



I. Sánchez Jiménez

Estudios biosistemáticos en el género *Echinops* L. (Asteraceae, Cardueae)

2012

Estudios biosistemáticos y evolutivos en el género *Echinops* L. (Asteraceae, Cardueae)

Ismael Sánchez Jiménez

Tesis Doctoral
Barcelona, 2012





UNIVERSITAT DE BARCELONA. FACULTAT DE FARMÀCIA
Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia,
Secció Botànica

Programa de Doctorat: Biodiversitat 2009-2012

INSTITUT BOTÀNIC DE BARCELONA (IBB-CSIC-ICUB)

Estudio biosistemático y evolutivo del género
***Echinops* L. (Asteraceae, Cardueae)**

Memòria presentada per Ismael Sánchez Jiménez per a optar al
títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Amb el vist-i-plau de les directores de tesi:

Dra. Teresa Garnatje Roca

Dra. Oriane Hidalgo

i del tutor de tesi:

Dr. Joan Vallès Xirau

Ismael Sánchez Jiménez

Barcelona, 2012



**institut
botànic**
de Barcelona



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

¿Por qué subir al Everest?

Porque está ahí...

George Mallory

ÍNDICE

Agradecimientos	7
Introducción	11
1. Marco taxonómico	11
1.1. La familia <i>Asteraceae</i> Martinov	11
1.2. La tribu <i>Cardueae</i> Cass.	15
1.3. La subtribu <i>Echinopsinae</i> (Cass.) Dumort. y el género <i>Echinops</i> L.	17
2. Antecedentes	23
2.1. Recuentos cromosómicos y cantidad de ADN	23
2.2. Palinología	25
2.3. Sistemática molecular	29
Objetivos de la Tesis Doctoral	33
Informe de las directoras de la Tesis	35
Síntesis y discusión de los resultados	39
Conclusiones	51
Referencias	53
Compendio de publicaciones	63
Chromosome Numbers in Three Asteraceae Tribes from Inner Mongolia (China), with Genome Size Data for Cardueae	65
Molecular systematics of <i>Echinops</i> L. (Asteraceae, Cynareae): A phylogeny based on ITS and <i>trnL-trnF</i> sequences with emphasis on sectional delimitation	83
Genome size and chromosome number in <i>Echinops</i> (Asteraceae, Cardueae) in the Aegean and Balkan regions: technical aspects of nuclear DNA amount assessment and genome evolution in a phylogenetic frame	99
<i>Echinops spinosissimus</i> Turra subsp. <i>neumayeri</i> (Vis.) Kožuharov (Asteraceae, Cardueae): a new record for the flora of Greece	117
Pollen study in the genus <i>Echinops</i> L. (Asteraceae, Cardueae)	123
ANEXO: Otros trabajos derivados de la Tesis Doctoral	139
Póster: Genome size of <i>Echinops</i> L. (Asteraceae, Cardueae) in the west Balkans: an attempt to elude the fresh material requirement	141
Publicación: Polyploidy and other changes at chromosomal level and in genome size: Its role in systematics and evolution exemplified by some genera of Anthemideae and Cardueae (Asteraceae)	145

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración y el apoyo de muchas personas que han desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de esta tesis, desde el ámbito profesional y científico al personal y anímico.

En primer lugar, tengo mucho que agradecer a mis directoras de tesis, la Dra. Teresa Garnatje y la Dra. Oriane Hidalgo, por la dedicación y empeño que han mostrado para que este trabajo salga adelante. Desde que me brindaron la oportunidad de realizar un trabajo de investigación para el Proyecto de Fin de Carrera, que tuvo su continuidad en este proyecto de tesis, hasta el apoyo científico y moral que me han dado durante estos años y, especialmente, en estos últimos meses. La labor que han realizado durante estos años es inmensurable, dirigiendo muy activamente la tesis y ayudándome en todo momento a todos los niveles, haciendo en ocasiones las tareas más espinosas en alguna de las recolecciones, o acogéndome y dando cobijo en los momentos iniciales, y no tan iniciales, de la estancia que realicé fuera de Barcelona.

La tesis tampoco habría sido posible sin la cooperación del Dr. Joan Vallès, por la colaboración y ayuda en los diferentes trabajos de estos años, así como por ejercer de tutor. Las demás personas del grupo de investigación en Biosistemática y Filogenia y Citogenética Moleculares de plantas han jugado un papel importante en la tesis, puesto que han participado en el desarrollo de

alguno de los trabajos que aquí se presentan, así como otras colaboraciones más allá de la tesis, además de disfrutar de la cotidianeidad de algunas de estas personas: Sònia Garcia, Jaume Pellicer, Daniel Vitales, Gemma Mas de Xaxars, Esperança Carrió, Alfredo García-Fernández, Joan Martín, Miguel Ángel Canela, y Sonja Siljak-Yakovlev, quien desde París se ha mostrado siempre interesada por el buen desarrollo de esta tesis, contribuyendo con la recolección de valiosísimos materiales.

Al personal del *Institut Botànic de Barcelona* también le tengo que agradecer su contribución al desarrollo de esta Tesis, puesto que son éstas las personas con las que he estado conviviendo en el trabajo durante estos años, y que, en numerosas ocasiones, me han ofrecido ayuda ya sea en el laboratorio, en el ordenador u otros aspectos: Laia, Andreas, Sara, Elisabet, Encarni, Javi, Jose, Carmen, etc...

Al Dr. Stephan Gleissberg le agradezco haberme permitido realizar una estancia en su laboratorio de Athens (Ohio), a pesar de que el trabajo allí realizado no haya sido incluido finalmente en esta tesis. Alastair Plant y Conny Bartholmes, también me ayudaron en el uso del laboratorio durante mi estancia en la Universidad de Ohio, bajo la dirección de una de mis directoras, Oriane, que estaba allí haciendo un *PostDoc*.

En estos años he tenido la oportunidad de realizar varios viajes de recolección. Éstos no habrían sido posible sin la colaboración de algunas personas: Teresa Garnatje, Sonja Siljak-Yakovlev, Marija Edita Šolic y Ángel Romo. Gracias también a las personas e instituciones que me han enviado material, como Georgy Lazkov, y los/las responsables de los herbarios que me han dejado examinar numerosos pliegos, ya sea presencialmente o enviándome los materiales: B, E, ERE, G, GB, LE, MA, P, PE, W, WU, YA, y, por supuesto al personal del herbario del Instituto Botánico de Barcelona, especialmente Jordi Pallàs, por gestionarme todos estos intercambios.

Son varias las personas que me han ayudado en aspectos técnicos, imprescindibles para el desarrollo del trabajo: Miquel Veny, por atender la colección de plantas vivas resultado de las recolecciones realizadas, Samuel Pyke, por las correcciones del inglés de las publicaciones, y el personal técnico de citometría de flujo y de microscopía electrónica, de los Centros Científicotécnicos y Tecnológicos de la UB, por el asesoramiento cuando ha sido necesario.

Por otra parte, fuera del mundo académico, son muchas las personas con las

que he pasado buenos momentos, y que me han animado a seguir adelante con esto, la gente del Barrio del Pilar en Madrid y la que he conocido en Barcelona durante estos últimos años, en especial a la gente del Clot por el tiempo pasado y los ánimos finales que me han servido para mirar de cara el final de la tesis cuando parecía que no iba a tener fin.

Es inevitable agradecer a Maria todo el tiempo que ha pasado conmigo durante casi todo el desarrollo de la esta tesis. Desde el recuerdo de los buenos momentos que hemos pasado cuando hemos vivido juntos y con la esperanza de encontrar otros en el futuro, no puedo sino agradecer y dedicar este trabajo a esta persona que ha tenido un papel tan importante en mi vida durante 4 de los últimos años.

Finalmente, tengo que agradecer a mi padre y mi madre, Miguel y Ángeles, por el apoyo que me han dado todos estos años, y a Aratz, por la compañía que me hace cada día.

INTRODUCCIÓN

1. MARCO TAXONÓMICO

1.1. LA FAMILIA *ASTERACEAE* MARTINOV

La familia *Asteraceae* (*Compositae* Adans.) es la de mayor extensión entre las angiospermas, comprendiendo 1.500-1.700 géneros y alrededor de 23.000-30.000 especies (Bremer, 1994; Funk et al., 2005, 2009). Se distribuye por todo el globo salvo por el continente Antártico, aunque es especialmente diversa en las regiones tropicales y subtropicales de Norteamérica, los Andes, Brasil oriental, la región mediterránea, Asia central y el suroeste de China (Panero & Crozier, 2008).

Las características diferenciales de este grupo de angiospermas son (Bremer, 1994; Funk et al., 2005):

- organización de las flores en una estructura pseudoantial muy particular, el capítulo, consistente en un receptáculo donde se asientan todas las flores. Ontogénicamente se trata de un racimo cuyos ejes permanecen cortos, ensanchados y fusionados, lo cual explica la floración centripeta de la inflorescencia (Weberling, 1992). Además, el receptáculo se encuentra rodeado de un conjunto de brácteas involucrales (Fig. 1A).

- fusión de las anteras del androceo, formando un anillo. Esta disposición estructural permite que durante la polinización la presentación del polen sea secundaria; esto es, el polen es depositado en el interior del anillo anterial por la dehiscencia introrsa de las anteras, empujado por la acción del estilo y posteriormente presentado en la superficie externa del fuste y ramas del mismo, que se abre exponiendo las áreas estigmáticas en la superficie adaxial (Fig. 1B).
- fruto monocarpelar indehiscente, el aquenio o cipsela, generalmente coronado por un anillo de pelos o escamas procedentes de la modificación del cáliz, conocido como vilano (Figs. 1C-E).

El capítulo de las asteráceas presenta un diseño adaptado para llamar la atención de los polinizadores, haciendo más visibles las partes reproductivas; la unidad de atracción del polinizador, por tanto, pasa de ser una simple flor

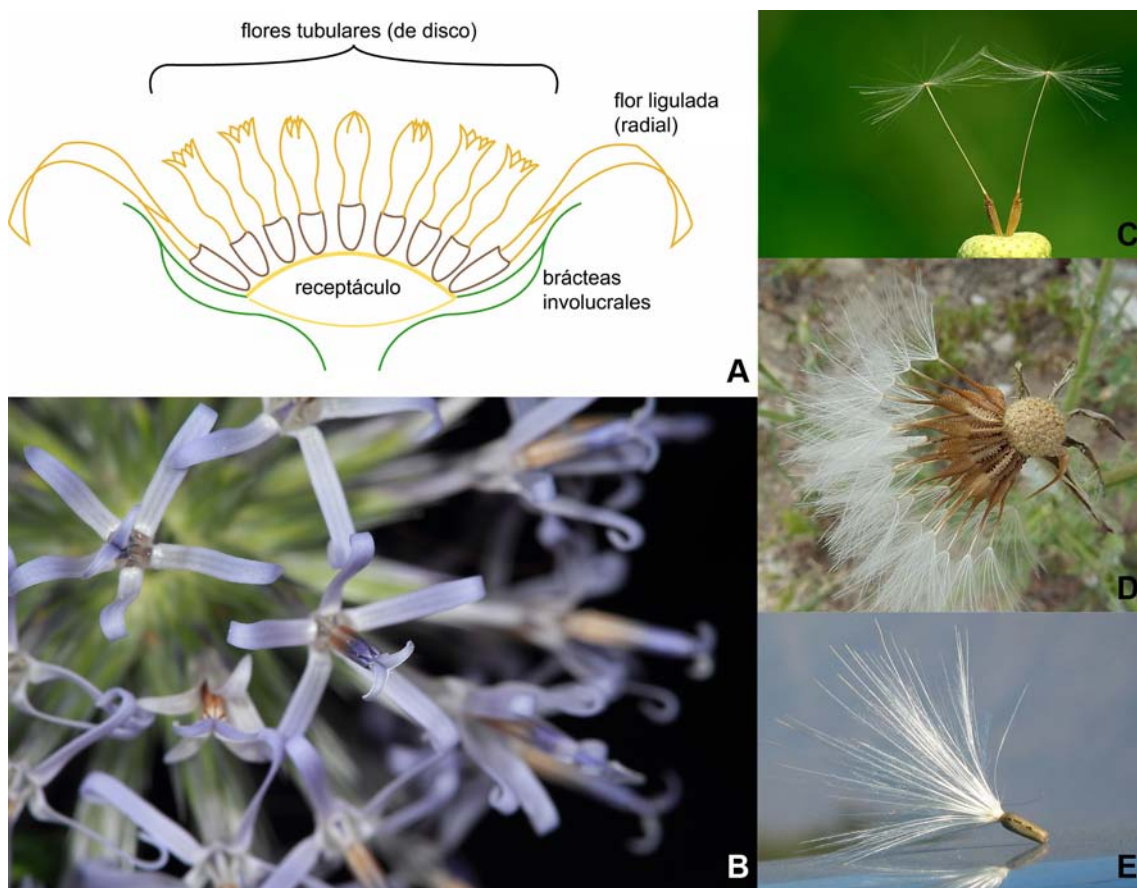


Figura 1. Características de la familia *Asteraceae* Martinov. **A.** Estructura del capítulo © 2008 Jose L. Panero (<http://www.tolweb.org/asteraceae>). **B.** Androceo singenésico y presentación secundaria © 2010 Ismael Sánchez-Jiménez. **C-E.** Diversos tipos de aquenios © 2007 Luc Viatur, 2011 Philmarin y 2009 Penarc, respectivamente (<http://www.wikipedia.org>).

a estar constituida por un grupo de flores (Harris, 1999). La complejidad de la “flor funcional” en *Asteraceae* puede ser incluso mayor, puesto que también se pueden encontrar capítulos compuestos (sincefalia) de segundo y de tercer orden (Jeffrey, 2007). La estructura de la inflorescencia, además, refleja un equilibrio entre varias funciones relacionadas con la polinización, el sistema de reproducción, la dispersión, germinación y defensa de la semilla (Stuessy & Garver, 1996). Las familia *Asteraceae* incluye organismos fundamentalmente



Figura 2. Subfamilias de *Asteraceae*, ilustradas por un ejemplo: **A.** *Barnadesioideae* K.Bremer & R.K.Jansen: *Schlechtendalia luzulaefolia* Less. © 2004 Josh. **B.** *Mutisioideae* (Cass.) Lindley: *Perezia pedicularifolia* Less. © 2006 Tim Waters. **C.** *Stiffioideae* Panero: *Stiffia fruticosa* (Vell.) D.J.N.Hind & Semir © Maria. **D.** *Wunderlichioideae* Panero & V.A.Funk: *Wunderlichia mirabilis* Riedel ex J.G.Baker © 2008 Mauro Cruz. **E.** *Gochnatioideae* Panero & V.A.Funk: *Gochnatia foliolosa* (D.Don) D.Don © 2007 Claudio Alvarado Solari. **F.** *Hecastocleidoideae* Panero & V.A.Funk: *Hecastocleis shockleyi* A.Gray © 2004 Jose L. Panero. **G.** *Carduoideae* Cass. ex Sweet: *Echinops sphaerocephalus* L. © 2009 Ismael Sánchez-Jiménez. **H.** *Pertyoideae* Panero & V.A.Funk: *Ainsliaea henryi* Diels © 2007. **I.** *Gymnarrhenoideae* Panero & Funk: *Gymnarrhena micrantha* Desf. © 2007 Sara Gold. **J.** *Cichorioideae* (Juss.) Chev.: *Malacothrix glabrata* (A.Gray ex D.C.Eaton) A.Gray © 2005 Dawn Endico. **K.** *Corymbioideae* Panero & V.A.Funk: *Corymbium glabrum* L. © 2011 Farm 215 Nature Retreat and Fynbos Reserve. **L.** *Asteroideae* (Cass.) Lindley: *Senecio auricula* Bourgeau ex Coss. © 2008 Annieta de Jong - van Bochoven. Todas las imágenes, excepto la G han sido obtenidas de <http://www.tolweb.org/asteraceae>.

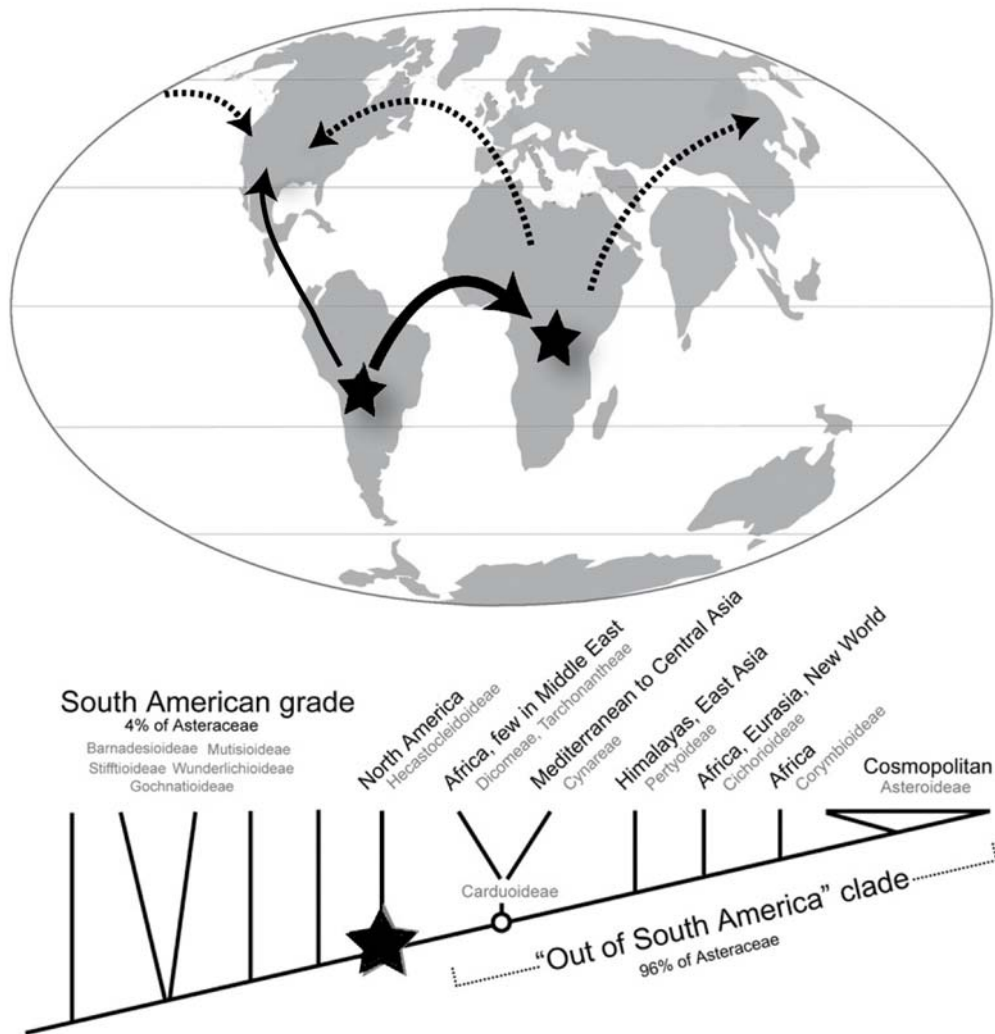


Figura 3. Radiación y dispersión de *Asteraceae*, desde su origen en Sudamérica. La flecha gruesa indica la primera dispersión hacia África, donde se produjo una importante radiación que acabó colonizando todo el planeta (flechas intermitentes). La flecha más delgada indica el posiblemente único evento de dispersión hacia Norteamérica desde el origen en Sudamérica, cuyo único representante actual es *Hecastocleis* A.Gray. Los continentes están dibujados como debían estar hace 40 millones de años. Adaptado de Panero & Funk (2008).

entomófilos que están principalmente adaptados a polinizadores específicos y no a generalistas. No obstante, existen algunas asteráceas cuya polinización es anemófila, como los géneros *Ambrosia* L. (*Heliantheae* Cass.) y *Artemisia* L. (*Anthemideae* Cass.) y algunas especies de *Espeletia* Mutis ex Humb. & Bonpl. (*Millerieae* Lindl. / *Heliantheae* s.l.) (Jeffrey, 2007).

Por otra parte, las asteráceas exhiben un rico surtido de metabolitos secundarios, cuya función como compuestos de almacenaje y mecanismos químicos de defensa han tenido una indudable importancia en el éxito evolutivo de la familia (Jeffrey, 2007); de hecho, la presencia de fructanos tipo inulina, de

derivados acetilénicos de ácidos grasos transformados en compuestos cíclicos (aromáticos o heterocíclicos) y de lactonas sesquiterpénicas es una característica de familia casi tan evidente como la existencia del capítulo (Hegnauer, 1977).

Nunca han existido dudas respecto a que las asteráceas constituyen un grupo con una entidad clara, desde los trabajos de principios del siglo XIX (Cassini, 1818, por ejemplo), hasta los estudios modernos basados en caracteres moleculares (Panero & Funk, 2002, 2008; Funk et al., 2005, 2009), los cuales muestran que se trata de un grupo claramente monofilético. Actualmente se considera que la familia *Asteraceae* presenta 12 linajes principales, que adquieren la categoría de subfamilia (Panero & Funk, 2008, Fig. 2).

El origen geográfico de la familia parece encontrarse en el Cono Sur americano, hace unos 50 millones de años (Funk et al., 2005; Panero & Funk, 2008). Se estima que el origen de *Asteraceae* es posterior a la ruptura de Gondwana, cuando el continente sudamericano estaba ya aislado, por lo que las conexiones con Norteamérica y con África se producirían a través de cadenas de islas expuestas por cambios en el nivel del mar (Panero & Funk, 2008). Desde Sudamérica, mediante procesos de dispersión a larga distancia, o bien según el modelo de *stepping stone*, debieron de migrar hacia África, donde sufrieron una gran explosión de diversidad, llegando a colonizar el resto del planeta (Fig. 3; Funk et al., 2005; Panero & Funk, 2008).

1.2. LA TRIBU *CARDUEAE* CASS.

La tribu *Cardueae* (= *Cynareae* Lam. & DC., ver Susanna, 2009) comprende unos 73 géneros y más de 2.300 especies (Susanna & Garcia-Jacas, 2007), caracterizadas por presentar flores siempre pentalobuladas, un estilo con un anillo de pelos debajo del punto de división en los estigmas, y anteras con apéndices generalmente largos y papilosos o pilosos (Bremer, 1994). La presencia de espinas en las *Cardueae* les confiere una defensa adicional a la proporcionada por la gran acumulación de metabolitos secundarios, lo cual puede explicar parcialmente el gran éxito evolutivo del grupo (Bremer, 1994). Pese a que también existen representantes inermes, el carácter espinoso parece ser ancestral en la tribu (Petit, 1997).

La tribu se distribuye geográficamente en la zona mediterránea, en la región iranoturania, y presenta un centro principal de diversidad en Asia Central (Susanna & Garcia-Jacas, 2007); es en las montañas del centro de Asia donde la mayoría de géneros alcanzan sus límites orientales de distribución. La tribu se

Cassini (1818), Dittrich (1977)	Bentham (1873), Hoffmann (1894), Bremer (1994), Garcia-Jacas et al. (2002)	Wagenitz (1976), Petit (1988, 1997)	Susanna et al. (2006)
tribu <i>Echinopeae</i> Cass.	tribu <i>Cardueae</i> Cass.	tribu <i>Echinopeae</i> Cass.	tribu <i>Cardueae</i> Cass.
tribu <i>Carlineae</i> Cass.	subtribu <i>Echinopsidinae</i> (Cass.) Dumort.	tribu <i>Cardueae</i> Cass.	subtribu <i>Echinopsinae</i> (Cass.) Dumort.
tribu <i>Cardueae</i> Cass.	subtribu <i>Carlininae</i> (Cass.) Dumort.	subtribu <i>Carlininae</i> (Cass.) Dumort.	subtribu <i>Cardopatiinae</i> Less.
subtribu <i>Carduinae</i> Cass.	subtribu <i>Carduinae</i> Cass.	subtribu <i>Carduinae- Centaureinae</i>	subtribu <i>Carlininae</i> Dumort.
subtribu <i>Centaureinae</i> (Cass.) Dumort.	subtribu <i>Centaureinae</i> (Cass.) Dumort.		subtribu <i>Carduinae</i> (Cass.) Dumort.
			subtribu <i>Centaureinae</i> (Cass.) Dumort.

Tabla 1. Clasificaciones propuestas por diferentes autores para el tratamiento de la actual tribu *Cardueae* Cass. El nombre de la subtribu basada en *Echinops* L. se ha llamado de diferentes formas. Sin embargo, debería ser *Echinopsinae* (Cass.) Dumort., según el artículo 19.3 del Código Internacional de Nomenclatura Botánica de 2006 (Vienna Code).

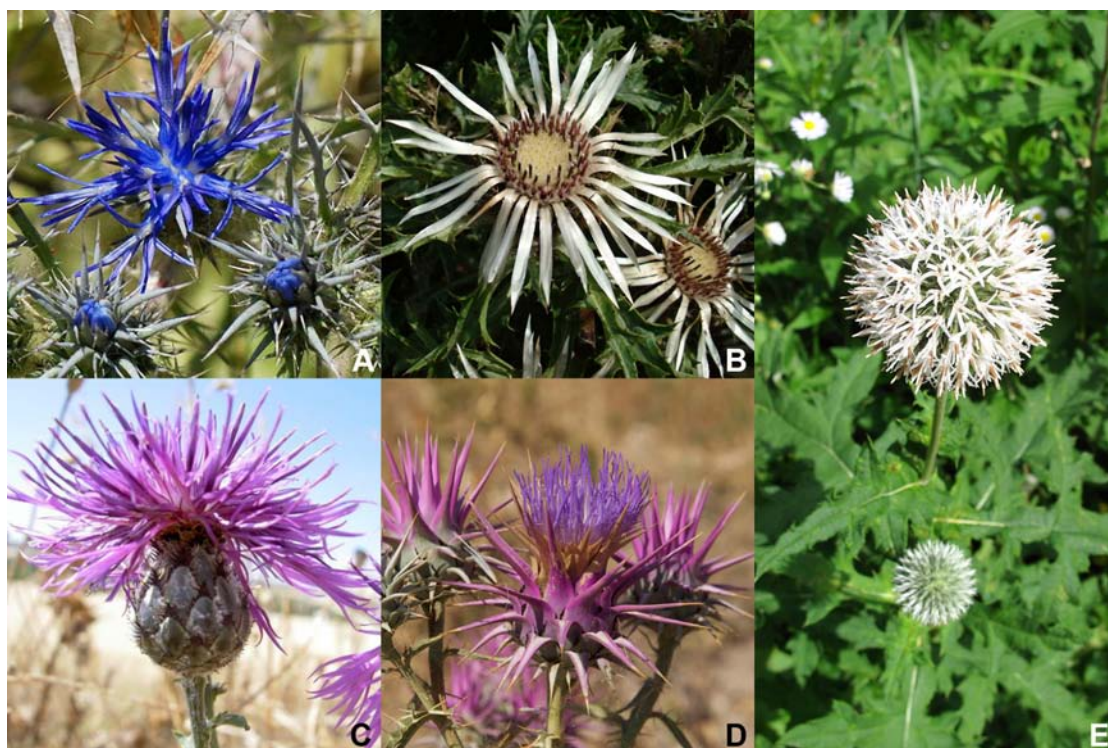


Figura 4. Subtribus de *Cardueae*, ilustradas con un ejemplo: **A.** *Cardopatiinae* Less.: *Cardopatum corymbosum* (L.) Pers. © 2008 Lior Almagor (<http://flora.huji.ac.il>). **B.** *Carlininae* Dumort.: *Carlina acaulis* L. © 2008 Gertrud K. (<http://www.tolweb.org/asteraceae>). **C.** *Centaureinae* (Cass.) Dumort.: *Centaurea scabiosa* L. © 2008 eusebiol (<http://es.wikipedia.org>). **D.** *Carduinae* (Cass.) Dumort.: *Cynara baetica* (Spreng.) Pau © 2011 Ismael Sánchez-Jiménez. **E.** *Echinopsinae* (Cass.) Dumort.: *Echinops exaltatus* Schrad. © 2009 Ismael Sánchez-Jiménez.

vuelve menos frecuente en África Central y desaparece en las zonas ecuatorial y sur de África. Por otra parte, existen unas pocas especies en Australia, en Norteamérica y en Sudamérica, además del género *Centaurodendron* Johow, endémico del archipiélago de Juan Fernández, en el océano Pacífico. El clado formado por las tribus *Cardueae*, *Tarchonantheae* Panero & V.A.Funk, *Dicomeae* Panero & V.A.Funk y el género *Oldenburgia* Less. (subfamilia *Carduoideae* Cass. ex Sweet, Panero & Funk, 2002, 2008), parece tener un origen africano, desde donde comenzó la radiación asiática de las *Cardueae*, seguida de otras radiaciones menores en Norteamérica, Eurasia y Europa (Fig. 3; Funk et al., 2005; Panero & Funk, 2008).

La tribu *Cardueae* se ha dividido generalmente en cuatro grupos principales, si bien los últimos estudios (Susanna et al., 2006; Susanna & Garcia-Jacas, 2007) añaden uno más, aunque los rangos considerados (tribal o subtribal) han variado según los autores (Tabla 1, Fig. 4). Por otra parte, las investigaciones basadas en caracteres moleculares muestran que las *Cardueae* constituyen un grupo monofilético robusto (Susanna et al., 1995, 2006; Garcia-Jacas et al., 2002), donde las subtribus *Cardopatiinae* Less., *Carlininae* Dumort., *Echinopsinae* (Cass.) Dumort. y el clado que incluye a las subtribus *Carduinae* (Cass.) Dumort. y *Centaureinae* (Cass.) Dumort. conforman una politomía basal (Susanna et al., 2006).

1.3. LA SUBTRIBU *ECHINOPSINAE* (CASS.) DUMORT. Y EL GÉNERO *ECHINOPS* L.

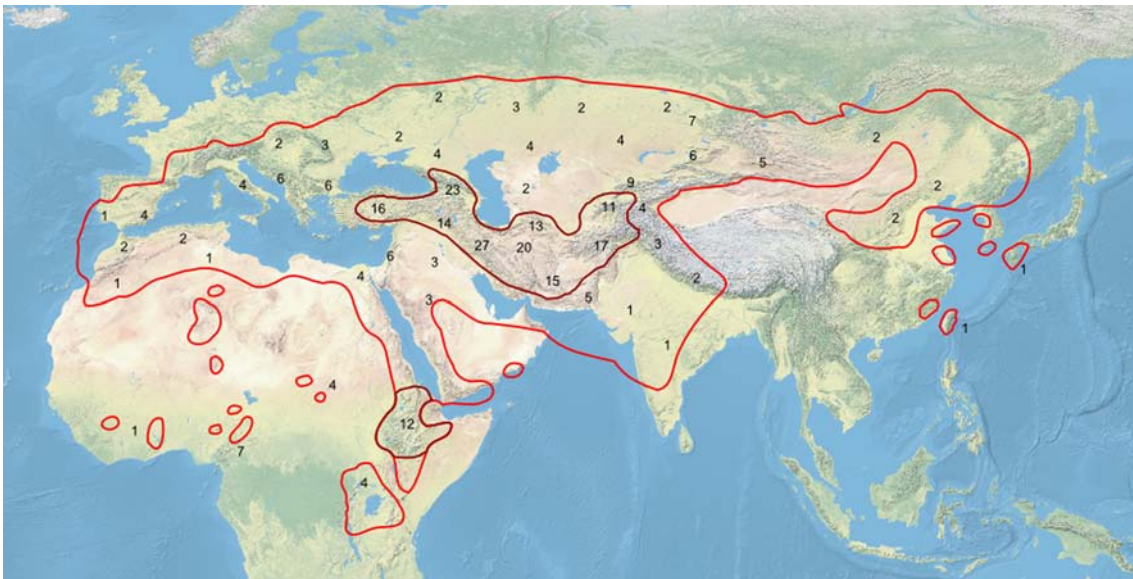
Algunos trabajos han sugerido la inclusión de los géneros *Cardopatium* Juss. y *Cousiniopsis* Nevski (Petit, 1988, 1997) o del grupo de *Xeranthemum* L. (Garcia-Jacas et al., 2002) dentro de la subtribu *Echinopsinae*, aunque los datos más recientes los sitúan en las subtribus *Cardopatiinae* y *Carduinae*, respectivamente (Susanna et al., 2006). El género *Echinops* (*sensu lato*, incluyendo *Acantholepis* Less.) es, por tanto, el único miembro de *Echinopsinae* (Bobrov, 1997; Garcia-Jacas et al., 2002; Garnatje et al., 2005; Susanna et al., 2006; Susanna & Garcia-Jacas, 2007), perfectamente monofilético y situado en una posición aislada entre los grupos de la base de la tribu *Cardueae* (Susanna et al., 2006).

El género *Echinops* se caracteriza por la presencia de capítulos unifloros, a su vez agregados en capítulos esféricos u ovalados de segundo orden (Petit, 1988; Bremer, 1994; Bobrov, 1997; Susanna & Garcia-Jacas, 2007; Fig. 1G, 5). La presencia de capítulos compuestos es una característica que aparece en aproximadamente 70 géneros de la familia (4,4% del total de asteráceas) repartidos en 11 tribus (Katinas et al., 2008). No obstante, el capítulo compuesto



Figura 5 (izquierda). Receptáculo del capítulo de segundo orden, en el cual se muestran las cicatrices hexagonales que dejan los capítulos unifloros al caer, de *Echinops fontqueri* Pau (BC-SJ82) © 2011 Ismael Sánchez-Jiménez.

Figura 6 (debajo). Mapa de distribución de *Echinops* L. Los números indican la cantidad aproximada de especies presentes en la zona, mientras que el contorno oscuro rodea aquellas regiones en que el número de especies es superior a 20, de acuerdo con Jäger (1987). Ilustración modificada de Jäger (1987).



de *Echinops* constituye una particularidad única en las *Cardueae*, y el principal carácter que define el género y la subtribu (Petit, 1988). Algunos autores se han planteado la cuestión del origen del capítulo compuesto de *Echinops*, coincidiendo en interpretar la sincefalia como el resultado de la agrupación y contracción de capítulos simples. Se ha postulado sucesivamente que este capítulo resultaría de la reducción de los ejes de un corimbo de capítulos (Brown, 1816), de un capítulo similar al de *Carlina* L. (Meuzel & Kohler, 1960; Kruze, 1987), o de la contracción de las cimas de capítulos de *Cardopatum* (Petit, 1988). Desafortunadamente, ninguna de estas propuestas puede explicar a la vez todas las características estructurales de la sincefalia de *Echinops*. El orden de floración descendente coincide con el de un corimbo de floración centrífuga, encajando mejor en la hipótesis de Brown (1816), mientras que, de acuerdo con Petit (1988), la reducción de los ejes estaría asociada a una remodelación completa del orden de floración de los capítulos. No obstante, Petit (1988) es el único autor que explica la forma globosa del receptáculo de segundo orden,

la disposición ortósica de los capítulos unifloros y la forma hexagonal de las cicatrices que dejan éstos en el receptáculo (Fig. 5).

