ME: E.C.1.1.1.40 ENZIM MÀLIC

Tris 0.1 M	100 ml
MTT	10 mg
NADP	8 mg
PMS	6 mg
Àcid màlic	500 mg

Cal ajustar tota la solució de tinció a pH 8.0 amb NaOH

ADH: E.C.1.1.1.1. ALCOHOL DESHIDROGENASA

Tris 0.1 M	100 ml
MTT	20 mg
NAD	20 mg
PMS	4 mg
Alcohol etílic	5 ml

Els valors de tots aquests paràmetres es van calcular, per a tots els *loci* interpretats, a partir de les freqüències individuals processades mitjançant el programa BIOSYS-1, versió 1.7 (SWOFFORD & SELANDER, 1989). Alguns càlculs es van haver de realitzar de forma semiautomàtica perquè el programa BIOSYS no admet casos d'herència tetrasòmica com tenia lloc en el PGM-1 (vegeu més endavant). Aquest sistema no s'ha inclòs en els càlculs de F_{IS} , F_{ST} i F_{IT} , com fan MACHON *et al.* (1995).

7.3. RESULTATS

Durant l'etapa de proves es van dur a terme més de 300 experiments, que ens han permès resoldre amb prou nitidesa per a poder interpretar 11 *loci* de 6 enzims pel subgènere *Delphinium*, 13 *loci* de 8 enzims per *D. bolosii* i 8 *loci* de 5 enzims per *D. montanum*, que tot seguit descriurem amb més detall.

7.3.1. ANÀLISI DELS SISTEMES ENZIMÀTICS

A continuació, descriurem breument els patrons de bandes obtinguts per a cadascun dels sistemes enzimàtics que han estat resolts en aquest treball. Per a tots els enzims on s'ha interpretat més d'un sistema enzimàtic, hem associat un nombre al sistema començant per les regions d'activitat situades en les zones del gel corresponents als isoenzims més ràpids en la migració cap a l'ànode, és a dir, els més distants de l'origen de migració. En cadascun d'aquests sistemes, a l'al·lel més ràpid se li ha atorgat la lletra *a*, al segon més ràpid, la *b* i així successivament.

Vam realitzar homologies i proves comparatives per tal de verificar les mobilitats enzimàtiques. No s'ha portat a terme, però, una anàlisi de la progènie o programa d'encreuaments controlats per confirmar la base genètica dels diferents patrons de bandes obtinguts, perquè el temps disponible no abraçava una generació suplementària. D'altra banda, les intensitats de les bandes dels heterozigots s'ajusten a l'assumpció d'herència codominant i el nombre de bandes va ser coherent amb l'esperat a partir del coneixement de l'estructura quaternària (nombre de subunitats) de l'enzim.

ACONITASA (ACO)

En la tinció d'aquest enzim de comportament monomèric, hem detectat dues zones d'activitat ACO-1 i ACO-2, amb una mobilitat electroforètica molt similar, fins al punt que, en la nostra interpretació els al·lells dels dos sistemes s'encavalquen parcialment, especialment en el subgènere *Delphinium*, cosa que dificultava la interpretació. La deducció d'aquest patró ha estat feta a partir de la intensitat de les bandes i perquè era l'únic model que explicava la presència de quatre bandes en la població FAV3 (*cf.* figura 7.1.), i de patrons de dos i tres bandes en el mateix gel en moltes poblacions.

En el primer sistema (ACO-1) hem detectat tres al·lels, un dels quals (el *b*) està pràcticament fixat en la majoria de poblacions del subgènere *Delphinium* del mostratge, excepte en la població FAV3 i l'espècie *D. gracile*. En els tàxons perennes, *D. bolosii* està fixat per l'heterozigot *ab*, i *D. montanum* l'heterozigot també sembla fixat, encara que en aquesta espècie no hem interpretat l'ACO, perquè alguns individus no es veien prou bé.

El sistema ACO-2 del subgènere *Delphinium* és un xic més variable, però només manifesta dos al·lels i una gran presència d'homozigots. En *D. bolosii* aquest sistema està fixat per l'al·lel *a*.

