



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Productes Naturals,

Biologia Vegetal i Edafologia

SECCIÓ DE BOTÀNICA

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

**Sònia Marta Garcia Giménez
Barcelona, 2007**

INTRODUCCIÓ



INTRODUCCIÓ

1. MARC TAXONÒMIC

a. Família *Asteraceae* (*Compositae*)

Una de cada deu plantes amb flor pertany a la família de les asteràcies o compostes, però, malgrat que es tracta d'una família enormement diversa (23000 espècies i 1535 gèneres, segons Bremer, 1994; de 24000 a 30000 espècies i de 1600 a 1700 gèneres, segons Funk *et al.*, 2005; i 23000 espècies i 1600 gèneres segons l'últim tractat de la família; Kubitzki, 2007), gairebé tots els seus tàxons són fàcilment identificables com a membres d'aquesta família. Es considera que és un grup monofilètic, i d'entre els caràcters morfològics que les defineixen, inflorescència en capítol (pràcticament exclusiva d'aquesta família), anteres fusionades en anell i fruit en cípsela (generalment acompanyat per un vilà que contribueix a la seva dispersió), probablement el primer és el que més ha contribuït al seu fàcil reconeixement, així com al seu èxit reproductiu i colonitzador. De fet, aquesta família té una gran biodiversitat i capacitat per a ocupar nous ambients (com il·lustra el títol d'una publicació recent sobre aquesta família "Everywhere but Antarctica...", Funk *et al.*, 2005), i representa un tipus biològic encara jove i en ple procés d'evolució (Hidalgo, 2006).

Segons reconstruccions filogenètiques recents, la família va tenir el seu origen en la zona meridional d'Amèrica del Sud fa aproximadament 50 milions d'anys, amb una radiació subsegüent al continent Africà, d'on van sorgir clades d'Àsia, Euràsia i Austràlia (Funk *et al.*, 2005). La majoria d'asteràcies estan incloses dins la subfamília Asteroideae (1210 gèneres i 1700 espècies; Kubitzki, 2007), de la qual la tribu Anthemideae és un dels grups més grans.

b. Tribu *Anthemideae*

Les Anthemideae comprenen 111 gèneres i unes 1800 espècies (Oberprieler *et al.*, 2007). Probablement el seu origen és sudafricà, i des del sud d'Àfrica s'ha dispersat cap a l'hemisferi Nord, (Noyes i Rieseberg, 1999; Watson *et al.*, 2000). Actualment, els representants d'aquesta tribu es distribueix pels cinc continents, essent més habitual a

les zones temperades de l'hemisferi nord. Té tres grans centres de diversificació: la regió mediterrània, el sud-centre asiàtic i Sud-Àfrica, tot i que moltes espècies es troben àmpliament distribuïdes al continent americà. D'entre els seus membres, hi ha nombroses plantes aromàtiques, algunes d'utilitzades des de temps immemorials pel seu valor medicinal, alimentari o ornamental (les camamilles, les artemísies o els crisantems en són exemples). També hi abunden plantes ruderals d'àmplia distribució, i que en alguns casos es poden comportar com a espècies invasores (per exemple, alguns taxons d'*Artemisia*, com *A. frigida* o de *Tripleurospermum*, com *T. perforatum*). Les característiques principals que permeten reconèixer-les són la seva fragància aromàtica - hi ha tres tipus principals de substàncies químiques amb importància sistemàtica: els acetilens, les lactones sesquiterpèniques i els flavonoides (respectivament, Greger, 1977; Seaman, 1982; Bohm i Stuessy, 2001)-, les fulles dissectes, les bràctees de l'involucre amb el marge escariós i el vilà no hirsut (quan és present). Estudis filogenètics recents (Kim i Jansen, 1995; Bayer i Starr, 1998; Panero i Funk, 2002) indiquen, amb més o menys suport, que el grup germana de les Anthemideae és la tribu Astereae. La monofília de la tribu no és clara (Watson *et al.*, 2000; Oberprieler, 2005) i estudis de filogènia molecular actuals (en els grans grups centrals de la tribu: *Achillea*, *Anthemis*, *Artemisia* i *Tanacetum*) mostren que les seves delimitacions genèriques també necessiten revisió.

i. Subtribu *Artemisiinae*

Segons la revisió més recent de la família el grup *Artemisia* forma part del grau asiàtic (Oberprieler *et al.*, 2007) i inclou els gèneres *Artemisia* (522 espècies), *Sphaeromeria* (nou espècies), *Neopallasia* (tres espècies), *Crossostephium*, *Filifolium*, *Mausolea*, *Picrothamnus* i *Artemisiella* (tots monotípics). Prèviament, i en un sentit més ampli, Bremer i Humphries (1993) i Bremer (1994) havien considerat la subtribu *Artemisiinae*, que incloïa tots aquests gèneres, excepte *Artemisiella*, i onze més (*Ajania*, *Ajaniopsis*, *Arctanthemum*, *Brachanthemum*, *Dendranthema*, *Kaschgaria*, *Phaeostigma*, *Seriphidium*, *Stinolepis*, *Tridactylina*, i *Turaniphytum*), la majoria dels quals passen actualment a formar part del grup *Ajania* L. Segons Oberprieler *et al.* (2007) es considera que la delimitació de la subtribu *Artemisiinae sensu* Bremer i Humphries (1993) és problemàtica, en base a diferents estudis de filogènia molecular (Kornkven *et al.*, 1998, 1999; Torrell *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2002; Vallès *et al.*, 2003), i la nova ordenació proposada (Oberprieler *et al.*, 2007), ordena i agrupa els gèneres seguint criteris biogeogràfics.

ii. El gènere *Artemisia*

Artemisia és un dels gèneres més grans de la família *Asteraceae* i el més gran de la seva tribu, amb unes 522 espècies (Kubitzki, 2007). És d'àmplia distribució a l'hemisferi Nord, principalment en zones temperades (Bremer, 1994) i molt poc freqüent a l'hemisferi Sud, on no hi ha més de 10 representants. Es considera que el seu centre primari de diversitat i especiació és l'Àsia central, i altres centres en són les regions iranoturànica, Mediterrània i Nord-americana. La plasticitat ecològica del gènere és remarcable i, si bé es considera un grup particularment adaptat a condicions d'aridesa, els hàbitats que colonitza comprenen àrees desèrtiques, ambients humits i des del nivell del mar a l'alta muntanya. S'hi troben des d'espècies endèmiques (*A. barrelieri* o *A. molinieri*), algunes d'elles en perill d'extinció (*A. granatensis*), fins a espècies ruderals o inclús invasores, com *A. vulgaris* o *A. frigida*. Tanmateix, encara que la majoria d'artemísies creixen esparses o en petites poblacions, d'altres formen grans comunitats que dominen el paisatge, particularment les espècies dels subgèneres *Seriphidium* i *Tridentatae* (Vallès i McArthur, 2001).