El género *Echinops* incluye más de 120 especies de plantas perennes y más raramente anuales, con hojas espinosas (Bobrov, 1997; Susanna & Garcia-Jacas, 2007), que se distribuyen ocupando las zonas semihúmedas de África tropical, las tierras semiáridas del norte de África, la cuenca mediterránea y las regiones templadas de Eurasia, llegando hasta Asia Central, Mongolia y el este de China, siendo en Anatolia oriental, el Cáucaso y Oriente Medio donde se citan un mayor número de especies (Fig. 6; Jäger, 1987). Además, el género está introducido en algunas partes del mundo, como en Norteamérica (Flora of North America Editorial Committee [eds.], 1993+) y algunas zonas del centro y norte de Europa (Greuter, 2006-2009). La gran uniformidad morfológica de *Echinops*, si bien facilita su delimitación taxonómica como género, dificulta su clasificación infragenérica. El análisis más completo del género fue el llevado a cabo por Bunge (1863), que reconocía 12 secciones, de las cuales siete fueron descritas por él mismo (Tabla 2). Los intentos posteriores de clasificación seccional más importantes son los realizados por Rechinger (1979) en "*Flora des Iranischen Hochlandes und der umrahmenden Gebirge*" y por Bobrov (1997) en "*Flora of USSR*", quienes reconocen cinco y ocho secciones, respectivamente (Tabla 2). Asimismo, Fries (1923) reconoció cinco secciones diferentes para las especies presentes en África tropical (Tabla 2). Otras revisiones taxonómicas del género han sido realizadas por Jeffrey (1968) y Tadesse (1997) para África tropical, Hedge (1975) en la flora de Turquía, Kožuharov (1976) para los taxones europeos y Mozzafarian (2008) para la flora de Irán. Los caracteres morfológicos utilizados para elaborar las clasificaciones infragenéricas de *Echinops* se limitan prácticamente a las brácteas del capítulo unifloro, teniendo en cuenta su número, así como el grado de unión entre las brácteas situadas más internamente (Fig. 7; Tabla 2; Hedge, 1975; Kožuharov, 1976; Rechinger, 1979; Bobrov, 1997). En este género, la diversidad de las brácteas involucrales parece estar relacionada con el hecho de que el capítulo unifloro, que tras la fecundación origina una sola semilla, es la unidad de dispersión, por lo que tiene un valor adaptativo (Davis, 1956). Por el contrario, el vilano, que es una fuente de caracteres taxonómicos clave en otras especies de *Cardueae*, no presenta ningún papel en la diseminación y es, de hecho, corto y bastante uniforme entre las especies del género. Otros caracteres, como el tipo y densidad de indumento en los tallos, hojas y brácteas, proporcionan la suficiente variabilidad para proveer de caracteres taxonómicos potencialmente útiles para la discriminación entre los taxones de cada uno de grupos del género (Mozaffarian, 2006).

Si bien la delimitación taxonómica de *Echinops* no ha sido objeto de muchas dudas y reestructuraciones, *E. acantholepis* Jaub. & Spach y *E. strigosus* L. han sido excluidos del género por algunos autores. *Echinops acantholepis* (= *Acantholepis orientalis* Less.) es una especie anual distribuida en toda la región iranoturana, incluyendo el Cáucaso y llegando hasta Pakistán y Afganistán (Hedge, 1975; Rechinger, 1979). Morfológicamente se puede distinguir bien del resto de especies de *Echinops*, puesto que presenta las brácteas involucrales del capítulo de segundo orden bien desarrolladas y visibles, con las externas

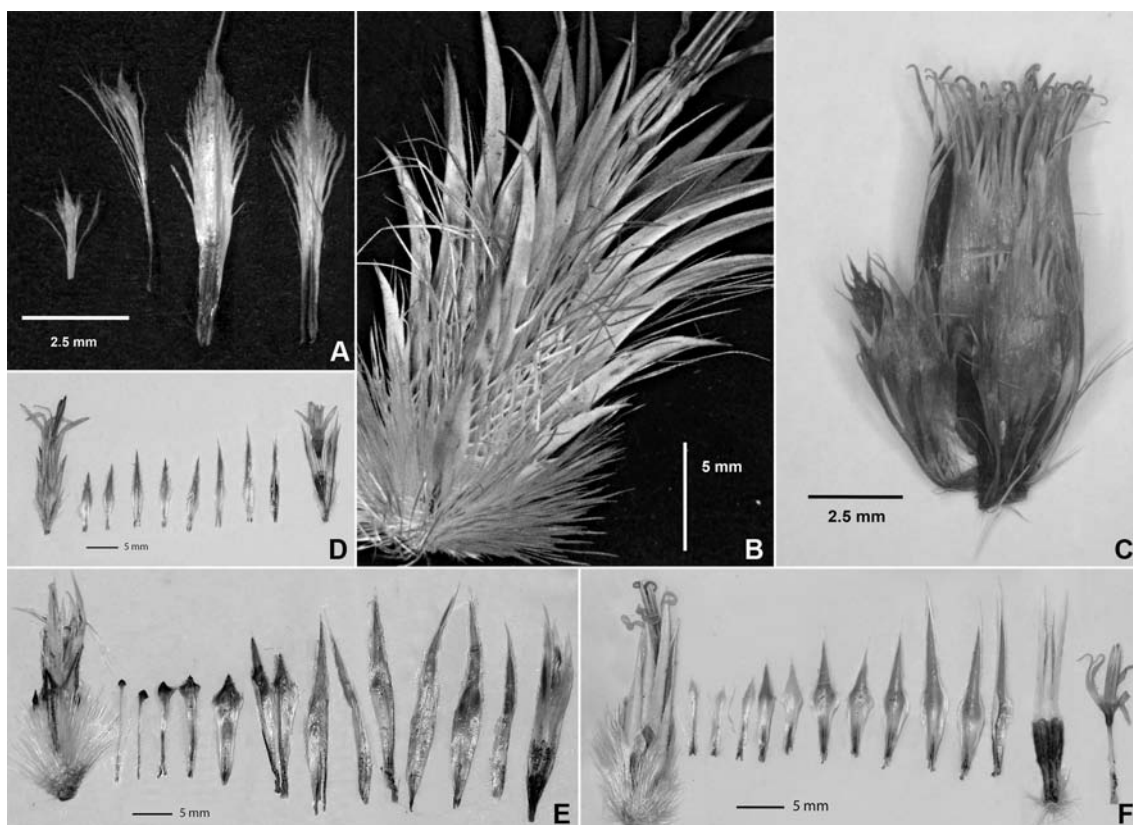


Figura 7. Diversidad de brácteas en el género *Echinops* L. **A.** Brácteas plumosas de *E. gmelini* Turcz. (sect. *Nanechinops* Bunge). **B.** Capítulos unifloros de *E. strigosus* L. (sect. *Psectra* Endl.) con 8-9 hileras de brácteas libres. **C.** Brácteas en forma de gancho de *E. hoehnelii* Schweinf. (sect. *Hamolepis* R.E.Fr.). **D.** Disección del capítulo unifloro de *E. koeltzii* Rech.f. (sect. *Echinops*), con las brácteas internas libres o ligeramente unidas en la base. **E.** Disección del capítulo unifloro de *E. spinosissimus* Turra subsp. *spinosissimus* (sect. *Ritropsis* Greuter & Rech.f.), con las brácteas internas unidas en un tubo membranoso. **F.** Disección del capítulo unifloro de *E. elymaiticus* Born (sect. *Oligolepis* Bunge), con las brácteas internas soldadas formando un tubo coriáceo.

Tabla 2 (página siguiente). Descripción y especie tipo de las secciones de *Echinops* L., de acuerdo con Bunge (1863), Fries (1923), Rechinger (1979) y Bobrov (1997). En esta tesis se ha adoptado la clasificación propuesta por Rechinger (1979), añadiendo las secciones no presentes en la región iránica según Fries (1923) y Bobrov (1997). La sección *Psectra* se ha considerado de acuerdo con Bunge (1863) y Tomšovic (1997). El número de especies de las secciones *Echinops*, *Oligolepis* y *Ritropsis* es aproximado, debido a las disconformidades entre autores.

Bunge (1863)	Fries (1923)	Rechinger (1979)	Bobrov (1997)	Esta Tesis	Especie tipo	Descripción
				<i>Acantholepis</i> (Less.) Jaub. & Spach	<i>E. acantholepis</i> Jaub. & Spach	Brácteas del involucre común grandes, las externas en forma de hoja excediendo y rodeando el capítulo. Plantas anuales. 1 especie.
<i>Psectra</i> Endl.				<i>Psectra</i> Endl.	<i>E. strigosus</i> L.	Brácteas involucrales libres, en 8-9 hileras. Plantas perennes. 1 especie.
<i>Cenchrolepis</i> Hochst.	<i>Cenchrolepis</i> Hochst.					
<i>Phaeochaete</i> Bunge	<i>Phaeochaete</i> Bunge			<i>Phaeochaete</i> Bunge	<i>E. longifolius</i> A.Rich.	Hasta 25 brácteas involucrales, las más internas unidas; las cerdas del penicilo aplanadas, unidas. Plantas perennes. 3 especies.
<i>Lasioclinium</i> Bunge						Entre 12 y 15 brácteas involucrales, en 3 hileras, las internas soldadas formando un tubo coriáceo. Plantas perennes. Aproximadamente 50 especies.
<i>Oligolepis</i> Bunge	<i>Oligolepis</i> Bunge	<i>Oligolepis</i> Bunge	<i>Oligolepis</i> Bunge	<i>Oligolepis</i> Bunge	<i>E. leucographus</i> Bunge	
<i>Rytrodes</i> Bunge	<i>Ritropsis</i> Greuter & Rech.f.	<i>Ritropsis</i> Greuter & Rech.f.	<i>Ritrodes</i> Bunge	<i>Ritropsis</i> Greuter & Rech.f.	<i>E. orientalis</i> Trautv.	Involucro de 16-25 brácteas, las internas unidas en un tubo cilíndrico membranoso. Plantas perennes. Aproximadamente 25 especies.
<i>Ritro</i> Endl.		<i>Ritro</i> Endl.				
<i>Sphaerocephalus</i> Bunge	<i>Echinops</i>	<i>Echinops</i>	<i>Echinops</i>	<i>Echinops</i>	<i>E. sphaerocephalus</i> L.	De 16 a 25 brácteas, las internas libres o ligeramente unidas en la base. Plantas perennes. Aproximadamente 50 especies.
<i>Terma</i> Endl.		<i>Terma</i> Endl.	<i>Terma</i> Endl.	<i>Terma</i> Endl.	<i>E. exaltatus</i> Schrad.	Brácteas involucrales internas libres; penicilo en forma de copa, unido sólo en la parte superior. Plantas perennes. 4 especies.
<i>Chamaechinops</i> Bunge	<i>Chamaechinops</i> Bunge	<i>Chamaechinops</i> Bunge	<i>Chamaechinops</i> Bunge	<i>Chamaechinops</i> Bunge	<i>E. humilis</i> M.Bieb.	Brácteas involucrales internas libres; cerdas del penicilo aristadas, ligeramente dentadas en la parte superior, no barbadas. Plantas perennes y bienales. 5 especies.
<i>Nanechinops</i> Bunge	<i>Nanechinops</i> Bunge	<i>Nanechinops</i> Bunge	<i>Nanechinops</i> Bunge	<i>Nanechinops</i> Bunge	<i>E. nanus</i> Bunge	De 16 a 20 brácteas involucrales libres, largamente plumosas. Plantas anuales. 3 especies.
	<i>Pterolepis</i> O.Hoffm.					
	<i>Harmolepis</i> O.Hoffm.			<i>Harmolepis</i> R.E.Fr.	<i>E. hoehnellii</i> Schweinf.	Brácteas involucrales terminadas en forma de gancho, las interiores unidas. Plantas perennes. 1 especie.
		<i>Hololeuce</i> Rech.f.		<i>Hololeuce</i> Rech.f.	<i>E. hololeucus</i> Rech.f.	Entre 15 y 20 brácteas involucrales, las exteriores largamente plumosas. Plantas perennes. 1 especie.
			<i>Pleiacme</i> Bornm.			

similares a hojas y que exceden notablemente las partes restantes de la sincefalia, mientras que las brácteas en *Echinops* son comparativamente menores y se encuentran ocultas por la sincefalia (Fig. 8). Aunque este taxón ya fue incluido dentro del género *Echinops* por Jaubert & Spach (1848), la mayoría de autores lo han considerado como un género aparte (Kupicha, 1975; Dittrich, 1977, 1996; Rechinger, 1979; Petit, 1988, 1997; Bremer, 1994; Bobrov, 1997; Susanna & Garcia-Jacas, 2007; Mozaffarian 2008). Sin embargo, tanto datos filogenéticos (Garnatje et al., 2005), como polínicos (Garnatje & Martín, 2007), relacionan *E. acantholepis* con el grupo de *Echinops* anuales, pertenecientes a la sección *Nanechinops* Bunge. Esta relación ya fue puesta de manifiesto por Kruse & Meusel (1972), en base a caracteres morfológicos. Por otra parte, de acuerdo con Petit (1988), *E. strigosus*, una especie bienal iberomauritánica, constituye un taxón aislado en el género, según los datos que ofrecen sus características polínicas y foliares. De hecho, Tomšovic (1997) sugirió segregar dicho taxón de *Echinops*, describiendo el género monotípico *Psectra* (Endl.) Tomšovic. No obstante, el estudio filogenético existente (Garnatje et al., 2005), muestra que su posición sistemática está claramente incluida dentro de *Echinops*, por lo que debe ser mantenida la especie *E. strigosus*.



Figura 8. Tipos de brácteas del involucre de segundo orden presentes en el capítulo de *Echinops*, indicadas con flechas: **A.** Visibles y en forma de hoja, rodeando el conjunto de la sincefalia, en *Echinops acantholepis* Jaub. & Spach (W-3703). **B.** Ocultas y reducidas, como se presentan en el resto de especies del género, en la imagen visibles al haber perdido la planta todos los capítulos unifloros durante la dispersión, ejemplificadas en *E. cf. orientalis* Trautv. © 2009, 2010 Ismael Sánchez-Jiménez.

2. ANTECEDENTES

La presente tesis recoge una serie de trabajos centrados en el género *Echinops*, el cual hemos pretendido estudiar desde diversos puntos de vista con tal de poder establecer un marco evolutivo sólido del género, desde una perspectiva multidisciplinar. En este sentido, se han utilizado diversas aproximaciones metodológicas, desde técnicas clásicas como la cariólogía y la palinología, hasta aproximaciones más modernas como la sistemática y filogenia moleculares y la citogenética.

2.1. RECUENTOS CROMOSÓMICOS Y CANTIDAD DE ADN

La citogenética se encarga de estudiar el cromosoma en cualquier nivel, comenzando por el recuento del número de cromosomas en placas metafásicas o la elaboración de cariotipos. Desde un punto de vista biosistemático, la citogenética resulta muy interesante al aportar datos fenotípicos cuyas variaciones (ya sean en número, medida o estructura) pueden ayudar a interpretar las relaciones entre taxones, así como los procesos que han conducido a la diversificación evolutiva o las direcciones que ha tomado la evolución. El recuento de los números cromosómicos ha gozado siempre de popularidad dentro de los estudios biosistemáticos en plantas, como muestra la existencia de algunas bases de datos disponibles en la red, como *Index of Plant Chromosome Numbers* (IPCN, Goldblatt & Johnson, 1979+) o *Index to chromosome numbers in the Asteraceae* (Watanabe, 2004).

Las asteráceas presentan una gran variabilidad de números cromosómicos, con números básicos que van desde $x = 2$ a $x = 120$. No obstante, el número más frecuente es $x = 9$, que posiblemente se trate del estado plesiomórfico del carácter para toda la familia (Jeffrey, 2007). La variabilidad en el número de cromosomas se ha explicado en base a los procesos de alopoliploidía, aneuploidía y disploidía (Solbrig, 1977). Además, la reducción por disploidía es muy característica en *Asteraceae* (especialmente anuales) de las zonas más áridas o perturbadas, y parece estar correlacionada con la especiación bajo estas condiciones (Jeffrey, 2007).

El número $x = 10$ se considera ancestral en la tribu *Cardueae* (Semple & Watanabe, 2009), pero los géneros más basales de la tribu presentan otros números cromosómicos básicos: $x = 9-12$ en *Carlininae*, $x = (7)13-18$ en *Echinopsinae* y $x = 18$ en *Cardopatiinae*, los cuales sugieren una poliploidización al principio de la historia evolutiva de la tribu. De acuerdo con Barker et al.

(2008) se habría producido un evento de paleoploidización anterior al origen de *Cardueae*, siendo ausentes otros eventos del mismo tipo entre la base de *Cardueae* y la tribu *Centaureinae*.

Dentro del género *Echinops* los números cromosómicos más frecuentes son $2n = 28, 30, 32$, sugiriendo una paleoploidización aunque funcionalmente se comporten como diploides. Otros valores menos frecuentes son $2n = 34$ en *E. aucheri* Boiss. (Sheidai et al., 2000) y $2n = 36$ en *E. transcaucasicus* Ilijin (Gukasian & Safarian, 1990), mientras que *E. acantholepis* presenta $2n = 14$ (Garnatje et al., 2004b). La existencia de diferentes números cromosómicos y niveles de ploidía sugiere que la disploidía y la poliploidía constituyen los principales mecanismos de la evolución cromosómica del grupo (Garnatje et al., 2004b). De todas formas, estos trabajos aportan solamente datos para un 40-50% de las especies de *Echinops* y de ahí la importancia de profundizar en este campo añadiendo recuentos que permitan una mejor comprensión de la evolución cromosómica en el género.

El valor C, esto es, la cantidad de ADN del complemento haploide (Swift, 1950), supone una herramienta muy útil para detectar patrones ecológicos, taxonómicos y evolutivos en los linajes vegetales (Bennett, 1972; Price & Bachmann, 1976; Torrell & Vallès, 2001; Vinogradov, 2003; Albach & Greilhuber, 2004; Garcia et al., 2004, 2008; Garnatje et al., 2004a, 2009; Chase et al., 2005; Price et al., 2005; Siljak-Yakovlev et al., 2005, 2008, 2010; Beaulieu et al., 2007; Hidalgo et al., 2008a, 2010; Slovák et al., 2009; Dušková et al., 2010; Lavergne et al., 2010; Muratovic et al., 2010; Pellicer et al., 2010a). De este modo, entender la variación de las cantidades de ADN nuclear entre las especies vegetales constituye un importante avance hacia incrementar el conocimiento sobre los procesos evolutivos y su diversificación. El tamaño del genoma es muy variable en angiospermas, yendo desde *Genlisea margaretae* Hutch. (*Lentibulariaceae* Rich.) con $1C = 0,0648$ pg de ADN (Greilhuber et al., 2006; Chase et al., 2009) hasta la monocotiledónea *Paris japonica* (Franch. & Sav.) Franch. (*Melanthiaceae* Batsch), con $1C = 152,23$ pg (Pellicer et al., 2010b). El interés por el conocimiento de los datos de cantidad de ADN en plantas ha sido creciente en las últimas dos décadas, tiempo en el que se han publicado numerosas listas de especies con su correspondiente valor C (Marie & Brown, 1993; Bennett & Leitch, 1995, 1997; Bennett et al., 2000; Zonneveld et al., 2005; Siljak-Yakovlev et al., 2010), así como algunas bases de datos disponibles en internet: *Plant DNA C-Value Database* (Bennett & Leitch, 2010), *GSAD: a genome size database in the Asteraceae* (Garnatje et al., 2010, 2011).

El conocimiento sobre la cantidad de ADN de la familia *Asteraceae* se ha incrementado notablemente en el último lustro, donde las estimaciones de cantidad de ADN nuclear han aumentado de 1.208 (Garnatje et al., 2007) hasta las 1.780, incluyendo estimaciones para 110 géneros y 820 especies, cubriendo, por tanto, el 6% de la familia a nivel genérico y el 3% a nivel de especie (Garnatje et al., 2010, 2011). Esto significa que, desde la perspectiva del tamaño del genoma, las asteráceas están relativamente bien estudiadas, en comparación con el 1,8% del conjunto de especies de angiospermas (Bennett & Leitch, 2011).

En el caso del género *Echinops* únicamente un trabajo previo al desarrollo de esta tesis presenta análisis en términos de cantidad de ADN (Garnatje et al., 2004a), lo cual supone que, a pesar de estar comparativamente mejor estudiado que la mayoría de géneros de *Asteraceae*, sólo se conoce el tamaño del genoma de menos del 25% de las especies, con valores que van desde $2C = 2,50$ pg en *E. strigosus* hasta 10,30 pg en *E. talassicus* Golosk. (Garnatje et al., 2004a).

2.2. PALINOLOGÍA

Los datos morfológicos de los granos de polen son útiles en todos los niveles de la jerarquía taxonómica (Stuessy, 2009) puesto que presentan un gran valor sistemático (Blackmore & Barnes, 1990). Las características del polen se han empleado exitosamente en estudios taxonómicos y sistemáticos de la familia *Asteraceae* (Dimon, 1971; Carlquist, 1976; Wagenitz, 1976; Skvarla et al., 1977; Jones, 1979; Blackmore, 1981; Vezev et al., 1994; Díez et al., 1999; Perveen, 1999; Torrell et al., 1999; Martín et al., 2001, 2003; Blackmore et al., 2009; Pellicer et al., 2009), así como de la tribu *Cardueae* (Tormo & Ubera, 1995; Martín & Garcia-Jacas, 2000; Vilatersana et al., 2001; Hidalgo et al., 2008b).

En *Asteraceae* los granos de polen son típicamente isopolares, radialmente simétricos y tricolporados (Stix, 1960). Además, la presencia de espinas bien desarrolladas en el grano de polen es mayoritaria en la familia, a pesar de que su forma y tamaño puede variar entre las tribus (Wodehouse, 1945). Gracias al desarrollo de las técnicas de microscopía electrónica de transmisión, los trabajos de Skvarla & Larson (1965), Skvarla & Turner (1966) y Skvarla et al. (1977) permitieron detallar y establecer tres tipos básicos de estratificación de la exina del polen en *Asteraceae*: el tipo anthemioide, caracterizado por un infratécum con columelas sólidas que conectan con la capa base de la ectexina, sin la interrupción de una cávea; el tipo heliantoide, caveado y con columelas que presentan forámenes internos; y el tipo senecioide, con cávea y sin forámenes (Blackmore et al., 2010). Por otra parte, la diversidad de los

granos de polen en asteráceas puede ser explicada por la combinación de tres tendencias evolutivas: i) reducción de espinas, ii) reducción y pérdida de las columelas internas, dando lugar a la formación de una cávea, y iii) formación de un patrón crestado, dando lugar al polen lofado o fenestrado; otras variaciones como la forma, longitud de los colpos o estructura de las capas de la exina son, de acuerdo con Wagenitz (1976), de importancia secundaria. La exina del polen de *Asteraceae* se caracteriza, además, por presentar varias capas: la ectexina, generalmente formada por un tectum usualmente microperforado, el infratectum, complejo y estratificado en varias capas, y, frecuentemente, la presencia de una cávea (Blackmore et al., 2009).

La variación morfológica del polen en *Cardueae* es probablemente mayor que en cualquier otra tribu de la familia (Blackmore et al., 2009), si bien los granos de polen son principalmente de gran tamaño, espinosos, tricolporados y con un infratectum con dos capas de columelas; la interna presenta unas columelas gruesas (megacolumelas), mientras que en la externa éstas son más delgadas (microcolumelas), dando lugar a una apariencia de columelas ramificadas (Wodehouse, 1945; Erdtman, 1952; Wagenitz, 1976; Dittrich, 1977; Nair & Lawrence, 1985). Por otra parte, en el polen de *Cardueae* se pueden observar dos tendencias evolutivas principales (Dittrich, 1977): i) la reducción de espinas y ii) la reducción de las columelas internas, llegando a formarse cavidades internas, tal y como ocurre en el grupo de *Rhaponticum* Vaill. (Hidalgo, 2008b). En la literatura se encuentran numerosas propuestas de clasificación de los tipos polínicos presentes en *Asteraceae* y *Cardueae*, teniendo la mayoría de ellos en

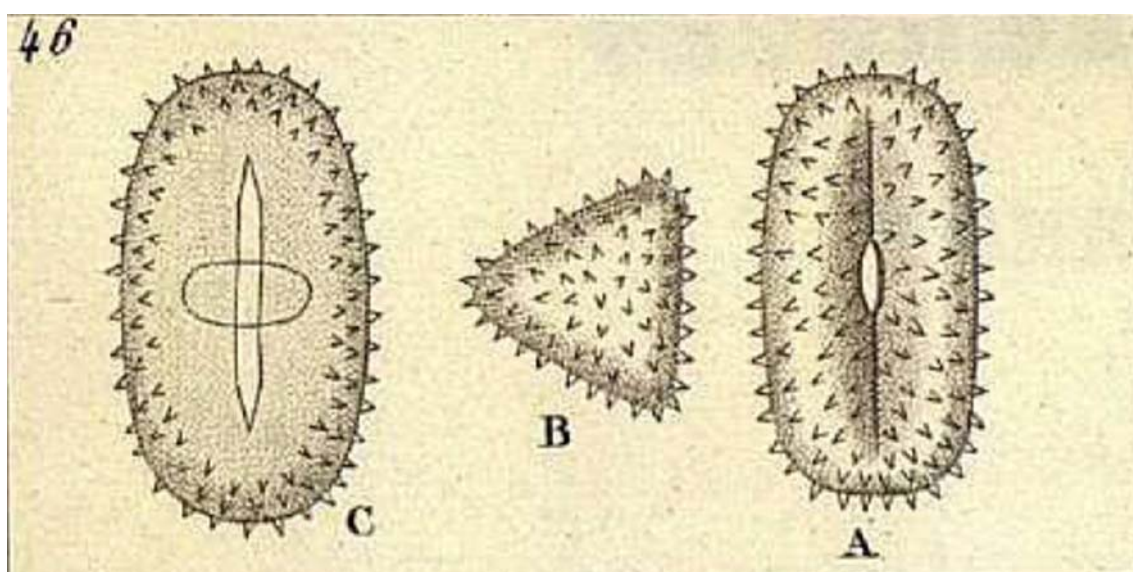


Figura 9. Primeras representaciones del polen de *E. sphaerocephalus*, dibujadas por Mohl (1835).

Taxón	Referencias
<i>E. acantholepis</i> Jaub. & Spach ¹	Tomšovic (1997), Meo (2005), Garnatje & Martín (2007)
<i>E. albicaulis</i> Kar. & Kir.	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. bannaticus</i> Rochel ex Schrad.	Stix (1964, 1970)
<i>E. chlorophyllus</i> Rech.f.	Ikuse (1962)
<i>E. cornigerus</i> DC.	Nair & Lawrence (1985)
<i>E. dumanii</i> C.Vural	Vural et al. (2010)
<i>E. echinatus</i> Roxb.	Chaubal & Deodikar (1965), Dakshini & Singh (1973), Parveen & Bhandari (1981), Perveen (1999)
<i>E. fontqueri</i> Pau	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. giganteus</i> A.Rich	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. hispidus</i> Fresen.	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. macrophyllus</i> Boiss. & Hauskn.	Jafari & Ghanbarian (2007)
<i>E. microcephalus</i> Sibth. & Sm.	Garnatje & Martín (2007), Chester & Raine (2001)
<i>E. mildbraedii</i> Mattf.	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. nanus</i> Bunge	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. obliquilobus</i> Iljin ²	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. ossicus</i> K.Koch ³	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. ritro</i> L.	Pla Dalmau (1961), Kuprianova & Alyoshina (1972), Tormo & Ubera (1888, 1995), Garnatje & Martín (2007)
<i>E. robustus</i> Bunge	Ikuse (1962)
<i>E. sphaerocephalus</i> L.	Mohl (1835), Wodehouse (1945), Erdtman (1952), Blackmore (1990), Tormo & Ubera (1988, 1995), Reille (1995), Garnatje & Martín (2007), Punt & Hoen (2009)
<i>E. spinosissimus</i> Turra	Reille (1998)
<i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>spinosus</i> (L) Greuter ⁴	Dimon (1971), Reille (1995)
<i>E. strigosus</i> L.	Díez (1987), Tormo & Ubera (1988, 1995), Tomšovic (1997), Garnatje & Martín (2007)

Tabla 3. Especies de *Echinops* que han sido estudiadas previamente desde el punto de vista palinológico, y referencias bibliográficas correspondientes. Los taxones o referencias indicadas con superíndices fueron publicadas como: 1) *Acantholepis orientalis* Less.; *E. saissanicus* (B.Keller) Bobr., 3) *E. galaticus* Freyn, y 4) *E. spinosus* L.

común la consideración del polen de *Echinops* como un tipo aparte (Mohl, 1835; Stix, 1960; Pla Dalmau, 1961; Díez, 1987; Tormo & Ubera, 1988, 1995; Perveen, 1999; Jafari & Ghanbarian, 2007; Punt & Hoen, 2009).

Las primeras observaciones del polen de *Echinops* fueron realizadas por Mohl (1835), quien describió el polen de *E. sphaerocephalus* L. como un prisma triangular, redondeado en los polos y con los laterales ligeramente hundidos

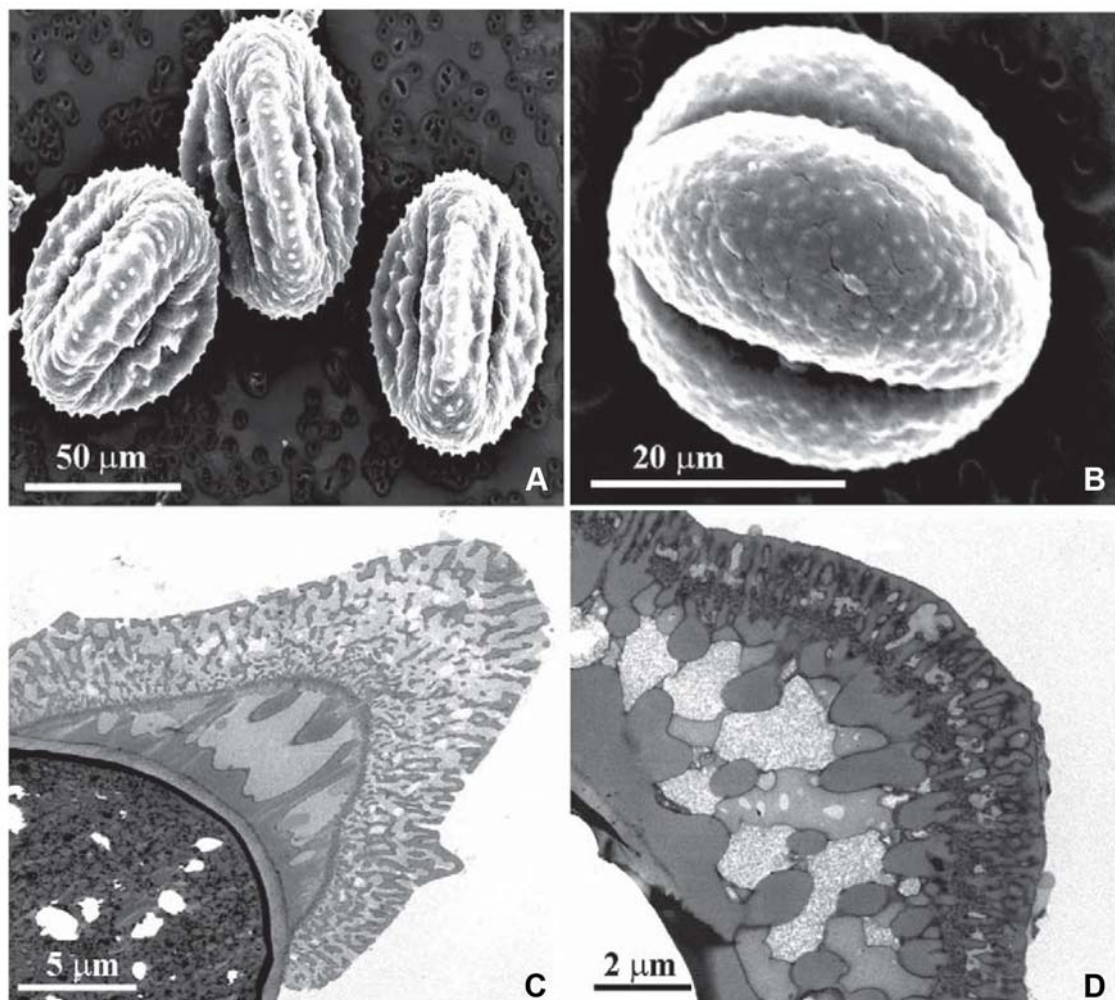


Figura 10. Tipos de polen en *Echinops*: **A, C.** Tipo perenne en *E. ossicus* K.Koch. **B,D.** Tipo anual en *E. strigosus*. Las imágenes proceden de Garnatje & Martín (2007).

(Fig. 9). A pesar de que más de 20 especies del género *Echinops* han sido incluidas en estudios generales de morfología polínica (i.e. Wodehouse, 1945; Pla Dalmau, 1961; Nair & Lawrence, 1985; Punt & Hoen, 2009), sólo unos pocos trabajos se han centrado específicamente en el estudio de caracteres presentes en los granos de polen de uno o varios taxones del género *Echinops* (Tabla 3). En relación con la ultraestructura del grano de polen, Stix (1964, 1970) analizó la exina y su morfogénesis en *E. bannaticus* Rochel ex Schrad., y Blackmore (1990) estudió la estructura de la exina de *E. sphaerocephalus* tomándola como un modelo para estudiar las homologías de la esporodermis y su morfogénesis en plantas terrestres. Desde el punto de vista sistemático, Tormo & Uberta (1988) estudiaron la morfología polínica de las especies de *Echinops* presentes en la península ibérica, y Tomšovic (1997), de acuerdo con sus observaciones del polen en *Echinops*, propuso algunos reajustes taxonómicos que fueron posteriormente rechazados en base a datos moleculares (Garnatje et al., 2005). Por último, el

trabajo más exhaustivo realizado sobre el polen en *Echinops* fue el realizado por Garnatje & Martín (2007), quienes describieron y analizaron las características de 13 especies desde un punto de vista sistemático y bajo un marco evolutivo. *Echinops* incluye pólenes de gran tamaño, de hasta 105 μm (Erdtman, 1952), y, según Garnatje & Martín (2007), se dividen en dos tipos principales, uno de ellos propio de las especies anuales y el otro de las perennes: el tipo perenne de polen es significativamente mayor que el anual, y se presenta como un grano de polen con un intercolpo prominente, en forma cresta o arista, que no aparece en el tipo anual (Fig. 10; Garnatje & Martín, 2007).

2.3. SISTEMÁTICA MOLECULAR

Uno de los principios de la biología evolutiva es la idea de que los organismos comparten un origen común y que, consecuentemente, han divergido a lo largo del tiempo. Las filogenias representan intentos de reconstruir la historia evolutiva de la vida, pretendiendo discernir cómo ha ocurrido la diversificación entre linajes, por lo que permiten el reconocimiento de grupos naturales, es decir, aquellos que comprenden todos los descendientes de un mismo ancestro. La clasificación taxonómica de los organismos se convierte, con esto, en el ordenamiento jerárquico de grupos monofiléticos. El análisis filogenético, por tanto, se ha constituido como una herramienta fundamental en el estudio de la evolución y de la biodiversidad.

Los caracteres bioquímicos, fisiológicos y morfológicos han sido tradicionalmente la herramienta de análisis en biología evolutiva. No obstante, la aparición y perfeccionamiento de las técnicas moleculares a partir de la última década del siglo pasado supuso un gran hito en el análisis filogenético, puesto que los caracteres genéticos proporcionan una mayor cantidad de información y con menos problemas de interpretación estructural. Esta situación, unida al desarrollo de importantes herramientas matemáticas e informáticas (incluyendo la construcción de ordenadores cada vez más potentes) capaces de procesar todos estos datos, ha conseguido que la inferencia filogenética constituya un análisis cada vez más rápido y eficiente. Actualmente, el estudio de las historias evolutivas de los organismos constituye un primer paso en el conocimiento de los distintos grupos, sea cual sea el rango jerárquico (familia, tribu, género, etc.), fundamental para establecer un marco sistemático que permita delimitarlos lo más precisamente posible.