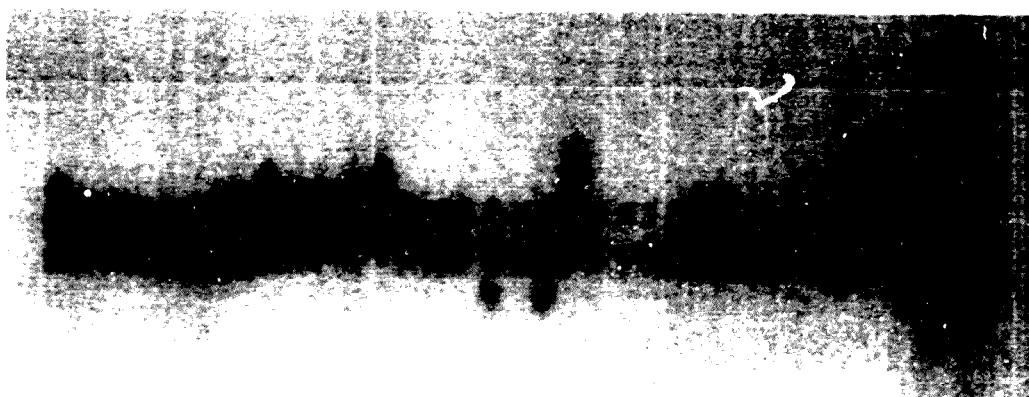


Figura 7.1. Zimograma de l'enzim ACO de *D. favargeri* (FAV3).
(les dues darreres mostres són de *Consolida* i les 2 penúltimes de *D. verdunense*)

ASPARTAT AMINOTRANSAMINASA (AAT / GOT)

Aquest enzim mostra un comportament clarament dimèric, ja que apareixen heterozigots amb una banda intermèdia tenyida amb una major intensitat (cf. figura 7.2.), que segueix la hipòtesi de la codominància, tot i que a vegades la intensitat no és ben bé el doble. Aquest enzim presenta dues zones d'activitat: AAT-1 i AAT-2.

El sistema AAT-1, en què hem detectat tres al·lels, està molt fixat per a la majoria de tàxons anuals, excepte per a les espècies *D. favargeri* (cf. figura 7.2.) i *D. gracile*. En els tàxons perennes del mostratge s'observa una major variabilitat.

La mobilitat del sistema AAT-2 està marcadament separada de la zona d'activitat del sistema AAT-1 i, per això, no hi ha hagut interferències de bandes que dificultessin la seva interpretació. No obstant això, no sempre es resolia o bé, apareixia molt flux i l'escàs contrast del patró de bandes respecte del fons vermellós que adquireix el gel en la tinció d'aquest enzim, no permetia una interpretació segura. Així doncs, les dades provinents d'aquest *locus* no han estat incloses en els càlculs efectuats.



Figura 7.2. Zimograma de l'enzim AAT de *D. favargeri* (FAV2).

ENZIM MÀLIC (ME)

Aquest enzim només conté una regió d'activitat, encara que en alguns tàxons hem detectat bandes d'una intensitat molt feble per sobre d'aquest sistema, comparativament massa fluixes per ser considerades com una altra regió d'activitat i, a més, no sempre apareixen. Probablement es tracta d'algun artefacte de la tinció.

Aquest enzim està molt fixat en molts tàxons anuals i és més variable en les espècies perennes. Vam identificar un total de cinc al·lels en les espècies anuals i tres en les perennes, destacant la gran fixació de l'al·lel c com a fet característic tant en el subgènere *Delphinium* com en *D. montanum*. Tots els al·lels presenten mobilitats restringides a un segment molt estret del gel.

Un altre fet destacable associat a l'enzim màlic és que en les espècies anuals mai hem detectat heterozigots, fenomen que ja va reportar CAUJAPÉ (1995) en 33 poblacions del gènere *Androcymbium*. En canvi, en *D. bolosii* i *D. montanum* (cf. figura 7.3.), les diferències de gruix entre algunes bandes ens han permès atribuir alguns heterozigots, però ha estat impossible determinar el nombre de subunitats que constitueixen aquest enzim, ja que quedaven massa juntes. A la bibliografia consultada s'ha descrit que aquest enzim manifesta un comportament tetràmer (WEEDEN & WENDEL, 1989; KEPHART, 1990).



Figura 7.3. Zimograma de l'enzim màlic (ME) de *D. montanum* (MON2).