Moltes espècies del gènere tenen interès econòmic en diversos camps, com la medicina (l'artemisinina, extreta d'*A. annua*, s'utilitza en la lluita contra la malària), l'alimentació (l'estragó, *A. dracunculus*, és usat com a condiment), com a agents estabilitzadors del sòl (*A. vulgaris*) o com a plantes ornamentals (*A. arborescens*, *A. ludoviciana*), entre molts altres usos. Un tret distintiu de moltes de les espècies d'*Artemisia* és l'olor camforada que desprenen, provinent, principalment, de components químics mono- i sesquiterpènics, localitzats en pèls glandulars i en canals secretors esquizògens (Greger, 1977).

Les artemísies són majoritàriament perennes, i formen arbustos o mates. Trobar-hi herbes perennes, i encara més, herbes anuals o biennals és rar (Bremer i Humphries, 1993); es considera que únicament al voltant d'una desena d'espècies del gènere no són anuals (Vallès i McArthur, 2001). Des del punt de vista morfològic, els capítols florals (petits i de forma ovoide, semiesfèrica o cilíndrica) són constituïts per flors flosculoses (de 4 a 40) i cap de ligulada, i apareixen agrupats en sinflorescències racemoses o paniculades. La corol·la, de colors blanquinosos, grocs o porpres, és molt poc vistosa, amb un receptacle pla o cònic, de vegades pilós (Bremer, 1994). Les fulles són alternades o esparses, sovint dividides (malgrat excepcions notables com moltes espècies del

subgènere *Dracunculus*, en que són senceres) i de diverses formes i mides. Els aquenís també són característics del gènere, petits, obovoides, lateralment comprimits i amb unes estries longitudinals de color marró clar, fosc o grisós i sense pappus. La morfologia del pol·len, d'altra banda, ha constituït un marcador útil per a aquest gènere, ja que la poca ornamentació de l'exina característica de tots els seus membres (verrucosa) els diferencia d'altres components de la tribu *Anthemideae*, que presenten una ornamentació de tipus espinulós (Wodehouse, 1926; Vallès *et al.*, 1987). Aquest tret ha servit també per a distingir *Artemisia* i alguns dels gèneres que hi són estretament vinculats d'altres gèneres propers (Martín *et al.*, 2001, 2003).

Un altre tret que diferencia els membres d'*Artemisia* de la resta de les *Anthemideae* i també de moltes *Asteraceae* és l'època de pol·linització i floració, ja que, majoritàriament, les espècies d'aquest gènere floreixen a la tardor. La pol·linització, a més, és bàsicament anemògama, una altra característica que només comparteixen *Artemisia* i els gèneres molt relacionats dins la tribu *Anthemideae* (encara que hi ha evidència de cert grau de pol·linització entomògama; Vallès *et al.*, 1987).

La història taxonòmica d'aquest grup, com en moltes altres asteràcies, és complexa, i encara no existeix un tractament del gènere globalment acceptat. Els primers treballs sobre les espècies que avui constitueixen *Artemisia* les van repartir en tres gèneres, definits per Tournefort (1700) (*Abrotanum*, *Absinthium* i *Artemisia*), que Linné (1835) va agrupar subseqüentment sota el nom d'*Artemisia*. Cassini (1817) i Lessing (1832) transferiren certes espècies a un nou gènere, *Oligosporus* Cass., que és l'actual subgènere *Dracunculus*. Besser (1829, 1832, 1834, 1835) fou el primer a abordar la classificació infragenèrica (subgèneres *Absinthium*, *Abrotanum*, *Artemisia* i *Dracunculus*), seguida també per De Candolle en el seu tractament (1837). Després s'han anat fent altres propostes en què s'intenta obtenir una agrupació més propera a la natural on o bé s'aglutinen o bé es divideixen els diferents grups creats (Rouy, 1903; Poljakov, 1961; Persson, 1974; Tutin *et al.*, 1976; McArthur *et al.*, 1981; Ling, 1991a, 1991b, 1995a, 1995b).

No obstant això hi ha agrupacions basades en caràcters florals que s'han mantingut més o menys constants en totes les classificacions d'*Artemisia*. En primer lloc, el subgènere *Artemisia*, que es caracteritza per capítols heterògams amb flors exteriors femenines, flors centrals hermafrodites i fèrtils i receptacle glabre; després, *Absinthium*, que comprèn espècies de les mateixes característiques que el subgènere *Artemisia* però amb el receptacle pilós (de fet, alguns autors el consideren secció d'aquest darrer subgènere; Poljakov, 1961); a continuació el subgènere *Dracunculus*, definit per capítols

heterògams, de flors exteriors femenines i flors centrals hermafrodites però funcionalment masculines i receptacle glabre; i, finalment, el subgènere *Seriphidium*, amb capítols homògams de flors hermafrodites i receptacle també glabre. És de remarcar que Rydberg (1916) va crear un grup dins de *Seriphidium*, la secció *Tridentatae*, per a incloure els tàxons arbustius nord-americans d'aquest subgènere, secció que posteriorment fou elevada a nivell subgènic per McArthur *et al.* (1981).

Amb l'adveniment de la seqüenciació del DNA i altres tècniques moleculars, la sistemàtica d'*Artemisia* ha estat objecte d'estudi per part de diversos autors, ja sigui analitzant les seqüències dels espaiadors transcrits intern i extern (ITS i ETS) de l'ADN ribosòmic nuclear (Kornkven i Watson, 1997; Kornkven *et al.*, 1998; Torrell *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2002; Vallès *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, sotmès), el gen cloroplàstic *ndhF* (Watson *et al.*, 2000), els llocs de restricció del DNA cloroplàstic (Kornkven *et al.*, 1999), o el DNA polimòrfic amplificat a l'atzar (RAPD; McArthur *et al.*, 1998). Aquests treballs, si bé donen, a grans trets, resultats congruents, encara no permeten una classificació definitiva d'aquest grup, probablement perquè esdeveniments d'hibridació i poliploidia múltiples i recurrents dificulten establir-ne un marc filogenètic clar. Per a aquest treball, i particularment considerant les conclusions de Torrell *et al.* (1999) i Vallès *et al.* (2003), s'ha adoptat la classificació que divideix el gènere en cinc subgèneres: *Artemisia*, *Absinthium*, *Dracunculus*, *Seriphidium* i *Tridentatae*.

