

Cheirolophus intybaceus (Asteraceae, Centaureinae) o la constància del valor 2C

T. GARNATJE¹, S. GARCIA¹, O. HIDALGO², J. PELLICER³,
I. SÁNCHEZ-JIMÉNEZ¹ & J. VALLÈS³

¹Institut Botànic de Barcelona (CSIC-ICUB), Pg. del Migdia s/n, 08038 Barcelona, Catalunya, Espanya.

²Plant Development and Evolution, Department of Environmental and Plant Biology, Ohio University,
500 Porter Hall, 45701 Athens, Ohio, Estats Units d'Amèrica.

³Laboratori de Botànica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona,
Catalunya, Espanya.

Autor per a correspondència: T. Garnatje (tgarnatje@ibb.csic.es)

Rebut 2 febrer 2009; Acceptat 26 febrer 2009

Abstract

Cheirolophus intybaceus (Asteraceae, Centaureinae) or the constancy of 2C value.- *Cheirolophus intybaceus* is a heliophyte growing in thermal Mediterranean scrublands along a coastal belt of 50 km large, stretching from Toulon (France) to the Southern part of the Iberian Peninsula, occurring also in the Balearic Islands (with the exception of Minorca). Moreover, this species is also growing in high and sunny lands in the Mediterranean river basins, constituting a complex of taxa closely related among them.

The objectives of this work are: i) to provide new genome size data for some Asteraceae species; ii) to study the variation of DNA amount along a species distribution area; iii) to evaluate the discrimination capability of this parameter at low taxonomic levels.

A significantly positive correlation between the DNA amount and the latitude has been found, that is, in drier and warmer habitats genome size tends to decrease in this species.

The variation in the whole distribution area of *Ch. intybaceus* is 1.15-fold. This low variability supports the constancy of 2C-value.

Key words: Asteraceae; *Cheirolophus*; Compositae; DNA amount; genome size; 2C-value.

Resumen

Cheirolophus intybaceus (Asteraceae, Centaureinae) o la constància del valor 2C.- *Cheirolophus intybaceus* es una especie heliófila propia de los matorrales mediterráneos termófilos que crece en una franja litoral de unos 50 km de anchura que va desde Tolón (Var, Francia) hasta el sur de la península Ibérica, estando también presente en las islas Baleares (excepto en Menorca). Se encuentra también en las zonas elevadas y soleadas de las cuencas fluviales mediterráneas, formando un complejo de táxones estrechamente relacionados entre sí.

Los objetivos de este trabajo son: i) contribuir a la aportación de datos de tamaño del genoma para diversas especies de Asteraceae; ii) estudiar la variación de la cantidad de ADN a lo largo del área de distribución de una especie; iii) evaluar la capacidad de discriminación de este parámetro a niveles taxonómicos bajos.

Se ha encontrado una correlación positiva y significativa entre la cantidad de ADN y la latitud, es decir, que en hábitats con menor pluviosidad y más cálidos el tamaño del genoma tiende a disminuir en esta especie.

La variación en todo el área de distribución de *Ch. intybaceus* es de 1,15 veces. Nos encontramos, por lo tanto, ante un caso de baja variabilidad que apoya la constancia del valor 2C.

Palabras clave: Asteraceae; cantidad de ADN; *Cheirolophus*; Compositae; tamaño del genoma; valor 2C.

INTRODUCCIÓ

El gènere *Cheirolophus* Cass. (*Asteraceae*, *Centaureinae*) conté unes 20 espècies distribuïdes a la Mediterrània occidental i la Macaronèsia. La majoria d'aquestes espècies ocupen àrees força restringides i amb un elevat grau d'endemisme, i tan sols tres espècies, *Cheirolophus intybaceus* (Lam.) Dostál, *Cheirolophus sempervirens* Pomel i *Cheirolophus uliginosus* (Brot.) Dostál, tenen una àmplia distribució. *Cheirolophus intybaceus* viu a la franja litoral que va des de Toló (Var, França) fins al sud de la península Ibèrica essent també present a les illes Balears (excepte a Menorca). Es tracta d'una espècie heliòfila –pròpia dels matollars mediterranis termòfils– que creix en els espais oberts –defugint la competència d'altres espècies– dels sòls margosos orientats a mar, sovint en roques i penya-segats.

A més d'aquesta banda litoral d'uns 50 km d'amplada, aquesta espècie també és present a les zones elevades i assolellades de les conques fluvials mediterrànies, tot evitant així la forta inversió tèrmica que es produeix en les parts baixes d'aquestes zones durant les èpoques hivernals. Sovint trobem *Ch. intybaceus* creixent prop de les roques, aprofitant els petits regalims intermitents d'aigua que li permeten suportar l'aridesa del clima mediterrani. De fet, presenta formes de creixement amb caràcters que indiquen adaptació a les altes temperatures de les hores centrals del dia degudes a la continentalitat (P. Montserrat, com. pers. 2008) com les bases de les tiges notablement llenyoses, l'absència de fulles en aquestes zones basals i unes branques llargues que allunyen els capítols de les roques calentes, alhora que els fan més visibles als pol·linitzadors.

Malgrat que la relació d'aquesta espècie amb les seves congèneres no és del tot clara (Garnatje *et al.*, 1998; Susanna *et al.*, 1999; Garnatje *et al.*, 2007a), hi ha un cert complex de tàxons que es troben estretament relacionats entre sí i que sempre apareixen formant un grup natural en els arbres filogenètics (Susanna *et al.*, 1999; Garnatje *et al.*, 2007a). Ens referim a tres espècies que han estat descrites dins de l'àrea de distribució de *Ch. intybaceus* i que presenten, segons els autors que les descriuen, diferències morfològiques prou significatives com per a segregar-les de l'espècie anterior. Es tracta de *Cheirolophus grandifolius* (Font Quer) Stübing, Peris, Olivares & Martín (Stübing *et al.*, 1997), que ocupa els territoris balearics, *Cheirolophus lagunae* Olivares, Peris,

Stübing & Martín (Olivares *et al.*, 1995), endèmica del cap Prim i la Caleta, prop de Xàbia (Alacant), i *Cheirolophus mansanetianus* Stübing, Peris, Olivares & Martín (Stübing *et al.*, 1997), espècie descrita del cap de Gata (Almeria). També han estat descrites nombroses varietats de *Ch. intybaceus*, algunes de les quals analitzem en el present treball, malgrat que alguns autors no les considerin vàlides (Susanna, 1989); es tracta de *Ch. intybaceus* var. *capillifolia* Sandwith ex Lacaita, descrita de Benitatxell (Alacant), i de *Ch. intybaceus* var. *microcephala* Rouy, que es troba al cap de Leucate (Aude, França).