Hasta el desarrollo de esta tesis, el género *Echinops* no había sido estudiado en profundidad desde el punto de vista de la filogenia. Los análisis filogenéticos

realizados hasta el momento se reducen a una única aproximación basada en la región de ADN nuclear del espaciador interno transcrito (ITS, Garnatje et al., 2005), en la que sólo se muestrearon 30 especies de *Echinops* incluyendo *E. acantholepis*, que entonces constaba como *Acantholepis orientalis*, lo cual supone apenas la cuarta parte de todos los miembros del grupo. Según este trabajo, *Echinops* constituye un grupo natural, confirmando los resultados de las investigaciones filogenéticas de la tribu (García-Jacas et al., 2002; Susanna et al., 2006), que sitúan *Echinops* en una politomía basal dentro de la tribu *Cardueae*, junto con las subtribus *Cardopatiinae* y *Carlininae*. De acuerdo con el estudio de Garnatje et al. (2005), la especie anual *E. acantholepis* queda incluida dentro

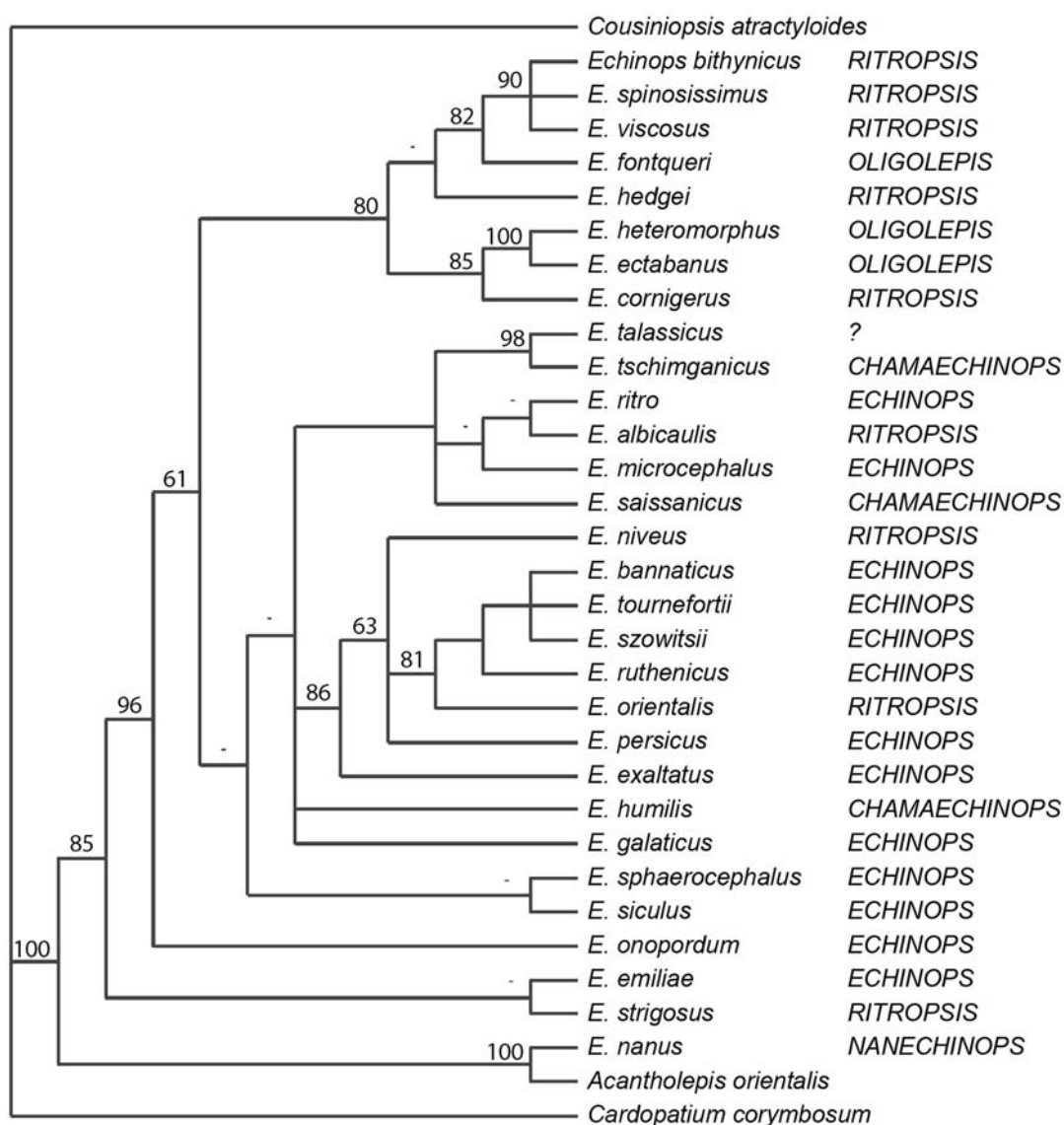


Figura 11. Filogenia de *Echinops* obtenida por Garnatje et al. (2005) a partir de la región ITS. Al lado de cada especie figura la sección considerada. Los números indican los valores de bootstrap. Imagen obtenida de Garnatje et al. (2005).

del género, lo cual concuerda con su tratamiento como *E. acantholepis* (Jaubert & Spach, 1848). *Echinops acantholepis* forma un clado consistente junto con *E. nanus* Bunge, perteneciente a la sección *Nanechinops*, caracterizada por incluir a todas las especies anuales del género. Además, otros datos como la morfología polínica (Garnatje & Martín, 2007), también apuntan a la relación de *E. acantholepis* con los *Echinops* con ciclo vital anual, tal y como ya sugirieran Kruse & Meusel (1972). De acuerdo con Garnatje et al. (2005), el grupo de *E. acantholepis* y *E. nanus* se sitúan en la base del árbol filogenético. No obstante, la asociación de dos taxones anuales en la base del árbol filogenético podría ser debida a la atracción de ramas largas, un error artefactual producido en los análisis de máxima parsimonia con mayor frecuencia que en otros tipos de análisis, en el que se tienden a agrupar taxones que evolucionan más rápidamente (Felsenstein, 1978; Bergsten, 2005), como puede ocurrir con las plantas anuales; esto se debe a que presentan una tasa de mutación del genoma mayor que las plantas perennes, por lo que se reproducen y dan lugar a generaciones nuevas a un ritmo más elevado. Es necesario, por tanto, confirmar esta relación filética mediante la realización de nuevos análisis, incluyendo un mayor número de representantes de *Echinops* potencialmente afines a *E. acantholepis* y *E. nanus* y escogiendo métodos de análisis menos sensibles que la parsimonia al efecto de los taxones con alta tasa de mutación, como pueden ser los métodos probabilísticos de máxima verosimilitud o de inferencia bayesiana (Philippe et al., 2005).

Por otra parte, el análisis de la región ITS (Fig. 11; Garnatje et al., 2005), sitúa al resto de especies analizadas agrupadas formando un clado consistente, en cuya base se diversifica el linaje de la especie bienal *E. strigosus*, presente en el sur de la península ibérica y el norte de África; se trata de una especie que, según Petit (1988), se encuentra aislada en el género y que, de hecho, Tomšovic (1997) sugirió segregarla en un género aparte, nombrándola *Psectra strigosa*, en base a caracteres polínicos y a la morfología foliar. Sin embargo, este taxón se encuentra perfectamente incluido en *Echinops* en base a los análisis moleculares junto con la especie endémica del sureste de Turquía *E. emiliae* Schwarz ex P.H.Davis, aunque esta asociación no es consistente en dichos análisis (Garnatje et al., 2005). *Echinops strigosus* ha sido clasificado en las secciones *Psectra* Endl. (Bunge, 1863) y *Ritrodes* Bunge (Kožuharov, 1976), mientras que *E. emiliae* se ha atribuido a la sección *Echinops* (Hedge, 1975). No obstante, su posición filogenética las sitúa aisladas del resto de especies de *Ritrodes* y *Echinops* (Garnatje et al., 2005), respectivamente, por lo que la necesidad de nuevos análisis, tanto moleculares como citogenéticos y morfológicos, se hace

patente para poder esclarecer adecuadamente su posición filogenética y la relación existente entre ambos taxones.

Por otra parte, el resto de especies analizadas por Garnatje et al. (2005), contenidas en un clado consistente, no forman grupos naturales que reflejen las clasificaciones seccionales consideradas en las revisiones del género (Bunge, 1863; Fries, 1923; Hedge, 1975; Kožuharov, 1976; Rechinger, 1979; Bobrov, 1997). Además, los análisis filogenéticos basados en ITS pueden incluir algunas distorsiones, como la falta de homogeneización entre las distintas secuencias ITS de un mismo genoma (Álvarez & Wendel, 2003), por lo que se requiere una discusión más amplia en la que se incluyan otros datos (citogenéticos, morfológicos, palinológicos) y se añadan más marcadores moleculares. En este sentido, la utilización de secuencias de ADN cloroplástico, de herencia monoparental, evita la distorsión producida por las secuencias nucleares en aquellos linajes en los que puede haber tenido lugar diferentes procesos de hibridación o introgresión (Mort et al., 2007). Por otra parte, la combinación de diferentes genomas es actualmente una de las mejores herramientas para la reconstrucción filogenética (Qiu et al., 1999); el análisis combinado soluciona un problema que muestran las filogenias basadas en un único marcador molecular, y es que, a pesar de ofrecer un gran número de caracteres, en última instancia conforma una taxonomía basada en un solo carácter, la región considerada (Doyle, 1992).

OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

El trabajo que aquí se presenta se enmarca dentro de la línea de investigación en *Organització del genoma, sistemàtica i filogènia*, en miembros de la familia *Asteraceae*, la cual se desarrolla en el *Laboratori de Botànica de la Universitat de Barcelona* y en el *Institut Botànic de Barcelona* (IBB-CSIC-ICUB), dentro del grupo de investigación en *Biosistemàtica i Filogènia i Citogenètica Moleculars de Plantes* (BioFiC-PLANTA, www.etnobioc.cat), integrado en el *Grup de Recerca en Biodiversitat i biosistemàtica vegetals* (GReB, www.webgreb.org). En particular, esta tesis doctoral tiene como hilo conductor el análisis filogenético, en cuyo marco se discuten el resto de estudios, de carácter taxonómico, cariológico, citogenético y palinológico, centrado en el género *Echinops*, perteneciente a la tribu *Cardueae* de la familia *Asteraceae*.

En este sentido se han planteado los siguientes objetivos generales:

- Obtener una reconstrucción filogenética sólida del género *Echinops* mediante el análisis de regiones nucleares y cloroplásticas utilizando diferentes métodos de análisis, ampliando el muestreo con respecto a lo publicado anteriormente (Garnatje et al., 2005).
- Discutir si las clasificaciones infragenéricas de *Echinops* forman grupos naturales, valorando, por tanto, la idoneidad de las clasificaciones taxonómicas

propuestas con anterioridad.

- Superponer algunos caracteres clave tradicionalmente empleados en los tratamientos infragenéricos, como la morfología de las brácteas involucrales del capítulo unifloro, a la filogenia obtenida.
- Incrementar el número de especies y poblaciones de *Echinops* para las cuales se conoce el número de cromosomas, así como su cantidad de ADN nuclear.
- Investigar la evolución cromosómica dentro del género valorando las posibles hipótesis que se generen sobre el número cromosómico básico ancestral, así como la homogeneidad cromosómica de los diferentes grupos definidos en el nuevo marco filogenético obtenido.
- Analizar e interpretar los nuevos datos de tamaño del genoma bajo un marco filogenético sólido, teniendo en cuenta también los datos publicados anteriormente.
- Aportar nuevos datos sobre el polen de *Echinops*, aumentando el número de especies estudiadas y el muestreo en las diferentes secciones del género.
- Interpretar los nuevos datos polínicos en base al marco filogenético establecido, con el objetivo de intentar vislumbrar la evolución de los caracteres polínicos dentro del grupo.
- Evaluar si la morfología polínica y las medidas del polen constituyen herramientas valiosas para contribuir en la resolución de la sistemática del género, así como valorar si éstas apoyan o no los datos obtenidos mediante los métodos moleculares.

INFORME DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS



**institut
botànic**
de Barcelona

IBB-CSIC-ICUB

Parc de Montjuic
Passeig del Migdia s/n
08038 Barcelona

Tel. 93 289 06 11
Fax 93 289 06 14

Teresa Garnatje Roca
tgarnatje@ibb.csic.es



U
UNIVERSITAT DE BARCELONA
B

Facultat de Farmàcia
Laboratori de Botànica

Av. Joan XXIII, s/n
08028 Barcelona

Tel. 93 402 44 89
Fax 93 403 58 79

Oriane Hidalgo
orianehidalgo@ub.edu

INFORME DE LA DRA. TERESA GARNATJE ROCA I LA DRA. ORIANE HIDALGO, DIRECTORES DE LA TESI DEL SR. ISMAEL SÁNCHEZ JIMÉNEZ, SOBRE LA PARTICIPACIÓ QUE AQUEST DOCTORAND HA TINGUT EN CADASCUN DELS ARTICLES QUE PRESENTA A LA SEVA TESI I SOBRE ELS FACTORS D'IMPACTE I LA CATEGORITZACIÓ DE LES REVISTES EN QUÈ HAN ESTAT PUBLICATS O ACCEPTATS O A LES QUALS SERAN ENVIATS.

El doctorand Ismael Sánchez Jiménez és el primer autor en totes les publicacions de la tesi que presenta. El doctorand ha estat el principal responsable del disseny experimental dels treballs, partint del seu projecte de tesi. Ha participat de manera molt activa, fins i tot realitzant expedicions pel seu compte, en la recol·lecció dels materials. Ha realitzat les anàlisis pertinents en cada cas per tal d'obtenir els resultats i ha escrit, en gran part, els articles. Els resultats de cap dels treballs presentats no han estat ni seran utilitzats de cap manera per a cap altra tesi doctoral.

A continuació esmentem els articles que constitueixen la tesi doctoral d'Ismael Sánchez Jiménez, tot indicant el factor d'impacte de la revista i la categorització d'aquesta en el seu àmbit, així com la participació del doctorand en cada article. El factor d'impacte de les revistes és el correponent a l'any 2011 (versió disponible més recent).

1. Chromosome Numbers in Three Asteraceae Tribes from Inner Mongolia (China), with Genome Size Data for Cardueae

ISMAEL SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Jaume Pellicer, Oriane Hidalgo, Sònia Garcia, Teresa Garnatje & Joan Vallès

Revista: Folia Geobotanica 44: 307-322 (2009). DOI 10.1007/s12224-009-9043-z

Participació del doctorand: Obtenció, anàlisi i discussió de dades, col·laboració en la redacció de l'article.

Factor d'impacte: 1,500

Categorització de la revista: Posició 90 de 190 (Q2, segon quartil)

2. Molecular systematics of *Echinops* L. (Asteraceae, Cynareae): A phylogeny based on ITS and *trnL-trnF* sequences with emphasis on sectional delimitation

ISMAEL SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Georgy A. Lazkov, Oriane Hidalgo & Teresa Garnatje

Revista: Taxon 59(3): 698-708 (2010)

Participació del doctorand: Recol·lecció de material, disseny del treball, obtenció, anàlisi i discussió de dades, redacció de l'article.

Factor d'impacte: 2,703

Categorització de la revista: Posició 46 de 190 (Q1, primer quartil)

3. Genome size and chromosome number in *Echinops* (Asteraceae, Cardueae) in the Aegean and Balkan regions: technical aspects of nuclear DNA amount assessment and genome evolution in a phylogenetic frame

ISMAEL SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Oriane Hidalgo, Miguel Ángel Canela, Sonja Siljak-Yakovlev, Marija Edita Šölić, Joan Vallès & Teresa Garnatje

Revista: Plant Systematics and Evolution 298: 1085-1099 (2012). DOI 10.1007/s00606-012-0618-4

Participació del doctorand: Recol·lecció de material, disseny del treball, obtenció, anàlisi i discussió de dades, redacció de l'article.

Factor d'impacte: 1,335

Categorització de la revista: Posició 97 de 190 (Q3, tercer quartil)

4. *Echinops spinosissimus* Turra subsp. *neumayeri* (Vis.) Kožuharov (Asteraceae, Cardueae): a new record for the flora of Greece

ISMAEL SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Oriane Hidalgo & Teresa Garnatje

Revista: Adansonia, sér. 3, 34 (1): 129-132 (2012).

<http://dx.doi.org/10.5252/a2012n1a15>

Participació del doctorand: Recol·lecció de material, idea del treball, redacció de l'article.

Factor d'impacte: 0,325

Categorització de la revista: Posició 171 de 190 (Q4, quart quartil)

5. Pollen study in the genus *Echinops* L. (Asteraceae, Cardueae)

ISMAEL SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Teresa Garnatje & Oriane Hidalgo

Revista: Plant Systematics and Evolution, en preparació (previst de ser enviat a la revista a finals de 2012)

Participació del doctorand: Recol·lecció de material (en part), obtenció, anàlisi i discussió de dades, redacció de l'article.

Factor d'impacte: 1,335

Categorització de la revista: Posició 97 de 190 (Q3, tercer quartil)

Barcelona, 26 d'octubre del 2012

Teresa Garnatje Roca

Científica titular CSIC

Oriane Hidalgo

Investigadora postdoctoral UB

Directores de la tesi doctoral d'Ismael Sánchez Jiménez

SÍNTESIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este apartado de la tesis se recoge un resumen y discusión de los principales resultados que han tenido lugar en el desarrollo de la misma, recogidos todos ellos en los correspondientes artículos, disponibles al final de este manuscrito.

En primer lugar, es razonable exponer los resultados del análisis filogenético (Sánchez-Jiménez et al., 2010), puesto que han constituido el marco de referencia en los trabajos que se han desarrollado con posterioridad. Este marco filogenético, además, se ha actualizado en el estudio dedicado a la cantidad de ADN (Sánchez-Jiménez et al., 2012a). A continuación, se expondrán las discusiones correspondientes a la interpretación de los datos de números cromosómicos y de valores de cantidad de ADN (Sánchez-Jiménez et al., 2009, 2012a). Si bien el trabajo dedicado al recuento cromosómico de, entre otros taxones, *Echinops gmelini* Turcz. (Sánchez-Jiménez et al., 2009) es anterior a la publicación del marco filogenético (Sánchez-Jiménez et al., 2010), los resultados obtenidos se discuten considerando las reconstrucciones filogenéticas previas que se estaban trabajando en aquel momento, y que fueron posteriormente confirmadas y publicadas. Por último, se discutirán los resultados obtenidos en el último trabajo, aún no publicado, referente a las características de la estructura del polen y su evolución en el género (Sánchez-Jiménez et al., en preparación).

Además de lo anterior, se expone una discusión en clave morfológica de las

diferencias entre las subespecies griegas de *E. spinosissimus* Turra (Sánchez-Jiménez et al., 2012b), a raíz del hallazgo, en el transcurso de una expedición de recolección de material en la península Balcánica en 2009, de una población de *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri* (Vis.) Kožuharov en Grecia, territorio donde este taxón no había sido descrito anteriormente.

En la primera reconstrucción filogenética (Sánchez-Jiménez et al., 2010) se analizaron las secuencias de la región nuclear ITS y la cloroplástica de *trnL-trnF*. En el análisis combinado de ambas secuencias se emplearon un total de 89 especímenes, incrementándose en ocho y cuatro en los análisis independientes de las regiones ITS y *trnL-trnF*, respectivamente, representando 88 taxones correspondientes a 81 especies y 10 subespecies (tres para *E. ritro* L., dos para *E. sphaerocephalus* y cinco para *E. spinosissimus*). La muestra fue representativa de todo el género, incluyendo las especies tipo de todas las secciones excepto las de las africanas *Cenchrolepis* Hochst. (descrita como monotípica) y *Pterolepis* O.Hoffm. (con tres especies asignadas; Fries, 1923). Además, toda la distribución geográfica del género fue cubierta en el análisis, a pesar de que la representación fue escasa para las especies de África tropical (4 de las 25 especies descritas; Tadesse, 1997). En total, se incorporaron 71 nuevas secuencias para la región ITS y 89 para la *trnL-trnF*. Este conjunto de datos fue actualizado en el análisis filogenético llevado a cabo en el estudio de tamaño del genoma (Sánchez-Jiménez et al., 2012a), donde se incorporaron 10 secuencias nuevas de sendos taxones, dos de ellos nunca antes secuenciados: *E. sphaerocephalus* subsp. *taygeteus* (Boiss. & Heldr.) Kožuharov y *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri*.

Los análisis filogenéticos confirman los resultados previos que apuntaban a la inclusión de *E. acantholepis* dentro del género, agrupándose con las especies anuales de *Echinops* (Garnatje et al., 2005). El género se divide en dos linajes, el primero incluyendo los taxones de las secciones *Chamaechinops* Bunge y *Nanechinops*, junto con *E. acantholepis*, y el otro comprendiendo el resto de especies del género. La reconstrucción filogenética presenta una resolución suficiente a nivel seccional, permitiendo valorar la idoneidad de las clasificaciones tradicionales del género. El árbol obtenido resuelve la clasificación del género en nueve secciones, siendo necesarias algunas reasignaciones de especies, con el objeto de que las secciones constituyan grupos naturales:

- *Echinops* sect. *Chamaechinops*. Esta pequeña sección, cuyas especies se restringen a las montañas del noreste de Asia Central (Bobrov, 1997), se encuentra perfectamente justificada en base al análisis filogenético.

- *Echinops* sect. *Acantholepis* (Less.) Jaub. & Spach. Todas las especies de la sección *Nanechinops* forman un grupo monofilético junto con *E. acantholepis*, cuya posición filogenética es hermana de *E. gmelini*. Este clado incluye, por tanto, los taxones tipo de dos secciones que fueron descritas simultáneamente (Bunge, 1863), *E. nanus* y *E. acantholepis*, si bien Bunge asignó *E.* sect. *Acantholepis* a Spach puesto que éste había descrito previamente *Echinops* subg. *Acantholepis* (Jaubert & Spach, 1848). De acuerdo con el Artículo 11.5 del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN, por sus siglas en inglés; McNeill et al., 2006), en caso de igualdad prioritaria cualquiera puede ser escogida, por lo que ha de tomarse una decisión: se ha escogido *Echinops* sect. *Acantholepis*, relegando a *Echinops* sect. *Nanechinops* a un sinónimo de la primera, por tratarse de la primera categoría infragenérica (aunque fuera a nivel de subgénero) descrita.
- *Echinops* sect. *Psectra*. El árbol obtenido descarta claramente la segregación de *E. strigosus* como *Psectra strigosa* (Tomšovic, 1997). Además, se confirma la relación entre *E. emiliae* y *E. strigosus* apuntada, pero sin el apoyo suficiente, en el trabajo filogenético anterior (Garnatje et al., 2005); incorporándose también en el clado *E. elbursensis* Rech.f. Este grupo presenta, sin embargo, una disyunción geográfica de tipo *Kiermack*, entre el Mediterráneo Occidental y el oriental e incluso entre el Mediterráneo Occidental y Asia Central (Ribera & Blasco-Zumeta, 1998): *E. strigosus* se distribuye en el sur de la península ibérica y Norte de África (Valdés, 2002), mientras que *E. elbursensis* y *E. emiliae* son endemismos de las montañas de de Alborz (Irán) y de Antalya (Turquía) respectivamente (Hedge, 1975; Rechinger, 1979).
- *Echinops* sect. *Hololeuce* Rech.f. Incluye sólo la especie *E. hololeucus*, Rech.f. que Rechinger (1979) relacionó con los *Echinops* anuales, en base a las brácteas plumosas del capítulo secundario. Sin embargo, esto no concuerda con los resultados del análisis, puesto que la sección *Acantholepis* se encuentra en el otro de los dos grandes linajes de *Echinops*, comentados anteriormente.
- *Echinops* sect. *Hamolepis* R.E.Fr. *Echinops angustilobus* S.Moore, especie clasificada dentro de la sección *Oligolepis* Bunge, es el taxón hermano de *E. hoehnelii* Schweinf., por lo que es necesario incorporar la especie a la sect. *Hamolepis* para mantener las secciones monofiléticas. Además, morfológicamente *E. angustilobus* era el único representante de la sect. *Oligolepis* con las brácteas internas del capítulo secundario unidas formando

un tubo membranoso (en el resto de las especies de la sección este tubo es coriáceo), por lo que la nueva asignación resulta en dos secciones homogéneas para el tipo de brácteas.

- *Echinops* sect. *Oligolepis*. Al igual que ocurre para la sección *Chamaechinops*, los análisis no muestran ninguna discrepancia sobre la consideración de esta sección como un grupo natural. Sin embargo, algunas especies que habían sido clasificadas anteriormente dentro de *E. sect. Oligolepis*, se encuentran filogenéticamente en otros grupos. Dichos casos se comentan en las discusiones acerca de las secciones correspondientes.
- *Echinops* sect. *Phaeochaete* Bunge. Incluye especies cuyos caracteres morfológicos las sitúan perfectamente en la sección *Oligolepis* (*E. cephalotes* DC., *E. ilicifolius* Bunge), si bien, la politomía existente entre las secciones *Hamolepis*, *Oligolepis*, *Phaeochaete* y *Ritropsis* Greuter & Rech.f. podría resolverse con la inclusión de *E. longifolius* A.Rich. en la sección *Oligolepis*, reconciliando así las evidencias morfológicas y moleculares.
- *Echinops* sect. *Ritropsis*. Esta sección incluye el interesante grupo de *E. spinosissimus*, un taxón polimórfico que ha estado sujeto a diferentes interpretaciones taxonómicas (Rechinger, 1943; Feinbrun, 1977; Greuter, 2003). Se distribuye principalmente por el Norte de África y el Mediterráneo oriental, pudiendo penetrar hacia Oriente Medio. Las dificultades para establecer los límites entre taxones de acuerdo con caracteres morfológicos quedan patentes en la variabilidad presente en los mismos, dependiendo incluso del hábitat particular en que se encuentren las diferentes poblaciones (observación personal). Sólo unos pocos caracteres pueden contribuir a discernir entre entidades diferentes, como ocurre en las subespecies de *E. spinosissimus* presentes en Grecia (*E. spinosissimus* subsp. *bithynicus* [Boiss.] Greuter, *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri* y *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus*): brácteas acuminadas o potencialmente espinosas, dando lugar a capítulos corníferos, o la ausencia o presencia y distribución del indumento en el tallo (Sánchez-Jiménez et al., 2012b). Puesto que el área geográfica ocupada por *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri* llega hasta Grecia (Sánchez-Jiménez et al., 2012b), solapa con las de las otras subespecies coexistentes en esta zona, aumentando la posibilidad de contactos genéticos entre los taxones del grupo presentes en Grecia. La hibridación en el género *Echinops* no ha sido estudiada con profundidad, si bien Kožuharov (1975) ya evocó este proceso en referencia a especies de la región Balcánica. La

introgresión podría explicar en parte las dificultades existentes en delimitar claramente las fronteras taxonómicas existentes dentro y fuera del complejo. Finalmente, dentro de esta sección, el taxón *E. spinosissimus* subsp. *fontqueri* (Pau) Greuter no se sitúa junto con sus presuntos conoespecíficos, por lo que se recomienda su tratamiento como *E. fontqueri* Pau.

- *Echinops* sect. *Echinops*. Dentro del clado que incluye los integrantes de esta sección aparecen algunos taxones atribuidos a otras secciones y que, por tanto, han de considerarse de la sección *Echinops*: *E. exaltatus* Schrad. y *E. platylepis* Trautv. (anteriormente en sect. *Terma* Endl.), y un nutrido grupo de ocho especies previamente atribuidas a la sección *Ritropsis*: *E. albicaulis* Kar. & Kir., *E. chantavicus* Trautv., *E. dasyanthus* Regel & Schmalh., *E. dubjanskyi* Iljin, *E. karatavicus* Regel & Schmalh., *E. obliquilobus* Iljin, *E. nuratavicus* A.D.Li y *E. tjanschanicus* Bobrov. Estas especies fueron clasificadas en *Echinops* sect. *Rytrodes* Bunge (Li, 1987; Bobrov, 1997), definida por Bunge (1863) en base a la unión de las brácteas internas del capítulo secundario, formando un tubo membranoso. Sin embargo, este carácter no se encuentra en la especie tipo de dicha sección, *E. ritrodes* Bunge, lo cual condujo a Rechinger (1979) a transferir esta especie a la sección *Echinops* y a describir una nueva sección, *Echinops* sect. *Ritropsis*, cuyo tipo, *E. orientalis* Trautv., sí que presentaba el carácter definido anteriormente. Los resultados del análisis apoyan la consideración de *Echinops* sect. *Rytrodes* como un sinónimo de *Echinops* sect. *Echinops*, por lo que algunas especies deberían ser transferidas a ésta desde la sect. *Ritropsis*, reasignación, además, amparada morfológicamente (Li, 1987; Bobrov, 1997). Por tanto, la sección *Rytrodes* considerada por Bunge (1863) y Bobrov (1997) incluye varias especies que no presentan los caracteres morfológicos utilizados para definirla. Además, ninguna de ellas presenta otras características frecuentes de *Echinops* sect. *Ritropsis*, como capítulos corníferos y hojas con espinas largas y robustas, sino que, por el contrario, presentan caracteres que recuerdan en el aspecto general a los integrantes de la sección *Echinops*.

Por último, en la reconstrucción filogenética aparece una incertidumbre con respecto a la posición filogenética de *E. onopordum* P.H.Davis, *E. pungens* Trautv. y *E. transcausicus*, y su inclusión en alguna sección de las existentes. De hecho es una incertidumbre doble, puesto que la monofilia del grupo en sí misma no está significativamente apoyada, y porque existe una tricotomía junto con otros clados del género. Por tanto, podrían enmarcarse dentro del grupo de *Echinops* sect. *Echinops*, como apuntan los datos morfológicos (Hedge, 1975),

aunque también podrían formar una sección nueva en el género. La situación filogenética de *E. onopordum* no queda en absoluto resuelta, si bien podría descartar la posible relación de este taxón con el grupo de *E. pannosus* Rech.f. (representado en esta filogenia por *E. emiliae*) sugerida por Davis (1956), y la consideración como una especie aislada (Hedge, 1975) es todavía posible.

La reconstrucción filogenética del género *Echinops* ha permitido avanzar en la interpretación de la evolución de algunos caracteres morfológicos dentro del grupo. Las brácteas internas del capítulo unifloro han sido empleadas tradicionalmente para caracterizar las secciones taxonómicas. El tipo ancestral parece ser aquél que presenta las brácteas internas libres, presente en las ramas basales del árbol: en las secciones *Acantholepis* y *Chamaechinops*, y sucesivamente en las ramas que dan lugar a las secciones *Psectra* y *Hololeuce*. Las brácteas internas con diferentes grados de unión o soldadura se encuentran posteriormente en el árbol, pudiendo encontrarse ligeramente unidas en la base o soldadas, formando un tubo que puede ser membranoso o coriáceo. Aunque los tipos de brácteas no proporcionan por sí mismos autapomorfías a nivel seccional, su distribución en las secciones de *Echinops* es relativamente homogénea, puesto que cada grupo presenta sólo un tipo de brácteas, o bien un tipo dominante. Es destacable la discrepancia morfológica y molecular existente en la especie *E. graecus* Mill., que presenta brácteas unidas en un tubo coriáceo, tipo de bráctea presente en la sect. *Oligolepis*, mientras que este taxón se ubica en la sect. *Echinops*. Anteriormente, *E. graecus* se había clasificado en la sect. *Oligolepis* en base a esta característica (Hedge, 1974; Kožuharov, 1976). Sin embargo, la observación de los capítulos unifloros de *E. graecus* en diferentes estados de maduración revela que las brácteas involucrales pueden estar libres durante la floración, por lo que es posible que la unión de las brácteas en ésta y otras especies pueda tener lugar durante la formación de la cipsela (observación personal). El tratamiento del grado de soldadura de las brácteas como carácter diferencial debe tratarse, por tanto, cuidadosamente, como ya sugería Kožuharov (1976), a pesar del hecho de que puede ser un carácter constante en varios grupos como en las secciones *Oligolepis* y *Ritropsis*. Puesto que el capítulo unifloro (que porta una sola semilla) es la unidad de dispersión de *Echinops* (Davis, 1956), no es de extrañar que puedan aparecer fenómenos de convergencia evolutiva para este carácter.

Una nueva reconstrucción filogenética posterior a la expuesta ha sido publicada recientemente (Sánchez-Jiménez et al., 2012a), en la que los taxones presentes en la península Balcánica y la región Egea adquirieron el protagonismo

principal. En este sentido, en esta región, *Echinops* se separa en dos clados, indicando que la colonización del área ocurrió al menos dos veces: en el linaje de la sect. *Ritropsis*, representado por tres subespecies de *E. spinosissimus*, y en el de la sect. *Echinops*, de la que están presentes cuatro especies y tres subespecies. En cualquier caso, las relaciones existentes entre los taxones presentes en esta región se encuentran fundamentalmente no resueltas, por lo que es difícil establecer el número preciso de eventos colonizadores que pueden haber tenido lugar. Sin embargo, es destacable la presencia de endemismos en la zona, presumiblemente debidos a los procesos de diversificación que tuvieron lugar, y en diferentes niveles taxonómicos. Así, son endémicas de los Balcanes las especies *E. bannaticus*, *E. graecus*, *E. microcephalus* Sibth. & Sm. y *E. oxyodontus* Bornm. & Diels (la última no incorporada en ningún análisis), y las subespecies *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus* (Boiss. & Spruner) Kožuharov y subsp. *taygeteus*, *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri* y *E. ritro* subsp. *sartorianus* (Boiss. & Heldr.) Kožuharov y subsp. *thracicus* (Velen.) Kožuharov (Kožuharov, 1976; Greuter, 2006-2009).

Esta tesis contribuye con el recuento de los números cromosómicos de 10 taxones, cinco de ellos nuevos (Sánchez-Jiménez et al., 2009, 2012a): *E. graecus* ($2n = 32$), *E. przewalskyi* Iljin ($2n = 32$), *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus* ($2n = 32$) y subsp. *taygeteus* ($2n = ca. 30$) y *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri* ($2n = 28$, contado en dos poblaciones). Los demás taxones de los que se han realizado recuentos cromosómicos son: *E. gmelini* ($2n = 26$, segundo recuento existente), *E. ritro* ($2n = 32$, dos poblaciones), *E. sphaerocephalus* subsp. *sphaerocephalus* ($2n = 30$) y *E. spinosissimus* subsp. *bithynicus* ($2n = 28$, tres poblaciones) y subsp. *spinosissimus* ($2n = 28$, cuatro poblaciones). *Echinops gmelini* y *E. przewalskyi* proceden de Mongolia interior (China, Sánchez-Jiménez et al., 2012a), mientras que el resto de taxones fueron recolectados en la península Balcánica (Sánchez-Jiménez et al., 2012a).

Estos mismos taxones han sido también analizados desde el punto de vista del valor C, añadiéndose la especie *E. bannaticus*. La cantidad de ADN de *E. gmelini* y *E. przewalskyi* (Sánchez-Jiménez et al., 2009), así como la de *E. graecus*, *E. ritro*, *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus*, *E. sphaerocephalus* subsp. *taygeteus*, y *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri* (Sánchez-Jiménez et al., 2012a), son nuevas contribuciones de esta tesis al conocimiento del tamaño del genoma.