iii. El subgènere *Tridentatae*

Un dels grups en què aquest treball de tesi aprofundeix especialment des de diversos punts de vista és el subgènere *Tridentatae* d'*Artemisia*. Com s'ha apuntat anteriorment, és un grup endèmic d'Amèrica del Nord, i és de particular interès en la història evolutiva d'aquest gènere. Les *Tridentatae* (popularment anomenades *sagebrushes*) caracteritzen el paisatge de l'oest nord-americà, i són, amb tota probabilitat, els arbusts més comuns de l'oest dels Estats Units d'Amèrica. Es tracta, aproximadament, d'una dotzena d'espècies (depenent dels autors), totes elles perennes i xerofítiques malgrat que poden colonitzar un ampli rang ecològic, des de seques planúries fins a cims de muntanya amb taxes de precipitació més elevades (West, 1983). La hibridació i/o la poliploidia han participat activament en l'evolució i diversificació del grup; es coneixen multitud de tàxons d'origen híbrid i se n'han trobat fins al nivell octaploide. Des dels primers treballs en aquestes espècies (Pursh, el 1814, va descriure la

primera espècie del grup, *Artemisia cana*), la classificació de les *Tridentatae* infragenèrica i supragenèrica ha estat molt dificultosa. En primer lloc, l'emplaçament subgenèric ja és motiu de controvèrsia, perquè tradicionalment han estat immerses en el subgènere *Seriphidium* (per bé que com a secció, segons Rydberg, 1916) en base a la morfologia floral, ja que totes les seves espècies (excepte *Artemisia bigelovii*) presenten capítols homògams de flors hermafrodites i receptacle glabre. Com s'ha mencionat en l'apartat anterior, McArthur *et al.* (1981) van elevar a subgènere aquesta secció, i explicaren les similituds entre aquest i *Seriphidium* com a producte d'una evolució convergent. De fet, *Seriphidium* ha estat segregat com a gènere independent d'*Artemisia* per diversos autors (Bremer i Humphries, 1993; Bremer, 1994; Ling, 1991a, 1995b), malgrat que aquesta separació no té el suport d'estudis moleculars més recents (Kornkven *et al.*, 1998, 1999; Torrell *et al.*, 1999; Vallès *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, *sotmès*).

Les relacions interespecífiques i els límits del subgènere *Tridentatae* també són complicats, tot i que generalment es considera un grup monofilètic (Kornkven *et al.*, 1998, 1999; Torrell *et al.*, 1999; Vallès *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, *sotmès*; Garcia *et al.*, *inèdit*). De fet, s'hi havien arribat a proposar dos llinatges (Ward, 1953; Beetle, 1960; Shultz, 1983), però tampoc no tenen el suport d'estudis posteriors. Particularment, algunes espècies han estat incloses i excloses del grup en repetides ocasions (*A. bigelovii*, *A. californica*, *A. filifolia*, *A. palmeri*, *A. pygmaea*, i *A. rigida*). Per a afegir dificultat a la sistemàtica del grup, *Sphaeromeria* i *Picrothamnus*, dos gèneres endèmics nordamericans estretament relacionats amb *Artemisia*, han aparegut dins de la clada de les *Tridentatae* en treballs recents de filogènia molecular (Watson *et al.*, 2002; Vallès *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, *sotmès*; Garcia *et al.*, *inèdit*). A hores d'ara, encara no es disposa d'un marc filogenètic adient per a aquestes espècies malgrat els esforços continuats amb aquest objectiu.

c. La subtribu Matricariinae i el gènere *Tripleurospermum*

Les *Matricariinae*, a la qual pertany el gènere *Tripleurospermum* (objecte d'un dels treballs sobre quantitat de DNA d'aquesta treball de tesi) és la subtribu més gran de les *Anthemideae* pel què fa a nombre de gèneres. Segons Bremer (1994) conté 25 gèneres i unes 250 espècies. És de distribució pràcticament cosmopolita, amb la majoria de gèneres presents a la regió Mediterrània i a l'Àfrica del Sud. Inclou plantes herbàcies i arbustives, anuals i perennes i amb fulles sovint molt dividides (de vegades amb pocs lòbuls, senceres o ericoides). Els capítols tenen flors flosculoses i ligulades, amb el

receptacle majoritàriament no paleaci. Els aquenis presenten de 4 a 6 costelles característiques. L'últim tractament taxonòmic existent per a les *Asteraceae*, no obstant, tampoc no considera la subtribu *Matricariinae*, perquè, com en el cas de la subtribu *Artemisiinae*, la seva delimitació no és prou clara (Kubitzki, 2007); en aquest treball, el gènere *Tripleurospermum* és inclòs en el grup *Anthemis*, conjuntament amb els gèneres *Anthemis*, *Brocchia*, *Cota*, *Gonospermum*, *Nananthea* i *Tanacetum*.

Tripleurospermum és un gènere petit format per 38 espècies. Els seus límits amb el gènere *Matricaria*, en el que sovint s'hi han inclòs algunes de les seves espècies, són conflictius i de fet hi ha autors que no separen els dos gèneres (Applequist, 2002). D'altra banda, Kubitzki (2007), no només els considera gèneres diferents, sinó que inclús els classifica en grups diferents, i en aquest cas *Matricaria* apareix en el grup *Leucanthemopsis*. Moltes de les espècies de *Tripleurospermum* són plantes ruderals, i algunes tenen aplicació medicinal o ornamental. Es caracteritzen, entre d'altres trets, pel fet de ser plantes anuals o perennes amb fulles pinnatisectes, de capítols solitaris o en corimbes, pedunculats, radiats, disciformes o discoides. El gènere és distribuït per tot Europa i Àsia (part temperada), amb algunes espècies més cosmopolites (*T. maritimum*, *T. perforatum*).