Des que Swift (1950) va proposar el terme “valor C” per a referir-se a la quantitat de DNA nuclear d'un genoma haploide no replicat d'un gàmeta, han estat nombrosos els treballs publicats sobre les implicacions biològiques d'aquest paràmetre (e.g. Bennett, 1972; Price & Bachmann, 1976; Vinogradov, 2003; Garcia *et al.*, 2004, 2008; Chase *et al.*, 2005), que remarquen l'interès de la mida del genoma en l'evolució tant de les plantes com dels animals. Pel que fa a *Cheirolophus*, Garnatje *et al.* (2007a) realitzaren una primera aproximació global sobre l'evolució de la mida del genoma en aquest gènere. A més, en altres gèneres basals de les *Centaureinae* s'han dut a terme treballs similars que han mostrat resultats notables (Hidalgo *et al.*, 2008; Hidalgo *et al.*, recerques inèdites) i també, en general, en nombroses espècies de la família *Asteraceae* per tal d'estudiar les possibles relacions entre la quantitat de DNA nuclear i altres paràmetres biològics (cicle de vida, sistema de reproducció, tipus biològic, etc.), cariològics, ecològics i biogeogràfics (Garnatje *et al.*, 2007b i referències que conté). Tot i que la mida del genoma nuclear s'ha mostrat com una eina molt útil per a revelar diferències entre tàxons propers, s'ha de tenir precaució a l'hora d'establir relacions entre el valor C i l'ecologia o la distribució de les plantes. Valors C semblants en espècies filogenèticament properes poden dependre més de compartir un ancestre comú que de les condicions ecològiques en les quals es desenvolupen (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2005).

Actualment, les dades sobre la mida del genoma constitueixen una informació bàsica per a la seqüenciació de genomes complets o per a recerques de biologia de poblacions mitjançant AFLPs (Fay *et al.*, 2005), estudis cada vegada més freqüents en el nostre àmbit de treball i només limitats per factors econòmics.

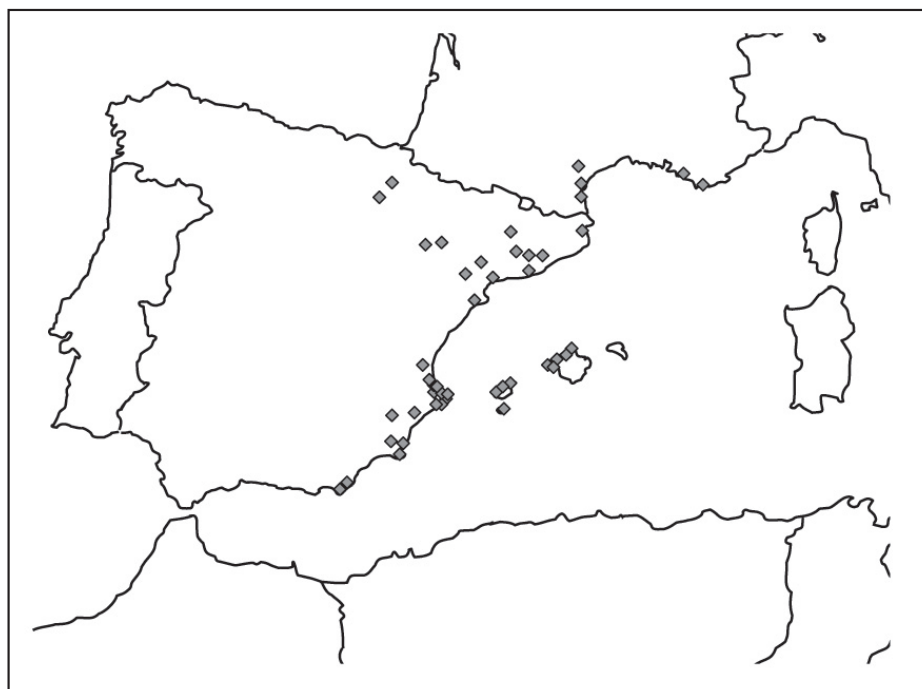


Figura 1. Mapa de distribució de les poblacions estudiades.

A *Cheirolophus*, la diferenciació de les espècies procedents de la radiació en les illes Canàries és difícilment detectable amb les eines de divergència genètica (isoenzims, Garnatje *et al.*, 1998; o la seqüenciació dels marcadors ITS i ETS, Susanna *et al.*, 1999; Garnatje *et al.*, 2007a). L'anàlisi de la mida del genoma d'aquestes espècies s'ha revelat una eina complementària de les anteriorment esmentades i de les dades morfològiques (Garnatje *et al.*, 2007a). A més, el gènere *Cheirolophus* mostra un patró interessant de disminució de la mida del genoma que acompanya la seva dispersió i diversificació a les illes Canàries (Garnatje *et al.*, 2007a), una tendència igualment observada en altres grups de plantes (Suda *et al.*, 2003, 2005). Aquest conjunt de resultats previs demostra l'interès d'estudiar la mida del genoma en aquest gènere incloent-hi les espècies de distribució més àmplia, atès que fins ara els estudis s'havien concentrat en el procés de radiació en les illes en les quals els representants del gènere són majoritàriament microespècies de distribució molt restringida. *Cheirolophus intybaceus* és l'espècie que té la distribució més àmplia de tot el gènere i el fet que ocupà les illes Balears –considerades illes continentals– la fa particularment interessant per a comparar l'evolució de la mida del genoma

en aquesta colonització amb la que s'esdevingué en el procés d'instal·lació i especiació del gènere en illes oceàniques (Garnatje *et al.*, 2007a). Per altra banda ens hem proposat comprovar la hipòtesi que la quantitat de DNA nuclear varia al llarg d'un gradient geogràfic, amb el que això pot significar respecte a la temperatura i a la precipitació.