El número cromosómico de *E. gmelini* ($2n = 26$) es el segundo menor en el género, sólo por encima de *E. acantholepis* ($2n = 14$, Garnatje et al., 2004b).

Ambas especies se agrupan en la reconstrucción filogenética propuesta en esta tesis (Sánchez-Jiménez et al., 2010). Esta asociación también recibe apoyo de los datos cariológicos, puesto que ambas especies presentan un par de cromosomas metafásicos notablemente más grandes que el resto, situación evidenciada para *E. acantholepis* en Garnatje et al. (2004b). Este patrón filogenético dificulta la interpretación del número cromosómico de *E. acantholepis*, notablemente inferior comparado con otras especies de *Echinops*, que van de $2n = 26$ (*E. gmelini*) a $2n = 36$ (*E. transcaucasicus*, Gukasyan & Safarian, 1990), siendo lo más habitual la presencia de 28, 30 o 32 cromosomas (Garnatje et al., 2004b). Se considera que todas las especies de *Echinops* son poliploides diploidizados (Garnatje et al., 2004b), excepto *E. acantholepis*, cuyo número cromosómico básico de $x = 7$ es pequeño para representar un antiguo poliploide (en general, los números básicos superiores a $x = 10$ son considerados de origen poliploide; Stebbins, 1971). En consecuencia, *E. acantholepis* podría constituir el único diploide con origen no poliploide conocido del género, lo que implicaría que hubieran existido al menos cuatro eventos independientes de poliploidización (hipótesis 1, Fig. 12). Por otro lado, podría ser que la condición de poliploide fuera heredada del ancestro de *Echinops*, en cuyo caso el número cromosómico de *E. acantholepis* sería el resultado de un evento de disploidía descendente drástico (hipótesis 2, Fig. 12). Sin embargo, con un valor $2C$ de 6,52 pg (Garnatje et al., 2004a), la cantidad de ADN de *E. acantholepis* no corresponde ni con el valor de *E. gmelini* ($2C = 9,73$ pg,) ni con la mitad del mismo. Este patrón, por tanto, implicaría una pérdida muy importante de ADN en ambas situaciones hipotéticas. Las pérdidas de ADN relacionadas con eventos de poliploidización y disploidía son igualmente plausibles, y están ampliamente documentadas en muchos grupos de plantas, incluyendo en la tribu *Cardueae* (por ejemplo, Garnatje et al., 2006, para poliploidía; Hidalgo et al., 2008a, para disploidía). En *Cardueae*, el patrón cariológico de *Echinops* ilustra el problema de cómo interpretar números cromosómicos bajos y discriminarlos entre diploides primarios y poliploides diploidizados, probablemente afectados por fenómenos de drástica disploidía descendente. Éste no es un caso aislado en la tribu, ya que existen otros taxones con números cromosómicos bajos coincidentes con aquellos con ciclos de vida cortos, con evidencias de reestructuraciones cromosómicas, y/o en las ramas finales de la filogenia (Hidalgo et al., 2007), lo cual hace improbable la asunción de su potencial origen de naturaleza diploide. Numerosos estudios de la tribu muestran cómo la interpretación más probable de los números cromosómicos básicos de $x = 7$ a 15 son de origen poliploide seguido por un evento de disploidía descendente (García-Jacas et al., 1996; Vilatersana et al., 2000; Hidalgo et al.,

2007).

Volviendo al marco filogenético establecido, los números cromosómicos de las especies de *Echinops* no se reparten aleatoriamente dentro del árbol. De hecho, los taxones con números cromosómicos similares se agrupan, haciendo

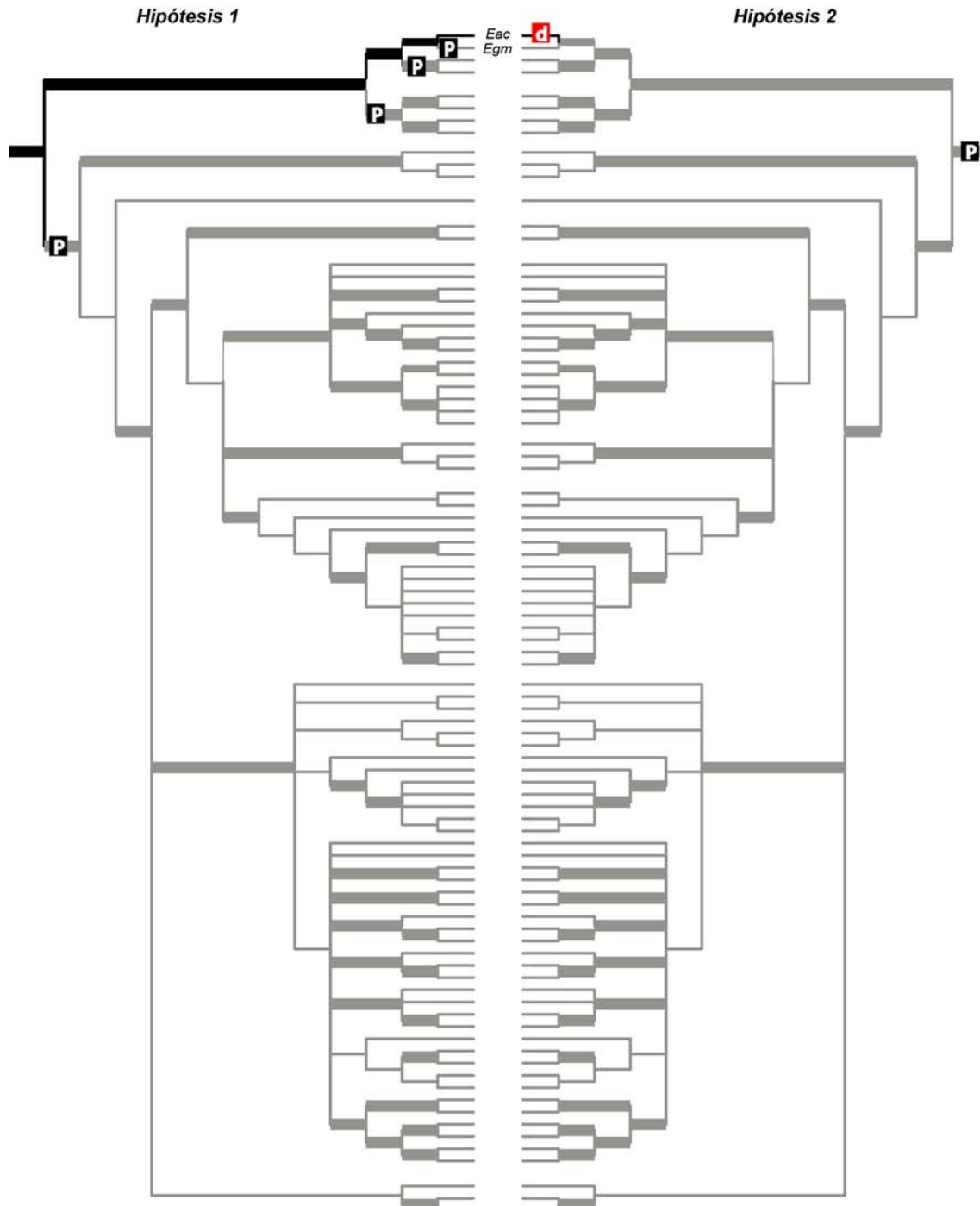


Figura 14. Representación gráfica de las hipótesis presentadas respecto al origen del número cromosómico de *Echinops acantholepis*. Los eventos de poliploidía están representados por una P, y la dispoloidía drástica de acuerdo con la segunda hipótesis, por una d. *Eac*: *E. acantholepis*; *Egm*: *E. gmelini*.

que los clados presenten números cromosómicos característicos (aunque no siempre exclusivos). La existencia de seis números cromosómicos sugiere que la aneuploidía y/o la disploidía podrían haber sido procesos de evolución genómica generalizados en el género, tal y como ocurre en otros miembros de la tribu *Cardueae* (p.e., Garcia-Jacas et al., 1996; Vilatersana et al., 2000; Hidalgo et al., 2007). En la península Balcánica y la región Egea, lugar de procedencia de los ejemplares estudiados en esta tesis (Sánchez-Jiménez et al., 2012a), además de los discutidos en el párrafo anterior (Sánchez-Jiménez et al., 2009), sólo se han encontrado los tres números cromosómicos más comunes en *Echinops*, uno de ellos ($2n = 28$) en la sect. *Ritropsis* y los otros dos ($2n = 30$ y 32) en la sect. *Echinops*. En este sentido, la disploidía no parece haber sido un conductor de la diversificación del género en este área, si bien *E. sphaerocephalus* podría constituir una excepción, puesto que las subespecies presentan números cromosómicos diferentes: *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus* ($2n = 32$), subsp. *sphaerocephalus* ($2n = 30$) y subsp. *taygeteus* ($2n = \text{ca. } 30$). No obstante, la reconstrucción filogenética no está resuelta en este grupo, por lo que podrían llegar a tratarse de linajes diferentes a pesar de la similitud morfológica existente. Los datos cariológicos, además, apoyan la inclusión de *E. graecus* en la sect. *Echinops*, como indican los resultados filogenéticos (ver discusión más arriba); de hecho, el número cromosómico de $2n = 32$ es prácticamente exclusivo de la sección *Echinops*, con las únicas excepciones de *E. emiliae* y *E. strigosus* (dato no publicado), ambos de la sección *Psectra*.

Referente a los taxones analizados de la región Balcánica y Egea, la cantidad de ADN discrimina entre las dos secciones presentes en la zona (*Echinops* y *Ritropsis*), lo cual es consistente con la consideración del tamaño del genoma como un carácter que contribuye a dilucidar las relaciones evolutivas entre los taxones (Ohri, 1998; Leitch et al., 2005; Garnatje et al., 2007, 2009; Popp et al., 2008; Chrtek et al., 2009; Muratovic et al., 2010). Además, el valor C constituye una propiedad intrínseca de los taxones, cuya variación, tanto a nivel de pérdida como de ganancia, se cree que puede estar implicada en muchos procesos evolutivos, incluyendo la especiación (Ohri, 1998; Kraaijeveld, 2010). El rango de variación entre la cantidad de ADN en la sect. *Echinops* es más amplio que en *Ritropsis*, heterogeneidad que puede ser explicada en parte por el mayor número de taxones de la sección *Echinops* que, además, se encuentran más dispersos en la filogenia. Esta heterogeneidad se extiende en la sect. *Echinops* al nivel infraespecífico en el caso de *E. sphaerocephalus* cuyas subespecies, como ya se ha comentado, presentan, además, números cromosómicos diferentes. La combinación de amplitud de valores C junto con disploidía presente en las

subespecies de *E. sphaerocephalus* podría ser un indicativo de heterogeneidad taxonómica, como, por ejemplo, en una especiación incipiente (p.e. Murray, 2005; Kraaijeveld, 2010). Por el contrario, *E. spinosissimus* presenta valores de cantidad de ADN, y también de cromosomas, muy homogéneos, a pesar de que su taxonomía es de gran complejidad. La baja divergencia entre valores de tamaño del genoma dentro de *E. spinosissimus* podría estar relacionada con una diversificación reciente del grupo, como ya ocurre en otras plantas (p.e. en *Artemisia*, Garcia et al. 2008).

De acuerdo con los análisis realizados para esta tesis, se confirma la correlación negativa entre la cantidad de ADN por cromosoma y el número cromosómico previamente establecida en Garnatje et al. (2004b). Los cambios en números cromosómicos, junto con variaciones en el tamaño de los cromosomas y señales de fusiones y fisiones de cromosomas (p.e. Sheidai et al., 2000), indican que los cambios cariológicos dentro de *Echinops* probablemente han tenido lugar mediante reestructuraciones cromosómicas más que a través de eliminaciones directas. Los cambios en número cromosómico y el valor de cantidad de ADN son de interés primario, puesto que pueden generar incompatibilidades genéticas que favorezcan el aislamiento reproductivo y, por tanto, la especiación (Kraaijeveld, 2010).

Finalmente, se han realizado algunas observaciones de las características del polen en *Echinops* (Sánchez-Jiménez et al., en prep.), el cual se muestra heterogéneo en forma y tamaño, variando el eje polar desde 14,5 μm en *E. nanus* hasta 145,5 μm en *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus*, si bien casi el 70 % de los datos se encuentran en el intervalo de 50-100 μm . En relación con la forma pueden ser esferoidales, subprolados o prolados, mostrándose una tendencia a presentar pólenes esferoidales aquéllos de menor tamaño y prolados los más grandes. Además, la variación de forma y tamaño es acompañada con una variación en el tamaño, la forma y la densidad de los ornamentos de la exina, siendo éstos microequinados o equinados – verrucoides.

Por otra parte, las observaciones realizadas han permitido identificar dos tipos de polen adicionales a los previamente descritos por Garnatje & Martín (2007), por lo que podemos encontrar cuatro tipos polínicos en el género: el tipo anual y el perenne (Garnatje & Martín, 2007), y el tipo equinado-anual y el "*Hololeucus*". La distribución de éstos dentro de las clasificaciones infragenéricas muestran a cada una de las secciones caracterizadas por un único tipo polínico, con alguna excepción. Éste es el caso de la sección *Psectra*, que presenta dos tipos, el

anual (*E. strigosus*) y el equinado-anual (*E. elbursensis* y *E. emiliae*). La otra excepción se da en la sección *Echinops* (con el tipo perenne), donde *E. albicaulis* presenta el tipo polínico equinado-anual. Ambos tipos, el anual y el equinado-anual, caracterizan los grupos que presentan una diversificación más basal en la filogenia, esto es, las secciones *Acantholepis*, *Chamaechinops* y *Psectra*, mientras que el tipo perenne es exclusivo de las secciones *Echinops*, *Hamolepis*, *Oligolepis*, *Phaeochaete* y *Ritropsis*. La sección monotípica *Hololeuce*, que en la filogenia ocupa una posición intermedia entre el primer grupo de secciones y el segundo, sin embargo, muestra un polen intermedio entre los tipos anual y perenne. Por tanto, la distribución del polen en la filogenia apunta a que el polen anual es el primitivo en el género, mientras que el perenne constituye una forma derivada. Estos resultados son consistentes con las conclusiones anteriores de Dimon (1971), quien interpretó la reducción extrema de espinas, entre otros caracteres, como estados derivados en la morfología del polen. Sin embargo, la “reducción de espinas” es relativa, puesto que la longitud de las espinas en estas especies puede exceder 1 μm , a pesar de que son muy pequeñas en relación con el tamaño del grano de polen y, hasta cierto punto, el tipo perenne de polen podría pertenecer a la categoría de polen sin espinas, perfectamente ilustrada por el tipo anual, lo cual constituye una minoría en *Asteraceae* (por ejemplo, el 22% de las asteráceas de Pakistán; Meo, 2005). El polen sin espinas tiende a estar especialmente bien representado en los linajes anuales, por ejemplo en *Centaureinae* (Hidalgo et al., 2008b), lo cual se verifica también en el trabajo realizado para esta tesis. De hecho, en *Echinops* la reducción más importante de espinas se observa en las especies anuales (sección *Acantholepis*) y en las bienales, es decir, aquéllas de la sección *Chamaechinops* y en *E. strigosus*.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se desprenden de este trabajo son:

- Se propone una organización del género *Echinops* en, al menos, ocho secciones monofiléticas: *Acantholepis*, *Chamaechinops*, *Hamolepis*, *Hololeuce*, *Oligolepis*, *Phaeochaete*, *Psectra* y *Ritropsis*. La posición filogenética de *E. onopordum*, *E. pungens* y *E. transcausicus* no permite considerar la sección *Echinops* como monofilética, si bien todo el resto de especies de la sección está contenido en un clado bien definido.
- Todas las especies anuales del género se atribuyen en la sección *Acantholepis*, incluso *E. acantholepis*, tradicionalmente considerada un género aparte.
- *Echinops strigosus* no se encuentra en una posición tan aislada en el género como consideraban algunos autores, y proponemos la inclusión de *E. elbursensis* y *E. emiliae* en la sección *Psectra* junto con *E. strigosus*.
- *Echinops hololeucus* es una especie aislada en el género, tal y como muestra la filogenia, que presenta un tipo de polen exclusivo.
- El marco filogenético nos ha permitido realizar algunas reasignaciones taxonómicas importantes, cómo la inclusión dentro de la sección *Echinops* de todo un conjunto de especies que anteriormente habían sido clasificadas

como *Ritrodes*.

- A pesar de que la morfología de las brácteas internas del capítulo unifloro no constituye una autapomorfía por sí misma, su distribución en las secciones de *Echinops* es homogénea, puesto que cada sección presenta sólo un tipo de brácteas o, al menos, un tipo claramente dominante.
- Las especies de *Echinops* han llegado a la península de los Balcanes al menos dos veces; por una parte el linaje de la sección *Echinops* y, por otra, el de la sección *Ritropsis*. Además, la cantidad de ADN resulta ser un factor discriminante entre las especies de las dos secciones presentes en los Balcanes.
- La heterogeneidad de los valores de tamaño del genoma y números cromosómicos es diferente en las secciones *Echinops* y *Ritropsis*, siendo elevada en el primer caso y prácticamente inexistente en el segundo. La homogeneidad en la cantidad de ADN y en los recuentos cromosómicos, unido a las dificultades taxonómicas existentes para discriminar entre taxones de la sección *Ritropsis*, podrían ser debidas a que sea un grupo de reciente diversificación.
- La presencia de diferentes números cromosómicos en la filogenia no es aleatoria, mostrando cómo la aneuploidía y/o disploidía podría haber sido un mecanismo de evolución genómica en el género.
- Se describen dos nuevos tipos de polen en el género *Echinops*, además del tipo anual y el perene propuestos en trabajos anteriores. Estos son el tipo equinado-anual y el tipo "*Hololeucus*". Además, el contexto filogenético permite apuntar la direccionalidad de la evolución del polen en *Echinops*, desde granos de polen pequeños y esferoidales, hasta de gran tamaño, prolados y de sección triangular.
- El grano de polen de *Echinops* parece haber dado dos pasos evolutivos de importancia: en primer lugar la aparición del tipo de polen anual en la base del género o en algún ancestro compartido con *Cardopatiinae*, y en segundo la formación del tipo perenne en el ancestro común de las secciones *Echinops*, *Hamolepis*, *Oligolepis*, *Phaeochaete* y *Ritropsis*.
- Las dos novedades evolutivas excepcionales en *Echinops* se generaron en diferentes momentos, primero la sincefalia mucho antes que el polen de gran tamaño y de sección triangular.

REFERENCIAS

- Albach, D.A. & Greilhuber, J. 2004.** Genome size variation and evolution in *Veronica*. *Ann. Bot.-London* 94: 897-911.
- Álvarez, I. & Wendel, J.F. 2003.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 417-434.
- APSA Members. 2007.** The Australasian Pollen and Spore Atlas V1.0. Canberra: Australian National University. Disponible en <http://apsa.anu.edu.au> [acceso 1 octubre 2012].
- Barker, M., Kane, N., Matvienko, M., Kozik, A., Michelmore, R.W., Knapp, S.J. & Rieseberg, L.H. 2008.** Multiple paleopolyploidizations during the evolution of the Compositae reveal parallel patterns of duplicate gene retention after millions of years. *Mol. Biol. Evol.* 25: 2445-2455.
- Beaulieu, J.M., Moles, A.T., Leitch, I.J., Bennett, M.D., Dickie, J.B. & Knight, C.A. 2007.** Correlated evolution of genome size and seed mass. *New Phytol.* 173: 422-437.
- Bennett, M.D. 1972.** Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 181: 109-135.
- Bennett, M.D. & Leitch, I.J. 1995.** Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.-London* 76: 113-176.
- Bennett, M.D. & Leitch, I.J. 1997.** Nuclear DNA amounts in angiosperms – 583 new estimates. *Ann. Bot.-London* 80: 169-196.
- Bennett, M.D., Bhandol, P. & Leitch, I.J. 2000.** Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. *Ann. Bot.-London* 86: 859-909.
- Bennett, M.D. & Leitch, I.J. 2010.** Plant DNA C-Values Database (release 5.0), disponible en <http://www.kew.org/cvalues/> [acceso 1 octubre 2012].
- Bennett, M.D. & Leitch, I.J. 2011.** Nuclear DNA amounts in angiosperms: Targets, trends and tomorrow. *Ann. Bot.-London* 107: 467-590.
- Bentham, G. 1873.** Compositae. Pp: 163-533, en: Bentham, G. & Hooker, J.D. (eds.), *Genera Plantarum, Vol. 2*. London: Lovell Reeve & Co, Williams & Norgate.
- Bergsten, J. 2005.** A review of longbranch

- attraction. *Cladistics* 21: 163-193.
- Blackmore, S. 1981.** Palynology and intergeneric relationships on subtribe Hyoseridinae (Compositae: Lactuceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 82: 1-13.
- Blackmore, S. 1990.** Sporoderm homologies and morphogenesis in land plants, with a discussion of *Echinops sphaerocephala* (Compositae). *Plant. Syst. Evol. Suppl.* 5: 1-12.
- Blackmore, S. & Barnes, S.H. 1990.** Comparative studies of mature and developing pollen grains. Pp 1-21, en: Claugher, D. & Griffiths, D. (eds.), *The Scanning Electron Microscope in Taxonomy and Functional Morphology*. Oxford: Oxford University Press.
- Blackmore, S., Wortley, A.H., Skvarla, J.J. & Robinson, H. 2009.** Evolution of pollen in Compositae. Pp. 101-130, en: Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F. & Bayer, R.J. (eds.), *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. Vienna: International Association for Plant Taxonomy (IAPT).
- Blackmore, S., Wortley, A.H., Skvarla, J.J. Gabarayeva, N.I. & Rowley, J.R. 2010.** Developmental origins of structural diversity in pollen walls of Compositae. *Plant. Syst. Evol.* 284:17-32.
- Bobrov, E.G. 1997.** *Echinops* L. Pp. 1-70, en: Shishkin, B.K. & Bobrov, E.G. (eds.), *Flora of the USSR, vol. 27*. Dehra Dun: Bishen Singh, Mahendra Pal Singh; Koenigstein: Koeltz Scientific Books.
- Bremer, K. 1994.** *Asteraceae: Cladistics & Classification*. Portland: Timber Press.
- Brown, R. 1816.** Some observations on the natural family of plants called Compositae. *Trans. Linn. Soc. London* 12: 76-142.
- Buchner, R. & Weber, M. 2000 onwards.** PalDat - a palynological database: Descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Published on the Internet. Disponible en <http://www.paldat.org> [acceso 1 octubre 2012].
- Bunge, A. 1863.** Über die Gattung *Echinops*. *Bull. Acad. Imp. Sci. Saint-Petersbourg* 6: 390-412.
- Carlquist, S. 1976.** Tribal interrelationships and phylogeny of the Asteraceae. *Aliso* 8: 465-492.
- Cassini, H. 1818.** De la classification naturelle des synanthérées. Pp: 152-157, en: Cuvier, G.F. (ed.), *Dictionnaire des Sciences Naturelles. Vol. 10*. Paris: Le Normant.
- 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.-London* 95: 191-199.
- Chaubal, P.D. & Deodikar, G.B. 1965.** Pollen morphotypes in the family Compositae from parts of Western Ghats (India). *Palynol. Bull.* 1: 56-58.
- Chester, P.I. & Raine, J.I. 2001.** Pollen and spore keys for Quaternary deposits in the northern Pindos Mountains, Greece. *Grana* 40: 199-387.
- Chrtek, J., Zahrádníček, J., Krak, K. & Fehrer, J. 2009.** Genome size in *Hieracium* subgenus *Hieracium* (Asteraceae) is strongly correlated with major phylogenetic groups. *Ann. Bot.-London* 104: 161-178.
- Dakshini, K.M.M. & Singh, P. 1973.** Contributions to the palynology of Compositae (Asteraceae). *Palynol. Bull.* 6: 99-107.
- Davis, P.H. 1956.** Fourteen new species from Turkey. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 22: 65-84.
- Díez, M.J. 1987.** Asteraceae (Compositae). Pp. 332-357, en: Valdés, B., Díez, M.J. & Fernández, I. (eds.), *Atlas Polínico de Andalucía Occidental*. Sevilla: Universidad de Sevilla y Excm. Diputación de Cádiz.
- Díez, M.J., Mejías, J.A. & Moreno-Socías, M. 1999.** Pollen morphology of *Sonchus* and related genera, and a general discussion. *Plant. Syst. Evol.* 214: 91-102.
- Dimon, M.T. 1971.** Problèmes généraux soulevés par l'étude pollinique de Composées méditerranéennes. *Nat. Monsp.* 22: 129-144.

- Dittrich, M. 1977.** Cynareae – Systematic review. Pp. 999–1015, en: Heywood, V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L. (eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae*, vol. 2. London: Academic Press.
- Dittrich, M. 1996.** Die Bedeutung morphologischer und anatomischer Achänen-Merkmale für die Systematik der Tribus *Echinopeae* Cass. und *Carlineae* Cass. *Boissiera* 51: 9-102.
- Doyle, J.J. 1992.** Gene trees and species trees: molecular systematics as one character taxonomy. *Syst. Bot.* 17: 144-163.
- Dušková, E., Kolář, F., Sklenář, P., Rauchová, J., Kubešová, M., Fér, T., Suda, J. & Marhold, K. 2010.** Genome size correlates with growth form, habitat and phylogeny in the Andean genus *Lasiocephalus* (Asteraceae). *Preslia* 82: 127-148.
- Erdtman, G. 1952.** *Pollen Morphology and Plant Taxonomy: Angiosperms (An Introduction to Palynology. I)*. Stockholm: Almqvist & Wiksell.
- Feinbrun, N. 1977.** The genus *Echinops* in Palestine. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 35: 235-245.
- Felsenstein, J. 1978.** Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* 27: 401-410.
- Flora of North America Editorial Committee (eds.) 1993+.** *Flora of North America North of Mexico*. 16+ vols. New York and Oxford.
- Fries, R.E. 1923.** Zur Kenntnis der ostafrikanischen *Echinops*-Arten. *Acta Horti Berg.* 8: 39-44.
- Funk, V.A., Bayer, R.J., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E., Panero, J.L., Baldwin, B.G., Garcia-Jacas, N., Susanna, A. & Jansen, R.K. 2005.** Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biol. Skrif.* 55: 343-374.
- Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F. & Bayer, R.J. 2009.** *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. Vienna: International Association for Plant Taxonomy.
- 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., 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.
- Garcia-Jacas, N., Susanna, A. & Ilarslan, R. 1996.** Aneuploidy in Centaureinae (Compositae): is n=7 the end of the series? *Taxon* 45: 39-42.
- Garcia-Jacas, N., Garnatje, T., Susanna, A. & Vilatersana, R. 2002.** Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 22: 51-64.
- Garnatje, T., Vallès, J., Garcia, S., Hidalgo, O., Sanz, M., Canela, M.A. & Siljak-Yakovlev, S. 2004a.** Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biol. Cell* 96: 117-124.
- Garnatje, T., Vilatersana, R., Susanna, A., Vallès, J. & Siljak-Yakovlev, S. 2004b.** Contribution to the karyological knowledge of *Echinops* L. (Asteraceae, Cardueae) and related genera. *Bot. J. Linn. Soc.* 145: 337-344.
- Garnatje, T., Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Vilatersana, R. & Vallès, J. 2005.** A first approach to the molecular phylogeny of the genus *Echinops* L. (Asteraceae): Sectional delimitation and relationships with the genus *Acantholepis* Less. *Folia Geobot.* 40: 407-419.
- 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.-London* 93: 461-467.
- Garnatje, T., Garcia, S., Hidalgo, O., Pellicer, J. & Vallès, J. 2007.** Genome size in Asteraceae: state-of-art and perspectives. *Nucleus* 50: 425-436.
- Garnatje, T. & Martín, J. 2007.** Pollen studies in the genus *Echinops* L. and *Xeranthemum* group (Asteraceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 154: 546-557.
- Garnatje, T., Garcia, S., Hidalgo, O., Pellicer, J., Sánchez-Jiménez, I. & Vallès, J. 2009.** *Cheirolophus intybaceus* (Asteraceae, Centaureinae) o la constància del valor 2C. *Collect. Bot.* 28: 7-17.
- Garnatje, T., Canela, M.Á., Garcia, S., Hidalgo, O., Pellicer, J., Sánchez-Jiménez, I., Siljak-Yakovlev, S., Vitales, D. & Vallès, J. 2010.** GSAD: a genome size database in the Asteraceae. Release 1.0, disponible en <http://www.asteraceagenomesize.com> (interfaz por Gálvez, F.) [acceso 1 octubre 2012].
- Garnatje, T., Canela, M.Á., Garcia, S., Hidalgo, O., Pellicer, J., Sánchez-Jiménez, I., Siljak-Yakovlev, S., Vitales, D. & Vallès, J. 2011.** GSAD: A genome size in the Asteraceae database. *Cytometry Part A* 79A: 401-404.
- Greilhuber, J., Borsch, T., Müller, K., Worberg, A., Poremboski, S. & Barthlott W. 2006.** Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae with chromosomes of bacterial size. *Plant Biol.* 8: 770-777.
- Greuter, W. 2006-2009.** Compositae (pro parte majore), en: Greuter, W., Raab-Straube, E. von (eds.), *Compositae. Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity*, disponible en: <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/> [acceso 1 octubre 2012].
- Greuter, W. 2003.** The Euro+Med treatment of Cardueae (Compositae) - generic concepts and required new names. *Willdenowia* 33: 49-61.
- Goldblatt, P. & Johnson, D.E. (eds.) 1979+.** *Index to plant chromosome numbers*. St. Louis: Missouri Botanical Garden, disponible en: <http://www.tropicos.org/Project/IPCN> [acceso 1 octubre 2012].
- Gukasyan, A.G. & Safarian, A.B. 1990.** Chromosome numbers of some representatives of Armenian flora. *Biol. Zhurn. Armenii* 43: 259-260.
- Harris, E.M. 1999.** Capitula in the Asteridae: a widespread and varied phenomenon. *Bot. Rev.* 65: 348-369.
- Hedge, I.C. 1974.** *Echinops*. Pp. 237-239, en: Davis, P.H. (ed.), *Materials for a Flora of Turkey XXX: Compositae, I. Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 33: 207-264.
- Hedge, I.C. 1975.** *Echinops* L. Pp. 609-622, en: Davis, P.H. (ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 5. Edinburgh: University Press.
- Hegnauer, R. 1977.** The Chemistry of the Compositae. Pp. 283-336, en: Heywood, V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L. (eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae*. London: Academic Press.
- Hidalgo, O., Garcia-Jacas, N., Garnatje, T., Susanna, A. & Siljak-Yakovlev, S. 2007.** Karyological evolution in *Rhaponticum* and related genera. *Bot. J. Linn. Soc.* 153: 193-201.
- Hidalgo, O., Garcia-Jacas, N., Garnatje, T., Romashchenko, K., Susanna A. & Siljak-Yakovlev, S. 2008a.** Extreme environmental conditions and phylogenetic inheritance: systematics of *Myopordon* and *Oligochaeta* (Asteraceae, Cardueae-Centaureinae). *Taxon* 57: 769-778.
- Hidalgo, O., Susanna, A., Garcia-Jacas, N. & Martín, J. 2008b.** From acaveate to caveate: evolution of pollen types in the *Rhaponticum* group (Asteraceae, Centaureinae) related to extreme conditions. *Bot. J. Linn. Soc.* 158: 499-510.
- Hidalgo, O., Mathez, J., Garcia, S., Garnatje, T., Pellicer, J. & Vallès, J. 2010.** Genome Size Study in the Valerianaceae: First Results and New Hypotheses. *J.*

- Bot. 2010: Article ID 797246, 19 págs, doi:10.1155/2010/797246.
- Hoffmann, O. 1894.** Compositae. Pp: 87-387, en: Engel, A. & Prantl, K. (eds.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien* 4. Leipzig: Engelmann.
- Ikuse, M. 1962.** On pollen grains of the Compositae collected by the Kyoto University scientific expedition to the Karakoram and Hindukush 1955. *Acta Phytotax. Geobot.* 20: 112-119.
- Jafari, E. & Ghanbarian, G. 2007.** Pollen morphological studies on selected taxa of Asteraceae. *Int. J. Plant. Sci.* 2: 195-201.
- Jäger, E.J. 1987.** Arealkarten der Asteraceen-Tribus als Grundlage der ökogeographischen Sippencharakteristik. *Bot. Jahrb. Syst.* 108: 481-497.
- Jaubert, H.-F. & Spach, E. 1847-1850.** *Illustrationes Plantarum Orientalum* 3. Paris.
- Jeffrey, C. 1968.** Notes on *Compositae* (III): The Cynareae in East Tropical Africa. *Kew Bull.* 22: 107-140.
- Jeffrey, C. 2007.** Introduction with Key to Tribes. Pp. 61-87, en: Kadereit, J. & Kubitzki, K. (eds.), *Compositae. The Families and Genera of Vascular Plants*. Heidelberg: SpringerVerlag.
- Jones, S.B. Jr. 1979.** Synopsis and pollen morphology of *Vernonia* (Compositae: Vernoniae) in the New World. *Rhodora* 81: 425-447.
- Katinas, L., Crisci, J.V., Schmidt-Javaily, R., Williams, C., Walker, J., Drew, B., Bonifacino, J.M. & Sytsma, K.J. 2008.** Evolution of secondary heads in Nassauviinae (Asteraceae, Mutisieae). *Am. J. Bot.* 95: 229-240.
- Kožuharov, S.I. 1975.** Notes on some European species of *Echinops* L. and *Jurinea* Cass. Pp: 41-43, en: Heywood, V.H. (ed.), *Flora Europaea – Notulae Systematicae ad Floram Europaeam spectantes*. *Bot. J. Linn. Soc.* 71: 39-50.
- Kožuharov, S.I. 1976.** *Echinops* L. Pp: 212-214, en: 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.
- Kraaijeveld, K. 2010.** Genome size and species diversification. *Evol. Biol.* 37: 227-233.
- Kruse, J. & Meusel, H. 1972.** Zur Blattfolge und Blattbildung einiger Cynareen Gattungen. 2. *Acantholepis*, *Xeranthemum*, *Chardinia*, *Siebera*, *Amphoricarpos*. *Feddes Repert. Sp. Nova. Reg. Veg.* 83: 289308.
- Kruze, J. 1987.** Untersuchungen zur Morphologie der Involukral und Spreublätter der Gattung *Carlina* L. *Flora* 179: 17-33
- Kupicha, F.K. 1975.** *Acantholepis* Less. Pp. 622, en: Davis, P.H. (ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 5. Edinburgh: University Press.
- Kuprianova, L.A. & Alyoshina, L.A. 1972.** *Pollen and Spores of Plants From the Flora of European Part of USSR*, vol. 1. Leningrad: The Academy of Sciences of the USSR, The Komarov Botanical Institute.
- Lavergne, S., Muenke, N.J. & Molofsky, J. 2010.** Genome size reduction can trigger rapid phenotypic evolution in invasive plants. *Ann. Bot.-London* 105: 109-116.
- Leitch, I.J., Soltis, D.E., Soltis, P.S. & Bennett, M.D. 2005.** Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Ann. Bot.-London* 95: 207-217.
- Li, A. 1987.** Species nova generis *Echinops* L. (Asteraceae) e Pamiro-Alaj. *Novosti Sist. Vyssh. Rast.* 24: 201-202.
- Marie, D. & Brown, S.C. 1993.** A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol. Cell* 78: 41-51.
- Martín, J., Torrell, M., Korobkov, A.A. & Vallès, J. 2003.** Palynological features as a systematic marker in *Artemisia* L. and related genera (Asteraceae, Anthemideae) II: implications for subtribe Artemisiinae delimitation. *Plant Biol.* 5: 85-93.
- Martín, J., Torrell, M. & Vallès, J. 2001.** Palynological features as a systematic marker in *Artemisia* L. and related genera (Asteraceae, Anthemideae). *Plant Biol.* 3:

- 372-378.
- Martín Villodre, J. & Garcia-Jacas, N. 2000.** Pollen studies in subtribe Centaureinae (Asteraceae): the *Jacea* group analysed with electron microscopy. *Bot. J. Linn. Soc.* 133: 473-484.
- McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Hawksworth, D.L., Marhold, K., Nicolson, D.H., Prado, J., Silva, P.C., Skog, J.E., Wiersema, J.H. & Turland, N.J. (eds.) 2006.** *International code of botanical nomenclature (Vienna Code): Adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005.* Regnum Vegetabile 146. Rugell, Liechtenstein: Gantner.
- Meo, A.A. 2005.** *Palynological Studies of Selected Genera of the Tribes of Asteraceae from Pakistan.* Islamabad: Ph.D. Thesis, Department of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University.
- Meuzel, H. & Kohler, E. 1960.** Die Blattbildung von *Carlina vulgaris* L. *Bot. Jahrb. Syst.* 79: 192-207.
- Mohl, H. 1835.** Sur la structure et les formes des graines de pollen. *Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 2, 3:* 148-180, 220-236, 304-346.
- Mort, E.M., Archibald, J.K., Randle, C.P., Levsen, N.D., O'Leary, T.R., Topalov, K., Wiegand, C.M. & Crawford, D.J. 2007.** Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci. *Am. J. Bot.* 94: 173-183.
- Mozaffarian, V. 2006.** A taxonomic survey of *Echinops* L. tribe Echinopeae (Asteraceae) in Iran: 14 new species and diagnostic keys. *Iranian J. Bot.* 11: 197-239.
- Mozaffarian, V. 2008.** Compositae: Anthemideae and Echinopeae. Pp. 261-292, en: Assadi, M., Maassoumi, A.A. & Mozaffarian, V. (eds.), *Flora of Iran, no. 59.* Teheran: Research Institute of Forests and Rangelands.
- Muratovic, E., Hidalgo, O., Garnatje, T. & Siljak-Yakovlev, S. 2010.** Molecular phylogeny and genome size in European lilies (genus *Lilium*, Liliaceae). *Adv. Sci. Lett.* 3: 180-189.
- Murray, B.G. 2005.** When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? *Ann. Bot.-London* 95: 119-125.
- Nair, P.K.K. & Lawrence, R. 1985.** *Pollen morphology of Indian Compositae. Advances in Pollen-Spore Research 14.* Lucknow: Scholar Publishing House.
- Ohri, D. 1998.** Genome size variation and plant systematics. *Ann. Bot.-London* 82: 75-83.
- Panero, J.L. & Crozier, B.S. 2008.** Asteraceae. Sunflowers. Version 04 April 2008, disponible en <http://tolweb.org/Asteraceae/20780/2008.04>. [acceso 1 octubre 2012].
- Panero, J.L. & Funk, V.A. 2002.** Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *P. Biol. Soc. Wash.* 115: 909-922.
- Panero, J.L. & Funk, V.A. 2008.** The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47: 757-782.
- Parveen, F. & Bhandari, M.M. 1981.** Pollen morphology of desert Asteraceae. *J. Palyno.* 17: 121-130.
- Pellicer, J., Hidalgo, O., Garcia, S., Garnatje, T., Korobkov, A.A., Vallès, J. & Martín, J. 2009.** Palynological study of *Ajanía* and related genera (Asteraceae, Anthemideae). *Bot. J. Linn. Soc.* 161: 171-189.
- Pellicer, J., Canela, M.Á., Garcia, S., Garnatje, T., Korobkov, A.A., Twibell, J.D. & Vallès, J. 2010a.** Genome size dynamics in *Artemisia* L. (Asteraceae): following the track of polyploidy. *Plant Biol.* 12: 820-830.
- Pellicer, J., Fay, M.F. & Leitch, I.J. 2010b.** The largest eukaryotic genome of them all? *Bot. J. Linn. Soc.* 164: 10-15.
- Perveen, A. 1999.** Contributions to the pollen morphology of the family Compositae. *Turk. J. Biol.* 23: 523-535.
- Petit, D.P. 1988.** Le genre *Echinops* L. (Compositae: Cardueae). 1. Position phylétique et interprétation de l'incapitulescence. *Candollea* 43: 467-481.