2. OBJECTIUS

El treball de tesi que es presenta està emmarcat en la línia de recerca en organització i evolució del genoma i les seves implicacions biosistemàtiques i evolutives en membres de la família *Asteraceae*, que es duu a terme al Laboratori de Botànica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona i a l'Institut Botànic de Barcelona (CSIC-ICUB). En concret, aquesta tesi doctoral té com a fil conductor la determinació de la quantitat de DNA i la realització d'estudis citogenètics, i és centrat en diversos gèneres de la tribu Anthemideae, especialment en les seves subtribus *Artemisiinae* (gènere *Artemisia* i afins) i *Matricariinae* (gènere *Tripleurospermum*) (*sensu* Bremer, 1994). A més a més i en un nivell més particular, s'ha incidit en un grup concret del gènere *Artemisia*, el subgènere *Tridentatae* (*sensu* McArthur *et al.*, 1981) on s'han dut a terme, a part de determinacions de la quantitat de DNA, estudis més aprofundits que inclouen citogenètica i filogènia moleculars. És per això que en el marc taxonòmic ens hem referit

amb especial èmfasi a aquests grups i hem obviat una explicació més detallada dels que no formen part explícita d'aquest treball.

a. Estudis de la variació de la quantitat de DNA nuclear

El contingut de DNA nuclear és un caràcter de significat biològic fonamental, que es relaciona directament o indirectament amb diverses característiques fenotípiques i factors d'importància pel que fa a biologia reproductiva, ecologia o distribució geogràfica (Bennett, 1998), entre d'altres. S'expressa com el valor C, terme utilitzat per primer cop per Swift (1950) que es refereix a la quantitat de DNA per genoma haploide no replicat d'un gàmeta, independentment del nivell de ploïdia del tàxon i que és considerat constant per a una espècie (la "C" del terme prové de constància). Existeix una enorme diversitat pel que fa a quantitat de DNA en plantes, des dels 0,06 fins als 127,4 pg (en valor 1C, seguint la nova terminologia proposada per Greilhuber *et al.*, 2005). Malgrat tot, només es coneix el contingut de DNA d'aproximadament un 4-5% de les angiospermes i, per tant, el rang real de variació és incert. Afortunadament, diverses bases de dades recullen la informació disponible sobre quantitat de DNA en plantes, amb la qual cosa s'afavoreixen els estudis comparatius (<http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage>; <http://flower.web.ua.pt/>; vegeu també Gregory *et al.*, 2007).

Entendre el significat biològic d'aquesta diversitat ha intrigat els investigadors des de fa dècades, així com l'aparent manca de relació entre quantitat de DNA i la complexitat d'un organisme, qüestió inicialment coneguda com la "paradoxa del valor C" (Thomas, 1971). Posteriorment, la paradoxa s'ha resolt amb l'actual coneixement de la forma i la funció dels genomes, sabent que en molts organismes més del 90% del DNA no codifica per a gens, sinó que és DNA egoista o deixalla (*selfish* o *junk* DNA; Dawkins, 1976; Pagel i Johnstone, 1992), i es considera més correcte parlar d'enigma del valor C (Gregory, 2001). Segons Flavell (1980) en les angiospermes amb valor C més elevats el DNA no gènic pot arribar a constituir fins el 90-99% del genoma nuclear. Així doncs, la variació del valor C es podria deure a un augment en la quantitat de seqüències de DNA repetitiu, deixalla i/o egoista, ja sigui per mecanismes de duplicació o amb la intervenció d'elements transposables, sense oblidar-nos de la poliploïdia o l'aparició de cromosomes B, fenòmens ja coneguts pel que fa a un augment més o menys dràstic de la quantitat de DNA.

Les dades de valors C s'utilitzen en diversos camps de la biologia i l'interès en l'obtenció de valors C és alt, si ens fixem en el nombre de noves estimacions publicades any rere any. Hi ha descrites al voltant d'unes 100 correlacions, tant positives com negatives, entre diferents paràmetres cel·lulars, tissulars i organísmics, i els nous treballs segueixen oferint resultats interessants i ampliant el rang de quantitats de DNA per a diferents grups d'organismes. De fet, amb el pas del temps i amb l'increment del nombre de treballs sobre aquest tema, cada cop ha anat esdevenint més clar que la variació de la quantitat de DNA té conseqüències no només en aquests nivells, sinó també en els nivells evolutiu i ecològic, influenciant com, quan i on una planta creixerà i les seves possibilitats de sobreviure en un món canviant (Leitch i Bennett, 2007).

Per a mesurar la quantitat de DNA es disposa de diverses tècniques, d'entre les quals la citometria de flux és la més comunament utilitzada, per la seva facilitat, rapidesa i precisió; aquesta tècnica ha estat l'escollida per a dur a terme la determinació de quantitat de DNA del present treball de tesi, amb els objectius principals de:

1. Aportar dades sobre quantitat de DNA d'un bon nombre d'espècies pertanyents al gènere *Artemisia* i gèneres afins (que permeti donar una idea sobre el rang de variació en aquest grup), així com també oferir una primera aproximació en aquest sentit d'un altre gènere de la mateixa tribu, *Tripleurospermum*.
2. Analitzar el significat biològic, sistemàtic i evolutiu de la variabilitat interespecífica, intentant detectar alguna relació més o menys significativa amb els trets morfològics, la filogènia o l'ecologia d'aquestes espècies, entre d'altres.
3. Establir quina relació existeix entre l'increment de la quantitat de DNA i el nivell de ploïdia per a aquestes espècies.
4. Posar de manifest el valor de les dades de quantitat de DNA en l'anàlisi de tàxons de posició sistemàtica conflictiva.
5. Aprofundir, en un grup concret d'espècies del gènere *Artemisia*, el complex d'*Artemisia arborescens*, en la possibilitat de variació intraespecífica, a part de constatar l'interès de la determinació de la quantitat de DNA en qüestions sobre l'origen d'algunes de les seves varietats de cultiu.
6. Finalment, des del punt de vista tècnic, convertir en rutinària al nostre laboratori la citometria de flux per a la determinació de la quantitat de DNA nuclear en plantes, tot acabant-ne la posada a punt, iniciada amb el treball de Torrell i Vallès (2001) en diverses espècies del gènere *Artemisia*.

b. Estudis de citogenètica clàssica i molecular

La citogenètica és la disciplina que estudia el cromosoma a qualsevol nivell o dimensió, i té com a objectiu fonamental analitzar-lo i explicar-ne l'estructura i comportament. S'hi inclouen els aspectes bàsics de la cariologia, com els recomptes cromosòmics en plaques metafàsiques, l'elaboració de cariotips, el bandatge amb fluorocroms (especialment per a detectar regions riques en bases A i T o G i C mitjançant l'ús de diferents fluorocroms), la localització dels *loci* de DNA ribosòmic mitjançant la hibridació *in situ* fluorescent (FISH), o la hibridació *in situ* genòmica (GISH), que permet de detectar l'origen genòmic de tàxons híbrids.