FOSFOGLUCOMUTASA (PGM)

La tinció d'aquest enzim mostra clarament dues zones d'activitat, PGM-1 i PGM-2, amb un comportament monomèric. En alguns taxons, però, són tan properes que en ocasions és difícil discriminar on acaba una i comença l'altra. Amb tot, l'especial nitidesa de resolució d'aquest enzim ens va permetre discernir diferències molt petites de mobilitat. Hem detectat un total de 8 al·lels per al PGM-1 i 5 per al PGM-2 en el subgènere *Delphinium* i un nombre inferior en les espècies perennes.

En el sistema PGM-1, l'elevada presència de bandes contrasta amb la d'altres sistemes monomèrics estudiats com el PGM-2. Això ens va conduir a pensar que l'única interpretació genètica compatible és una segregació tetrasòmica, originada en una duplicació genètica. Aquest fenomen, poc reportat a la bibliografia en espècies diploides, ha estat donat a conèixer per MACHON *et al.* (1995) per a algunes espècies del gènere *Ulmus*. El nostre model de bandes s'adapta perfectament a la interpretació donada per aquests autors. El PGM-2 té un comportament monomèric típic. Aquest diferent comportament és factible perquè aquest enzim està controlat per dos gens que presenten una distribució subcel·lular diferent: el PGM-1 es troba al cloroplast i el PGM-2, al citosol (WEEDEN & GOTTLIEB, 1980; STUBER & GOODMAN, 1983; WEEDEN & WENDEL, 1989; KEPHART, 1990).

En el subgènere *Delphinium*, aquest enzim mostra una gran variabilitat (*cf.* figura 7.4.), mentre que en les dues espècies perennes està molt més fixat. Tot i això, en les espècies perennes els patrons de bandes són diferents. *D. holosii* presenta la mobilitat dels al·lels del

PGM-1 molt similar a les anuals, però els al·lels del PGM-2 d'aquesta perenne són molt més ràpids amb una mobilitat electroforètica propera al sistema 1 (pràcticament es toquen). En *D. montanum* els al·lels del PGM-2 són sensiblement més lents que en *D. bolosii*.



Figura 7.4. Zimograma de l'enzim PGM de *D. favargeri* (FAV2).

6-FOSFOGLUCONAT DESHIDROGENASA (6PGD)

El revelat d'aquest enzim posa de manifest un patró de bandes complex, atribuïble a tres zones d'activitat: 6PGD-1, 6PGD-2 i 6PGD-3. La presència de nombroses bandes, especialment en el sistema 6PGD-2 del subgènere *Delphinium* (diploides), suggereix la possibilitat que aquest gen pugui estar duplicat, hipòtesi que s'hauria de verificar per mitjà d'anàlisis de progènie. *D. monianum* també manifesta moltes bandes, però en aquest cas és atribuïble a la seva dotació cromosòmica tetraploide ($2n=32$). La complexitat de la interpretació, junt amb el fet que semblava força fixat, ens va portar a no considerar el sistema 6PGD-2 per a la realització dels càlculs posteriors.

Els altres dos sistemes que sí han estat interpretats, han permès identificar fins a 3 al·lels diferents en cadascun d'aquests. Mostren un comportament dimèric que es pot visualitzar en la figura 7.5. En les espècies del subgènere *Delphinium* estudiades, els al·lels més freqüents són els *b* d'ambdós sistemes, és a dir, els de mobilitat intermèdia.

Els individus del mostratge de *D. bolosii* mostren un patró de bandes molt fixat. En *D. montanum*, aquest enzim està bastant fixat. El 6PGD-3 només té 1 al·lel, més lent que el dels anuals.



Figura 7.5. Zimograma de l'enzim 6-PGD de *D. balansae* (BAL1).

MALATDESHIDROGENASA (MDH)

El patró de bandes d'aquest enzim és molt complex, amb possibles duplicacions (GOTTLIEB, 1982) i encavalcaments que poden donar lloc a petites diferències entre els individus. Aquestes irregularitats han estat atribuïdes a canvis de la conformació post-transcripcional de la proteïna (GOODMAN *et al.*, 1981; DOEBLEY *et al.*, 1986), poden estar associades a artefactes en el procés d'extracció o del propi gel o a distorsions provocades pel corrent elèctric. També s'ha descrit l'aparició de bandes secundàries produïdes per complexos amb cofactors o ions (ARULSEKAR *et al.*, 1986) o per la formació de dimers intergènics (GOTTLIEB, *loc. cit.*), cosa que fa que aquest enzim mostri una gran complexitat i una interpretació complicada.