Els objectius d'aquest treball són: i) contribuir a l'aportació de dades de mida del genoma per a diverses espècies d'*Asteraceae*; ii) estudiar la variació de la quantitat de DNA al llarg de l'àrea de distribució d'una espècie; iii) avaluar la capacitat de discriminació d'aquest paràmetre a nivells taxonòmics baixos.

MATERIAL I MÈTODES

El material vegetal estudiat, juntament amb el seu origen, els recol·lectors i els números dels plecs d'herbari es troben a la Taula 1 i la distribució de les 45 poblacions estudiades es pot veure a la Fig. 1. Es recol·lectaren dues fulles fresques de cada individu i de cinc individus de cadascuna de les poblacions estudiades. Es trituraren separatament uns 2,5 cm² de cada fulla en 600 µl de tampó de lisi Galbraith

Taula 1. Localitat, recol·lectors, data, testimoni d'herbari, contingut de DNA nuclear i latitud de les poblacions estudiades de *Cheirolophus*. ¹ 2C contingut de DNA nuclear (mitjana \pm desviació estàndard de cinc individus). ² 1 pg = 978 Mbp (Doležel *et al.*, 2003).

Tàxon	Localitat, recol·lectors, data i testimoni d'herbari	Codi	Latitud (°)	2C \pm SD (pg)¹	2C (Mbp)²
<i>Cheirolophus grandifolius</i> (Font Quer) Stübing, Peris, Olivares & Martín	Espanya: Illes Balears, Eivissa, cala Albarca, 20.08.2008, <i>Garnatje 293 & Sánchez-Jiménez</i> (BC)	CG1	39,0786	1,51 \pm 0,02	1.476,78
<i>Cheirolophus grandifolius</i> (Font Quer) Stübing, Peris, Olivares & Martín	Espanya: Illes Balears, Eivissa, cap Negret, 20.08.2008, <i>Garnatje 294 & Sánchez-Jiménez</i> (BC)	CG2	39,0433	1,61 \pm 0,01	1.574,58
<i>Cheirolophus grandifolius</i> (Font Quer) Stübing, Peris, Olivares & Martín	Espanya: Illes Balears, Eivissa, cala Xemena, 20.08.2008, <i>Garnatje 295 & Sánchez-Jiménez</i> (BC)	CG3	39,0803	1,52 \pm 0,03	1.486,56
<i>Cheirolophus grandifolius</i> (Font Quer) Stübing, Peris, Olivares & Martín	Espanya: Illes Balears, Formentera, la Mola, 18.04.2005, <i>Garnatje & Vilatersana 411</i> (BC)	CG4	38,6683	1,51 \pm 0,03	1.476,78
<i>Cheirolophus grandifolius</i> (Font Quer) Stübing, Peris, Olivares & Martín	Espanya: Illes Balears, Mallorca, Estellenes, 24.11.2006, <i>Garnatje 220a & Hidalgo</i> (BC)	CG5	38,6533	1,53 \pm 0,10	1.496,34
<i>Cheirolophus grandifolius</i> (Font Quer) Stübing, Peris, Olivares & Martín	Espanya: Illes Balears, Mallorca, Estellenes (separada uns 50 m de l'altra població d'Estellenes), 24.11.2006, <i>Garnatje 220b & Hidalgo</i> (BC)	CG6	38,6550	1,47 \pm 0,07	1.437,66
<i>Cheirolophus grandifolius</i> (Font Quer) Stübing, Peris, Olivares & Martín	Espanya: Illes Balears, Mallorca, sa Talaia, 27.11.2006, <i>Garnatje 222 & Hidalgo</i> (BC)	CG7	39,8653	1,50 \pm 0,06	1.467,00
<i>Cheirolophus grandifolius</i> (Font Quer) Stübing, Peris, Olivares & Martín	Espanya: Illes Balears, Mallorca, Son Morro, 26.11.2006, <i>Garnatje 221, Hidalgo & M. A. Soriano</i> (BC)	CG8	39,7122	1,54 \pm 0,06	1.506,12
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Aragó, Saragossa, barranc de la Almunia, 09.2007, <i>Pyke s. n.</i> (BC)	CI9	41,7464	1,56 \pm 0,02	1.525,68
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Aragó, Saragossa, Mequinensa, 15.10.2006, <i>Garnatje 193 & Vallès</i> (BC)	CI10	41,3803	1,53 \pm 0,02	1.496,34
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Aragó, Saragossa, Rueda de Jalón, 31.12.2006, <i>Garnatje 225 & Vallès</i> (BC)	CI11	41,6347	1,54 \pm 0,03	1.506,12
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Aragó, Terol, Calanda, 08.11.2006, <i>Garnatje 217 & Pellicer</i> (BC)	CI12	40,9414	1,55 \pm 0,02	1.515,90
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Castella-la Manxa, Albacete, Cancaix, 07.11.2006, <i>Garnatje 216 & Pellicer</i> (BC)	CI13	38,4220	1,51 \pm 0,02	1.476,78
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Catalunya, Barcelona, Garraf, 05.12.2006, <i>Garnatje 223 & Vallès</i> (BC)	CI14	41,2600	1,54 \pm 0,04	1.506,12

Taula 1. (Cont.)