Des del punt de vista de la biosistemàtica, la citogenètica té aplicacions molt interessants, perquè aporta alhora informació sobre caràcters fenotípics (nombre, mida, simetria) i genotípics (localització de bandes heterocromàtiques, localització de certs gens, com els del DNA ribosòmic, o d'elements transposables). A més, les variacions en els cromosomes (ja sigui en mida, estructura o marcatge) ens poden ajudar a interpretar més adequadament les relacions entre espècies, els processos que han portat a la diversificació evolutiva i les direccions en què s'ha donat l'evolució.

Els estudis de citogenètica i cariologia en *Artemisia* són abundants (McArthur i Sanderson, 1999; Torrell *et al.*, 2003; Vallès *et al.*, 2003 i les seves referències), particularment pel que fa a recomptes cromosòmics, i es pot considerar que els nombres cromosòmics han estat determinats en aproximadament un 50% de les seves espècies. Aquests han permès de constatar l'existència de dos nombres cromosòmics bàsics, $x=9$ (present en tots els subgèneres) i $x=8$ (present només a *Absinthium*, *Artemisia i Dracunculus*), que es creu derivat de l'anterior per un procés de fusió cromosòmica (displòidia descendent; Vallès i Siljak-Yakovlev, 1997). També gràcies a tots aquests treballs s'ha vist que la poliploidia és especialment activa en *Artemisia*, i el nivell de ploïdia més alt conegut és l'hexaidecaploid (16x), trobat recentment (Pellicer *et al.*, 2007), tot i que la majoria d'espècies són diploides i tetraploides. Fenòmens com l'aneusomatia o la presència de cromosomes B són també relativament freqüents en aquest gènere (Vallès, 1987; McArthur i Sanderson, 1999; Kreitschitz i Vallès, 2003; Vallès i Garnatje, 2005). Així doncs, *Artemisia* es revela com un gènere molt interessant en el camp de la citogenètica, i encara queden per elucidar molts dels mecanismes que, a aquest nivell, han donat lloc a la seva actual diversitat i riquesa. Amb aquestes premisses, l'objectiu més general del nostre estudi en aquest apartat és:

1. Aportar noves dades sobre recomptes cromosòmics en espècies d'origen asiàtic (especialment de Mongòlia). Aquesta regió es considera un dels centres d'especiació i diversificació de la subtribu *Artemisiinae* i en particular del gènere *Artemisia*, i actualment no es disposa de gaires dades corresponents a aquesta part rellevant de l'àrea de distribució del gènere.

Particularment, en el subgènere *Tridentatae* d'*Artemisia* s'han dut a terme estudis més aprofundits, amb els objectius de:

2. Determinar l'estructura del cariotip, el nombre i la distribució de bandes (per mitjà del bandeig amb fluorocroms) riques en bases G-C i A-T, i, mitjançant la hibridació *in situ* fluorescent, la localització i l'organització de les famílies de gens de DNA ribosòmic 18S-5.8S-26S i 5S per a tractar d'elucidar l'existència d'un patró de marcatge particular i un idiograma que caracteritzi les espècies d'aquest subgènere i el diferenciï de la resta, comparant els resultats obtinguts amb treballs anteriors (Vallès i Siljak-Yakovlev, 1997; Torrell *et al.*, 2001; Torrell *et al.*, 2003).
3. Avaluar la utilitat dels estudis citogenètics en la classificació de la posició sistemàtica de tres espècies clàssicament problemàtiques des d'aquest punt de vista del grup: *A. bigelovii*, *A. pygmaea* i *A. rigida*. També hem analitzat *A. filifolia* des d'aquesta òptica, perquè treballs anteriors (McArthur i Pope, 1979; Kornkven *et al.*, 1999) n'havien suggerit una relació reticulada amb el grup de les *Tridentatae*.
4. Avaluar la presència de cromosomes B en el subgènere *Tridentatae* i comparar els resultats amb treballs anteriors d'aquest tipus en el grup (McArthur i Sanderson, 1999).
5. Descriure i analitzar canvis en l'organització del DNA ribosòmic i heterocromàtic o qualsevol reordenament cromosòmic relacionats amb l'increment de nivell de ploidia, mitjançant el seu estudi en poblacions diploides, tetraploides i en algun cas hexaploides de les mateixes espècies. També, mitjançant la hibridació *in situ* genòmica, aprofundir en el presumpte origen híbrid del tàxon hexaploide *A. arbuscula* ssp. *longicaulis*, al qual estudis previs donen suport (Winward i McArthur, 1995).
6. Determinar si la seqüència telomèrica de tipus *Arabidopsis* (TTTAGGG)ⁿ és present al gènere i mirar de trobar algun altre tipus de marcatge per a *Artemisia* que permeti caracteritzar més completament el seu cariotip.

7. Relacionar les dades de quantitat de DNA amb els canvis observats en la longitud total i estructura del cariotip, nombre de bandes heterocromàtiques i de *loci* del DNA ribosòmic.

c. Estudis de reconstrucció filogenètica

Cada organisme viu conté DNA, RNA i proteïnes, i organismes estretament relacionats generalment presenten una elevada congruència en l'estructura d'aquestes molècules, mentre que les molècules d'organismes més dèbilment emparentats sovint són més diferents entre sí. La sistemàtica molecular utilitza la informació proveïda per la comparació d'aquestes molècules, particularment el DNA, i mitjançant mètodes cladístics i filogenètics, elucida les relacions evolutives en un grup d'organismes, plasmant els seus resultats en els anomenats arbres filogenètics.

Tots tres genomes de què disposa la cèl·lula vegetal, el nuclear, el cloroplàstic i el mitocondrial, poden ser utilitzats en estudis de filogènia molecular, per bé que el primer i el segon són els més emprats amb aquesta finalitat. Particularment en la família de les *Asteraceae* l'anàlisi de l'espaiador transcrit intern (ITS, *internal transcribed spacer*) del DNA ribosòmic nuclear s'ha revelat especialment útil per a inferir-ne les relacions a nivells intergenèric i intragènere (Baldwin *et al.*, 1995), al qual posteriorment s'han sumat altres regions nuclears com l'espaiador transcrit extern (ETS, *external transcribed spacer*) o cloroplàstiques (*trnL*, *trnL/F*, *matK*), (Taberlet *et al.*, 1991; Khidir i Hongping, 1997; Linder *et al.*, 2000) que han anat afegint caràcters per a millorar la resolució de les reconstruccions filogenètiques.