- Petit, D.P. 1997.** Generic interrelationships of the Cardueae (Compositae): a cladistic analysis of morphological data. *Plant Syst. Evol.* 207: 173-203.
- Philippe, H., Zhou, Y., Brinkmann, H., Rodrigue, N. & Delsuc, F. 2005.** Heterotachy and long-branch attraction in phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* 5: 50.
- Pla Dalmau, J.M. 1961.** *Polen. Estructura y Características de los Granos de Polen. Precisiones Morfológicas Sobre el Polen de Especies Recolectadas en el N.E. de España. Polinización y Aeropalinología.* Gerona: Talleres Gráficos D.C.P.
- Popp, M., Gizaw, A., Nemomissa, S., Suda, J. & Brochmann, C. 2008.** Colonization and diversification in the African 'sky islands' by Eurasian *Lychnis* L. (Caryophyllaceae). *J. Biogeogr.* 35: 1016-1029.
- Price, H.J. & Bachmann, K. 1976.** Mitotic cell time and DNA content in annual and perennial Microseridinae (Compositae, Chicoriaceae). *Plant Syst. Evol.* 126: 323-330.
- Price, H.J., Dillon, S.L., Hodnett, G., Rooney, W.L., Ross, L. & Johnston, J.S. 2005.** Genome evolution in the genus *Sorghum* (Poaceae). *Ann. Bot.-London* 95: 219-227.
- Punt, W. & Hoen, P.P. 2009.** The Northwest European Pollen Flora, 70. Asteraceae-Asteroidae. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 157: 22-183.
- Qiu, Y.L., Lee, J., Bernasconi, Quadroni, F., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zanis, M., Zimmer, E.A., Chen, Z., Savolainen, V. & Chase, M.W. 1999.** The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402: 404-407.
- Rechinger, K.H. 1943.** *Flora Aegaea: Flora der Inseln und Halbinseln des Ägäischen Meeres.* Vienna: Springer.
- Rechinger, K.H. (ed.). 1979.** *Flora des Iranischen Hochlandes und der umrahmenden Gebirge. Compositae III – Cynareae.* Graz: Akademische Druck-u. Verlagsanstalt.
- Reille, M. 1995.** *Pollen et Spores d'Europe et d'Afrique du Nord. Supplément 1.* Marseille: Laboratoire de Botanique Historique et Palynologie.
- Reille, M. 1998.** *Pollen et Spores d'Europe et d'Afrique du Nord. Supplément 2.* Marseille: Laboratoire de Botanique Historique et Palynologie.
- Ribera, I. & Blasco-Zumeta, J. 1998.** Biogeographical links between steppe insects in the Monegros region (Aragon, NE Spain), the Eastern Mediterranean, and Central Asia. *J. Biogeogr.* 25: 969-986.
- Sánchez-Jiménez, I., Lazkov, G.A., Hidalgo, O. & Garnatje, T. 2010.** Molecular systematics of *Echinops* L. (Asteraceae, Cynareae): A phylogeny based on ITS and *trnL-trnF* sequences with emphasis on sectional delimitation. *Taxon* 59: 698-708.
- Sánchez-Jiménez, I., Pellicer, J., Hidalgo, O., García, S., Garnatje, T. & Vallès, J. 2009.** Chromosome Numbers in Three Asteraceae Tribes from Inner Mongolia (China), with Genome Size Data for Cardueae. *Folia Geobot.* 44: 307-322.
- Sánchez-Jiménez, I., Hidalgo, O., Canela, M.Á., Siljak-Yakovlev, S., Šolić, M.E., Vallès, J. & Garnatje, T. 2012a.** Genome size and chromosome number in *Echinops* (Asteraceae, Cardueae) in the Aegean and Balkan regions: technical aspects of nuclear DNA amount assessment and genome evolution in a phylogenetic frame. *Plant Syst. Evol.* 298: 1085-1099.
- Sánchez-Jiménez, I., Hidalgo, O. & Garnatje, T. 2012b.** *Echinops spinosissimus* Turra subsp. *neumayeri* (Vis.) Kožuharov (Asteraceae, Cardueae): a new record for the flora of Greece. *Adansonia* 34: 129-132.
- Semple, J.C. & Watanabe, K. 2009.** A review of chromosome numbers in Asteraceae with hypotheses on chromosomal base number evolution. Pp. 61-72, en: Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F. & Bayer, R.J. (eds.), *Systematics, evolution and biogeography of Compositae.* Vienna: International Association for Plant Taxonomy.

- Sheidai, M., Nasirzadeh, A. & Kheradnam, M. 2000.** Karyotypic study of *Echinops* (Asteraceae) in Fars Province, Iran. *Bot. J. Linn. Soc.* 134: 453-463.
- Siljak-Yakovlev, S., Solic, M.E., Catrice, O., Brown, S.C. & Papes, D. 2005.** Nuclear DNA content and chromosome number in some diploid and tetraploid *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae) from the Dalmatia region. *Plant Biol.* 7: 397-404.
- Siljak-Yakovlev, S., Stevanovic, V., Tomasevic, M., Brown, S.C. & Stevanovic, B. 2008.** Genome size variation and polyploidy in the resurrection plant genus *Ramonda*: cytogeography of living fossils. *Environ. Exp. Bot.* 62: 101-112.
- Siljak-Yakovlev, S., Pustahija, F., Solic, E.M., Bogunic, F., Muratovic, E., Basic, N., Catrice, O. & Brown, S.C. 2010.** Towards a genome size and chromosome number database of Balkan Flora: C-values in 343 taxa with novel values for 242. *Adv. Sci. Lett.* 3: 190-213.
- Skvarla, J.J. & Larson, D.A. 1965.** An electron microscopic study of pollen morphology in the Compositae with special reference to the Ambrosiinae. *Grana Palynol.* 6: 210-269.
- Skvarla, J.J. & Turner, B.L. 1966.** Systematic implications from electron microscopic studies of Compositae pollen – a review. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 53: 220-256.
- Skvarla, J.J., Turner, B.L., Patel, V.C. & Tomb, A.S. 1977.** Pollen morphology in the Compositae and in morphologically related families. Pp. 141-248, en: Heywood, V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L. (eds.), *The biology and chemistry of the Compositae*. London: Academic Press.
- Slovák, M., Urfus, T., Vít, P. & Marhold, K. 2009.** The Balkan endemic *Picris hispidiissima* (Compositae): morphology, nuclear DNA content and relationship to the polymorphic *P. hieracioides*. *Plant. Syst. Evol.* 278: 187-201.
- Solbrig, O.T. 1977.** Chromosomal cytology and evolution in the family Compositae. Pp. 269–281, en: Heywood, V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L. (eds.), *The biology and chemistry of the Compositae, vol. 1*. London, New York, San Francisco: Academic Press.
- Stebbins, G.L. 1971.** *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. London: Arnold Pub.
- Stix, E. 1960.** Pollenmorphologische Untersuchungen an Compositen. *Grana Palynol.* 2: 41-104.
- Stix, E. 1964.** Polarisationsmikroskopische Untersuchungen am Sporoderm von *Echinops banaticus*. *Grana* 5: 289-297.
- Stix, E. 1970.** Beitrag zur Morphogenese der Pollenkörner von *Echinops banaticus*. *Grana* 10: 240-242.
- Stuessy, T.F. 2009.** *Plant Taxonomy. The Systematic Evaluation of Comparative data*. 2nd edition. New York: Columbia University Press.
- Stuessy, T.F. & Garver, D. 1996.** The defensive role of pappus in heads of Compositae. Pp 81-91, en: Caligari, P.D.S. & Hind, D.J.N. (eds.), *Compositae: Biology & Utilization. Proceedings of the International Compositae Conference. Kew, 1994. Vol. 2*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Susanna, A. 2009.** Botanical nomenclature: Master or servant? *Collect. Bot.* 28: 141-143.
- Susanna, A. & Garcia-Jacas, N. 2007.** The tribe Cardueae. Pp. 135-158, en: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (eds.), *The families and genera of vascular plants, vol. 8, Flowering plants; Eudicots; Asterales*. Heidelberg: Springer.
- Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Hidalgo, O., Vilatersana, R. & Garnatje, T. 2006.** The Cardueae (Compositae) revisited: Insights from ITS, *trnL-trnF*, and *matK* nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 93: 150-171.
- Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 1995.** Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. *Am. J. Bot.* 82: 1056-1068.
- Swift, H. 1950.** The constance of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA* 36: 643-654.
- Tadesse, M. 1997.** A revision of the genus *Echinops* (Compositae-Cardueae) in tropical Africa. *Kew Bull.* 52: 879-901.
- Tomšovic, P. 1997.** Some palynological observations on the genus *Echinops* (Asteraceae) and their taxonomic implications. *Preslia* 69: 150-171.
- Tormo, M.R. & Uberta, J.L. 1988.** Contribución a la palinología de *Echinops* L. (Compositae) en la Península Ibérica. *An. Asoc. Palin. Leng. Esp.* 4: 25-32.
- Tormo, M.R. & Uberta, J.L. 1995.** Tipos polínicos de la tribu Cardueae en la Península Ibérica. *Mg. Jard. Bot. Cord.* 2: 5-52.
- Torrell, M., Bosch, M., Martín, J. & Vallès, J. 1999.** Cytogenetic and isozymic characterization of the narrow endemic species *Artemisia molinieri* (Asteraceae, Anthemideae): implications for its systematics and conservation. *C. J. Botany* 77: 51-60.
- Torrell, M. & Vallès, J. 2001.** Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome* 44: 231-238.
- Valdés, B. 2002.** *Echinops* L. Pp: 723-724, en: Valdés, B., Rejdali, M., Achhal el Kadmiri, A., Jury, L.L. & Montserrat, J.M. (eds.), *Check-list of vascular plants of N Morocco with identification keys, vol. 2.* Madrid: CSIC.
- Vezey, E.L., Watson, L.E., Skvarla, J.J. & Estes, J.R. 1994.** Plesiomorphic and apomorphic pollen structure characteristics of Anthemideae (Asteroideae: Asteraceae). *Am. J. Bot.* 81: 648-657.
- Vilatersana, R., Susanna, A., Garcia-Jacas, N. & Garnatje, T. 2000.** Karyology, generic delimitation and dysploidy in the genera *Carduncellus*, *Carthamus* and *Phonus* (Asteraceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 134: 425-438.
- Vilatersana, R., Martín, J., Susanna, A., Garcia-Jacas, N. & Garnatje, T. 2001.** Pollen studies in subtribe Centaureinae (Asteraceae): the *Carthamus* complex and the genus *Aegialophila* analyzed with electron microscopy. *Plant Biol.* 3: 607-615.
- Vinogradov, A.E. 2003.** Selfish DNA is maladaptive: evidence from the plant Red List. *Trends Genet.* 19: 609-614.
- Vural, C., Biter, M.K. & Dadandi, M.Y. 2010.** A new species of *Echinops* (Asteraceae) from Turkey. *Turk. J. Bot.* 34: 513-519.
- Wagenitz, G. 1976.** Systematics and phylogeny of the Compositae (Asteraceae). *Plant Syst. Evol.* 125: 29-46.
- Watanabe, K. 2004.** Index to chromosome numbers in the Asteraceae on the web. *Compositae Newslett.* 41: 64. Base de datos disponible en: http://www.lib.kobe-u.ac.jp/infolib/meta_pub/G0000003asteraceae_e [acceso 1 octubre 2012]
- Weberling, F. 1992.** *Morphology of flowers and inflorescences.* Cambridge: Cambridge University Press.
- Wodehouse, R.P. 1945.** *Hayfever Plants.* Waltham: Chronica Botanica Co.
- Zonneveld, B.J.M., Leitch, I.J. & Bennett, M.D. 2005.** First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Ann. Bot.-London* 96: 229-244.

COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Números cromosómicos en tres tribus de *Asteraceae* de Mongolia Interior (China)

Ismael SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Jaume PELLICER, Oriane HIDALGO, Sònia GARCIA, Teresa GARNATJE y Joan VALLÈS

Folia Geobotanica 44: 307–322 (2009).

Se presentan los números cromosómicos de 15 especies de la familia *Asteraceae* de Mongolia Interior (República popular de China). Este estudio incluye representantes de las tribus *Anthemideae* (*Artemisia*, *Chrysanthemum*, *Filifolium*, *Hippolytia* y *Neopallasia*), *Astereae* (*Heteropappus*) y *Cardueae* (*Echinops* y *Olgaea*). El significado de cada recuento se discute para cada especie. Dentro de las *Anthemideae*, los recuentos de *Hippolytia alashanensis* ($2n = 36$) y el nivel tetraploide de *Artemisia eriopoda* ($2n = 36$) se presentan por primera vez. El número cromosómico de *Heteropappus altaicus* (*Astereae*) concuerda con recuentos previos de uno ($4x$) de los dos niveles de ploidía descritos para este taxón. Como complemento a los datos cariológicos, el tamaño del genoma de los representantes de la tribu *Cardueae* fue obtenido mediante citometría de flujo. Dentro de esta tribu, *Echinops gmelini* ($2n = 26$) y su especie hermana, *E. acantholepis* ($2n = 14$) muestran unos patrones cariológicos fuertemente divergentes de difícil interpretación, mientras que el recuento de *E. przewalskyi* ($2n = 32$), obtenido aquí por primera vez, coincide con el de las especies más próximas. En *Olgaea tangutica*, el recuento cromosómico ($2n = 24$) y el tamaño del genoma ($2C = 3,01$ pg) proporcionados en este trabajo constituyen los primeros datos para la especie y el género.



El texto completo de este trabajo no se encuentra disponible por cuestiones de copyright

Referencia bibliográfica completa:

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Ismael; PELLICER, Jaume ; HIDALGO, Oriane ;
GARCIA, Sònia ; GARNATJE, Teresa y VALLÈS, Joan.
Chromosome Numbers in Three Asteraceae Tribes from Inner Mongolia
(China), with Genome Size Data for Cardueae. *Folia Geobotanica* 44: 307–322
(2009)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12224-009-9043-z>

Sistemática molecular de *Echinops* L. (Asteraceae, Cynareae): una filogenia basada en secuencias de ITS y *trnL-trnF* con énfasis en la delimitación seccional

Ismael SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Georgy A. LAZKOV, Oriane HIDALGO y Teresa GARNATJE

Taxon 59(3): 698–708 (2010).

La subtribu monogenérica *Echinopsinae* de *Cynareae* (*Asteraceae*) fue analizada utilizando las secuencias de ADN nuclear ITS y ADN del cloroplasto *trnL-trnF* para 81 de las cerca de 120 especies que la comprenden, representando todas las secciones del género *Echinops* excepto *Cenchrolepis* y *Pterolepis*. Se usaron análisis de máxima parsimonia y bayesianos para cada conjunto de datos y para la matriz combinada con ambos sets de secuencias. El marco filogenético molecular resultante resuelve el género *Echinops* como monofilético y confirma la inclusión de *E. acantholepis* (= *Acantholepis orientalis*) dentro del género. *Echinops* se divide en dos linajes, uno consistente en las sect. *Chamaechinops* y sect. *Acantholepis* (casi exclusivamente formadas por especies anuales o bienales), y el otro que incluye el resto de secciones (compuesta por especies mayoritariamente perennes). Nuestros resultados apoyan una clasificación infragenérica de *Echinops* con nueve secciones reconocidas previamente: *Acantholepis* (= *Nanechinops*), *Chamaechinops*, *Echinops* (= *Terma*), *Hamolepis*, *Hololeuce*, *Oligolepis*, *Phaeochaete*, *Psectra* y *Ritropsis*, todas resueltas como claramente monofiléticas después de la reasignación de algunas especies. El estatus de *E. sect. Phaeochaete* y la asignación seccional de *E. onopordum*, *E. pungens* y *E. transcausicus* queda sin clarificar. La evolución de las brácteas involucrales es congruente con el marco filogenético y apoya la clasificación seccional. El polen de tipo anual no constituye una autapomorfía del clado que agrupa las especies anuales, pero puede representar el estado de carácter ancestral del género entero.

MOLECULAR PHYLOGENETICS AND BIOGEOGRAPHY

Molecular systematics of *Echinops* L. (Asteraceae, Cynareae): A phylogeny based on ITS and *trnL-trnF* sequences with emphasis on sectional delimitation

Ismael Sánchez-Jiménez,¹ Georgy A. Lazkov,² Oriane Hidalgo^{3,4} & Teresa Garnatje^{1,4}

1 Institut Botànic de Barcelona (CSIC-ICUB), Passeig del Migdia, s.n, 08038 Barcelona, Catalonia, Spain

2 Laboratory of Flora, Institute for Biology and Soil, Academy of Sciences, Chui Str. 265, 720071, Bishkek, Kyrgyzstan

3 Plant Development and Evolution, Department of Environmental and Plant Biology, Ohio University, Porter Hall 500, Athens, Ohio 45701, U.S.A.

4 Both authors contributed equally to the design and supervision of this work.

Author for correspondence: Ismael Sánchez-Jiménez, ismasanchez83@gmail.com

Abstract The monogeneric subtribe Echinopsinae of Cynareae (Asteraceae) was analysed using nrDNA ITS and plastid *trnL-trnF* for 81 of the ca. 120 species, representing all *Echinops* sections except *Cenchrolepis* and *Pterolepis*. Maximum parsimony and Bayesian analyses were used for each dataset and for the combined data. The resulting molecular phylogenetic framework resolves *Echinops* as monophyletic and confirms the inclusion of *E. acantholepis* (= *Acantholepis orientalis*) within the genus. *Echinops* is divided into two lineages, one consisting of *E.* sect. *Chamaechinops* and sect. *Acantholepis* (almost exclusively annual or biennial), and the other the remaining sections (almost all perennial). Our results support an infrageneric classification of *Echinops* into nine previously recognized sections: *Acantholepis* (= *Nanechinops*), *Chamaechinops*, *Echinops* (= *Terma*), *Hamolepis*, *Hololeuce*, *Oligolepis*, *Phaeochaete*, *Psectra* and *Ritropsis*, all resolved as strongly monophyletic after some species relocations. The status of *E.* sect. *Phaeochaete* and the sectional assignment of *E. onopordum*, *E. pungens* and *E. transcaucasicus* remain to be clarified. The evolution of involucre bracts is congruent with the phylogenetic framework and supports the sectional classification. Annual pollen type does not constitute an autapomorphy of the clade grouping the annuals but may represent the ancestral character state for the entire genus.

Keywords *Acantholepis*; Bayesian inference; Compositae; Echinopsinae; morphological characters

■ INTRODUCTION

The genus *Echinops* s.l. (including *Acantholepis* Less.) is the only member of Echinopsinae (Cass.) Dumort., one of the five subtribes of Cynareae Lam. & DC., otherwise known as Cardueae Cass. (Susanna & al., 2006). It is characterized by the presence of uniflowered capitula aggregated into second order spherical or oval heads, this syncephalia being a unique feature within the tribe (Petit, 1997). *Echinops* comprises ca. 120 species (Bobrov, 1997; Susanna & Garcia-Jacas, 2007) distributed in tropical Africa, the Mediterranean basin, temperate regions of Eurasia, reaching Central Asia, Mongolia and north-eastern China, with the greater number of species occurring in the Caucasus and the Middle East (for a distribution map of the genus, see Jäger, 1987).

The strong morphological uniformity of *Echinops* makes its taxonomical delimitation to be almost unquestioned, but it also hinders the attempts at establishing natural groups and an infrageneric classification. The most complete analysis of the genus was made by Bunge (1863) who recognized twelve sections, seven of them new. After Bunge, revisions were published by Fries (1923), Jeffrey (1968) and Tadesse (1997) for tropical Africa, Hedge (1975) for the Turkish flora, Kožuharov (1976) for the European taxa, Rechinger (1979) and Mozaffarian (2008) for the Iranian flora, and Bobrov (1997) for the former U.S.S.R.

territories. Morphological characters used for infrageneric classifications of *Echinops* are almost limited to the bracts of the uniflowered capitula, such as their number, or the degree of connation of the inner bracts (Fig. 1; Table 1; Hedge, 1975; Kožuharov, 1976; Rechinger, 1979; Bobrov, 1997). In this genus, the diversity of the involucre bracts seems to be related to the fact that the one-seeded capitulum is the unit of dispersal, and therefore has an adaptive value (Davis, 1956). On the contrary, the pappus—a main source of key taxonomical characters for other Cynareae—plays no role in dissemination and is very short and quite uniform throughout *Echinops* species. Other features like the type and density of indumentum on stems, leaves and phyllaries display a certain amount of variability that provides taxonomically useful characters (Mozaffarian, 2006).

A previous attempt at molecular phylogenetic reconstruction for *Echinops* (Garnatje & al., 2005) consisted of a parsimony analysis based on the ITS region and representing 30 species and the monotypic genus *Acantholepis*; that is, hardly a quarter of all the members in the group. *Echinops* (*Acantholepis* included) was consistently resolved as a natural group in this study, as well as in molecular phylogenies of the tribe Cynareae (Garcia-Jacas & al., 2002; Susanna & al., 2006). The inclusion of *Acantholepis orientalis* Less. within *Echinops* species (Garnatje & al., 2005) agreed with its treatment as *E. acantholepis* (Jaubert & Spach, 1848). Nevertheless, most authors had considered

this taxon as an independent genus close to *Echinops* (Hedge, 1975; Dittrich, 1977, 1996; Rechinger, 1979; Petit, 1988, 1997; Bremer, 1994; Bobrov, 1997). The molecular evidence of Garnatje & al. (2005) suggested a tight relationship between *Acantholepis* and *E. nanus*, an assumption consistent with life cycles (they are both annual), and pollen type data (Garnatje & Martín, 2007). Nevertheless, using traditional morphological characters, *Acantholepis* is well distinguished from *Echinops* species by having second-order head involucral bracts well-developed and patent; the outer ones are similar to the leaves and exceed notably the remaining parts of the syncephalia, whereas these bracts in *Echinops* are comparatively small and hidden. The karyological data also differentiate *Acantholepis* and *Echinops*, although both *Acantholepis* and *E. gmelini* present a metacentric chromosome pair notably larger than the rest, which is not found in other species (Garnatje & al., 2004; Sánchez-Jiménez & al., 2009). However there exists the doubt that, in the previous molecular phylogenetic reconstruction, the association of the two annual taxa at the base of the tree could be produced

by long-branch attraction, the parsimony method being particularly sensitive to this bias (Philippe & al., 2005). Therefore, the relationship between *Acantholepis* and annual *Echinops* needs to be confirmed. As stated above, the taxonomical delimitation of *Echinops* has not been the object of many doubts and restructurations, and in fact, apart from *E. acantholepis*, the only other species whose position as a member of the genus has been questioned is *E. strigosus*, an Ibero-mauritanian biennial species. According to palynological and leaf features, this species is isolated within the genus (Petit, 1988), which led Tomšovic (1997) to suggest its segregation from *Echinops* to form the monotypic genus *Psectra* (Endl.) Tomšovic. The ITS analysis performed by Garnatje & al. (2005) fully resolves the systematic position of this taxon as nested within *Echinops*, and therefore better considered as *E. strigosus*. Due to the limited species sampling, the previous molecular study did not allow to test the suitability of traditional infrageneric classifications.

The ITS region has been chosen for carrying out the present study because it has provided good results for *Echinops*

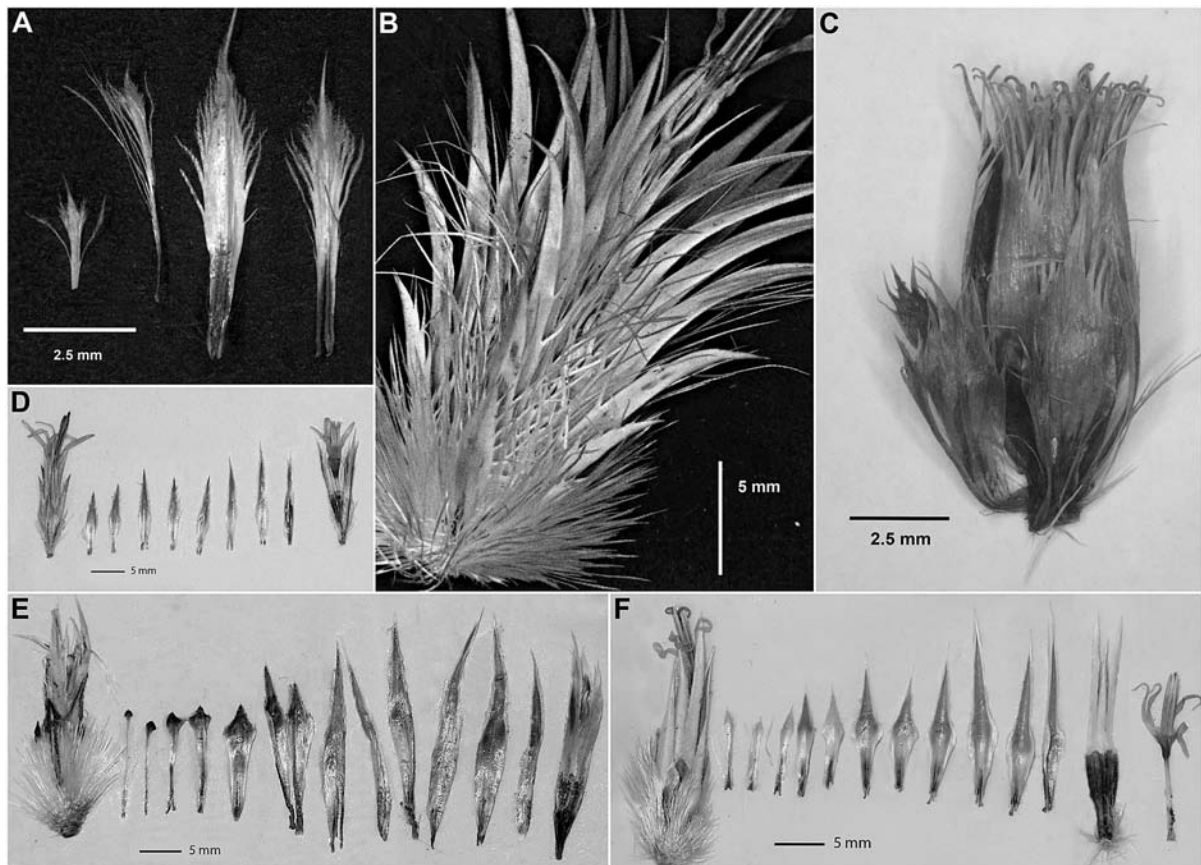


Fig. 1. Bract diversity in the genus *Echinops*. **A**, plumose bracts of *E. gmelini* (sect. *Nanechinops*); **B**, unflowered capitulum of *E. strigosus* (sect. *Psectra*) with 8–9 rows of free bracts; **C**, hooked bracts of *E. hoehnelii* (sect. *Hamolepis*); **D**, dissection of *E. koeltzii* Rech. f. (sect. *Echinops*) unflowered capitulum with the inner bracts free or slightly connate at the base; **E**, dissection of *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus* (sect. *Ritropsis*) unflowered capitulum with the inner bracts united in a membranous tube; **F**, dissection of *E. elymaiticus* (sect. *Oligolepis*) unflowered capitulum with the inner bracts connate forming a leather-like tube.

(Garnatje & al., 2005) and other genera of Cynareae (e.g., Susanna & al., 1999; Vilatersana & al., 2000; Wang & al., 2005, 2007; Hidalgo & al., 2006). The *trnL-trnF* region has also been used successfully in Cynareae (e.g., Wang & Liu, 2004; Hidalgo & al., 2006; Wang & al., 2007) and in other groups of Asteraceae (e.g., Kiers & al., 1999; Álvarez & al., 2001; Bayer & al., 2002; Liu & al., 2006; Katinas & al., 2008; Mort & al., 2008). The main goal of this study is to establish a comprehensive molecular phylogenetic framework of *Echinops* in order to (1) discuss whether or not the sections of the genus form natural groups, thus evaluating the suitability of the current classifications, and (2) link the findings to the distribution of some key morphological characters traditionally used in the infrageneric treatments of this genus.

■ MATERIALS AND METHODS

Plant material. — We analyzed the sequences of the internal transcribed spacers region of nrDNA (ITS1, 5.8S, ITS2) and the *trnL-trnF* region of cpDNA in 89 ingroup specimens, with eight additional specimens for the ITS region and four for the *trnL-trnF*. Eighty-eight taxa corresponding to 81 species and 10 subspecies (three for *E. ritro*, two for *E. sphaerocephalus*, five for *E. spinosissimus*) were represented. We have sequenced a well-rounded representative sample of the genus, which includes the type species of all sections except for the two African sections *Cenchrolepis* (described as monotypic

and *Pterolepis* (three species assigned; Fries, 1923). The entire geographic distributional range of the genus is covered, although the tropical African area is still somewhat weakly represented in our sampling (4 of the 25 species considered by Tadesse, 1997). Four species, *Brachylaena discolor*, from tribe Tarchonantheae Kostel, *Cardopatum corymbosum* and *Cousiniopsis atractyloides*, from subtribe Cardopatiinae Less., and *Tugarinovia mongolica*, from subtribe Carlininae (Cass.) Dumort. were chosen as outgroup members according to previous works based on morphological (Petit, 1988) and molecular characters (Susanna & al., 2006). The source of the investigated species is shown in the Appendix in the Electronic Supplement to the online version of this article. Both previously published and new sequences were used in the analysis; the present study contributes 71 new sequences for the ITS region and 89 for the *trnL-trnF* one. The species have been named according to Greuter (2006–2009).

DNA isolation, PCR amplification and sequencing. —

Total genomic DNA was extracted using a Nucleospin Plant II kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co., Düren, Germany) from sheets provided by different herbaria, silica gel-dried material collected during our expeditions, and young plants from germinated cypsela cultivated in the greenhouse of the Botanical Institute of Barcelona (see Appendix in the Electronic Supplement).

The plastid *trnL-trnF* region includes the *trnL* intron, the 3' *trnL* (UAA) exon, and the intergenic spacer between *trnL* (UAA) and *trnF* (GAA), which were amplified and sequenced

Table 1. Description and type species of *Echinops* sections according to Bunge (1863), Fries (1923), Rechinger (1979) and Bobrov (1997). Classification according to Rechinger (1979), with sections from outside the Iranian region added (Fries, 1923; Bobrov, 1997). *Echinops* sect. *Psectra* follows Bunge (1863) and Tomšovic (1997). Number of species in *E.* sect. *Echinops*, sect. *Oligolepis* and sect. *Ritropsis* are estimates.