En les nostres espècies hem detectat quatre regions d'activitat que corresponen als sistemes MDH-1, MDH-2, MDH-3 i MDH-4, amb mobilitat electroforètica molt propera, de manera que no hi ha pràcticament separació entre ells (*cf.* figura 7.6.). D'aquests sistemes, l'MDH-2 no ha estat interpretat, donada la seva complexitat. La resta contenen 2, 3 i 3 al·lels respectivament. Els zimogrames de *D. montanum* no han estat interpretats perquè el zimograma va sortir molt distorsionat. Tot i així, igual que en el cas de *D. bolosii*, mostrava un patró molt fixat.

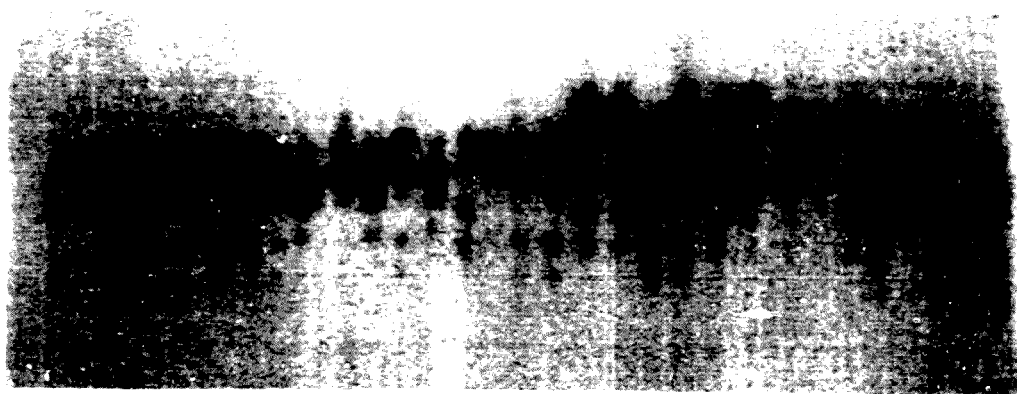


Figura 7.6. Zimograma de l'enzim MDH de *D. peregrinum* (PER1) i *D. virgatum* (VIR1).

FOSFOGLUCOISOMERASA (PGI)

La resolució de les bandes d'aquest enzim no ha estat suficient per discernir quin comportament té. Sembla força fixat en les espècies anuals i més variable en les espècies perennes. En el subgènere *Delphinium* no l'hem interpretat perquè sovint sortia poc nítid i lleugerament patinat. A vegades, depenent del tipus de gel (però no sempre en el mateix), apareix un sistema molt enganxat a l'origen de migració. En els tàxons perennes —*D. bolosii* i *D. montanum*— hem identificat dos sistemes, el PGI-1 i el PGI-2 de mobilitat electroforètica molt similar (cf. figura 7.7.), en ambdues espècies. Aquests *loci* contenen 2 i 3 al·lels, respectivament.



Figura 7.7. Zimograma de l'enzim PGI de *D. montanum* (MON2).

ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH)

Aquest enzim només s'ha resolt en granes. Tot i obtenir una bona resolució d'aquest enzim, ha estat interpretat únicament en l'espècie *D. bolosii*, que mostra un elevat grau de fixació (cf. figura 7.8.). En les espècies anuals apareixen moltes bandes de difícil interpretació i en alguns casos, a causa de la poca quantitat de mostra (les granes són molt petites), les bandes han sortit massa fluixes i, conseqüentment, són difícils de distingir per poder assignar els al·lels corresponents.



Figura 7.8. Zimograma de l'enzim ADH (en grana) de *D. bolosii* (BOL2).

7.3.2. PARÀMETRES POBLACIONALS I VARIABILITAT GENÈTICA

A partir de la interpretació dels zimogrames, hem caracteritzat genotípicament cada individu del mostratge i hem obtingut una taula de freqüències al·lèliques per a cada població (cf. taules 7.5. i 7.6.). Cal remarcar que l'assignació dels al·lels entre les espècies anuals i perennes és independent i no es corresponen, tot i que alguns al·lels coincideixen. La mida de la mostra per població es consigna igualment en aquestes taules. A partir de les freqüències al·lèliques s'han calculat els paràmetres bàsics descriptors de la variabilitat genètica isoenzimàtica representats a les taules 7.7., 7.8. i 7.9.