En el grup que ens ocupa, el subgènere *Tridentatae* d'*Artemisia*, també s'han fet aproximacions a la seva sistemàtica amb treballs basats en dades moleculars. Un primer intent de resoldre les relacions filogenètiques en aquest subgènere fou realitzat per Kornkven *et al.* (1998) en base a l'anàlisi de fragments de restricció del DNA cloroplàstic en què, tot i que s'establí la monofília del grup amb alguna excepció notable, no s'arribaren a discernir les relacions entre les espècies d'aquest subgènere. Les dades que aporta un altre treball, basat en l'anàlisi de l'ITS del DNA ribosòmic nuclear (Kornkven *et al.*, 1999) tampoc no aconsegueixen elucidar quina és la relació entre els seus tàxons i, a més a més, troba incongruències notables amb el treball anterior. Com ja s'ha mencionat en l'apartat sobre el marc taxonòmic, la sistemàtica del grup esdevé encara més

complicada amb l'aportació de treballs posteriors (Watson *et al.*, 2002; Vallès *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, *sotmès*) quan espècies de dos gèneres propers, *Sphaeromeria* i *Picrothamnus*, també endèmics nord-americans, apareixen estretament relacionats amb la clada del grup *Tridentatae*. Probablement, processos evolutius de tipus reticulat (amb fenòmens d'hibridació, introgressió i poliploïdia) estiguin actuant en aquest conjunt de tàxons, i d'aquí la dificultat per a establir-ne un marc filogenètic adequat.

Coneixent els problemes que comporta l'anàlisi filogenètica d'aquest grup, hem tractat de resoldre les relacions interespecífiques de les *Tridentatae*, així com la seva posició en el gènere *Artemisia*, mitjançant un estudi filogenètic més complet que combina dades dels genomes nuclear (ITS i ETS) –tot i coneixent les limitacions que té l'ús d'aquests marcadors– i cloroplàstic (*trnS^{UGA}-trnM^{CAU}* i *trnS^{GCU}-trnC^{GCA}*), després de provar altres regions que hem abandonat per manca de caràcters informatius (com el també cloroplàstic *trnL-F*; o el gen de còpia única *ncpGS*, glutamina sintetassa). A més, s'inclou una representació exhaustiva de totes les espècies i subespècies de *Tridentatae*, de les altres artemísies endèmiques d'Amèrica del Nord i dels gèneres *Sphaeromeria* (amb més espècies que en treballs previs) i *Picrothamnus*. Resumidament, els objectius d'aquest treball de filogènia molecular són:

1. Examinar i avaluar la monofília i la circumscripció del subgènere *Tridentatae*.
2. Estudiar quin és el lligam de les *Tridentatae* amb els gèneres *Sphaeromeria* i *Picrothamnus* i quines poden ser les causes d'aquesta relació.
3. Resoldre relacions a nivell subgenèric, avaluant, per exemple, l'existència de llinatges prèviament proposada per Ward (1953), i les relacions interespecífiques, particularment aclarir la posició d'espècies tradicionalment conflictives des del punt de vista taxonòmic tant d'algunes de dins del grup *Tridentatae* com d'algunes d'estretament relacionades però clàssicament segregades (*A. filifolia*, *A. palmeri*).
4. Identificar l'emplaçament subgenèric de les altres artemísies endèmiques nord-americanes.
5. Examinar la congruència entre les filogènies obtingudes a partir de les dades del DNA nuclear i cloroplàstic, amb la finalitat d'avaluar possibles fenòmens de captura cloroplàstica o de flux gènic interespecífic.

3. Bibliografia

- APPLEQUIST, W. L. 2002. A reassessment of the nomenclature of *Matricaria* L. and *Tripleurospermum* Sch. Bip. (Asteraceae). *Taxon* 51: 757-761.
- BALDWIN, B. G., M. J. SANDERSON, J. M. PORTER, M. F. WOJCIECHOWSKI, C. S. CAMPBELL, AND M. J. DONOGHUE. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- BAYER, R. J. AND J. R. STARR. 1998. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the *trnL* intron and *trnL/trnF* intergenic spacer. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 242-256.
- BENNETT, M. D. 1998. Plant genome values: How much do we know? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2011-2013.
- BENNETT, M. D. AND I. J. LEITCH. 2005. Angiosperm DNA C-values database (release 4.0, Oct. 2005) <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>
- BESSER, W. S. J. G. 1829. Lettre de Mr. le Dr. Besser au directeur (« Synopsis Absinthiorum »). *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou* 1: 219-265.
- BESSER, W. S. J. G. 1832. Tentamen de *Abrotanis* seu de sectione II^{da} *Artemisiarum* Linnaei. Nouveau. *Mémoires de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou* 3: 5-92.
- BESSER, W. S. J. G. 1834. De *Seriphidiis* seu de sectione III^a *Artemisiarum* Linnaei. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou* 7: 5-46.
- BESSER, W. S. J. G. 1835. *Dracunculi* seu de sectione IV^{ta} et ultima *Artemisiarum* Linnaei. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou* 8: 3-97.
- BEETLE, A. A. 1960. A study of sagebrush, the section *Tridentatae* of *Artemisia*. In: Bulletin 368, University of Wyoming experiment station. Laramie, WY.
- BOHM, B.A. AND T.F. STUESSY. 2001. *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)*. Springer-Verlag, Vienna.
- BREMER, K. AND C. J. HUMPHRIES. 1993. Generic monograph of the Asteraceae-Anthemideae. *Bulletin of the Natural History Museum of London (Botany)* 23: 71-177.
- BREMER, K. 1994. Asteraceae: cladistics and classification. Portland: Timber Press.
- CASSINI, A. H. G. 1817. Aperçu des genres formés par M. Cassini dans la famille des Synantherées. Troisième fascicule. *Bulletin des Sciences par la Société Philomatique*. Paris 3: 31-34.
- DAWKINS, R. 1976. *The Selfish Gene*. Oxford: Oxford University Press.
- DE CANDOLLE, A. P. 1837. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Paris.
- FLAVELL, R. 1980. The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 569-59.
- FUNK, V. A., R. J. BAYER, S. KEELEY, R. CHAN, L. WATSON, B. GEMEINHOLZER, E. SCHILLING, J. L. PANERO, B. G. BALDWIN, N. GARCIA-JACAS, A. SUSANNA AND R. K. JANSEN. 2005. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. In: Friis, I. & Balslev, H. (eds.). *Biologiske Skrifter* 55: 343-373.