Section	Type	Description
<i>Acantholepis</i> (Less.) Jaub. & Spach	<i>E. acantholepis</i> Jaub. & Spach	Bracts of the common involucre large, external ones leaf-shaped, exceeding and surrounding the head. Annual plants. 1 species.
<i>Chamaechinops</i> Bunge	<i>E. humilis</i> M. Bieb.	Inner involucre bracts free; pappus bristles awn-shaped, remotely toothed above, not bearded. Biennial and perennial plants. 5 species.
<i>Echinops</i>	<i>E. sphaerocephalus</i> L.	Involucre bracts 16–25, the inner free to base or slightly connate. Perennial plants. About 50 species.
<i>Hamolepis</i> R.E. Fr.	<i>E. hoehnelii</i> Schweinf.	Involucre bracts hooked above, inner ones connate. Perennial plants. 1 species.
<i>Hololeuce</i> Rech. f.	<i>E. hololeucus</i> Rech. f.	Involucre bracts 15–20, free, the outer largely plumose. Perennial plants. 1 species.
<i>Nanechinops</i> Bunge	<i>E. nanus</i> Bunge	Involucre bracts 16–20, free, largely plumose, perennial; anther appendages awn-shaped below, bearded above. Annual plants. 3 species.
<i>Oligolepis</i> Bunge	<i>E. leucographus</i> Bunge	Involucre bracts 12–15, in 3 rows, inner involucre bracts united to form a leather-like tube. Perennial plants. About 50 species.
<i>Phaeochaete</i> Bunge	<i>E. longifolius</i> A. Rich.	Involucre bracts up to 25, innermost connate; penicillate bristles complanate, connate. Perennial plants. 3 species.
<i>Psectra</i> Endl.	<i>E. strigosus</i> L.	Involucre bracts free, in 8–9 rows. Perennial plants. 1 species.
<i>Ritropsis</i> Greuter & Rech. f.	<i>E. orientalis</i> Trautv.	Involucres of 16–25 bracts; inner united in a membranous cylindrical tube. Perennial plants. About 25 species.
<i>Terma</i> Endl.	<i>E. exaltatus</i> Schrad.	Inner involucre bracts free; pappus cup-shaped, split only above. Perennial plants. 4 species.

together. Universal primers trnL-c, forward, and trnL-f, reverse, and, in some cases, trnL-d, reverse, and trnL-e, forward, were used for amplifying and sequencing the *trnL-trnF* region (Taberlet & al., 1991). The polymerase chain reaction (PCR) procedure included a hot start at 95°C for 1 min 35 s, 34 cycles of 1 min denaturation at 93°C, 1 min annealing at 58°C, 1 min extension at 72°C, and a final 10 min extension at 72°C. The ITS1 spacer, 5.8S gene and ITS2 spacer (ITS region) were amplified and sequenced together. The ITS region was amplified by PCR with the forward primer ITS1, and the reverse primer ITS4 (White & al., 1990), as described in Soltis & Kuzoff (1993). In some cases, we used the 1406F (Nickrent & al., 1994) as forward primer. Sequencing primers ITS1, ITS4 and sometimes ITS2 and ITS3 (reverse and forward, respectively; White & al., 1990) were used.

Both ITS and *trnL-trnF* products were purified with a QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Valencia, California, U.S.A.) or DNA Clean & Concentrator™-5 D4004 (Zymo Research, Orange, California, U.S.A.). Direct sequencing of the amplified DNA segments was performed using the BigDye® Terminator Cycle Sequencing v.3.1 (PE Biosystems, Foster City, California, U.S.A.), following the protocol recommended by the manufacturer. Nucleotide sequencing was carried out at the *Serveis Científicotècnics* of the University of Barcelona on an ABI PRISM 3700 DNA analyzer (PE Biosystems, Foster City, California, U.S.A.).

Phylogenetic analyses. — Nucleotide sequences were edited and aligned manually with SeaView v.4 (Galtier & al., 1996) and BioEdit v.7.0.9 (Hall, 1999). ITS and *trnL-trnF* analyses were performed both separately and combined. Positions 38–39 and 119–121 of ITS matrix were excluded for the analyses because of their ambiguous alignment.

Bayesian analyses. — Datasets were analysed using MrModeltest v.2.3 (Nylander, 2004) to determine the sequence evolution models that best described the present data. These models were used to perform Bayesian analysis using MrBayes v.3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), which runs two parallel analyses simultaneously. Four Markov chains were run simultaneously for 106 generations, and these were sampled every 100 generations. Data from the first 1000 generations were discarded as the “burn-in” period, after confirming that likelihood values were stabilized prior to the 1000th generation. The 50% majority rule consensus tree and posterior probability (PP) of nodes were calculated from the remaining 9001 trees sampled.

Parsimony analysis. — Heuristic analyses of the ITS and the combined data using PAUP* v.4.0b10 (Swofford, 2003) failed because of tree storage limitations. As a result, heuristic analysis was carried out with the PAUPRat approach (Nixon, 1999; Sikes & Lewis, 2001), a tool for implementing parsimony ratchet searches using PAUP*. For parsimony ratchet analyses, uninformative characters were deactivated and 15% of the informative characters were perturbed. The analyses consisted of 10 runs of 200 iterations with tree bisection reconnection (TBR) branch swapping, one tree held at each iteration. On the other hand, parsimony analyses of *trnL-trnF* region involved heuristic searches conducted with PAUP* using TBR branch swapping with character states specified as unordered

and unweighted. To locate islands of most parsimonious trees (Maddison, 1991), 1000 replicates were performed with random taxon addition. All most parsimonious trees (MPTs) were saved and PAUP* was used to compute a strict consensus. Tree lengths, consistency index (CI) and retention index (RI) were calculated excluding uninformative characters.

Bootstrap (BS; Felsenstein, 1985) was carried out to obtain support estimates of the nodes of the trees selected. A fast stepwise-addition bootstrap analysis was performed in PAUP* using 2,000,000 replicates with the default options because of the size of the dataset. The fast stepwise-addition bootstrap method usually provides underestimates as compared to those obtained with branch swapping bootstrap analyses (Mort & al., 2000).

RESULTS

Bayesian analyses. — In some cases Akaike information criterion (AIC) and hierarchical Likelihood Ratio Tests (hLRT) implemented in MrModeltest v.2.3 (Nylander, 2004) determined different models as best fitting the datasets (Table 2). When this occurred, we performed analyses with all models. No inconsistencies were detected between the resulting trees, this leading us to show only the results obtained with the AIC model (Fig. 2), because this approach presents several important advantages over the hLRTs for model selection (Posada & Buckley, 2004).

Parsimony analyses. — The numerical results of the combined ITS and *trnL-trnF* dataset, as well as for separated regions, are given in Table 2.

Congruence of the trees. — Bayesian analyses produced trees with better resolution than parsimony; however they do not show topological discordance for significantly supported

Table 2. Statistics of the PAUP* and Bayesian analyses. Consistency and homoplasy indexes are calculated excluding uninformative characters.

Dataset	Combined ^a	ITS ^a	<i>trnL-trnF</i>	
Ingroup taxa	89	97	93	
Total characters	1519	659	860	
Informative substitutions	240	216	25	
Number of MPTs	1954	1983	32	
Number of steps	681	652	33	
Consistency index (CI)	0.5051	0.4923	0.8182	
Retention index (RI)	0.7643	0.7690	0.9455	
Rescaled consistency index (RC)	0.3861	0.3786	0.7736	
Models selected for Bayesian Inference	AIC	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+G
	hLRT	GTR+I+G	GTR+G	F81+G
	hLRT2	GTR+I+G	SYM+G	F81+I
	hLRT3	GTR+I+G	SYM+I+G	F81+G
	hLRT4	GTR+I+G	SYM+G	F81+I

^a PAUPRat approach (Nixon, 1999; Sikes & Lewis, 2001) performed.

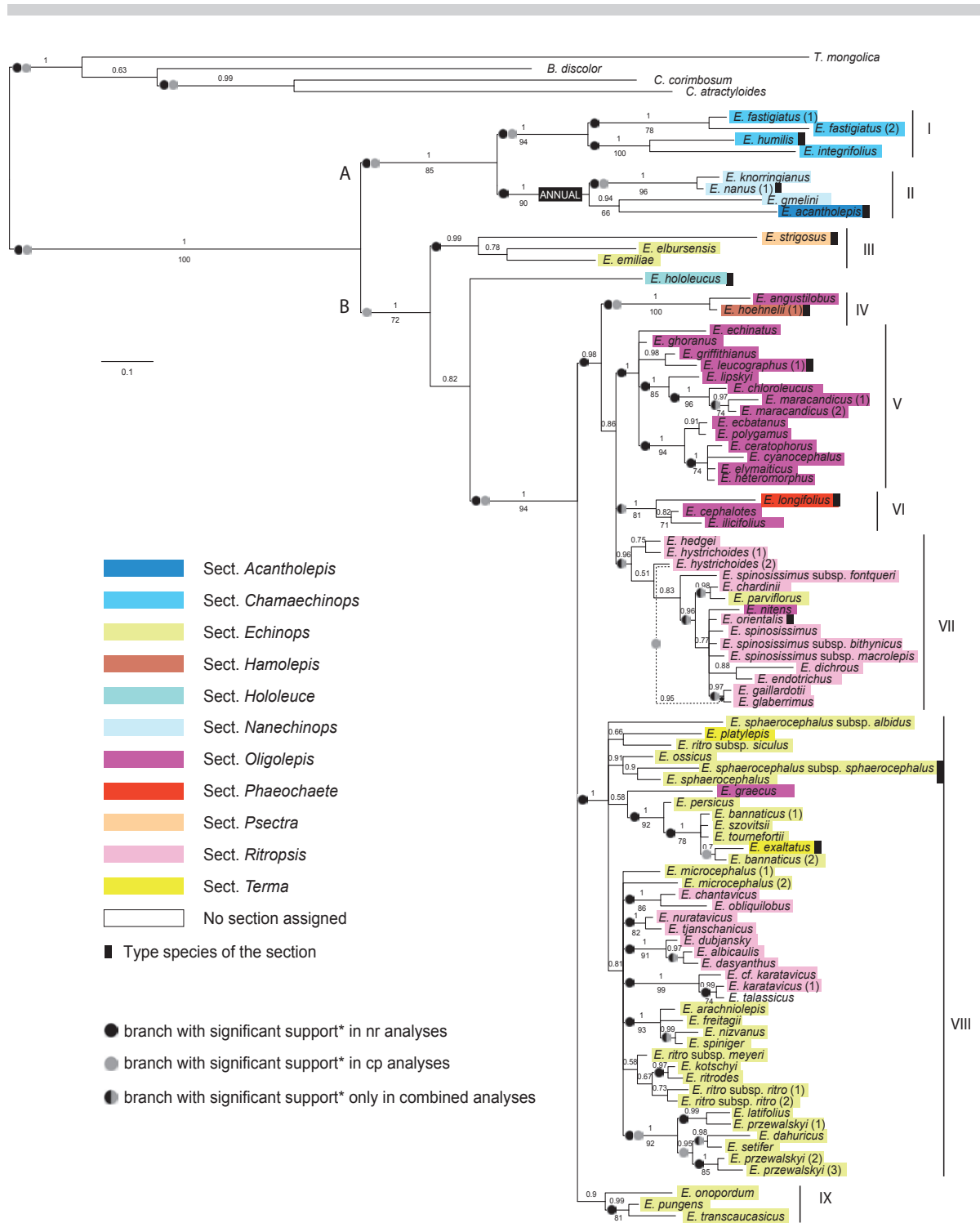


Fig. 2. Majority rule consensus tree resulting from Bayesian analysis of the combined ITS + *trnL-trnF* dataset; numbers above branches are Bayesian posterior probabilities and below branches Bootstrap ($\geq 70\%$). * indicates PP ≥ 0.95 and/or BS $\geq 80\%$. Sections are those considered by various authors before this study. Numbers in parentheses after species names differentiate individuals of the same species; A and B denote the two main lineages; roman numerals on the tree indicate the sections as treated in this work. Discontinuous line indicates the incongruence between combined and *trnL-trnF* trees (see text for explanation).

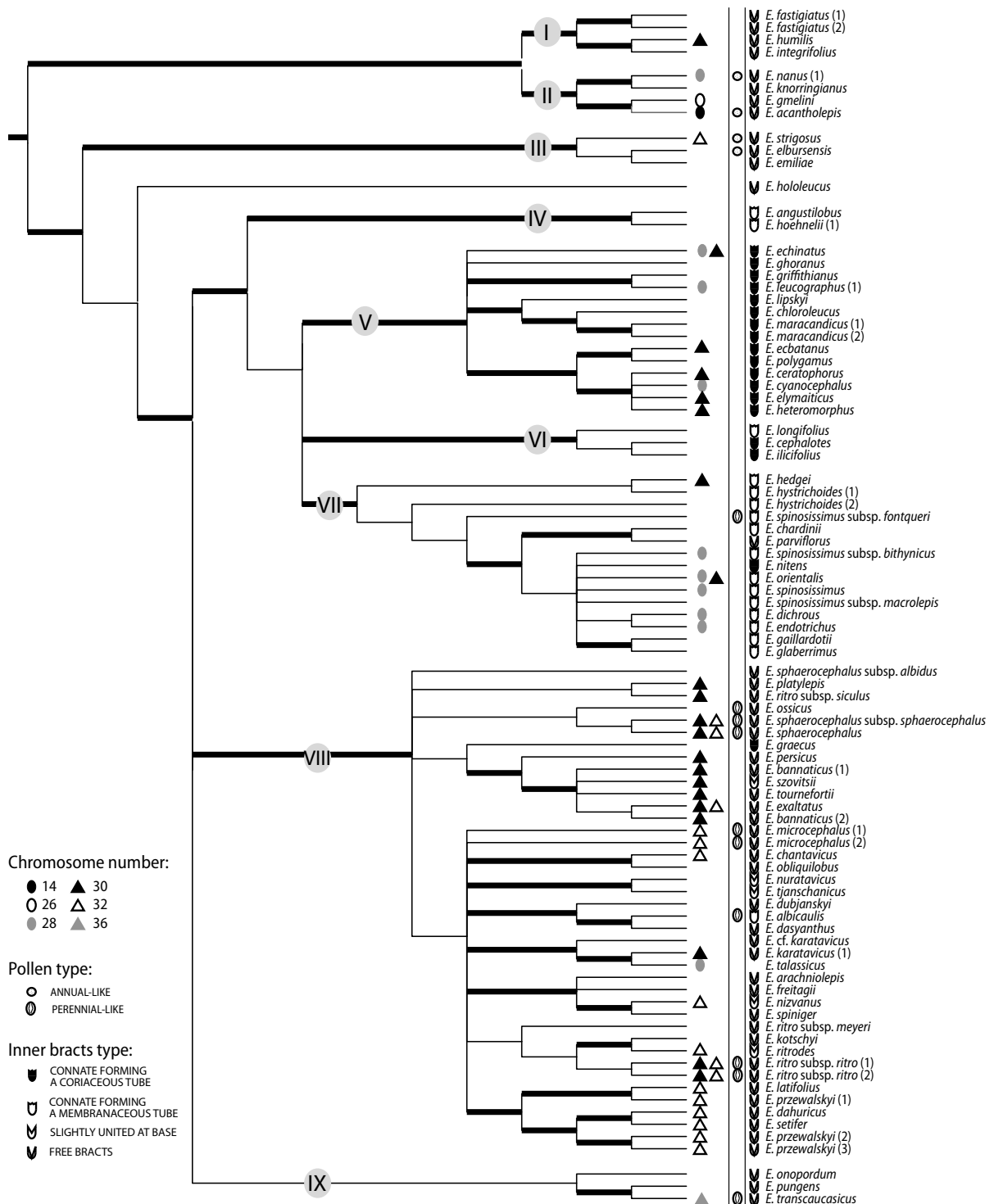


Fig. 3. Distribution of selected morphological characters in the phylogeny. See text for bract morphology, Garnatje & Martín (2007) for pollen and Sánchez-Jiménez & al. (2009) and references therein for chromosome numbers. Numbers in parentheses after species names differentiate individuals of the same species; roman numerals on the tree indicate the sections as treated in this work. Thick lines are branches with PP ≥ 0.95.

branches. This led us to present only the tree obtained with the Bayesian analysis of the combined dataset (Fig. 2). Posterior probabilities and bootstrap values are indicated on this tree. Moreover, inspection of topologies and branch support values do not show any conflict between the plastid and nuclear DNA phylogenetic reconstructions. The only inconsistency is between the combined and plastid trees, and concerns the position of *E. hystrichoides* (specimen 2). This specimen groups with *E. gaillardotii* and *E. glaberrimus* in *trnL-trnF* analyses (PP = 0.95), while its position in combined analyses is not compatible with such an association. The great compatibility of the nuclear and chloroplastic datasets is also expressed in terms of branch supports, as 20% of supported branches occur only in combined analyses. Notwithstanding, the branch grouping *E. bannaticus* (specimen 2) and *E. exaltatus* in *trnL-trnF* analyses (PP = 0.98) lost significance in combined analyses (PP = 0.70), this indicating a certain level of incongruence, even quite localized.

Morphological characters. — The diversity of inner involucre bracts of the uniflowered capitula within *Echinops* is distributed into four main categories (Fig. 3): free bracts (FB); bracts slightly united at the base (SUB); connate, forming a membranous tube (CMT); and connate, forming a coriaceous tube (CCT).

DISCUSSION

Phylogenetic and taxonomic implications

The new phylogenetic framework established by these analyses shows *Echinops* to be monophyletic (PP = 1.00, BS = 100%; Fig. 2), and confirms previous results pointing towards the inclusion of *E. acantholepis* (= *Acantholepis orientalis*) within the genus (Garnatje & al., 2005). *Echinops* is divided into two main lineages, one comprising the representatives of *E. sect. Chamaechinops*, *sect. Nanechinops* and *E. acantholepis* (lineage A, PP = 1.00, BS = 85%; Fig. 2), the other including the remaining *Echinops* species (lineage B, PP = 1.00, BS = 72%; Fig. 2). The tree provides a valuable resolution at the sectional level, permitting the comparison of the molecular phylogenetic framework with the traditional classifications of the genus. Our results resolved the infrageneric classification of *Echinops* in nine sections, and highlighted the need to do some species relocations to make these sections monophyletic:

***Echinops* sect. *Chamaechinops*.** — (Clade I, PP = 1.00, BS = 94%; Fig. 2) This includes plants restricted to the Tian Shan and Sayan mountains, in northeast Central Asia, which are characterized by pappus bristles that are awn-shaped and remotely serrate above and not bearded (Table 1; Bobrov, 1997).

***Echinops* sect. *Acantholepis*.** — (Clade II, PP = 1.00, BS = 90%; Fig. 2) All the species from *E. sect. Nanechinops* are represented in the analysis and form a monophyletic group along with *E. acantholepis*. This clade is well characterized by involucre bracts with a plumose margin (Fig. 1A; Table 1). Clade II includes the types of two different sections, namely *E. sect. Acantholepis* (*E. acantholepis*) and *sect. Nanechinops* (*E. nanus*), which were described simultaneously (Bunge,

1863), even although Bunge assigned *E. sect. Acantholepis* to Spach because that author had previously described *Echinops* subg. *Acantholepis* (Jaubert & Spach, 1848). In such a case of equal priority, either *E. sect. Acantholepis* or *sect. Nanechinops* can be chosen for the combined section, and we must make a decision (Art. 11.5 of the ICBN; McNeill & al., 2006): **we select here *Echinops* sect. *Acantholepis* and place *Echinops* sect. *Nanechinops* in synonymy under *E. sect. Acantholepis*.**

The close relationship between *E. sect. Acantholepis* and *sect. Chamaechinops* has been suggested on the basis of the likely biennial habit of *E. integrifolius* (Kamelin & Tscherneva, 1971). Bunge (1863) also described both *E. humilis* and *E. integrifolius* as biennial plants. Moreover, Mulkidzhanyan (Bobrov, 1997) stated that “genus *Acantholepis* is a derivative from the genus *Echinops* and seems to have originated from an ancestor of the type *E. integrifolius* and *E. humilis*”. Our results support these assumptions of close affinities between the two sections (lineage A, PP = 1.00, BS = 85%; Fig. 2).

***Echinops* sect. *Psectra*.** — (Clade III, PP = 0.99; Fig. 2) Our phylogenetic trees are not consistent with the segregation of *E. strigosus* in *Psectra strigosa* (L.) Tomšovic (Tomšovic, 1997). The phylogenetic position of this taxon is clearly within *Echinops* in an early-branched lineage (clade III, Fig. 2), as stated in previous work (Garnatje & al., 2005). The relationship between *E. emiliae* and *E. strigosus* is confirmed with significant statistical support, and *E. elbursensis* is added to this group of species.

This group shows an interesting, strongly disjunct distribution. Both *E. elbursensis* and *E. emiliae* are narrow endemics from the Central Alborz mountain range (Iran) and the Antalya mountains (Turkey), respectively (Hedge, 1975; Rechinger, 1979), whereas *E. strigosus* grows below an altitude of 500 m. and is distributed in the north of Africa and the southern parts of the Iberian Peninsula (Valdés, 2002). The so called “Kiermack” disjunctions, between the eastern and western Mediterranean, or even Central Asia and the western Mediterranean (Ribera & Blasco-Zumeta, 1998), have been reported for a number of taxa (Braun-Blanquet & Bolòs, 1957; Davis & Hedge, 1971; Thorne, 1972; Willis, 1996; Oberprieler, 2005; Meerow & al., 2006; Pérez-Collazos & al., 2009). Processes of dispersal and vicariance occurring during the Miocene (15–10 Ma) between the eastern and western Mediterranean are documented for the Asteraceae, in the tribe Anthemideae (Oberprieler, 2005).

***Echinops* sect. *Hololeuce*.** — (Fig. 2) *Echinops hololeucus* was described as constituting the monotypic *E. sect. Hololeuce*, and related to *E. sect. Nanechinops* (in the present classification, *E. sect. Acantholepis*) on the basis of its plumose bracts (Rechinger, 1979). *Echinops hololeucus* appears as isolated within lineage B (Fig. 2), and therefore its affinities should be searched more likely amongst this lineage than with *sect. Acantholepis*, which belongs to lineage A (Fig. 2).

***Echinops* sect. *Hamolepis*.** — (Clade IV, PP = 1.00, BS = 100%; Fig. 2) The African species *E. angustilobus* and *E. hoehnelii* were classified by Fries (1923) in *E. sect. Oligolepis* and *sect. Hamolepis* respectively. The two species are sister in the molecular phylogeny, and consequently the transfer of *E.*

angustilobus to sect. *Hamolepis* is required in order to keep the sections monophyletic. *Echinops angustilobus* was the only representative of *E. sect. Oligolepis* having CMT inner involucral bracts, and its new sectional assignment results in two homogeneous sections for bract type (Fig. 3).

***Echinops* sect. *Oligolepis*.** — (Clade V; PP = 1.00; Fig. 2) This section, characterized by the presence of CCT inner involucral bracts (Rechinger, 1979; Bobrov, 1997; Fig. 1F; Table 1), is well defined in our phylogenetic analysis. *Echinops cornigerus* and *E. kandaharensis*, included only in the ITS analyses, are also located within this clade (data not shown). *Echinops* sect. *Oligolepis* is practically restricted to the Middle East. In fact, 38 of the 40 species described by Rechinger (1979) for this section in the Iranian flora are endemic.

***Echinops* sect. *Phaeochaete*.** — (Clade VI, PP = 1.00, BS = 81%; Fig. 2) Although morphological features of *E. cephalotes* and *E. ilicifolius* are clearly attributable to *E. sect. Oligolepis*, these species group with *E. longifolius*, the type of the name of *E. sect. Phaeochaete*. However, this clade VI forms a polytomy with sects. *Hamolepis*, *Oligolepis* and *Ritropsis*, and therefore its merging with *E. sect. Oligolepis*, thus reconciling the molecular and morphological evidences, cannot be discarded.

***Echinops* sect. *Ritropsis*.** — (Clade VII, PP = 0.96; Fig. 2) *Echinops parviflorus* and *E. nitens*, whose morphological characters are perfectly attributable to the sections to which they were previously assigned (*E. sects. Echinops* and *Oligolepis*, respectively; Fig. 2), are now nested in *E. sect. Ritropsis*. This clade includes *E. spinosissimus*, a polymorphic taxon that has been subject to different taxonomical interpretations (Rechinger, 1943; Feinbrun, 1977; Greuter, 2003). It is mainly distributed in North Africa and the east of the Mediterranean basin, coexisting with several related taxa, like *E. gaillardotii* and *E. glaberrimus* (Rechinger, 1943; Feinbrun, 1977), which are also close phylogenetic relatives (PP = 0.96; Fig. 2). *Echinops tenuisectus* (only on ITS analyses, data not shown) is also included in this *E. spinosissimus* clade. *Echinops spinosissimus* subsp. *fontqueri*, an endemism from the Rif in Morocco (Valdés, 2002) does not group with its presumed conspecifics, which supports its consideration as an independent species, namely *E. fontqueri* Pau. We found the only case of incongruence between combined and plastid analyses for the second specimen of *E. hystrioides* (see Results; Fig. 2), a species that has been related to *E. spinosissimus* (Tan, 1995). This finding affecting a group with such a taxonomical complexity, which probably results from a recent radiation, may be a product of hybridization.

***Echinops* sect. *Echinops*.** — (Clade VIII, PP = 1.00; Fig. 2). Clade VIII comprises both types of the names of *E. sect. Echinops* and *E. sect. Terma*. *Echinops* sect. *Terma* is represented in our study by *E. exaltatus* (the type species) and *E. platylepis*. The two species are both nested within *E. sect. Echinops* representatives and do not group together. Our results agree with Kožuharov (1976) for considering *E. sect. Terma* a synonym of *E. sect. Echinops*. *Echinops* sect. *Echinops* is characterized by uniflorous capitula with 16–25 involucral bracts, the inner ones free or slightly connate at the base (Fig. 1D; Table 1; Rechinger, 1979). Bunge (1863) and Bobrov (1997) considered

an additional section, *E. sect. Ritro* Endl., characterized by external involucral bracts deprived of glandular hairs and leather-like, whereas *E. sect. Echinops* s.str. species have usually glandular external involucral bracts relatively thin. Moreover, species of section *Echinops* s.str. grow in forest edges and shrubby thickets, whereas those of sect. *Ritro* are found in open habitats in steppes and semi-deserts (Bobrov, 1997). The resolution of clade VIII prevents any conclusion as to the suitability of such a classification.

Clade VIII includes a series of eight species previously assigned to *E. sect. Ritropsis* (Fig. 2): *E. albicaulis*, *E. chantavicus*, *E. dasyanthus*, *E. dubjanskyi*, *E. karatavicus*, *E. obliquilobus*, *E. nuratavicus* and *E. tjanschanicus*. These species were also classified in *E. sect. Rythrodes* Bunge (Li, 1987; Bobrov, 1997). Bunge (1863) defined *E. sect. Rythrodes* because of the connation of the inner involucral bracts in a membranous tube, a trait never observed in the type of the name of this section, *E. ritrodes*. This led Rechinger (1979) to transfer this species in *E. sect. Echinops*, and to describe a new section, *E. sect. Ritropsis*, whose type, *E. orientalis*, is characterized by CMT involucral bracts (Table 1). Our results give support to this consideration of *E. sect. Rythrodes* as a synonym of *E. sect. Echinops*. Furthermore, the phylogenetic tree also suggests that other species from *E. sect. Rythrodes* should be placed in *E. sect. Echinops* rather than in *E. sect. Ritropsis*. Morphological evidence reveals that *E. chantavicus*, *E. dasyanthus*, *E. dubjanskyi*, *E. karatavicus* and *E. obliquilobus* have FB (Bobrov, 1997), *E. nuratavicus* and *E. tjanschanicus* SUB (Li, 1987; Bobrov, 1997); and only *E. albicaulis* has CMT (Bobrov, 1997; Fig. 3). Therefore, *E. sect. Rythrodes*, as considered by Bunge (1863) and Bobrov (1997), includes several species that do not present the morphological characters used for defining it. Further, none of them have other frequent characteristics of *E. sect. Ritropsis*, like cornigerous capitula with middle bracts ending in long spines and leaves with large and strong spines. On the contrary, all those characters strongly resemble a general aspect similar to species from section *Echinops*. To sum up, the morphological evidence supports the placement of these species in *E. sect. Echinops*. *Echinops talassicus*, which has until now never been assigned to any section, is included in this group and therefore in *E. sect. Echinops*.

Clade IX. — (PP = 0.90; Fig. 2) This clade constitutes one of the few uncertainties of our phylogenetic reconstruction regarding the assignment of species throughout *Echinops* sections. In fact, this is a double uncertainty, because the monophyly of the group in itself is not significantly established, and because there is a trichotomy between clades (IV, V, VI, VII), VIII and IX. If the polytomy is resolved by the grouping of *E. pungens*, *E. onopordum* and *E. transcaucasicus* with clade VIII, these species would remain in *E. sect. Echinops*, as previously stated by morphological data (Hedge, 1975), but if it is resolved in another possible topology, this would mean that these species should probably constitute a new section within the genus. *Echinops polyacanthus* (included only in ITS analyses) groups with *E. pungens* and *E. transcaucasicus* (PP = 0.98 and BS = 81%, data not shown), a result consistent with morphological data (Hedge, 1975).

Our results do not resolve the systematic position of *Echinops onopordum*, an endemic species from southwest Turkey. Nevertheless, they do permit the discarding of a possible relationship of this taxon with the *E. pannosus* group (represented in our phylogeny by *E. emiliae*) suggested by Davis (1956). Its consideration as an isolated species (Hedge, 1975) is still possible.

Evolution of morphological characters

Involucral bracts of the unflowered capitula. — These have been consistently used for sectional characterization, especially regarding their degree of connation (Table 1). The *Echinops* ancestral bract type seems to be that of inner free bracts (FB), present in lineage A, and successively in the grades giving rise to *E. sect. Psectra* and *sect. Hololeuce* at the base of B lineage (Fig. 3). Inner involucral bracts of increasing connection degrees are found later in the tree: bracts slightly united at the base (SUB); connate, forming a membranous tube (CMT); and connate, forming a coriaceous tube (CCT; Fig. 3). Although bract types in themselves do not provide autapomorphies at a sectional level, their distribution throughout *Echinops* sections is quite homogeneous. Each section has only one bract type or at least one clearly dominating type (Fig. 3): FB for *E. sects. Acantholepis, Chamaechinops, Echinops* and *Psectra*, CMT for *E. sects. Hamolepis* and *Ritropsis*, CCT for *E. sect. Oligolepis*. The SUB type is exclusively found in *E. sect. Echinops* (Fig. 3). The association of sects. *Hamolepis, Oligolepis, Phaeochaete* and *Ritropsis* (PP = 0.98, Fig. 2) is supported morphologically; they are characterized by connate inner involucral bracts (of CMT or CCT types) with the only exception of *E. parviflorus* (Rechinger, 1979; Tadesse, 1997).

Some sectional re-locations are quite difficult to explain on morphological bases. This is the case of *E. graecus*, a species with CCT inner bracts previously classified in *E. sect. Oligolepis* (Hedge, 1974; Kožuharov, 1976), which appears in our phylogenetic reconstruction nested in *E. sect. Echinops* (Fig. 2). The observation of unflowered capitula of *E. graecus* at different maturation stages revealed that involucral bracts can be free at floration. We believe that connation of the inner bracts in this and other species may occur during cypsela formation. We agree with Kožuharov (1975) that connation of the bracts should be treated with caution as a differential character, in spite of the fact that it can be consistently found in several groups like *E. sect. Oligolepis* and *sect. Ritropsis*. Nevertheless, since the one-seeded capitulum is the dispersion unit in *Echinops* (Davis, 1956) it is not surprising that evolutionary convergence occurs for this character.

Pollen types. — Garnatje & Martín (2007) suggested a close relationship of *E. acantholepis* with other annual *Echinops* species on the basis of pollen type. Both *E. acantholepis* and *E. nanus* have subprolate microechinate pollen without prominent intercolpia (annual-like pollen type), whereas a subprolate microechinate/echinate verrucoid pollen with very prominent intercolpia in the shape of a bridge is present in all the perennial species of *Echinops* examined at this time (perennial-like pollen; Garnatje & Martín, 2007). Recent

pollen morphological work revealed the occurrence of the annual-like pollen type in *E. elbursensis* (I. Sánchez-Jiménez, unpub., Fig. 3), also seen before in *E. strigosus* (Garnatje & Martín, 2007), both from *E. sect. Psectra* (clade III, Fig. 2). Annual pollen type, which seemed at first to be restricted to species with an annual habit (Garnatje & Martín, 2007), is in fact present in *E. acantholepis, E. elbursensis, E. nanus* and *E. strigosus*, and consequently extended to *E. sect. Psectra* in the B lineage (Figs. 2–3). Therefore, annual pollen type can no longer be considered as constituting an autapomorphy of the clade grouping the annuals, but it may represent the ancestral character state for the whole genus.

CONCLUDING REMARKS

The present study contributes to the establishment of an infrageneric classification of the genus *Echinops*. The sections *Acantholepis, Hamolepis* and *Psectra* were considered before as monotypic, whereas the present phylogenetic study shows they are composed of two or more species. Based on our study, only *E. sect. Hololeuce* remains as monotypic. More work including analysis of other molecular markers is necessary to clarify the phylogenetic relationships of species with doubtful placement. Moreover, sampling should be enlarged to include some more species belonging to the African sections. Although biogeography was not a principal aim of this work, some interesting geographical patterns were detected such as the disjunction within *E. sect. Psectra* and the distributions of *E. sects. Chamaechinops* and *Oligolepis*. Detailed phylogeographical analysis of sections such as *E. sect. Ritropsis* might contribute to elucidate the relationships between the floras of the Mediterranean and the Middle East. The complex taxonomy of the *E. spinosissimus* group could be clarified by means of population studies. A detailed study of pollen morphology and evolution in the genus *Echinops* might also be promising.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank all the collectors, botanical gardens and herbaria cited for supplying material. Acknowledgements are given to the SYNTHESYS Project (<http://www.synthesys.info/>), financed by the European Community Research Infrastructure Action under the FP6 “Structuring the European Research Area” Programme, Dr. Ernst Vitek from the Naturhistorisches Museum Wien, in making possible the study of herbarium vouchers, Dr. Daniel Petit for advice and material, and Samuel Pyke and the editor-in-chief of *Taxon* for improvement of the English manuscript. We are also grateful to three anonymous reviewers for critically reading the manuscript. O.H. benefited of a MICINN postdoctoral contract, I.S.-J. benefited of a FPU grant and T.G. of a Marina Bueno grant, from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Ministerio de Educación of the Spanish government and the CSIC, respectively. This work was supported by projects CGL2007-64839-C02-01/BOS of the Spanish government and 2005/SGR/00344 of the Generalitat de Catalunya.