Tàxon	Localitat, recol·lectors, data i testimonis d'herbari	Codi	Latitud (°)	2C ± SD (pg) ¹	2C (Mbp) ²
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Catalunya, Barcelona, la Puda de Montserrat, 21.11.2006, <i>Garnatje 218 & Vallès</i> (BC)	CI15	41,5711	1,52 ± 0,04	1.486,56
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Catalunya, Barcelona, Sant Miquel del Fai, 21.11.2006, <i>Garnatje 219 & Vallès</i> (BC)	CI16	41,7086	1,52 ± 0,02	1.486,56
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Catalunya, Girona, l'Escala, 18.10.2006, <i>Garnatje 195 & Pellicer</i> (BC)	CI17	42,1033	1,55 ± 0,06	1.515,90
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Catalunya, Lleida, Arbeca, 15.10.2006, <i>Garnatje 194 & Vallès</i> (BC)	CI18	41,5428	1,53 ± 0,02	1.496,34
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Catalunya, Lleida, Serra de Monteró, 12.10.2006, <i>Garnatje 183 & Vallès</i> (BC)	CI19	41,8842	1,50 ± 0,04	1.467,00
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Catalunya, Tarragona, Montroig del Camp, 30.10.2006, <i>Garnatje 202 & Pellicer</i> (BC)	CI20	41,0925	1,49 ± 0,03	1.457,22
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: La Rioja, Santa Eulalia Somera, 13.10.2006, <i>Garnatje 185 & Vallès</i> (BC)	CI21	42,2117	1,52 ± 0,05	1.486,56
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Múrcia, Albudeite, 04.11.2006, <i>Garnatje 213 & Pellicer</i> (BC)	CI22	38,0275	1,50 ± 0,04	1.467,00
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Múrcia, de la Unió a Portman, 04.11.2006, <i>Garnatje 212 & Pellicer</i> (BC)	CI23	37,6197	1,51 ± 0,02	1.476,78
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: Navarra, Mendavia, 13.10.2006, <i>Garnatje 186 & Vallès</i> (BC)	CI24	42,4464	1,51 ± 0,04	1.476,78
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, Alacant, Benirrama, 02.11.2006, <i>Garnatje 205 & Pellicer</i> (BC)	CI25	38,8311	1,50 ± 0,02	1.467,00
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, Alacant, cala de la Barraca, 02.11.2006, <i>Garnatje 206 & Pellicer</i> (BC)	CI26	38,7522	1,49 ± 0,04	1.457,22
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, Alacant, cap de la Nau, 03.11.2006, <i>Garnatje 207 & Pellicer</i> (BC)	CI27	38,7456	1,50 ± 0,02	1.467,00
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, Alacant, Dehesa de Campoamor, 04.11.2006, <i>Garnatje 211 & Pellicer</i> (BC)	CI28	37,9031	1,59 ± 0,02	1.555,02
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, Alacant, Xixona, 03.11.2006, <i>Garnatje 210 & Pellicer</i> (BC)	CI29	38,5389	1,40 ± 0,06	1.369,20

Taula 1. (Cont.)

Tàxon	Localitat, recol·lectors, data i testimoni d'herbari	Codi	Latitud (°)	2C ± SD (pg) ¹	2C (Mbp) ²
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, Castelló, barranc d'Aigua Oliva, 13.12.2006, Aparicio, Garnatje 224 & Pellicer (BC)	CI30	40,4739	1,52 ± 0,02	1.486,56
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, València, Bicorp, 02.01.2007, Garnatje 226 & Vallès (BC)	CI31	39,1331	1,50 ± 0,03	1.467,00
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, València, Cullera, a les roques, 01.11.2006, Garnatje 204a & Pellicer (BC)	CI32	39,1869	1,46 ± 0,01	1.427,88
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, València, Cullera, al costat de la conducció d'aigua, 01.11.2006, Garnatje 204b & Pellicer (BC)	CI33	39,1886	1,46 ± 0,01	1.427,88
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, València, la Safor, 30.12.2008, Pellicer 22 (BC)	CI34	38,8822	1,43 ± 0,03	1.398,54
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	Espanya: País Valencià, València, Pedralba, 01.11.2006, Garnatje 203 & Pellicer (BC)	CI35	38,6050	1,48 ± 0,03	1.447,44
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	França: Languedoc-Rosselló, Aude, la Clape, 20.10.2006, Garnatje 201 & Pellicer (BC)	CI36	43,1611	1,55 ± 0,04	1.515,90
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	França: Languedoc-Rosselló, Pirineus Orientals, Taltaüll, 19.10.2006, Garnatje 196 & Pellicer (BC)	CI37	42,8128	1,53 ± 0,03	1.496,34
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	França: Provença-Alps-Costa Blava, Bouches-du-Rhône, Sommiou, 20.10.2006, Garnatje 199 & Pellicer (BC)	CI38	43,2222	1,51 ± 0,02	1.476,78
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál	França: Provença-Alps-Costa Blava, Var, Toló, 20.10.2006, Garnatje 200 & Pellicer (BC)	CI39	43,1253	1,55 ± 0,02	1.515,90
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál var. <i>capillifolia</i> Sandwith ex Lacaita	Espanya: País Valencià, Alacant, Benitaxell, cala Moraig, 03.11.2006, Garnatje 209 & Pellicer (BC)	CC40	38,7119	1,51 ± 0,02	1.476,78
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál var. <i>capillifolia</i> Sandwith ex Lacaita	Espanya: País Valencià, Alacant, Benitaxell, urbanització "Cumbre del Sol", 03.11.2006, Garnatje 208 & Pellicer (BC)	CC41	38,7161	1,49 ± 0,03	1.457,22
<i>Cheirolophus intybaceus</i> (Lam.) Dostál var. <i>microcephala</i> Rouy	França: Languedoc-Rosselló, Aude, Leucate, 19.10.2006, Garnatje 197 & Pellicer (BC)	CR42	42,9322	1,47 ± 0,05	1.437,66
<i>Cheirolophus lagumae</i> Olivares, Peris, Stübting & Martín	Espanya: País Valencià, Alacant, Xàbia, punta del cap Prim, 20.05.2005, Garnatje & Vilatersana 442 (BC)	CL43	38,7617	1,51 ± 0,01	1.476,78
<i>Cheirolophus mansanetianus</i> Stübting, Peris, Olivares & Martín	Espanya: Andalusia, Almeria, barranc del Sabinar, 05.11.2006, Garnatje 215 & Pellicer (BC)	CM44	36,7847	1,52 ± 0,03	1.486,56
<i>Cheirolophus mansanetianus</i> Stübting, Peris, Olivares & Martín	Espanya: Andalusia, Almeria, Rodalquilar, 05.11.2006, Garnatje 214 & Pellicer (BC)	CM45	36,8514	1,49 ± 0,02	1.457,22