- GREILHUBER, J., J. DOLEŽEL, M. LYSÁK AND M. D. BENNETT. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms "genome size" and "c-value" to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* 95: 255-260.
- GREGER, H. 1977. Anthemideae-Chemical Review. In: *The Biology and Chemistry of the Compositae*, vol.2. Eds. V.H. Heywood, J.B. Harborne, and B.L. Turner. London, Academic Press: 899-941.
- GREGORY, T. R. 2001. Coincidence, coevolution and causation? DNA content, cell size and the C-value enigma. *Biological Reviews* 76: 65-101.
- GREGORY, T. R., J. A. NICOL, H. B. TAMM, K. KULLMAN, I. J. LEITCH, B. G. MURRAY, D. F. KAPRAUN, J. GREILHUBER AND M. D. BENNETT. 2007. Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Research* 35: 332-338.
- HIDALGO, O. 2006. El grupo *Rhaponticum* (Asteraceae, *Cardueae*, *Centaureinae*): delimitación y filogenia. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- KORNKVEN, A. B., L. E. WATSON AND J. R. ESTES. 1998. Phylogenetic analysis of *Artemisia* sect. *Tridentatae* (Asteraceae) based on sequences from the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 85: 1787-1795.
- KORNKVEN, A. B., L. E. WATSON AND J. R. ESTES. 1999. Molecular phylogeny of *Artemisia* sect. *Tridentatae* (Asteraceae) based on chloroplast DNA restriction site variation. *Systematic Botany* 24: 69-84.
- KHIDIR, W. H. AND L. HONGPING. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany* 19: 830-839.
- KIM, K. J. AND R. K. JANSEN. 1995. *ndhF* sequence evolution and the major clades in the Sunflower family. *Proceedings of the National Academy of the United States of America* 92: 10379-10383.
- KREITSCHITZ, A., AND J. VALLÈS. 2003. New or rare data on chromosome numbers in several taxa of the genus *Artemisia* (Asteraceae) in Poland. *Folia Geobotanica* 38: 333-343.
- KUBITZKI, K. 2007. The families and genera of vascular plants. Vol VIII Flowering plants. Eudicots. Asterales. Editors: J. W. Kadereit and C. Jeffrey. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- LESSING, C. F. 1832. *Synopsis generum Compositarum*. Berlin.
- LEITCH, I. J. AND M. D. BENNETT. 2007. Genome size and its uses. The impact of flow cytometry. In: Dolezel, J., J. Greilhuber, and J. Suda (eds.). *Flow cytometry with plant cells*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- LINDER, C. R., L. R. GOERTZEN, B. VANDEN HEUVEL, J. FRANCISCO-ORTEGA AND R. K. JANSEN. 2000. The complete External Transcribed Spacer of 18S - 26S rDNA: Amplification and Phylogenetic utility at low taxonomic levels in the Asteraceae and closely allied families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19:167-176.
- LING, Y. R. AND Y. R. LING. 1978. *Elachanthemum*, genus novum familiae Compositarum. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 16(1): 61-65.
- LING, Y. R. 1982. On the system of the genus *Artemisia* L. and the relationship with its allies. *Bulletin of Botanical Research, Harbin* 2(2):1-60.
- LING, Y. R. 1991a. The Old World *Seriphidium* (Compositae). *Bulletin of Botanical Research, Harbin* 11(4):1-40.
- LING, Y. R. 1991b. The Old World *Artemisia* (Compositae). *Bulletin of Botanical Research, Harbin* 12(1):1-108.
- LING, Y. R. 1995a. The New World *Artemisia* L. In: Hind DJN, Jeffrey C, Pope GV (ed.), *Advances in Compositae systematics*. Kew: Royal Botanic Garden, 255-281.

- Ling YR. 1995b. The New World *Seriphidium* (Besser) Fourr. In: Hind DJN, Jeffrey C, Pope GV (ed.), *Advances in Compositae systematics*. Kew: Royal Botanic Garden, 283-291.
- LINNÉ C. 1735. *Systema naturae*. Leiden.
- MARTÍN, J., M. TORRELL, A. A. KOROBKOV AND J. VALLÈS. 2003. Palynological features as a systematic marker in *Artemisia* L. and related genera (Asteraceae, Anthemideae) II: implications for subtribe Artemisiinae delimitation. *Plant Biology* 5: 85-93.
- MARTÍN, J., M. TORRELL AND J. VALLÈS. 2001. Palynological features as a systematic marker in *Artemisia* L. and related genera (Asteraceae, Anthemideae). *Plant Biology* 3: 372-378.
- MCARTHUR, E. D., J. MUDGE, R. VAN BUREN, W. R. ANDERSEN, S. C. SANDERSON AND D. G. BABEL. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of *Artemisia* subgenus *Tridentatae* species and hybrids. *Great Basin Naturalist* 58: 12-27.
- MCARTHUR, E. D. AND E. L. POPE. 1979. Karyotypes of four *Artemisia* species: *A. carruthii*, *A. filifolia*, *A. frigida* and *A. spinescens*. *Great Basin Naturalist* 39: 419-426.
- MCARTHUR, E. D., E. L. POPE AND D. C. FREEMAN. 1981. Chromosomal studies of subgenus *Tridentatae* of *Artemisia*: evidence for autopolyploidy. *American Journal of Botany* 68(5): 589-605.
- MCARTHUR E. D. AND S. C. SANDERSON. 1999. Cytogeography and chromosome evolution of subgenus *Tridentatae* of *Artemisia* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 86: 1754-1775.
- NOYES R. D. AND L. H. RIESBERG. 1999. ITS sequence data support a single origin for North American Astereae (Asteraceae) and reflect deep geographic divisions in *Aster s.l.* *American Journal of Botany* 86: 398-412.
- OBERPRIELER, CH. 2005. Temporal and spatial diversification of Circum-Mediterranean Compositae-Anthemideae. *Taxon* 54: 951-966.
- OBERPRIELER, CH., R. VOGT AND L. E. WATSON. 2007. Tribe Anthemideae. Vol VIII Flowering plants. Eudicots. Asterales (editors: J. W. Kadereit and C. Jeffrey), In: K. Kubitzki (ed.), *The families and genera of vascular plants*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- PAGEL, M. AND R. A. JOHNSTONE. 1992. Variation across species in the size of nuclear genome supports the junk-DNA explanation for the C-value paradox. *Proceedings of the Royal Society of London, Botany* 24: 119-124.
- PANERO, J. L. AND V. A. FUNK. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the *Compositae* (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115: 909-92.
- PELLICER, J., S. GARCIA, T. GARNATJE, O. HIDALGO, A. A. KOROBKOV, SH. DARIIMAA AND J. VALLÈS. 2007. Chromosome counts in Asian *Artemisia* L. (Asteraceae) species: from diploids to the first report of the highest polyploid in the genus. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 301-310.
- PERSSON, K. 1974. Biosystemtic studies in the *Artemisia maritima* complex in Europe. *Opera Botanica* (Lund.) 35: 1-188.
- POLJAKOV, P. P. 1961a. Materialy k sistematike roda polyn'-*Artemisia* L. Trudy Inst. Bot. Akad. Nauk Kazaksh. S.S.R. 11: 134-177.-1961b. Rod 1550. Polyn'-*Artemisia* L. In: Komarov, VL (ed.), *Flora SSSR*; 26. Leningrad.
- POLJAKOV, P.P. 1961b. Rod 1550. Polyn-Artemisia L. In: B.K. Shishkin and E.G. Bobrov (eds.), *Flora SSSR*, vol. 25, Leningrad.
- PURSH, F. T. 1814. *Flora Americae septentrionalis*. White, Cochrane and Co., London.