■ LITERATURE CITED

- Álvarez, I., Fuertes, J., Panero, J.L. & Nieto, G. 2001. A phylogenetic analysis of *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae) based on morphological, nuclear ribosomal (ITS), and chloroplast (*trnL-F*) evidence. *Molec. Phylog. Evol.* 20: 41–64.
- Bayer, R.J., Greber, D.G. & Bagnall, N.H. 2002. Phylogeny of Australian Gnaphalieae (Asteraceae) based on chloroplast and nuclear sequences, the *trnL* intron, *trnL-trnF* intergenic spacer, *matK*, and ETS. *Syst. Bot.* 27: 801–814.
- Bobrov, E.G. 1997. *Echinops* L. Pp. 1–70 in: Shishkin, B.K. & Bobrov, E.G. (eds.), *Flora of the USSR*, vol. 27. Dehra Dun: Bishen Singh, Mahendra Pal Singh; Koenigstein: Koeltz Scientific Books.
- Braun-Blanquet, J. & Bolòs, O. de. 1957. Les groupements végétaux du bassin moyen de l'Ebre et leur dynamisme. *Anales Estac. Exp. Aula Dei* 5: 1–266.
- Bremer, K. 1994. *Asteraceae: Cladistics & classification*. Portland: Timber Press.
- Bunge, A. 1863. Über die Gattung *Echinops*. *Bull. Acad. Imp. Sci. Saint-Petersbourg* 6: 390–412.
- Davis, P.H. 1956. Fourteen new species from Turkey. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 22: 65–84.
- Davis, P.H. & Hedge, I.C. 1971. Floristic links between NW Africa and SW Asia. *Ann. Naturhist. Mus. Wien* 75: 43–57.
- Dittrich, M. 1977. Cynareae – Systematic review. Pp. 999–1015 in: Heywood, V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L. (eds.), *The biology and chemistry of the Compositae*, vol. 2. London: Academic Press.
- Dittrich, M. 1996. Die Bedeutung morphologischer und anatomischer Achänen-Merkmale für die Systematik der Tribus *Echinopeae* Cass. und *Carlineae* Cass. *Boissiera* 51: 9–102.
- Feinbrun, N. 1977. The genus *Echinops* in Palestine. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 35: 235–245.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Fries, R.E. 1923. Zur Kenntnis der ostafrikanischen *Echinops*-Arten. *Acta Horti Berg.* 8: 39–44.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. 1996. SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 543–548.
- García-Jacas, N., Garnatje, T., Susanna, A. & Vilatersana, R. 2002. Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Molec. Phylog. Evol.* 22: 51–64.
- Garnatje, T., Vilatersana, R., Susanna, A., Vallès, J. & Siljak-Yakovlev, S. 2004. Contribution to the karyological knowledge of *Echinops* L. (Asteraceae, Cardueae) and related genera. *Bot. J. Linn. Soc.* 145: 337–344.
- Garnatje, T. & Martín, J. 2007. Pollen studies in the genus *Echinops* L. and *Xeranthemum* group (Asteraceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 154: 549–557.
- Garnatje, T., Susanna, A., García-Jacas, N., Vilatersana, R. & Vallès, J. 2005. A first approach to the molecular phylogeny of the genus *Echinops* L. (Asteraceae): Sectional delimitation and relationships with the genus *Acantholepis* Less. *Folia Geobot.* 40: 407–419.
- Greuter, W. 2003. The Euro+Med treatment of *Cardueae* (Compositae) – generic concepts and required new names. *Willdenowia* 33: 49–61.
- Greuter, W. 2006–2009. Compositae (pro parte majeure). In: Greuter, W. & Raab-Straube, E. von (eds.): *Compositae. Euro+Med Plantbase—the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity*. Retrieved 1 Aug. 2009 from <http://www2.bgbm.org/EuroPlusMed/>.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hedge, I.C. 1974. *Echinops*. Pp. 237–239 in: Davis, P.H. (ed.), *Materials for a Flora of Turkey XXX: Compositae, I. Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 33: 207–264.
- Hedge, I.C. 1975. *Echinops* L. Pp. 609–622 in: Davis, P.H. (ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 5. Edinburgh: Edinburgh Univ. Press.
- Hidalgo, O., García-Jacas, N., Garnatje, T. & Susanna, A. 2006. Phylogeny of *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae-Centaureinae) and related genera inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data: Taxonomic and biogeographic implications. *Ann. Bot.* 97: 705–714.
- Jäger, E.J. 1987. Arealarten der *Asteraceen*-Tribus als Grundlage der ökogeographischen Sippencharakteristik. *Bot. Jahrb. Syst.* 108: 481–497.
- Jaubert, H.-F. & Spach, E. 1847–1850. *Illustrationes plantarum orientalum*, vol. 3. Paris: apud Roret bibliopolam.
- Jeffrey, C. 1968. Notes on Compositae (III): The Cynareae in East Tropical Africa. *Kew Bull.* 22: 107–140.
- Kamelin, R.V. & Tschernova, O.V. 1971. A new species of the genus *Echinops* L. from the section *Chamaechinops* Bunge. *Novosti Sist. Vyssh. Rast.* 8: 262–265.
- Katinas, L., Crisci, J.V., Schmidt-Javaily, R., Williams, C., Walker, J., Drew, B., Bonifacino, J.M. & Sytsma, K.J. 2008. Evolution of secondary heads in Nassauviinae (Asteraceae, Mutisieae). *Amer. J. Bot.* 95: 229–240.
- Kiers, A.M., Mes, T.H.M., Van der Meijden, R. & Bachmann, K. 1999. Morphologically defined *Cichorium* (Asteraceae) species reflect lineages based on chloroplast and nuclear (ITS) DNA data. *Syst. Bot.* 24: 645–659.
- Kožuharov, S.I. 1975. Notes on some European species of *Echinops* L. and *Jurinea* Cass. Pp. 41–43 in: Heywood, V.H. (ed.), *Flora Europaea – Notulae Systematicae ad Floram Europaeam spectantes*. *Bot. J. Linn. Soc.* 71: 39–50.
- Kožuharov, S.I. 1976. *Echinops* L. Pp. 212–214 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 Univ. Press.
- Li, A. 1987. Species nova generis *Echinops* L. (Asteraceae) e Pamiro-Alaj. *Novosti Sist. Vyssh. Rast.* 24: 201–202.
- Liu, J.-Q., Wang, Y.-J., Wang, A.-L., Hideaki, O. & Abbott, R.J. 2006. Radiation and diversification within the *Ligularia-Cremathodium-Parasenecio* complex (Asteraceae) triggered uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Molec. Phylog. Evol.* 38: 31–49.
- Maddison, D.R. 1991. The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. *Syst. Zool.* 40: 315–328.
- McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Hawksworth, D.L., Marhold, K., Nicolson, D.H., Prado, J., Silva, P.C., Skog, J.E., Wiersema, J.H. & Turland, N.J. (eds.) 2006. *International code of botanical nomenclature (Vienna Code): Adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005*. Regnum Vegetabile 146. Rugell, Liechtenstein: Gantner.
- Meerow, A.W., Francisco-Ortega, J., Kuhn, D.N. & Schnell, R.J. 2006. Phylogenetic relationships and biogeography within the Eurasian clade of Amaryllidaceae based on plastid *ndhF* and nrDNA ITS sequences: Lineage sorting in a reticulate area? *Syst. Bot.* 31: 42–60.
- Mort, E.M., Randle, C.P., Kimball, R.T., Tadesse, M. & Crawford, D.J. 2008. Phylogeny of Coreopsidae (Asteraceae) inferred from nuclear and plastid DNA sequences. *Taxon* 57: 109–120.
- Mort, E.M., Soltis, P.S., Soltis, D.E. & Mabry, M.L. 2000. Comparison of three methods for estimating internal support on phylogenetic trees. *Syst. Biol.* 49: 160–161.
- Mozaffarian, V. 2006. A taxonomic survey of *Echinops* L. tribe Echinopeae (Asteraceae) in Iran: 14 new species and diagnostic keys. *Iranian J. Bot.* 11: 197–239.
- Mozaffarian, V. 2008. Compositae: Anthemideae and Echinopeae. In: Assadi, M., Maassoumi, A.A. & Mozaffarian, V. (eds.), *Flora of Iran*, no. 59. Teheran: Research Institute of Forests and Rangelands.
- Nickrent, D.L., Schuette, K.P. & Starr, E.M. 1994. A molecular

- phylogeny of *Arceuthobium* (Viscaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer. J. Bot.* 81: 1149–1160.
- Nixon, K.C. 1999. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407–414.
- Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest, version 2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oberprieler, C. 2005. Temporal and spatial diversification of Circum-Mediterranean Compositae-Anthemideae. *Taxon* 54: 951–966.
- Pérez-Collazos, E., Sánchez-Gómez, P., Jiménez, F. & Catalán, P. 2009. The phylogeographical history of the Iberian steppe plant *Ferula loscosii* (Apiaceae): A test of the abundant-centre hypothesis. *Molec. Ecol.* 18: 848–861.
- Petit, D.P. 1988. Le genre *Echinops* L. (Compositae: Cardueae). 1. Position phylétique et interprétation de l'incapitulescence. *Candollea* 43: 467–481.
- Petit, D.P. 1997. Generic interrelationships of the Cardueae (Compositae): A cladistic analysis of morphological data. *Pl. Syst. Evol.* 207: 173–203.
- Philippe, H., Zhou, Y., Brinkmann, H., Rodrigue, N. & Delsuc, F. 2005. Heterotachy and long-branch attraction in phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* 5: 50. doi:10.1186/1471-2148-5-50.
- Posada, D. & Buckley, T.R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.* 53: 793–808.
- Rechinger, K.H. 1943. *Flora Aegaea: Flora der Inseln und Halbinseln des Ägäischen Meeres*. Vienna: Springer.
- Rechinger, K.H. (ed.). 1979. *Flora des Iranischen Hochlandes und der umrahmenden Gebirge. Compositae III – Cynareae*. Graz: Akademische Druck und Verlagsanstalt.
- Ribera, I. & Blasco-Zumeta, J. 1998. Biogeographical links between steppe insects in the Monegros region (Aragon, NE Spain), the Eastern Mediterranean, and Central Asia. *J. Biogeogr.* 25: 969–986.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Sánchez-Jiménez, I., Pellicer, J., Hidalgo, O., García, S., Garnatje, T. & Vallès, J. 2009. Chromosome numbers in three Asteraceae tribes from Inner Mongolia (China), with genome size data for Cardueae. *Folia Geobot.* 44: 307–322.
- Sikes, D.S. & Lewis, P.O. 2001. PAUPRat: PAUP* implementation of the parsimony ratchet, beta software, version 1. Distributed by the authors, Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, U.S.A.
- Soltis, D.E. & Kuzoff, R.K. 1993. ITS sequence homogeneity within and among populations of *Lomatium grayi* and *L. laevigatum* (Umbelliferae). *Molec. Phylog. Evol.* 2: 166–170.
- Susanna, A. & García-Jacas, N. 2007. The tribe Cardueae. Pp. 135–158 in: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (eds.), *The families and genera of vascular plants*, vol. 8, *Flowering plants; Eudicots; Asterales*. Heidelberg: Springer.
- Susanna, A., García-Jacas, N., Hidalgo, O., Vilatersana, R. & Garnatje, T. 2006. The Cardueae (Compositae) revisited: Insights from ITS, *trnL-trnF*, and *matK* nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 93: 150–171.
- Susanna, A., Garnatje, T. & García-Jacas, N. 1999. Molecular phylogeny of *Cheirolophus* (Asteraceae: Cardueae-Centaureinae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pl. Syst. Evol.* 214: 147–160.
- Swofford, D.L. 2003. *PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*, version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Pl. Molec. Biol.* 17: 1105–1109.
- Tadesse, M. 1997. A revision of the genus *Echinops* (Compositae-Cardueae) in tropical Africa. *Kew Bull.* 52: 879–901.
- Tan, K. 1995. Seven new species of *Echinops* (Asteraceae). *Ann. Bot. Fenn.* 32: 117–126.
- Thorne, R.F. 1972. Major disjunctions in the geographic ranges of seed plants. *Quart. Rev. Biol.* 47: 365–411.
- Tomšović, P. 1997. Some palynological observations on the genus *Echinops* (Asteraceae) and their taxonomic implications. *Preslia* 69: 31–33.
- Valdés, B. 2002. *Echinops* L. Pp. 723–724 in: Valdés, B., Rejdali, M., Achhal el Kadmiri, A., Jury, L.L. & Monserrat, J.M. (eds.), *Checklist of vascular plants of N Morocco with identification keys*, vol. 2. Madrid: CSIC.
- Vilatersana, R., Susanna, A., García-Jacas, N. & Garnatje, T. 2000. Generic delimitation and phylogeny of the *Carduncellus-Carthamus* complex (Asteraceae) based on ITS sequences. *Pl. Syst. Evol.* 221: 89–105.
- Wang, Y.J. & Liu, J.Q. 2004. Phylogenetic analyses of *Saussurea* sect. *Pseudoeriocoryne* (Asteraceae: Cardueae) based on chloroplast DNA *trnL-F* sequences. *Biochem. Syst. Ecol.* 32: 1009–1023.
- Wang, Y.J., Liu, J.Q. & Miede, G. 2007. Phylogenetic origins of the Himalayan endemic *Dolomiaea*, *Diplazoptilon* and *Xanthopappus* (Asteraceae: Cardueae) based on three DNA regions. *Ann. Bot.* 99: 311–322.
- Wang, Y.J., Pan, J.T., Liu, S.W. & Liu, J.Q. 2005. A new species of *Saussurea* (Asteraceae) from Tibet and its systematic position based on ITS sequence analysis. *Bot. J. Linn. Soc.* 147: 349–356.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 in: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. & White, T. (eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press.
- Willis, K.J. 1996. Where did all the flowers go? The fate of temperate European flora during glacial periods. *Endeavour* 20: 110–114.

Appendix. List of taxa, vouchers and GenBank accession numbers of DNA sequences used in this paper (ITS, *trnL-trnF*, respectively). Numbers in parentheses differentiate individuals of the same species. Sections according to Bunge (1863), Fries (1923), Rechinger (1979) and Bobrov (1997). GenBank accession numbers marked with a superscript number are sequences published in: ¹García-Jacas & al. (2002), ²Garnatje & al. (2005) and ³Susanna & al. (2006).

Echinops* sect. *Acantholepis (Less.) Jaub. & Spach: *E. acantholepis* Jaub. & Spach, Uzbekistan, Kyzylkum, 30 km N of Bukhara, IX.1999, *Khassanov s.n.* (BC), AY826222³, AY772267³ (published as *Acantholepis orientalis* Less.). ***Echinops* sect. *Chamaechinops*** Bunge: *E. fastigiatus* Kamelin & Tscherneva (1), Kyrgyzstan, NW of Kirguize Range, 9.VI.1963, *Golosokov s.n.* (LE), GU116503, GU134553; (2), Kyrgyzstan, Aktash, 21.VII.1970, *Kamelin s.n.* (LE), GU116502, GU134552; *E. humilis* M. Bieb, Russia, Altai Republic, Khabarovsk, 20.VIII.1978, *Krasnobrov & Danilov s.n.* (LE), GU116514, GU134568; *E. integrifolius* Kar. & Kir., Kazakhstan, Urdzhar, 23.VII.1970, *Myrzakulov s.n.* (W), GU116517, GU134572. ***Echinops* sect. *Echinops***: *E. arachnolepis* Rech. f., Iran, Khorasan, Torbat-e-Jam, XI.1972, *Reino Alava 10964 & Iranshahr* (W), GU116486, GU134532; *E. bannaticus* Rochel ex Schrad. (1), Botanical Garden, University Hohenheim, Stuttgart, Germany (BC), AY538636², GU134533; (2), Botanical Garden, University of Pécs, Hungary (BC), AY538651², GU134601 (published as *E. ruthenicus* M. Bieb); *E. dahuricus* Fisch., Mongolia, Bulgan Aimag, sum Koskit Samsar, 24.VIII.2004, *Vallès 7 & al.* (BC), GU116493, GU134541; *E. elbursensis* Rech. f., Iran, Tehran, Karaj valley, Assemvarak, 25.VIII.1975, *Wendelbo s.n. & al.* (W), GU116498, GU134547; *E. emiliae* Schwarz ex P.H. Davis, Turkey, Antalya, Ovacik, 30.VII.2002, *Susanna 2262 & al.* (BC), AY538641², GU134549; *E. freitagii* Rech. f., Iran, Khorasan, Sharad, Ghazieh-je Tash, 1.VIII.1975, *unknown col.* (W), GU116504, GU134555; *E. kotschy* Boiss., Iran, Khafr-Kuhé Dena, 16.VIII.1972, *Riazi 6768* (W), GU116520, GU134575; *E. latifolius* Tausch, China, Inner Mongolia, Ulanqab province, Yin Shan, 29.VIII.2007, *Vallès 11 & al.* (BC), GU116521, GU134576; *E. microcephalus* Sibth. & Sm. (1), Turkey, Mugla, Dirmil Mountain Pass, 29.VII.2002, *Susanna 2253 & al.* (BC), AY538643², GU134583; (2), Bulgaria, between Haskovo and Asenograd, 13.VIII.1965, *Rechinger 32983* (BC), GU116543, GU134584; *E. nizvanus* Rech. f., Iran, Gorgan (Asterabad), near Hadjilag, 27.VII.1948, *Rechinger 6206* (W), GU116530, GU134587; *E. onopordum* P.H. Davis, Turkey, Antalya, Tahtali Dag, near Beycik, 31.VII.2002, *Susanna 2270B & al.* (BC), AY538642², GU134589; *E. ossicus* K. Koch, Turkey, Sivas, 8.VIII.2002, *Susanna 2416 & al.* (BC), AY538644², GU134556 (published as *E. galaticus* Freyn); *E. parviflorus* Boiss. & Buhse, Iran, 32 km NE Karaj, 10.IX.1972, *Amin & Bazargan 4471* (W), GU116533, GU134591; *E. persicus* Steven ex Fisch., The Medicinal Herb Garden at the University of Washington, Seattle, U.S.A. (BC), AY538639², AY772324³; *E. polyacanthus* Iljin, Armenia, Akhuryan, 10.IV.1984, *Takhtachan s.n.* (LE), GU116554, –; *E. przewalskyi* Iljin (1), China, East Mongolia, Ouladan, Ourato, *David s.n.* (LE), GU116535, GU134594; (2), Beijing Zhiwuyuan, n° 1922183, *unknown col.* (PE), GU116536, GU134595; (3), China, Inner Mongolia, Alxa province, 5.IX.2007, *Vallès 41 & al.* (BC), GU116537, GU134596; *E. pungens* Trautv., Azerbaijan, near Bajergeh, 21.VII.1974, *Rechinger 49781* (W), GU116538, GU134597; *E. ritro* subsp. *meyeri* (DC.) Kožuharov, Kazakhstan, Chinchir-lankiy district, Turat-bast mountains, 31.VII.1935, *Liyarkova s.n.* (LE), GU116527, GU134582; *E. ritro* L. subsp. *ritro* (1), France, Hautes Alpes, Infournas Haut, 4.VII.2007, *Hidalgo 200 & al.* (BC), GU116544, GU134599; (2), Spain, Tarragona, Xerta, 6.VII.1998, *Garnatje & Susanna 1870* (BC), (AF319074, AF319028)¹, GU134600 (published as *E. ritro* L.); *E. ritro* subsp. *siculus* (Strobl) Greuter, Italy, Sicily, Palermo, near Gibbilmanna-Pizi, University of Palermo, Botanical Garden, Sicily, Italy (BC), AY538652², GU134604 (published as *E. siculus* Strobl); *E. ritrodes* Bunge, Iran, Tehran, pass between Qazvin and Mangil, 13.VII.1975, *Wendelbo 18290 & Assadi* (W), GU116539, GU134598; *E. setifer* Iljin, Kanagawa Prefectural Ofuna Botanical Garden, Japan (BC), GU116540, GU134603; *E. sphaerocephalus* L., Armenia, Kapan region, Shishkert, 9.VII.2004, *Oganesian ERE-154869* (ERE), GU116541, GU134606; *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus* (Boiss. & Spruner) Kožuharov, Greece, Thrace, Makri, 28-VI-1965, *Bauer & Spitzenberger 1678* (W), GU116485, GU134529; *E. sphaerocephalus* L. subsp. *sphaerocephalus*, Hungary, Kisar et, Fas near Belmegyer, University of Warsaw Botanical Garden, Poland (BC), AY538637², GU134605 (published as *E. sphaerocephalus* L.); *E. spiniger* Iljin, Turkmenistan, Balkhani mountains near Chegui-su, 4.VI.1928, *Bobrov & Jarmolenko 330*, (LE), GU116542, GU134607; *E. scovitsii* DC., Botanical Garden of Ruhr University, Bochum, Germany (BC), AY538650², GU134610; *E. tournefortii* Ledeb., Botanical Garden, University of Oxford, England (BC), AY538646², GU134613; *E. transcaucasicus* Iljin, Armenia, Ijevan region, between Kirants and Tsakhkavan, 20.VIII.2004, *Oganesian ERE-154871* (ERE), GU116546, GU134614. ***Echinops* sect. *Hamolepis*** R.E. Fr.: *E. hoehnelli* Schweinf. (1), Kenya, Chogoria Park, 10.IX.2006, *Galbany AF-A & Arrabal* (BC), GU116506, GU134565; (2), Kenya, Nyeri, Aberdare Mountains, 20.IX.1986, *Hagemann & Clafsen 3120* (B), –; GU134566. ***Echinops* sect. *Hololeuce*** Rech. f.: *E. hololeuce* Rech. f., Afghanistan, Ghorat, between Sharak and Naourak, 27.VII.1962, *Rechinger 18892* (W), GU116513, GU134567. ***Echinops* sect. *Nanechinops*** Bunge: *E. gmelini* Turcz., Mongolia, Gobi Aimag, sum Bulgan, 1.IX.2004, *Vallès 65 & al.* (BC), GU116510, GU134560; *E. knorringianus* Iljin, Kyrgyzstan, Aravan, 27.VI.1999, *Lazkov s.n.* (FRU), GU116519, GU134574; *E. nanus* Bunge (1), Kyrgyzstan, Kadzhi-saj, 2.07.1999, *Lazkov s.n.* (FRU), GU116528, GU134585; (2), Kazakhstan, Almatinskaya oblast, Kurtagai canyon, 24.VIII.2000, *Susanna 2132 & al.* (BC), AY538654², –; ***Echinops* sect. *Oligolepis*** Bunge: *E. angustilobus* S. Moore, Tanzania, Olmoti crater, 4.IX.2006, *Galbany AF-8 & Arrabal* (BC), GU116505, GU134531; *E. cephalotes* DC., Iran, between Qazvin and Takestan, 29.VI.1971, *Rechinger 42312* (W), GU116487, GU134535; *E. ceratophorus* Boiss., Iran, Kermân, Râien Gohariat'1 Arah, 20.VI.1976, *Moussavi 34988 & Tehrani* (W), GU116488, GU134536; *E. chloroleucus* Rech. f., Afghanistan, Kataghan, 14.VII.1967, *Rechinger 37041* (W), GU116491, GU134539; *E. cornigerus* DC., Afghanistan, Khandud, 22.VII.1971, *Grey-Wilson & Hewer 1656* (GB), GU116552, –; *E. cyanocephalus* Boiss. & Hausskn., Iran, Fars province, Fahlian to Hosseinalabad, 1.VI.1973, *Iranshah & Moussavi 15504* (W), GU116492, GU134540; *E. ecbatanus* Bornm. ex Rech. f., Iran, Hamadan, 12.VIII.1996, *Susanna 1721 & al.* (BC), (AF319073, AF319127)¹, GU134545; *E. echinatus* Roxb., Pakistan, Gilgit, upper Hunza, 7.IX.1983, *Aldén 6011 & al.* (GB), GU116497, GU134546; *E. elymaiticus* Born, Iran, Esfahan, Dahagan, 2.VI.1974, *Rechinger 47027* (W), GU116499, GU134548; *E. ghoranus* Rech. f., Iran, Khorassan, Esfayaren, 15.VI.1975, *Rechinger 53567* (W), GU116508, GU134558; *E. graecus* Mill., Greece, Attika, between Menidi and Acharna, 17.VII.1956, *Rechinger 18165* (W), GU116511, GU134561; *E. griffithianus* Boiss., Afghanistan, 50 km from Kabul to Gardez, 26.VI.1965, *Rechinger 31465* (W), GU116512, GU134562; *E. heteromorphus* Bunge, Iran, Khorassan, ca. 20 km from Sabzevar to Esferayen, 4.VIII.1999, *Mozaffarian 79761* (TARI), AY538630², GU134564; *E. ilicifolius* Bunge, Iran, Yazd, Taft, Ghazieh-je Nodeshan, 16.VI.1976, *Moussavi 34988 & Tehrani* (W), GU116516, GU134571; *E. kandaharensis* Rech. f. & Koie, Afghanistan, Kandahar, 21.V.1967, *Rechinger 34809* (W), GU116550, –; *E. leucographus* Bunge (1), Afghanistan, Nangarhar, 29.IV.1969, *Wendelbo 7417 & al.* (GB), GU116522, GU134577; (2), Turkmenistan, Badkhyz, 6.V.1981, *unknown col.* (LE), GU116549, –; *E. lipskyi* Iljin, Uzbekistan, near Kunda-Dzhuaza, 20.VII.1955, *Sabirov 442* (LE), GU116523, GU134578; *E. maracandicus* Bunge (1), Tadjikistan, Turkestan Range, Zerapshan river valley, 11.VII.1960, *Egorava 1727* (LE), GU116525, GU134580; (2), Kyrgyzstan, Near Bishkek, 15.VIII.1990, *Lazkov s.n.* (FRU), GU116526, GU134581; *E. nitens* Bornm., Iraq, Shirwan Mazin, 19.VI.1961, *Hadac 5861 & al.* (W), GU116529, GU134586; *E. phaeocephalus* Hand-Mazz., Turkey, Erzurum, from Erzurum to Erzinkan, crossroads to Kandill, 8.VIII.2002, *Susanna 2407 & al.* (BC), –; GU134592; *E. polygamus* Bunge, Mongolia, 5.VII.1974, *unknown col.* (LE), GU116534, GU134593. ***Echinops* sect. *Phaeochaete*** Bunge: *E. longifolius* A. Rich, Togo, 27.VII.1979, *Peuker 158 & al.* (B), GU116524, GU134579; *E. amplexicaulis* Oliv., Kenya, Ravine District, 26.IX.1953, *Drummond & Hemsley 4439* (B), –; GU134530. ***Echinops* sect. *Psectra*** Endl.: *E. strigosus* L., Spain, Cádiz, Puerto del Cabrito, 20.VII.2001, *García-Jacas & Susanna 2218* (BC), AY538653², GU134609. ***Echinops* sect. *Ritropsis*** Greuter & Rech. f.: *E. albicaulis* Kar. & Kir., Kazakhstan, Almatinskaya oblast, 26.VIII.2000, *Susanna 2144 & al.* (BC), AY538638², GU134528; *E. chantavicus* Trautv., Kyrgyzstan, Toktogul region, Basin of Uzun-Ahmat, 6.VII.1976, *Lazkov s.n.* (FRU), GU116489, GU134537; *E. chardinii* Boiss. & Buhse, Iran, Kurdistan, between Sanandaj and Salavatatabad, 3.VII.1971, *Rechinger 42823* (W), GU116490, GU134538; *E. dasyanthus* Regel & Schmalh., Kyrgyzstan, Chatkal'at, between Hodzha-Ata and Aflatun, 28.VII.1985, *Lazkov s.n.* (FRU), GU116494, GU134542; *E. dichrous* Boiss. & Hausskn., Iran, Masjed Soleyman, 2.V.1973, *Riazi 9542* (W), GU116495, GU134543; *E. dubjanskyi* Iljin, Kazakhstan, Karagandskaya region, Sands of Dopotogksnur, 10.VI.1961, *Kazalysm & Yunatov 9223* (LE), GU116496, GU134544; *E. endotrichus* Rech. f., Iran, Fars province, Bamu protected region, 30.V.1975, *Wendelbo 17579 & Foroughi* (W), GU116500, GU134550; *E. gaillardotii* Boiss., Lebanon, Marmoussa, Bou Dagher Kharrat, 18.IX.2005, *Hidalgo & Romashchenko 404* (BC), GU116507, GU134557; *E. glaberrimus* DC., Jordan, Edom, Wadi Rum, W Jebel Khasali, 25.IV.1998, *Staudinger J247* (W), GU116509, GU134559; *E. hedgei* Kit Tan, Yemen, At Tawilah, *Hein 3871*, Botanical Garden Berlin-Dahlem Germany (BC), AY538648², GU134563; *E. hystrichoides* Kit Tan (1), Yemen, Suleyman, 10.V.1997, *Hein 3942* (BC), GU116515, GU134570; (2), Yemen, near the village Nadj al Ahmar, 3.IV.1997, *Hein 3806* (BC), GU116548, GU134616; *E. cf. karatavicus*, Uzbekistan, Tashkent, Chimgan ski resort, 10.XI.1999, *Susanna 2070 & al.* (BC), AY538633², AY772325³ (published as *E. tschimganicus* B. Fedtsch.); *E. karatavicus* Regel & Schmalh. (1), Kyrgyzstan, Rhavine of Bok-Tokaikulm, 13.VI.2001, *Lazkov s.n.* (FRU), GU116518, GU134573; (2), Kyrgyzstan,

Appendix. Continued.

2.VIII.1955, *unknown col.* (LE), GU116553, –; *E. nuratavicus* A.D. Li, Uzbekistan, Nurata, Eksu Range, 14.VII.1972, *Kamelin 115* (LE), GU116531, GU134588; *E. obliquilobus* Iljin, Kazakhstan, Turaigir Mountains near Charin canyon, 23.VIII.2000, *Susanna 2124 & al.* (BC), AY538640², GU134602, (published as *E. saissanicus* (B. Keller) Bobrov); *E. orientalis* Trautv., Armenia, Eghgnadsor region, Eghgnadsor, 18.06.2004, *Oganesian ERE-154868* (ERE), GU116532, GU134590; *E. spinosissimus* Turra, Botanical Garden, Berlin, Germany (BC), AY826283³, AY772326³ (published as *E. viscosus* DC.); *E. spinosissimus* subsp. *bithynicus* (Boiss.) Greuter, Iran, Kurdistan, ca. 10 km from Marivan to Bane, 18.VIII.1999, *Mozaffarian 79844*, (TARI), AY538629², GU134534 (published as *E. bithynicus* Boiss.); *E. spinosissimus* subsp. *fontqueri* (Pau) Greuter, Morocco, SE of Tanger, 19.V.2002, *Gómiz s.n.* (BC), AY538632², GU134554 (published as *E. fontqueri* Pau); *E. spinosissimus* subsp. *macrolepis* (Boiss.) Greuter, Lebanon, Broummana, Bou Dagher Kharrat, 18.IX.2005, *Hidalgo & Romashchenko 403* (BC), GU116547, GU134615; *E. spinosissimus* Turra subsp. *spinosissimus*, Greece, Nomos Dodekanisou, Karpathos, Botanical Garden, Berlin, Germany (BC), (AF319075, AF319129)¹, –; *E. spinosissimus* subsp. *spinosus* Greuter, Algeria, 24 km to Gardaya, 9.V.1968, *Rodin & Miroshinchenko 449* (LE), –, GU134608; *E. tenuisectus* Rech. f., Iraq, Kurdistan, Mosul, 9.VII.1957, *Rechinger 10738* (BC), GU116551, –; *E. tianschanicus* Bobrov, Uzbekistan, Tian-Shan, 22 km N of Nurata, 10.VII.1930, *unknown col.* (LE), GU116545, GU134612. **Echinops sect. Terma** Endl.: *E. exaltatus* Schrad., Austria, Oberinntal, Innsbruck, 8.VIII.1980, *Polatschek s.n.* (W), GU116501, GU134551; *E. platylepis* Trautv., Botanical Garden Bielefeld, Germany (BC), AY538635², GU134569 (published as *E. humilis* M. Bieb.). **Species not attributed to any section:** *E. talassicus* Golosk., Kazakhstan, Shimir, Aksu-Zhabagly natural reserve, 29.VIII.2000, *Susanna 2180 & al.* (BC), AY538631², GU134611. **Outgroup:** TRIBE TARCHONANTHEAE: *Brachylaena discolor* DC., South Africa, 20.III.02, *Ortiz s.n.* (NBG), AY826236², AY772280²; TRIBE CARDUEAE: *Cardopatum corimbosum* (L.) Pers. (subtribe Cardopatiinae), Greece, Macedonia: between Themi and Thessaloniki, 18.VI.1999, *Roché & Susanna 1951* (BC), AY826238², AY772282²; *Cousiniopsis atractyloides* (C.Winkl.) Nevski (subtribe Cardopatiinae), Uzbekistan, Babatak mountains, 40 Km E of Lalmikar, 18.V.1979, *Sukervanik s.n.* (BC), (AF319071, AF319125)¹, AY772317²; *Tugarinovia mongolica* Iljin (subtribe Carlininae), Mongolia, 1.VII.89, *Trubov s.n. & al.* (LE), AY826342³, AY772377³.

■ LITERATURE CITED

- Bobrov, E.G.** 1997. *Echinops* L. Pp. 1–70 in: Shishkin, B.K. & Bobrov, E.G. (eds.), *Flora of the USSR*, vol. 27. Dehra Dun: Bishen Singh, Mahendra Pal Singh; Koenigstein: Koeltz Scientific Books.
- Bunge, A.** 1863. Über die Gattung *Echinops*. *Bull. Acad. Imp. Sci. Saint-Pétersbourg* 6: 390–412.
- Fries, R.E.** 1923. Zur Kenntnis der ostafrikanischen *Echinops*-Arten. *Acta Horti Berg.* 8: 39–44.
- García-Jacas, N., Garnatje, T., Susanna, A. & Vilatersana, R.** 2002. Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Molec. Phylog. Evol.* 22: 51–64.
- Garnatje, T., Susanna, A., García-Jacas, N., Vilatersana, R. & Vallès, J.** 2005. A first approach to the molecular phylogeny of the genus *Echinops* L. (Asteraceae): Sectional delimitation and relationships with the genus *Acantholepis* Less. *Folia Geobot.* 40: 407–419.
- Rechinger, K.H. (ed.)**. 1979. *Flora des Iranischen Hochlandes und der umrahmenden Gebirge*. Compositae III – Cynareae. Graz: Akademische Druck und Verlagsanstalt.
- Susanna, A., García-Jacas, N., Hidalgo, O., Vilatersana, R. & Garnatje, T.** 2006. The Cardueae (Compositae) revisited: Insights from ITS, *trnL-trnF*, and *matK* nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 93: 150–171.

Tamaño del genoma y número cromosómico en *Echinops* (Asteraceae, Cardueae) en las regiones Egea y Balcánica: aspectos técnicos de la estimación de la cantidad de ADN nuclear y evolución del genoma en un marco filogenético

Ismael SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Oriane HIDALGO, Miguel Ángel CANELA, Sonja SILJAK-YAKOVLEV, Marija Edita ŠOLIĆ, Joan VALLÈS y Teresa GARNATJE

Plant Systematics and Evolution 298: 1085–1099 (2012).

Este trabajo se centra en los representantes del género *Echinops* (Asteraceae, Cardueae) en las regiones Egea y Balcánica, desde una perspectiva de la evolución de su genoma. Los números cromosómicos fueron determinados mediante tinción de orceína en 14 poblaciones de nueve taxones, y la cantidad de ADN fue medida mediante citometría de flujo en 24 poblaciones de nueve taxones. Una filogenia molecular basada en las regiones ITS y *trnL-trnF*, incluyendo las primeras secuenciaciones de dos taxones (*Echinops sphaerocephalus* subsp. *taygeteus* y *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri*), proporcionó un marco sobre el cual discutir los cambios en el genoma. Desde un punto de vista metodológico, las estimaciones del valor C fueron similares cuando eran obtenidas, para la misma población, a partir de hojas frescas recogidas en plantas recolectadas en el campo y las procedentes de plantas cultivadas. Inversamente, a pesar de dar la apariencia de ser correctas (i.e. bajo coeficiente de variación), las estimaciones del tamaño del genoma utilizando material preservado en gel de sílice difieren significativamente de los valores obtenidos para las mismas poblaciones con material fresco. No obstante, el material conservado en gel de sílice puede proporcionar estimaciones aproximadas para, por ejemplo, inferir el nivel de ploidía. Las cantidades de ADN a partir de material adecuado (no almacenado en gel de sílice) fueron calculadas para 23 poblaciones, con un rango entre $2C = 6,52$ pg (*E. spinosissimus* subsp. *neumayeri*) y $2C = 9,37$ pg (*E. bannaticus*). Los números cromosómicos de *E. graecus* ($2n = 32$), *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus* ($2n = 32$), *E. sphaerocephalus* subsp. *taygeteus* ($2n = \text{ca. } 30$) y *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri* ($2n = 28$) se presentan por primera vez en este trabajo. El tamaño del genoma y el número cromosómico se han confirmado como parámetros cruciales para descifrar la diversificación de los linajes dentro del género *Echinops*.