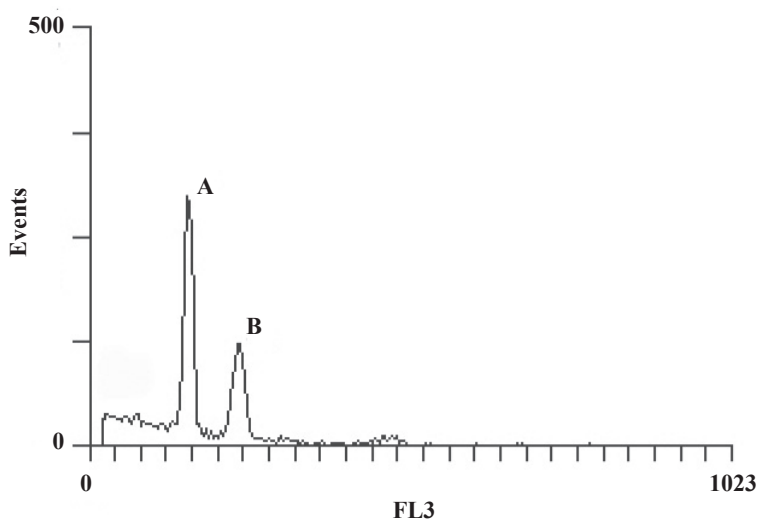


Figura 2. Histograma d'intensitat de fluorescència relativa obtingut mitjançant anàlisi simultània per citometria de flux de l'estàndard (B) i de la planta problema (A).

(Galbraith *et al.*, 1983) –al qual s'havien afegit prèviament 10 µl (100 µg/ml) de ribonucleasa A (RNasa A, Boehringer Meylan, França)– juntament amb la mateixa quantitat de *Petunia hybrida* Vilm. 'PxPc6', que es va usar com a patró intern (2C = 2,85 pg, Marie & Brown, 1993). S'afegiren 36 µl de iodur de propidi (Sigma-Aldrich Química, Alcobendas, Madrid, Espanya) a la suspensió de nuclis així obtinguda i es deixà reposar uns vint minuts en gel abans de ser analitzada en un citòmetre de flux Epics XL (Coulter Corporation, Hialeah, Florida). La quantitat total de DNA nuclear es calculà multiplicant la quantitat de DNA del patró intern pel quocient entre les dades numèriques de les posicions dels pics 2C de la mostra problema i del patró, assumint que hi ha una correlació lineal entre els senyals de fluorescència dels nuclis tenyits de la mostra problema i del patró i el contingut de DNA (Fig. 2).

Anàlisi de les dades

Es varen dur a terme anàlisis de la variància (ANOVA) d'una sola via per a comprovar si hi havia diferències significatives en la quantitat de DNA de les poblacions continentals i les insulars, així com entre les poblacions que han estat segregades de *Ch. intybaceus*, a les quals s'ha atorgat estatus d'espècie (*Ch. grandifolius*, *Ch. lagunae* i *Ch. mansanetianus*) o de varietat (var. *capillifolia* i var. *microcephala*), i aquelles de les quals mai no s'ha qüestionat la posició taxonòmica en el si de *Ch. intybaceus*. Les anàlisis es varen dur

a terme amb el programa Statgraphics 5.1 (Statistical Graphic Corp.).

La correlació d'Spearman va ser el mètode no paramètric escollit per a verificar si hi havia correlació entre el valor 2C de les poblacions estudiades i la seva latitud.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els resultats de les mesures de la quantitat de DNA de les poblacions estudiades es troben a la Taula 1. El valor 2C mínim obtingut és d'1,40 pg de DNA per a la població de Xixona i el màxim és d'1,61 pg per a la població del cap Negret, a Eivissa. Malgrat semblar un rang ampli de valors, la mitjana és d'1,51 pg i la desviació estàndard només de 0,03. L'histograma de la Fig. 3 il·lustra la distribució que segueixen aquests valors.

Exerceix algun efecte la insularitat en la mida del genoma?

No hem detectat diferències significatives entre les quantitats de DNA de les poblacions insulars i de les continentals ($P = 0,9024$). En treballs previs havíem observat diferències significatives entre la quantitat de DNA d'espècies insulars i continentals (Garcia *et al.*, 2006; Garnatje *et al.*, 2007a). En el cas de *Cheirolophus*, però, la comparació es va fer entre les espècies continentals i les espècies

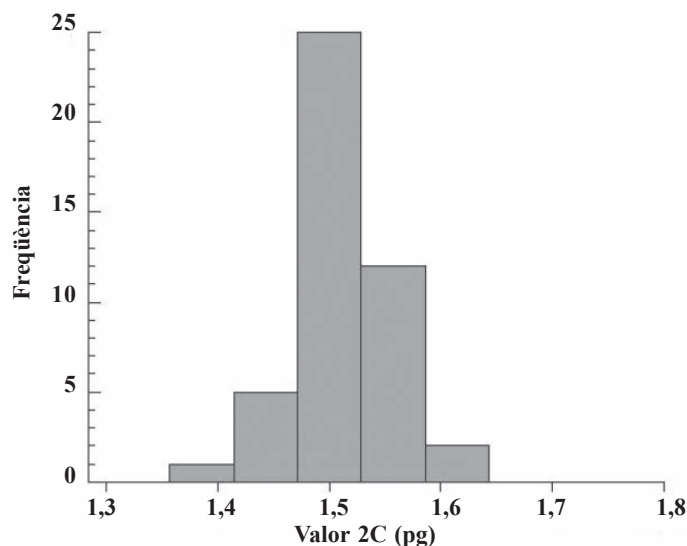


Figura 3. Histograma de freqüències que il·lustra la distribució de les dades de quantitat de DNA de les poblacions estudiades.

que habiten a les illes Canàries, de manera que hi trobem dues diferències substancials respecte al treball actual; en primer lloc es tracta d'espècies diferents i per altra banda, en aquell cas es referia a illes oceàniques (Garnatje *et al.*, 2007a). Altres autors també han trobat resultats similars per a diferents grups d'espècies (Suda *et al.*, 2005).