- ROUY, C. C. 1903. Flore de France 8. Paris, France
- RYDBERG, P. A. 1916. *Artemisia* and *Artemisiastrum*. *North American Flora* 34: 244-285.
- SANZ, M., R. VILATERSANA, O. HIDALGO, N. GARCIA-JACAS, A. SUSANNA, G. M. SCHNEEWEISS AND J. VALLÈS. Molecular phylogeny and evolution of floral characters of *Artemisia* and allies (Anthemideae, Asteraceae): evidence from nrDNA ETS and ITS sequences. *Taxon*, sotmès.
- SEAMAN, F. C. 1982. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Botanical Review* 48: 121-595.
- SHULTZ, L. M. 1983. *Artemisia*, sagebrush. In: J. C. Hickman (ed.). The Jepson Manual, higher plants of California, 202-205. University of California Press, Berkeley, USA.
- SWIFT, H. 1950. The constancy deoxyribose nuclei acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 36: 643-654.
- TABERLET, P., L. GIELLY, G. PAUTOU AND J. BOUVET. 1991. Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- THOMAS, C. A. 1971. The genetic organization of chromosomes. *Annual Review of Genetic* 5: 237-256.
- TORRELL, M., N. GARCIA-JACAS, A. SUSANNA AND J. VALLÈS. 1999. Infrageneric phylogeny of the genus *Artemisia* L. (Asteraceae, Anthemideae) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *Taxon* 48:721-736.
- TORRELL, M., M. CERBAH, S. SILJAK-YAKOVLEV AND J. VALLÈS. 2001. Étude cytogénétique de trois taxons du complexe d'*Artemisia campestris* L. (Asteraceae, Anthemideae): localisation de l'hétérochromatine et de l'ADN ribosomique. *Bocconeia* 13: 623-628.
- TORRELL, M., M. CERBAH, S. SILJAK-YAKOVLEV AND J. VALLÈS. 2003. Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescent *in situ* hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant Systematics and Evolution* 239: 141-153.
- TORRELL, M. AND J. VALLÈS. 2001. Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary and ecological implications. *Genome* 44: 231-238.
- TOURNEFORT, J. P. 1700. *Institutiones rei herbariae*. Paris.
- TUTIN, T. G. 1976. *Soliva* Ruiz & Pavon, and *Gymnostyles* Juss. In: Tutin, T. G.; Heywood, V. H.; Burges, N. A.; Moore, D. M.; Valentine, D. H.; Walters, S. M.; Webb, D. A. (eds.), *Flora Europaea*, Vol. 4. Cambridge, Cambridge University Press. 178.
- VALLÈS, J. AND T. GARNATJE. 2005. *Artemisia* and its allies: genome organization and evolution and their biosystematic, taxonomic, and phylogenetic implications in the Artemisiinae and related subtribes (Asteraceae, Anthemideae). In: *Plant genome: biodiversity and evolution* (eds. Sharma AK, Sharma A). Vol 1 part B. pp 255-285.
- VALLÈS, J. AND E. D. MCARTHUR. 2001. *Artemisia* systematics and phylogeny: cytogenetic and molecular insights. In *Proceedings: Shrubland Ecosystem Genetics and Biodiversity; 2000 June 13-15; Provo, UT* (McArthur Ed, Fairbanks DJ, eds.), Ogden: U. S. Department of Agriculture Forest Service, Rocky Mountain Research Station.
- VALLÈS, J. AND S. SILJAK-YAKOVLEV. 1997. Cytogenetic studies in the genus *Artemisia* L.: fluorochrome banded karyotypes of five taxa, including Iberian endemic species *Artemisia barrelieri* Besser. *Canadian Journal of Botany* 75: 595-606.

- VALLÈS, J., M. SUÁREZ AND J. A. SEOANE. 1987. Estudio palinológico de las especies ibérico-baleáricas de las secciones *Artemisia* y *Seriphidium* Bess. del género *Artemisia* L. *Acta Salmanticensia, Ciencias* 66: 167-174.
- VALLÈS, J., M. TORRELL, N. GARCIA-JACAS AND L. A. KAPUSTINA. 2001b. New or rare chromosome counts in the genera *Artemisia* L., and *Mausolea* Bunge (Asteraceae, Anthemideae) from Uzbekistan. *Botanical Journal of the Linnean Society* 135: 391-400.
- VALLÈS, J., M. TORRELL, T. GARNATJE, N. GARCIA-JACAS, R. VILATERSANA AND A. SUSANNA. 2003. The genus *Artemisia* and its allies: phylogeny of the subtribe Artemisiinae (Asteraceae, Anthemideae) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *Plant Biology* 5: 274-284.
- WARD, G. H. 1953. *Artemisia* section *Seriphidium* in North America: a cytotaxonomic study. *Contributions from the Dudley Herbarium* 4: 155-205.
- WATSON, L. E., TIMOTHY M. E. AND T. BOLUARTE. 2000. Molecular phylogeny and biogeography of tribe Anthemideae (Asteraceae), based on chloroplast gene *ndhF*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 59-69.
- WATSON, L. E., P. L. BATES, T. M. EVANS, M. M. UNWIN, AND J. R. ESTES. 2002. Molecular phylogeny of subtribe Artemisiinae (Asteraceae), including *Artemisia* and its allied and segregate genera. *BMC Evolutionary Biology* 2: 17.
- WEST, N. E. 1983. Western intermountain sagebrush-steppe. In N. E. West (ed.) *Ecosystems of the world 5, temperate deserts and semi-deserts*, 351-374. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam NL.
- WINWARD, A. H. AND E. D. MCARTHUR. 1995. Lahontan sagebrush (*Artemisia arbuscula* ssp. *longicaulis*): a new taxon. *Great Basin Naturalist* 55: 151-157.
- WODEHOUSE, R. P. 1928. Pollen grains in the identification and classification of plants II: *Barnadesia*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 55: 449-462.