7.3.3. PARÀMETRES REPRODUCTIUS

La taula 7.10. recull els valors dels índexs de fixació de Wright (F) per a cada enzim i la mitjana per a cada tàxon, així com els valors dels coeficients de pol·linització encreuada (t) i d'autogàmia (s). La taula 7.11. recull els valors de F_{IS} , F_{ST} i F_{IT} de totes les espècies en que teniem més d'una població i una general de tots els tàxons del mostratge del subgènere *Delphinium*, que reflecteixen el grau de contribució de els components intrapoblacionals, interpoblacionals i totals, respectivament, a la variabilitat.

Taula 7.5. FREQUÈNCIES AL·LÈLIQUES EN EL SUBGÈNERE *DELPHINIUM*.

POBLACIONS															
Locus	FAV1	FAV2	FAV3	OBC1	MAC1	COS1	BAL1	VER1	VER3	GRA1	GRA2	GRA3	DAV1	PER1	VIR1
(N)	30	30	30	30	5	30	30	29	30	30	30	28	30	15	15
ACO-1															
a	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,036	0,000	0,000	0,000
b	1,000	1,000	0,950	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,950	0,964	1,000	1,000	1,000
c	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ACO-2															
a	0,183	0,150	0,067	0,167	0,100	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,083	0,533	0,933
b	0,817	0,850	0,933	0,833	0,900	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,917	0,467	0,067
ME															
a	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,067
b	0,167	0,000	0,133	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,107	0,000	0,067	0,067
c	0,767	1,000	0,867	0,900	0,800	0,900	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000	0,857	1,000	0,933	0,867
d	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,067	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
e	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AAT-1 / GOT-1															
a	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,733	0,750	0,696	0,000	0,033	0,000
b	0,883	0,783	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,267	0,250	0,304	1,000	0,833	1,000
c	0,117	0,217	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,133	0,000
PGM-1															
a	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
b	0,167	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,035	0,000	0,000	0,109	0,000	0,192	0,000	0,000
c	0,033	0,009	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,542	0,000	0,000
d	0,042	0,092	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,043	0,375	0,000	0,009	0,000	0,059	0,000	0,000
e	0,192	0,167	0,033	0,117	0,000	0,000	0,000	0,250	0,058	0,209	0,200	0,313	0,209	0,267	0,284
f	0,067	0,283	0,259	0,217	0,400	0,159	0,242	0,302	0,042	0,667	0,683	0,688	0,000	0,617	0,500
g	0,484	0,392	0,692	0,558	0,400	0,500	0,750	0,371	0,425	0,042	0,000	0,000	0,000	0,067	0,217
h	0,017	0,009	0,009	0,075	0,200	0,342	0,009	0,000	0,100	0,084	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000
PGM-2															
a	0,000	0,017	0,000	0,083	0,000	0,050	0,050	0,000	0,100	0,090	0,000	0,000	0,000	0,233	0,000
b	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000
c	0,850	0,933	1,000	0,800	1,000	0,867	0,950	1,000	0,817	1,000	0,983	0,982	0,000	0,733	0,333
d	0,083	0,050	0,000	0,033	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,067
e	0,067	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,033	0,600
6PGD-1															
a	0,033	0,083	0,017	0,067	0,100	0,000	0,083	0,069	0,033	0,000	0,000	0,071	0,133	0,033	0,000
b	0,967	0,917	0,983	0,933	0,900	1,000	0,917	0,931	0,967	1,000	1,000	0,929	0,867	0,967	1,000
6PGD-3															
a	0,117	0,050	0,050	0,167	0,000	0,350	0,083	0,000	0,017	0,050	0,000	0,071	0,233	0,700	0,067
b	0,883	0,800	0,950	0,833	1,000	0,383	0,867	1,000	0,833	0,950	1,000	0,857	0,650	0,100	0,900
c	0,000	0,150	0,000	0,000	0,000	0,267	0,050	0,000	0,150	0,000	0,000	0,071	0,117	0,200	0,033
MDH-1															
a	0,150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,367
b	0,850	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,983	0,917	1,000	1,000	1,000	1,000	0,633
MDH-3															
a	0,000	0,067	0,083	0,000	0,800	0,917	0,000	0,138	0,183	0,350	0,483	0,857	0,000	0,367	0,133
b	1,000	0,933	0,867	0,000	0,000	0,033	0,033	0,224	0,383	0,217	0,250	0,143	0,000	0,133	0,400
c	0,000	0,000	0,050	1,000	0,200	0,950	0,967	0,638	0,433	0,433	0,267	0,000	1,000	0,500	0,467
MDH-4															
a	1,000	0,950	0,883	0,000	0,200	0,033	0,000	0,31	0,250	1,000	1,000	1,000	0,000	0,133	0,067
b	0,000	0,050	0,117	1,000	0,800	0,967	0,917	0,683	0,600	0,000	0,000	0,000	1,000	0,867	0,933
c	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,086	0,133	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

(N) = Mida de la mostra per població

Taula 7.6. FREQUÈNCIES AL·LÈLIQUES EN *D. BOLOSII* I *D. MONTANUM*.