En d'altres grups estudiats, com és el cas del complex d'*Artemisia arborescens* L., potser més comparable als resultats d'aquest treball, atès que es tractava d'una sola espècie i d'illes mediterrànies, a les poblacions insulars trobàvem un lleuger augment de la quantitat de DNA respecte a les poblacions del continent (Garcia *et al.*, 2006). El mateix vam trobar en el gènere *Carthamus* L., en què la quantitat de DNA en diferents espècies en illes mediterrànies també era lleugerament superior a la de les continentals (Garnatje *et al.*, 2006). En el present treball no s'observa aquesta tendència, malgrat que la població que presenta un valor de quantitat de DNA més elevat és la del cap Negret, a Eivissa, com ja hem esmentat abans. Caldrien estudis citogenètics més acurats per tal de determinar les possibles causes d'aquest augment de DNA respecte a les poblacions properes de la cala Albarca (1,51 pg) i de la cala Xemena (1,52 pg), ambdues de la mateixa illa d'Eivissa. Per altra banda, la població de Xixona presenta un valor estranyament baix (1,4 pg), que no sembla correspondre a cap condició ecològica particular.

Ecologia i paràmetres biològics de l'espècie: canvis en el valor C

No s'han observat diferències significatives entre les quantitats de DNA de les poblacions pertanyents a *Ch. intybaceus* i les que pertanyen a les altres espècies i varietats estudiades ($P = 0,4319$), ni tampoc entre les poblacions de *Ch. intybaceus* (incloent les varietats, vegeu la Taula 1) i les espècies que n'han estat segregades ($P = 0,8558$).

Hem trobat una correlació positiva i significativa entre la quantitat de DNA i la latitud (0,407; $P < 0,005$), és a dir, que en hàbitats amb menys pluviositat i més càlids la mida del genoma tendeix a disminuir en aquesta espècie. Jakob *et al.* (2004) van comprovar aquesta correlació per a espècies d'*Hordeum* L. i no varen trobar-la significativa.

La variació en tota l'àrea de distribució de *Ch. intybaceus* és només del 15% i es redueix al 8,9% si descartem els dos valors extrems abans esmentats, essent la variació d'1,15 i d'1,11 vegades, respectivament. Ens trobem per tant, davant d'un cas amb una baixa variabilitat que dona suport a la constància del valor C. En el treball sobre *A. arborescens* abans esmentat (Garcia *et al.*, 2006), vàrem trobar variabilitats del 14% entre cultivars i del 8,8% entre poblacions silvestres, que vàrem qualificar igualment de baixes. Rayburn *et al.* (1997) trobaren una variació d'1,12 vegades en 90 poblacions de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), que es va reduir a

1,018 quan les dades varen ser avaluades de nou per Obermayer & Greilhuber (1999) en una selecció d'aquestes poblacions. Rayburn *et al.* (2004) han trobat, però, una variació de fins a un 40%.

Les poblacions de *Cheirolophus* viuen en hàbitats força similars malgrat la seva àmplia distribució. Només la població de Rodalquilar (Almeria) és digna de ser mencionada en aquest aspecte pel fet d'ocupar un hàbitat que podríem considerar força contaminat per metalls pesants, però no presenta diferències pel que fa a la quantitat de DNA. En la història de Rodalquilar han existit dos tipus de mines diferents, les antigues d'alum i les més modernes de metalls [plom, plata, or, coure, manganès, ferro, platí i zinc (Hernández, 2002)] que oferien la possibilitat de detectar diferències en la quantitat de DNA degudes a la contaminació com s'havia trobat en altres treballs (Vilhar *et al.*, 2005).

Possibles causes que indueixen variabilitat en el valor C

Si tenim en compte que *Ch. intybaceus* és una espècie per a la qual s'han reportat $2n = 32$ cromosomes (Gardou, 1972, com *Centaurea intybacea*) i també $2n = 32$ (Boscaiu *et al.*, 1998) o $2n = 30 + (0-2) B$ (Valdés-Bermejo & Agudo, 1983) per a *Ch. lagunae*, la quantitat de DNA per cromosoma és d'uns 0,05 pg aproximadament, de manera que en aquestes poblacions amb quantitats més altes o més baixes que la resta, hi podrien haver tingut lloc alguns canvis o reestructuracions cromosòmiques.

Malgrat que nombroses dades mostren una variació intraespecífica en plantes (Bennett & Leitch, 1995, 1997), la majoria d'autors tendeixen a creure que hi ha una constància d'aquest valor (Greilhuber, 1997, 1998; Greilhuber & Obermayer, 1997; Auckland *et al.*, 2001; Obermayer & Greilhuber, 2005). Aquesta variabilitat sovint ha estat relacionada amb el caràcter anual de les espècies, que fa que presentin cicles vitals més curts que impliquen un nombre més gran de divisions cel·lulars (Bennett, 1972), així com també s'ha postulat una variabilitat intraspecífica més baixa per a les espècies autògames que per a les al·logames (Bennett *et al.*, 2000). *Cheirolophus intybaceus* és una espècie perenne, però en canvi presenta una elevada taxa d'al·logàmia (Garnatje, 1995). La causa última de la variació en la quantitat de DNA nuclear semblaria ser la presència

d'elements transposables en el genoma (Kellogg & Bennetzen, 2004; Bennetzen *et al.*, 2005). Auckland *et al.* (2001) troben una gran constància en la mida del genoma de poblacions disjunctes d'*Abies fraseri* (Pursh) Poir. La variació en el contingut de DNA dins d'una espècie pot seguir l'activació de l'amplificació de seqüències i (o) esdeveniments de delecció, possiblement deguts a l'estrès ambiental o genòmic (Walbot & Cullis, 1985), però en algunes espècies, com *A. fraseri* o *Ch. intybaceus*, l'ocurrència i la magnitud d'aquests fenòmens desestabilitzadors, si és que hi han tingut lloc, no han estat suficients per a generar una variació significativa en la quantitat de DNA dins i entre les espècies.

El fet de trobar baixos coeficients de variació (3,5%), fa pensar que no hi ha substàncies del tipus dels metabòlits secundaris que puguin afectar les mesures. Algunes poblacions han estat mesurades diferents vegades i en diferents anys, i els resultats són coincidents, per tant la poca variació existent sembla més genuïna que no pas un artefacte (Suda *et al.*, 2007).

S'han fet força estudis en animals en aquest sentit (Boulesteix *et al.*, 2006 i referències incloses en aquest treball), però no tants en plantes; per tant, seran necessàries més recerques en el gènere *Cheirolophus* per tal de correlacionar les pèrdues i els guanys que es produeixen en el genoma de les seves espècies amb la variabilitat de determinats elements transposables, tan abundants en el genoma, i el sentit adaptatiu d'aquest esdeveniment, si en té.

AGRAÏMENTS

Els autors volem agrair a J. Aparicio, M. À. Soriano i S. Pyke la seva col·laboració en l'obtenció de material. També volem donar les gràcies als Drs. J. Comas i R. Álvarez i a R. López del servei de Citometria de flux dels Serveis científicotècnics generals de la Universitat de Barcelona pel seu ajut tècnic, així com al Dr. M. À. Canela pel seu suport en les qüestions estadístiques. Igualment regreïem les Dres. M. Galbany i A. Gómez i el Dr. J. Martín pels comentaris que ens han fet, adreçats a millorar el manuscrit. Aquest treball ha estat finançat pels projectes CGL2007-64839-C02-01/BOS i CGL2007-64839-C02-02/BOS (DGICYT, Ministerio de Ciencia e Innovación) i "Ajuts a grups de recerca consolidats" 2005SGR00344 (Generalitat de Catalunya). Dos dels autors (S.G. i J.P.) gaudeixen de contractes postdoctoral i predoctoral del Ministerio de Ciencia e Innovación (programes JAE i FPI, respectivament).

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Auckland, L. D., Johnston, J. S., Price, H. J. & Bridgwater, F. E. 2001. Stability of nuclear DNA content among divergent and isolated populations of Fraser fir. *Canad. J. Bot.* 79: 1375-1378.
- Bennett, M. D. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc. Royal Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.* 181: 109-135.
- Bennett, M. D. & Leitch, I. J. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot. (Oxford)* 76: 113-176.
- Bennett, M. D. & Leitch, I. J. 1997. Nuclear DNA amounts in angiosperms-583 new estimates. *Ann. Bot. (Oxford)* 76: 169-196.
- Bennett, M. D., Johnston, S., Hodnett, G. L. & Price, H. J. 2000. *Allium cepa* L. cultivars from four continents compared by flow cytometry show nuclear DNA constancy. *Ann. Bot. (Oxford)* 85: 351-357.
- Bennetzen, J. L., Ma, J. & Devos, K. M. 2005. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann. Bot. (Oxford)* 95: 127-132.
- Boscaiu, M., Riera, J., Estrelles, E. & Güemes, J. 1998. Números cromosòmatics de plantes occidentals 786-808. *Anales Jard. Bot. Madrid* 56: 119-120.
- Boulesteix, M., Weiss, M. & Biéumont, Ch. 2006. Differences in genome size between closely related species: the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Molec. Biol. Evol.* 23: 162-167.
- Chase, M. W., Hanson, L., Albert, V. A., Whitten, W. M. & Williams, N. H. 2005. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *Ann. Bot. (Oxford)* 95: 191-199.
- Doležel, J., Bartos, J., Voglmayr, H. & Greilhuber, J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51A: 127-128.
- Fay, M. F., Cowan, R. S. & Leitch, I. J. 2005. The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. *Ann. Bot. (Oxford)* 95: 237-246.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P. & Firoozabady, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- Garcia, S., Sanz, M., Garnatje, T., Kreitschitz, A., McArthur, D. E. & Vallès, J. 2004. Variation of DNA amount in 47 populations of the subtribe Artemisiinae and related taxa (Asteraceae, Anthemideae): karyological, ecological, and systematic implications. *Genome* 47: 1004-1014.
- Garcia, S., Garnatje, T., Twibell, J. & Vallès, J. 2006. Genome size variation in the *Artemisia arborescens* complex (Asteraceae, Anthemideae) and its cultivars. *Genome* 49: 244-253.
- Garcia, S., Canela, M. Á., Garnatje, T., McArthur, E. D., Pellicer, J., Sanderson, S. C. & Vallès, J. 2008. Evolutionary and ecological implications of genome size in the North American endemic sagebrushes and allies (*Artemisia*, Asteraceae). *Biol. J. Linn. Soc.* 94: 631-649.
- Gardou, C. 1972. In: Löve, A. (Ed.), IOPB Chromosome number reports. XXXVII. *Taxon* 21: 495-500.
- Garnatje, T. 1995. *Relació entre el polimorfisme enzimàtic i alguns aspectes de l'especiació i de l'evolució en el gènere Cheirolophus Cass.* Universitat Autònoma de Barcelona. Tesi doctoral.
- Garnatje, T., Susanna, A. & Messeguer, R. 1998. Isozyme studies in the genus *Cheirolophus* (Asteraceae: Cardueae-Centaureinae) in the Iberian Peninsula, North Africa and the Canary Islands. *Pl. Syst. Evol.* 213: 57-70.
- Garnatje, T., Garcia, S., Vilatersana, R. & Vallès, J. 2006. Genome size variation in the genus *Carthamus* (Asteraceae, Cardueae): Systematic implications and additive changes during allopolyploidization. *Ann. Bot. (Oxford)* 97: 461-467.
- Garnatje, T., Garcia, S. & Canela, M. Á. 2007a. Genome size variation from a phylogenetic perspective in the genus *Cheirolophus* Cass. (Asteraceae): biogeographic implications. *Pl. Syst. Evol.* 264: 117-134.
- Garnatje, T., Garcia, S., Hidalgo, O., Pellicer, J. & Vallès, J. 2007b. Genome size in the Asteraceae: state-of-art and perspectives. *The Nucleus* 50: 427-438.
- Greilhuber, J. 1997. The problem of variable genome size in plants (with special reference to woody plants). In: Borzan, Z. & Schlarbaum, S. E. (Eds.), *Cytogenetic studies of forest trees and shrub species*. Croatian Forests Inc., Faculty of Forestry, University of Zagreb, Zagreb: 13-34.
- Greilhuber, J. 1998. Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. *Ann. Bot. (Oxford)* 82 (Supplement A): 27-35.
- Greilhuber, J. & Obermayer, R. 1997. Genome size and maturity group in *Glycine max* (soybean). *Heredity* 78: 547-551.
- Hernández, F. 2002. Minas de alumbre de Rodalquilar en el obispado de Almería: siglo XVI. *Tierra y Tecnología* 24: 37-45.
- Hidalgo, O., Garcia-Jacas, N., Garnatje, T., Romashchenko, K., Susanna A., & Siljak-Yakovlev, S. 2008. Extreme environmental conditions and phylogenetic inheritance: systematics of *Myopordon* and *Oligochaeta* (Asteraceae, Cardueae-Centaureinae). *Taxon* 57: 769-778.
- Jakob, S. S., Meister, A. & Blattner, F. R. 2004. The considerable genome size variation of *Hordeum* species (Poaceae) is linked to phylogeny, life form, ecology, and speciation rates. *Molec. Biol. Evol.* 21: 860-869.
- Kellogg, E. A. & Bennetzen, J. L. 2004. The evolution of nuclear genome structure in seed plants. *Amer. J. Bot.* 91: 1709-1725.
- Marie, D. & Brown, S. C. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol. Cell.* 78: 41-51.
- Obermayer, R. & Greilhuber, J. 1999. Genome size in Chinese soybean accessions—stable or variable? *Ann. Bot. (Oxford)* 84: 259-262.
- Obermayer, R. & Greilhuber, J. 2005. Does genome size in *Dasypyrum villosum* vary with fruit colour? *Heredity* 95: 91-95.
- Olivares, A., Peris, J. B., Stübing, G. & Martín, J. 1995. *Cheirolophus lagunae*, sp. nov. (Asteraceae), endemismo iberolevantino. *Anales Jard. Bot. Madrid* 53: 262-265.
- Price, H. J. & Bachmann, K. 1976. Mitotic cell time and DNA content in annual and perennial Microserinidinae (Compositae, Chicoriaceae). *Pl. Syst. Evol.* 126: 323-330.
- Rayburn, A. L., Biradar, D. P., Bullock, D. G., Nelson, R. L., Gourmet, C. & Wetzel, J. B. 1997. Nuclear DNA content diversity in Chinese soybean introductions. *Ann. Bot. (Oxford)* 80: 321-325.
- Rayburn, A. L., Biradar, D. P., Nelson, R. L., McCloskey, R. &