POBLACIONS			POBLACIONS		
Locus	BOL1	BOL2	Locus	MON1	MON2
(N)	36	36	(N)	40	40
ACO-1			ME		
a	0,236	0,500	a	0,000	0,138
b	0,764	0,500	b	0,100	0,162
			c	0,900	0,700
ACO-2			GOT-1		
a	1,000	1,000	a	0,050	0,038
ME			b	0,675	0,650
a	0,694	0,500	c	0,275	0,313
b	0,194	0,375			
c	0,111	0,125	PGM-1		
GOT-1			a	0,019	0,000
a	0,069	0,596	b	0,250	0,238
b	0,931	0,431	c	0,250	0,250
			d	0,481	0,512
PGM-1			PGM-2		
a	0,250	0,250	a	0,000	0,025
b	0,750	0,750	b	0,050	0,138
			c	0,950	0,837
PGM-2			6-PGD-1		
a	0,917	1,000	a	0,750	0,850
b	0,083	0,000	b	0,075	0,125
6-PGD-1			c	0,175	0,025
a	0,000	0,000			
b	1,000	1,000	6-PGD-3		
6-PGD-3			a	0,938	1,000
a	0,000	0,000	b	0,062	0,000
b	1,000	1,000			
MDH-1			PGI-1		
a	1,000	1,000	a	0,212	0,613
			b	0,788	0,287
MDH-3			PGI-2		
a	0,056	0,000	a	0,125	0,100
b	0,083	0,028	b	0,875	0,613
c	0,861	0,972	c	0,000	0,287
PGI-1					
a	0,917	0,917			
b	0,083	0,083			
PGI-2					
a	0,917	0,917			
b	0,083	0,083			
ADH					
a	1,000	0,972			
b	0,000	0,028			

(N) = Mida de la mostra per població.

Taula 7.7. VALORS DELS DESCRIPTORS BÀSICS DE VARIABILITAT GENÈTICA ISOENZIMÀTICA EN EL SUBGÈNERE *DELPHINIUM*.

POBLACIONS	N	A	P	Ho	He
<i>D. favargerii</i> (FAV1)	30	2,4 (0,5)	63,6	0,157 (0,064)	0,215 (0,060)
<i>D. favargerii</i> (FAV2)	30	2,5 (0,6)	72,7	0,151 (0,084)	0,196 (0,062)
<i>D. favargerii</i> (FAV3)	30	2,2 (0,3)	63,6	0,112 (0,051)	0,134 (0,040)
<i>D. obcordatum</i> (OBC1)	30	2,1 (0,4)	54,5	0,167 (0,083)	0,166 (0,058)
<i>D. macropetalum</i> (MAC1)	5	1,6 (0,2)	54,5	0,200 (0,089)	0,178 (0,060)
<i>D. cossonianum</i> (COS1)	30	2,0 (0,3)	45,5	0,130 (0,079)	0,168 (0,070)
<i>D. balansae</i> (BAL1)	30	1,7 (0,2)	45,5	0,127 (0,076)	0,098 (0,036)
<i>D. verdunense</i> (VER1)	29	1,8 (0,4)	36,4	0,147 (0,084)	0,172 (0,079)
<i>D. verdunense</i> (VER3)	30	2,5 (0,4)	45,5	0,161 (0,064)	0,238 (0,077)
<i>D. gracile</i> (GRA1)	30	1,7 (0,3)	45,5	0,212 (0,102)	0,162 (0,068)
<i>D. gracile</i> (GRA2)	30	1,7 (0,3)	36,4	0,182 (0,086)	0,147 (0,067)
<i>D. gracile</i> (GRA3)	28	1,9 (0,2)	54,5	0,201 (0,087)	0,168 (0,047)
<i>D. davisi</i> (DAV1)	30	1,6 (0,3)	36,4	0,142 (0,087)	0,138 (0,065)
<i>D. peregrinum</i> (PER1)	15	2,4 (0,3)	72,7	0,242 (0,094)	0,292 (0,064)
<i>D. virgatum</i> (VIR1)	15	2,2 (0,3)	72,7	0,303 (0,119)	0,262 (0,071)