- Yeater, K. M. 2004. Documenting intraspecific genome size variation in soybean. *Crop Sci.* (Madison) 44: 261-264.
- Stübing, G., Peris, J. B., Olivares, A. & Martín, J. 1997. *Cheirolophus mansanetianus* Stübing, Peris, Olivares & Martín, *sp. nov.* and *Ch. grandifolius* (Font Quer) *comb. & stat. nov.* (Asteraceae), two endemics from Spain. *Anales Jard. Bot. Madrid* 55: 170-173.
- Suda, J., Kyncl, T. & Freiová, R. 2003. Nuclear DNA amounts in Macaronesian Angiosperms. *Ann. Bot. (Oxford)* 92: 153-164.
- Suda, J., Kyncl, T. & Jarolimová, V. 2005. Genome size variation in Macaronesian angiosperms: forty percent of the Canarian endemic flora completed. *Pl. Syst. Evol.* 252: 215-238.
- Suda, J., Krahulcová, A., Trávníček, P., Rosenbaumová, R., Peckert, T. & Krahulec, F. 2007. Genome size variation and species relationships in *Hieracium* sub-genus *Piloseilla* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. *Ann. Bot. (Oxford)* 100: 1323-1335.
- Susanna, A. 1989. Mapa 114. *Cheirolophus intybaceus* (Lam.) Dostál. In: Fernández Casas, J. (Ed.), Asientos para un Atlas corológico de la flora occidental. 11. *Fontqueria* 22: 16-18.
- Susanna, A., Garnatje, T. & Garcia-Jacas, N. 1999. Molecular phylogeny of *Cheirolophus* (Asteraceae: Cardueae-Centaureinae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pl. Syst. Evol.* 214: 147-160.
- Swift, H. 1950. The constance of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 36: 643-654.
- Valdés-Bermejo, E. & Agudo, M. P. 1983. Estudios cariológicos en especies ibéricas del género *Centaurea* L. (Compositae). *Anales Jard. Bot. Madrid* 40: 119-142.
- Vilhar, B., Vidic, T. & Greilhuber, J. 2005. Genome size - pollution and survival. Symposium "Plant genome size: its evolution and significance" XVII International Botanical Congress. Book of abstracts: 29.
- Vinogradov, A. E. 2003. Selfish DNA is maladaptive: evidence from the plant Red List. *Trends Genet.* 19: 609-614.
- Walbot, V. & Cullis, C. A. 1985. Rapid genomic change in higher plants. *Annual Rev. Pl. Physiol.* 36: 367-396.
- Weiss-Schneeweiss, H., Greilhuber, J. & Schneeweiss, G. M. 2005. Genome size evolution in holoparasitic *Orobanche* (Orobanchaceae) and related genera. *Amer. J. Bot.* 93: 148-156.