N = mida de la mostra. A = mitjana del nombre d'al·lels per locus. P = percentatge de loci polimòrfics (criteri del 0,95).
Ho = heterozigosi observada. He = heterozigosi esperada (els valors dins dels parèntesis corresponen a l'error estàndard)

Taula 7.8. VALORS DELS DESCRIPTORS BÀSICS DE VARIABILITAT GENÈTICA ISOENZIMÀTICA EN *D. MONTANUM*.

POBLACIONS	N	A	P	Ho	He
<i>D. montanum</i> (MON1)	40	2,5 (0,3)	100	0,263 (0,117)	0,307 (0,063)
<i>D. montanum</i> (MON2)	40	2,8 (0,3)	87,5	0,291 (0,122)	0,389 (0,065)

N = mida de la mostra; A = mitjana del nombre d'al·lels per locus; P = percentatge de loci polimòrfics (criteri del 0,95);
Ho = heterozigosi observada; He = heterozigosi esperada (els valors dins dels parèntesis corresponen a l'error estàndard)

Taula 7.9. VALORS DELS DESCRIPTORS BÀSICS DE VARIABILITAT GENÈTICA ISOENZIMÀTICA EN *D. BOLOSII*.

POBLACIONS	N	A	P	Ho	He
<i>D. bolosii</i> (BOL1)	36	1,8 (0,2)	61,5	0,141 (0,082)	0,157 (0,045)
<i>D. bolosii</i> (BOL2)	36	1,7 (0,2)	53,8	0,173 (0,106)	0,183 (0,064)

N = mida de la mostra; A = mitjana del nombre d'al·lels per locus; P = percentatge de loci polimòrfics (criteri del 0,95);
Ho = heterozigosi observada; He = heterozigosi esperada (els valors dins dels parèntesis corresponen a l'error estàndard)

Taula 7.10. ÍNDEXS DE FIXACIÓ DE WRIGHT (F), COEFICIENT DE REPRODUCCIÓ ENCREUADA (I) I D'AUTOGÀMIA (S).

Taxon	ACO-1	ACO-2	ME	AAT-1	PGM-1	PGM-2	6PGD-1	6PGD-3	MDH-1	MDH-3	MDH-4	PGI-1	PGI-2	ADH	F	I	S
FAV1	---	0,221	1,000	- 0,132	0,867	0,499	1,000	0,515	- 0,176	---	---	---	---	---	0,261	0,586	0,414
FAV2	---	0,085	---	0,509	0,083	0,736	0,345	0,900	---	1,000	- 0,053	---	---	---	0,286	0,555	0,445
FAV3	- 0,040	- 0,071	1,000	---	0,067	---	- 0,017	0,649	---	0,582	- 0,132	---	---	---	0,150	0,739	0,251
OBC1	---	0,280	1,000	---	- 0,333	0,426	- 0,071	- 0,200	---	---	---	---	---	---	0,080	0,852	0,148
MAC1	---	- 0,111	1,000	---	1,000	---	- 0,111	---	---	- 0,250	- 0,250	---	---	---	- 0,026	1,053	- 0,055
COS1	---	---	1,000	---	0,374	0,582	---	0,343	---	0,653	1,000	---	---	---	0,287	0,554	0,446
BAL1	---	---	---	---	- 0,669	- 0,053	0,345	0,165	---	- 0,034	0,782	---	---	---	0,019	0,963	0,037
VER1	---	---	---	---	0,321	---	- 0,074	---	---	- 0,605	0,417	---	---	---	- 0,057	1,121	- 0,121
VER3	---	---	1,000	---	0,547	0,051	1,000	0,175	- 0,017	0,472	0,702	---	---	---	0,303	0,535	0,463
GRA1	---	---	---	0,318	- 0,594	---	---	0,053	- 0,091	- 0,245	---	---	---	---	0,086	1,189	- 0,189
GRA2	- 0,053	---	---	- 0,333	0,183	- 0,017	---	---	---	0,210	---	---	---	---	- 0,090	1,198	- 0,198
GRA3	- 0,037	---	1,000	- 0,098	- 0,497	- 0,018	- 0,077	- 0,120	---	0,125	---	---	---	---	- 0,020	1,042	- 0,042
DAV1	---	- 0,091	---	---	- 0,392	---	0,712	0,346	---	---	---	---	---	---	- 0,020	1,041	0,064
PER1	---	0,196	1,000	0,767	- 0,556	0,016	- 0,034	0,710	---	- 0,004	1,000	---	---	---	0,255	0,594	0,406
VIR1	---	1,000	1,000	---	- 0,030	- 0,017	---	0,277	- 0,579	- 0,544	1,000	---	---	---	0,139	0,756	0,244
BOL1	- 0,309	---	0,762	- 0,075	- 1,000	0,273	---	---	---	1,000	---	1,000	1,000	---	0,204	0,661	0,339
BOL2	- 1,000	---	0,579	- 0,530	- 1,000	---	---	---	---	1,000	---	1,000	1,000	1,000	0,158	0,728	0,272
MON1	---	---	0,444	- 0,287	- 0,555	- 0,053	1,000	- 0,067	---	---	---	0,477	1,000	---	0,245	0,607	0,393
MON2	---	---	0,462	- 0,463	- 0,616	0,015	1,000	---	---	---	---	0,947	0,852	---	0,276	0,568	0,432

--- indica els loci monomòrfics.

Taula 7.11. ESTADÍSTICA D'F DE TOTS ELS LOCI POLIMÒRFICS:

En 3 poblacions de *D. favargeri*.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
ACO-1	- 0,040	0,026	- 0,013
ACO-2	0,116	0,021	0,135
AAT-1	0,267	0,079	0,325
MDH-1	- 0,176	0,105	- 0,053
MDH-3	0,725	0,038	0,736
MDH-4	- 0,107	0,044	- 0,059
ME	1,000	0,070	1,000
6PGD-1	0,457	0,019	0,477
6PGD-3	0,738	0,044	0,750
PGM-2	0,575	0,044	0,594
Mitjana	0,443	0,051	0,471

En 15 poblacions del subgènere *Delphinium*.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
ACO-1	- 0,044	0,035	- 0,007
ACO-2	0,180	0,745	0,791
AAT-1	0,160	0,555	0,626
MDH-1	- 0,363	0,235	- 0,043
MDH-3	0,113	0,502	0,563
MDH-4	0,456	0,706	0,840
ME	1,000	0,086	1,000
6PGD-1	0,262	0,036	0,288
6PGD-3	0,346	0,289	0,535
PGM-2	0,218	0,499	0,608
Mitjana	0,280	0,516	0,652

En 3 poblacions de *D. gracile*.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
ACO-1	- 0,046	0,016	- 0,029
AAT-1	- 0,035	0,003	- 0,033
MDH-1	- 0,091	0,057	- 0,029
MDH-3	0,004	0,136	0,140
ME	1,000	0,080	1,000
6 PGD-1	- 0,077	0,049	- 0,024
6PGD-3	- 0,102	0,045	- 0,052
PGM-2	- 0,018	0,009	- 0,009
Mitjana	0,039	0,073	0,100

En 2 poblacions de *D. bolosii*.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
ACO-1	- 0,710	0,075	- 0,582
AAT-1	- 0,435	0,287	- 0,022
MDH-3	1,000	0,030	1,000
ME	0,660	0,032	0,671
PGI-1	1,000	0,060	1,000
PGI-2	1,000	0,000	1,000
PGM-2	0,273	0,043	0,304
ADH	1,000	0,014	1,000
Mitjana	0,226	0,298	0,092

En 2 poblacions de *D. verdunense*.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
MDH-1	- 0,017	0,008	- 0,008
MDH-3	0,532	0,029	0,546
MDH-4	0,563	0,003	0,564
ME	1,000	0,017	1,000
6PGD-1	0,285	0,007	0,290
6PGD-3	0,175	0,082	0,243
PGM2	0,051	0,074	0,121
Mitjana	0,451	0,028	0,466

En 2 poblacions de *D. montanum*.

Locus	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
AAT-1	- 0,376	0,001	- 0,375
ME	0,457	0,046	0,482
6PGD-1	1,000	0,026	1,000
6PGD-3	- 0,067	0,032	- 0,032
PGI-1	0,753	0,165	0,794
PGI-2	0,900	0,092	0,909
PGM2	- 0,003	0,027	0,025
Mitjana	0,380	0,137	0,400