El texto completo de este trabajo no se encuentra disponible por cuestiones de copyright

Referencia bibliográfica completa:

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Ismael; HIDALGO, Oriane; CANELA, Miguel Ángel; SILJAK-YAKOVLEV, Sonja ŠOLIĆ, Marija Edita VALLÈS, Joan; GARNATJE, Teresa. Genome size and chromosome number in *Echinops* (Asteraceae, Cardueae) in the Aegean and Balkan regions: technical aspects of nuclear DNA amount assessment and genome evolution in a phylogenetic frame. *Plant Systematics and Evolution* 298 (6) :1085–1099 (2012).
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-012-0618-4>

***Echinops spinosissimus* subsp. *neumayeri* (Vis.) Kožuharov (Asteraceae; Cardueae): un nuevo taxón para la flora de Grecia**

Ismael SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Oriane HIDALGO y Teresa GARNATJE

Adansonia, sér. 3 34(1): 129–132 (2012).

Se cita por primera vez la presencia de *Echinops spinosissimus* subsp. *neumayeri* (Vis.) Kožuharov en Grecia, en la Unidad Periférica de Préveza, próxima al mar Jónico. Esta nueva localidad pone de manifiesto una mayor proximidad geográfica entre *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri* y las otras subespecies *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus* y subsp. *bithynicus*. Esto implica que la eventualidad de contactos genéticos debería ser considerada para descifrar la historia evolutiva de estos taxones.



El texto completo de este trabajo no se encuentra disponible por cuestiones de copyright

Referencia bibliográfica completa:

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Ismael; HIDALGO, Oriane; GARNATJE, Teresa
Echinops spinosissimus Turra subsp. neumayeri (Vis.) Kožuharov (Asteraceae,
Cardueae): a new record for the flora of Greece
Adansonia, sér. 3 34(1): 129–132 (2012).
DOI: <http://dx.doi.org/10.5252/a2012n1a15>

Estudio polínico del género *Echinops* L. (Asteraceae, Cardueae)

Ismael SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Oriane HIDALGO y Teresa GARNATJE

Plant Systematics and Evolution, en preparación (previsto de enviar a la revista a finales de 2012).

Se ha estudiado el polen de 26 especies de *Echinops* (Asteraceae, Cardueae) mediante microscopía óptica y electrónica de barrido. Un análisis de componentes principales de los rasgos del polen (longitud de los ejes polar y ecuatorial, forma) ha sido realizado en una muestra en que se incluyen tanto datos nuevos como previamente publicados, cubriendo nueve de las once secciones reconocidas en el género. Además de los tipos de polen anual y perenne previamente descritos en el género, se han encontrado otras morfologías, por lo que se han descrito dos nuevos tipos. El polen en *Echinops* muestra una gran diversidad en tamaño, desde los más pequeños (p.e. *E. nanus*, $P = 14,5 \mu\text{m}$) al más grande (*E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus*, $P = 145.5 \mu\text{m}$) de los descritos en Asteraceae. La distribución de los tipos polínicos en la filogenia sugiere que el polen de gran tamaño y sección triangular, exclusivo de *Echinops*, ha surgido relativamente tarde en la historia evolutiva del género.

POLLEN STUDY IN THE GENUS *ECHINOPS* L. (ASTERACEAE, CARDUEAE)

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, ISMAEL¹, GARNATJE, TERESA¹ & HIDALGO, ORIANE^{2,*}

¹*Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB). Passeig del Migdia s.n. Parc de Montjuïc. 08038 Barcelona. Catalonia. Spain.*

²*Laboratori de Botànica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII, s.n. 08028 Barcelona. Catalonia. Spain.*

*Corresponding author (phone: 34-934024490; fax: 34-934035879; e-mail:orianeidalgo@ub.edu)

Keywords: Compositae, *Echinops*-type, exine ornamentation, fossil pollen, SEM, systematics, very large pollen

Abstract: Pollen morphology of 26 species of *Echinops* (Cardueae, Asteraceae) was studied using light and scanning electron microscopy. Principal component analysis of pollen traits (polar and equatorial axis length, shape) were carried out on a sample comprising new and previously published data, covering nine of the eleven sections recognized in the genus. Besides the “annual” and “perennial” types previously described for the genus, other pollen morphologies were also found leading to the description of two new types. *Echinops* pollens display a huge diversity in size, amongst the smallest (e.g. *E. nanus*, P = 14.5 µm) and the biggest (e.g. *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus*, P = 145.5 µm) in Asteraceae. Distribution of pollen types on to the phylogeny suggests that the pollen of large size and triangular section -unique of *Echinops*- has arisen lately in the evolutionary history of the genus.

INTRODUCTION

Echinops L. is unique amongst the Asteraceae family for presenting two exclusive features, both related to reproductive structures: a syncephalia constituted by uniflowered capitula and a pollen of large size and triangular section. Such exceptional features led the genus to constitute by its own a subtribe within Cardueae (= Cynareae), the Echinopsinae. These morphological specificities are likely to be tightly related with the genesis and diversification of *Echinops*, which can be traced back to *Echinops* evolutionary history.

A number of Asteraceae and Cardueae pollen grain classifications have been made, having most of them in common to be able to consistently consider *Echinops*

Taxon	References
<i>E. acantholepis</i> Jaub. & Spach ¹	Tomšovic (1997), Meo (2005), Garnatje & Martín (2007)
<i>E. albicaulis</i> Kar. & Kir.	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. bannaticus</i> Rochel ex Schrad.	Stix (1964, 1970)
<i>E. chlorophyllus</i> Rech.f.	Ikuse (1962)
<i>E. cornigerus</i> DC.	Nair & Lawrence (1985)
<i>E. dumanii</i> C.Vural	Vural et al. (2010)
<i>E. echinatus</i> Roxb.	Chaubal & Deodikar (1965), Dakshini & Singh (1973), Parveen & Bhandari (1981), Perveen (1999)
<i>E. fontqueri</i> Pau	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. giganteus</i> A.Rich	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. hispidus</i> Fresen.	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. macrophyllus</i> Boiss. & Hauskn.	Jafari & Ghanbarian (2007)
<i>E. microcephalus</i> Sibth. & Sm.	Garnatje & Martín (2007), Chester & Raine (2001)
<i>E. mildbraedii</i> Mattf.	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. nanus</i> Bunge	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. obliquilobus</i> Iljin ²	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. ossicus</i> K.Koch ³	Garnatje & Martín (2007)
<i>E. ritro</i> L.	Pla Dalmau (1961), Kuprianova & Alyoshina (1972), Tormo & Ubera (1888, 1995), Garnatje & Martín (2007)
<i>E. robustus</i> Bunge	Ikuse (1962)
<i>E. sphaerocephalus</i> L.	Mohl (1835), Wodehouse (1945), Erdtman (1952), Blackmore (1990), Tormo & Ubera (1988, 1995), Reille (1995), Garnatje & Martín (2007), Punt & Hoen (2009)
<i>E. spinosissimus</i> Turra	Reille (1998)
<i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>spinosus</i> (L) Greuter ⁴	Dimon (1971), Reille (1995)
<i>E. strigosus</i> L.	Díez (1987), Tormo & Ubera (1988, 1995), Tomšovic (1997), Garnatje & Martín (2007)

Table 1. *Echinops* species whose pollen has been previously studied and corresponding references. Taxa indicated with superindex were published as: 1) *Acantholepis orientalis* Less.; *E. saissanicus* (B.Keller) Bobr., 3) *E. galaticus* Freyn, y 4) *E. spinosus* L.

pollen as forming a separated type (Mohl, 1835; Stix, 1960; Pla Dalmau, 1965; Díez, 1987; Tormo & Ubera, 1988, 1995; Perveen, 1999; Jafari & Ghanbarian, 2007; Punt & Hoen, 2009). Mohl (1835) first observed in *Echinops* pollen grains, describing *E. sphaerocephalus* L. pollen as a triangular prism, rounded in the poles and with the lateral sides slightly sunken. In addition, more than 20 *Echinops* species had their pollen features documented (Table 1), although few works specifically focused on *Echinops* pollen. In relation with pollen grain

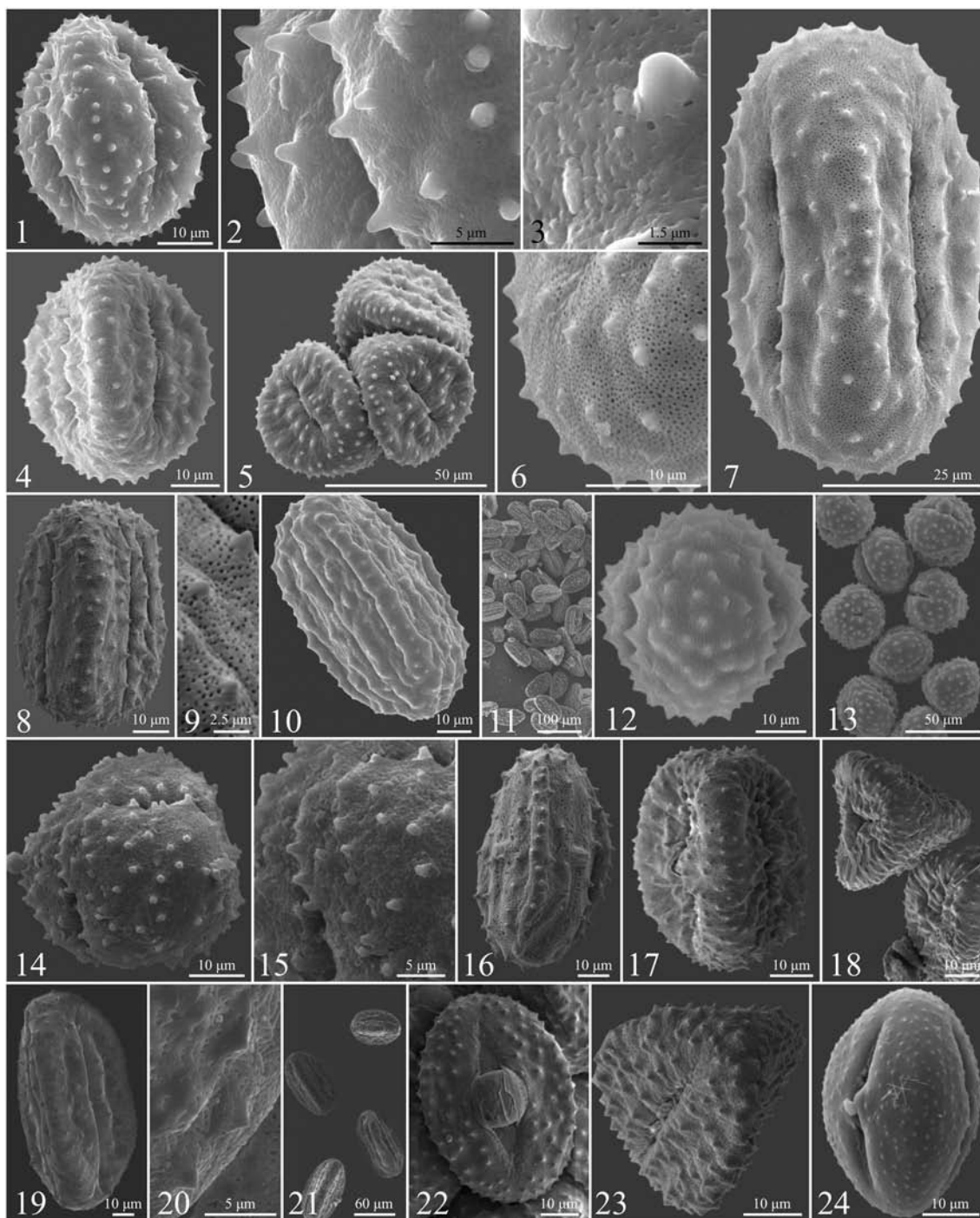
ultrastructure, Stix (1964, 1970) analyzed the exine and its morphogenesis in *E. bannaticus* Rochel ex Schrad., and Blackmore (1990) used *E. sphaerocephalus* exine as model for studying the sporoderm homologies and its morphogenesis in land plants. From the systematic point of view, Tormo & Uberta (1988) studied the morphology of the *Echinops* species from the Iberian peninsula, and Tomšović (1997) proposed some taxonomical rearrangements on the base of pollen grain characters, that were subsequently refuted (Garnatje et al., 2005; Sánchez-Jiménez et al., 2010). Finally, the most exhaustive survey of *Echinops* pollen was made by Garnatje & Martín (2007), who described and analyzed the pollen characteristics of 13 species within a systematic and evolutionary framework. *Echinops* includes very large pollen grains, with polar length up to 105 μm (Erdtman, 1952), that, according to Garnatje & Martín (2007), distribute in two types corresponding to annual and perennial species. The perennial pollen type is significantly larger than the annual one, with a prominent bridge-shaped intercolpia, which is absent in the annual pollen type. So far, pollen data are too scarce to allow addressing the question of the systematic value of pollen type within the genus, although a possible configuration would be the annual type distributed in a basal grade of *Echinops* phylogeny and the perennial type more derived (Sánchez-Jiménez et al., 2010).

This work aims to provide a more comprehensive understanding of pollen morphology evolution within the genus *Echinops* and evaluating the suitability of pollen characters as taxonomic markers.

MATERIAL AND METHODS

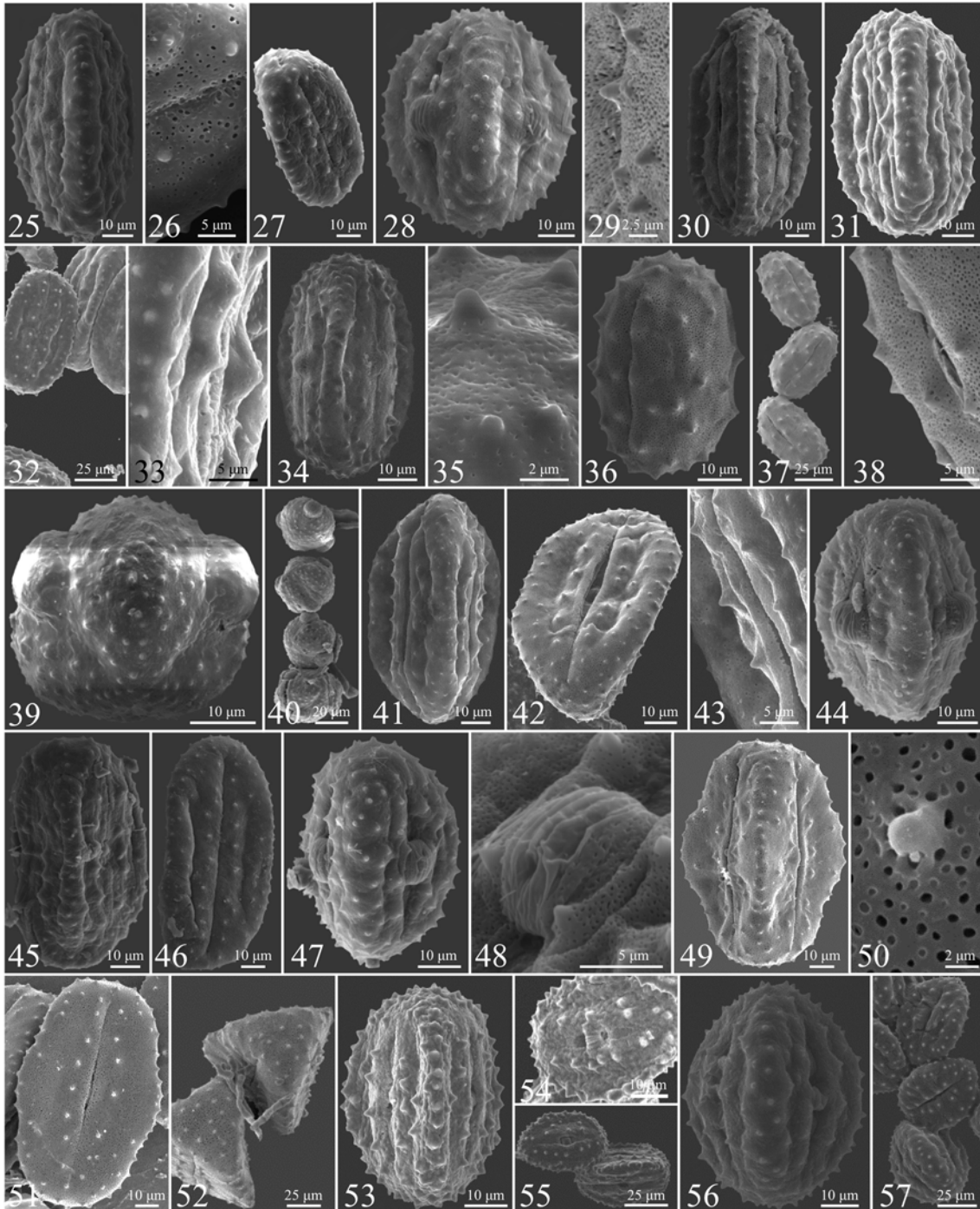
Pollen material was obtained from dried herbarium specimens for 26 species (Appendix), 22 of them observed by both light microscopy (LM) and scanning electron microscopy (SEM). Analyses were carried out using new and previously published data. Sampling covers the nine *Echinops* sections whose circumscription was recently verified and redefined by Sánchez-Jiménez et al. [2010; sections *Acantholepis* (Less.) Jaub. & Spach, *Chamaechinops* Bunge, *Echinops*, *Hamolepis* R.E.Fr., *Hololeuce* Rech.f., *Oligolepis* Bunge, *Phaeochaete* Bunge, *Psectra* Endl. and *Ritropsis* Greuter & Rech.f.], along with one representative of the sect. *Cenchrolepis* Hochst. (*E. hispidus* Fresen). The tropical African species *E. eryngiifolius* O.Hoffm. and *E. gracilis* O.Hoffm., whose classification remains doubtful, were not attributed to any of the *Echinops* sections for the analyses.

For LM, pollen was acetolysed following the micromethod described by Avetissian (1950), mounted on glycerogelatine and sealed with nail polish. Pollen



Figures 1-24. Pollen grains of some of the taxa studied at scanning electron microscopy (SEM). **1-3** *Echinops albicaulis*, **4-7** *E. bannaticus*, **8-9** *E. cephalotes*, **10-11** *E. cornigerus*, **12-13** *E. elbursensis*, **14-15** *E. emiliae*, **16** *E. eryngiifolius*, **17-18** *E. exaltatus*, **19-21** *E. fontqueri* [2], **22-23** *E. Freitagii*, **24** *E. gmelini*.

plates were photographed with a digital camera (Zeiss AxioCamHRm) mounted on a Zeiss Axioplan microscope, and images were analyzed with AxioVision LE version 4.8.2. Depending on the specimen, 7-50 fully developed grains were measured (Table 2). The parameters considered were polar (P) and equatorial (E) diameters, shape (P/E ratio), and volume. Since in most of species the polar



Figures 25-57. Pollen grains of some of the taxa studied at scanning electron microscopy (SEM). **25-27** *Echinops gracilis*, **28-30** *E. graecus*, **31-33** *E. griffithianus*, **34-35** *E. hoehnelii*, **36-38** *E. hololeucus*, **39-40** *E. humilis*, **41-43** *E. hystricoides*, **44** *E. latifolius*, **45-46** *E. longifolius*, **47-48** *E. przewalskyi*, **49-52** *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus*, **53-55** *E. talassicus*, **56-57** *E. transcaucasicus*.

view of pollen grains shows an equilateral triangle, E diameter was actually the side length.

For SEM observations, we followed the procedure of Halbritter (1998), slightly modified. Pollen grains from herbarium vouchers were rehydrated by placing the

anthers into an Eppendorf tube filled with pure water, and further dehydrated in acidified 2,2-dimethoxypropane (a drop of 0.2 M HCl added to 30 ml DMP) overnight. Anther tissues were subsequently removed and the tube centrifuged before eliminating the DMP. Pollen grains were critical point dried in CO₂, using ethanol as intermediate fluid, further mounted on stubs, sputter-coated with graphite and observed with an ESEM Quanta 200 FEI, XTE 325/D8395 at high vacuum conditions at the *Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona*. In the case of *E. elbursensis* Rech.f. and *E. transcaucasicus* Iljin, pollen grains were acetolysed as described above, gold-coated with diode sputtering and observed under a Hitachi 52300.

In order to evaluate the evolutionary trends of pollen in the whole genus, a principal component analysis (PCA) was carried out with XLSTAT 2009 (Addinsoft) using the equatorial axis length (E), polar axis length (P) and pollen shape (P/E ratio), and including present and previously published data (Table 2).

Pollen description followed the nomenclature recommendations of Punt et al. (2007) and Hesse et al. (2009).

RESULTS

Results from LM observations are presented in Table 2, and those from SEM in Figures 1-57. Figure 58 illustrates the PCA results.

Pollen in *Echinops* is heterogeneous in length and shape (Figure 58; Table 2). The polar axis (P) presents a 10-fold range, from 14.5 μm in *E. nanus* Bunge up to 145.5 μm in *E. spinosissimus* Turra subsp. *spinosissimus*. However, almost 70% of the data are fitting in the interval of 50-100 μm . Pollen grains are isopolar in shape and can be spheroidal, subprolate or prolate, with P/E ratio from 0.90 in *E. humilis* M.Bieb. to 1.62 in *E. eryngiifolius*. Pollen morphologies in *Echinops* are covering a wide set of combinations of parameters E, P, and P/E (Figure 58). P and E have the same direction, and are globally uncorrelated with the P/E parameter. However, the smallest grains tend to be spheroidal and the largest ones prolate. Exine ornamentation is overall microechinated/echinated-verrucoid and pollen walls are consistently microperforated. Variation in size and shape of pollen grain is coupled with a variation in the size, shape and density of exine ornaments (Figures 1-57).

The present results recovered the “annual” and “perennial” *Echinops* types previously described for the genus by Garnatje & Martín (2007). Furthermore, pollens of diverging morphologies neither attributable to the “annual” nor to

Taxon	P (μm) \pm sd	E (μm) \pm sd	P/E	Shape	n
<i>E. acantholepis</i> ¹	41.87 \pm 2.7	33.36 \pm 2.2	1.25	SP	-
<i>E. albicaulis</i> [1] ¹	34.66 \pm 1.8	32.66 \pm 5.5	1.06	Sph	-
<i>E. albicaulis</i> [2]	88.80 \pm 7.3	72.99 \pm 6.1	1.22	SP	15
<i>E. amplexicaulis</i>	80.21 \pm 6.3	51.95 \pm 4.7	1.55	P	13
<i>E. bannaticus</i>	72.12 \pm 4.8	55.22 \pm 4.0	1.31	SP	23
<i>E. cephalotes</i>	78.77 \pm 3.5	63.63 \pm 4.6	1.24	SP	50
<i>E. cornigerus</i>	99.62 \pm 5.8	71.50 \pm 5.2	1.40	P	39
<i>E. dumanii</i> ²	84.81 \pm 3.5	53.25 \pm 2.8	1.59	P	-
<i>E. echinatus</i>	76.45 \pm 4.5	61.43 \pm 3.7	1.25	SP	46
<i>E. emiliae</i>	61.21 \pm 4.3	57.07 \pm 4.5	1.07	Sph	44
<i>E. eryngiifolius</i>	103.80 \pm 5.9	64.28 \pm 5.6	1.62	P	35
<i>E. exaltatus</i>	66.89 \pm 5.4	55.75 \pm 5.6	1.20	SP	50
<i>E. fontqueri</i> [1] ¹	82.88 \pm 8.0	56.44 \pm 7.4	1.46	P	-
<i>E. fontqueri</i> [2]	103.70 \pm 3.5	74.98 \pm 2.8	1.38	P	15
<i>E. freitagii</i>	55.14 \pm 2.1	44.13 \pm 3.5	1.26	SP	40
<i>E. gmelini</i>	41.91 \pm 3.7	36.36 \pm 2.9	1.15	SP	7
<i>E. gracilis</i>	67.69 \pm 6.1	50.71 \pm 5.9	1.34	P	48
<i>E. graecus</i>	67.01 \pm 3.7	61.77 \pm 3.6	1.09	Sph	27
<i>E. griffithianus</i>	103.3 \pm 3.6	76.70 \pm 4.3	1.35	P	42
<i>E. hispidus</i> ¹	75.30 \pm 4.4	57.44 \pm 3.7	1.31	SP	-
<i>E. hoehnelii</i>	80.65 \pm 4.1	51.19 \pm 4.1	1.58	P	45
<i>E. hololeucus</i>	58.14 \pm 3.7	46.49 \pm 3.2	1.25	SP	37
<i>E. humilis</i>	33.67 \pm 1.1	37.49 \pm 1.0	0.90	Sph	47
<i>E. hystrichoides</i>	101.10 \pm 7.3	70.84 \pm 6.1	1.43	P	21
<i>E. latifolius</i>	64.01 \pm 3.7	46.10 \pm 3.2	1.39	P	47
<i>E. longifolius</i>	78.15 \pm 4.7	48.23 \pm 6.9	1.62	P	16
<i>E. microcephalus</i> ¹	51.48 \pm 5.3	39.05 \pm 6.9	1.31	SP	15
<i>E. nanus</i> ¹	14.50 \pm 0.9	12.75 \pm 1.0	1.13	Sph	-
<i>E. obliquilobus</i> ¹	54.44 \pm 3.5	43.10 \pm 2.8	1.26	SP	-
<i>E. ossicus</i> ¹	64.71 \pm 5.8	51.43 \pm 3.6	1.25	SP	-
<i>E. przewalskyi</i>	68.82 \pm 2.7	51.21 \pm 3.5	1.35	P	43
<i>E. ritro</i> ¹	52.21 \pm 4.3	41.80 \pm 3.6	1.24	SP	-
<i>E. sphaerocephalus</i> ¹	55.10 \pm 2.5	39.10 \pm 2.2	1.40	P	15
<i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>spinosissimus</i>	145.50 \pm 4.1	106.30 \pm 4.1	1.37	P	39
<i>E. strigosus</i> ¹	34.55 \pm 1.9	31.77 \pm 2.4	1.08	Sph	-
<i>E. talassicus</i>	76.24 \pm 3.7	58.64 \pm 4.3	1.30	SP	32

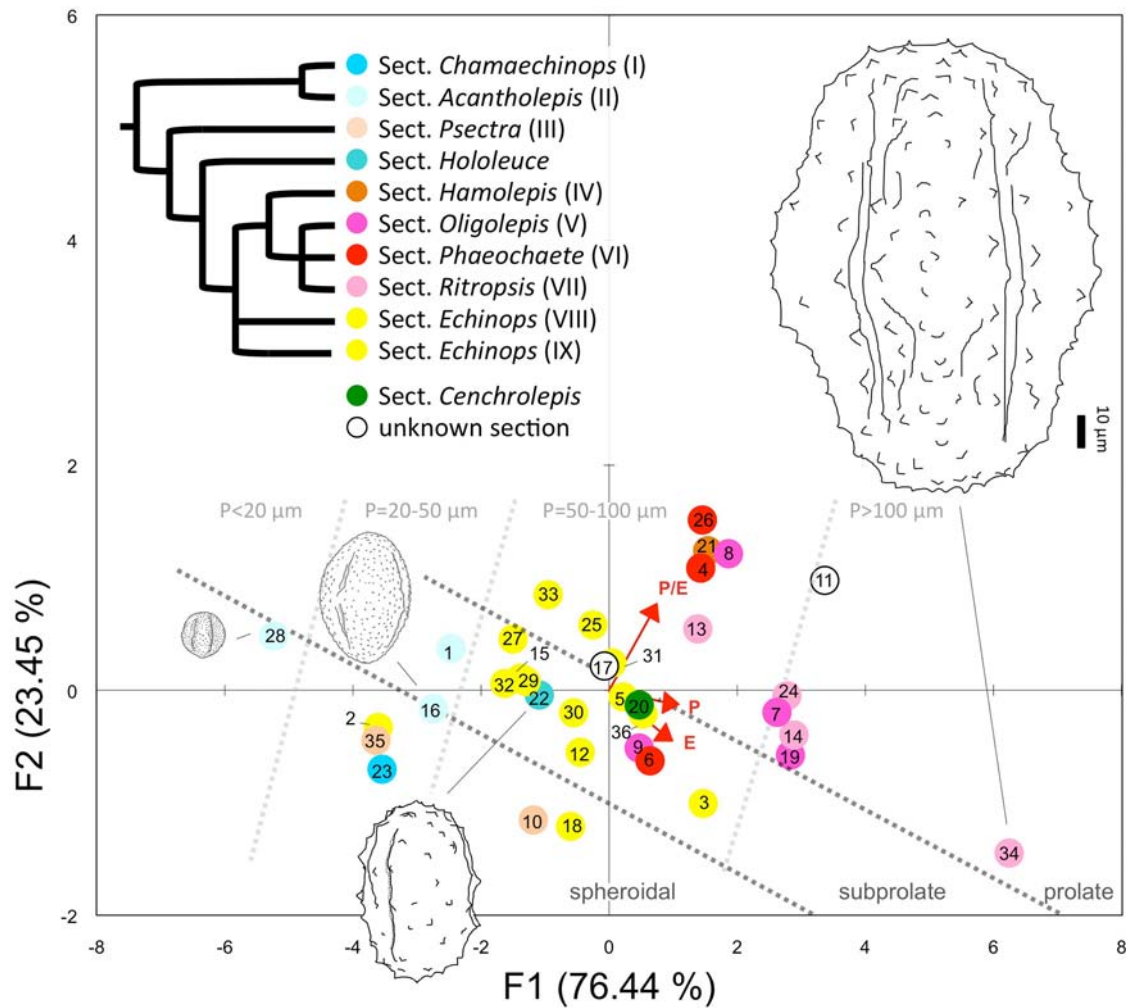
Table 2. Pollen size and shape for *Echinops* species. E: equatorial axis, P: polar axis, Sph: spheroidal (P/E from 0.88 to 1.14), SP: subprolate (P/E from 1.14 to 1.33), P: prolate (P/E from 1.33 to 2), n: number of pollen grains measured. 1 from Garnatje & Martín (2007), 2 from Vural et al. (2010).

“perennial” types were described into two new types: “echinate-annual” and “*Hololeucus*” (Table 3).

DISCUSSION

Pollen morphologies of *Echinops* are displaying an unexpected richness. The outstanding range of pollen sizes within the genus largely accounts for such diversity, from amongst the smallest (e.g. *E. nanus*) up to the largest (e.g. *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus*) in the Asteraceae family.

The distribution of pollen types across the infrageneric classification shows the *Echinops* sections to present a single type, with very few exceptions (Table 3). One exception is sect. *Psectra*, which has two different pollen types, the annual (*E. strigosus* L.) and the echinate-annual (*E. elbursensis* and *E. emiliae* O.Schwarz ex P.H.Davis). The other is sect. *Echinops*, whose clade VIII presents the perennial type except *E. albicaulis* Kar. & Kir., with an echinate-annual pollen. The annual and the echinate-annual types characterize the earliest branched groups of *Echinops* phylogeny, corresponding to sect. *Acantholepis*, *Chamaechinops* and *Psectra*, whereas the perennial type is exclusive to sections *Echinops*, *Hamolepis*, *Oligolepis*, *Phaeochaete* and *Ritropsis* (Figure 58). The monotypic section *Hololeuce*, which is the sister group of those sections with perennial pollen types, exhibits a pollen intermediary between the annual and perennial types (Table 3). Taken together, the configuration of pollen distribution throughout *Echinops* phylogeny suggests that the primitive pollen type is likely the annual and that perennial type is derived. This result is consistent with earlier conclusion of Dimon (1971), who interpreted the extreme reduction of spines, the complicated distal part of columellae and the presence of microperforations of *E. spinosissimus* subsp. *spinosus* Greuter pollen as derived features. These three exine traits might represent structural changes required to maintain the harmomegathic efficiency (the capacity of the pollen to accommodate volumetric changes during hydration and desiccation) when increasing pollen size. Accordingly, Lee (1990) reported a positive relation between pollen size and exine thickness. Whether the huge pollen size increase observed in the perennial type is an adaptive response to ecological and/or reproductive factors remains to be investigated. The “extreme reduction of spines” reported by Dimon (1971) for *E. spinosissimus* subsp. *spinosus* is a little controversial. Indeed, the absolute length of spines in this species may exceed 1 μm , although they are very small in relation to the whole pollen size. To a certain extent, the *Echinops* perennial type might belong to the category of spineless pollen, perfectly illustrated by the *Echinops* annual type, and which constitutes a minority in Asteraceae (e.g. 22% of the Asteraceae in Pakistan; Meo, 2005). Spineless pollen tends to be especially well represented in annual lineages (e.g. within Centaureinae, Hidalgo et al., 2008),



Figures 58. Bidimensional dispersion graph obtained with the first two principal component scores (explaining 99.89% of the observed variability) and built with the following variables: equatorial axis length (E), polar axis length (P), pollen shape (P/E ratio). Arrows depict the magnitude and sign of each variable. Circumscription of Echinops sections and phylogenetic frame were the established by Sánchez-Jiménez et al. (2010). 1: *E. acantholepis*, 2: *E. albicaulis* [1], 3: *E. albicaulis* [2], 4: *E. amplexicaulis*, 5: *E. bannaticus*, 6: *E. cephalotes*, 7: *E. cornigerus*, 8: *E. dumanii*, 9: *E. echinatus*, 10: *E. emiliae*, 11: *E. eryngiifolius*, 12: *E. exaltatus*, 13: *E. fontqueri* [1], 14: *E. fontqueri* [2], 15: *E. freitagii*, 16: *E. gmelini*, 17: *E. gracilis*, 18: *E. graecus*, 19: *E. griffithianus*, 20: *E. hispidus*, 21: *E. hoehnelii*, 22: *E. hololeucus*, 23: *E. humilis*, 24: *E. hystrichoides*, 25: *E. latifolius*, 26: *E. longifolius*, 27: *E. microcephalus*, 28: *E. nanus*, 29: *E. obliquilobus*, 30: *E. ossicus*, 31: *E. przewalskyi*, 32: *E. ritro*, 33: *E. sphaerocephalus*, 34: *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus*, 35: *E. strigosus*, 36: *E. talassicus*.

which is verified once more in the present study. Indeed, the stronger reduction of spines is observed in the annual (sect. *Acantholepis*) and the biennial *Echinops* species, i.e. those from sect. *Chamaechinops* and *E. strigosus*.

Phylogenetic relationships of Echinopsinae with other Cardueae subtribes are still unresolved (Susanna et al., 2006), which impedes an accurate inference of

Echinops pollen type

Annual

Pollen grains small or medium ($P < 50 \mu\text{m}$), spheroidal to subprolate. Exine ornamentation microechinated with suprategal pointed elements from 0.10 to 0.15 μm , which are regularly distributed (Garnatje & Martín, 2007). Circular section in polar view.

Taxa included in this type:

- Sect. *Acantholepis*: *E. acantholepis*², *E. gmelini*⁵, *E. nanus*²
 Sect. *Chamaechinops*: *E. fastigiatus*^{*}, *E. humilis*⁵, *E. integrifolius*^{*}
 Sect. *Psectra*: *E. strigosus*²

Echinate-annual

Pollen grains medium or large ($20 < P < 100 \mu\text{m}$), resembling to annual type but with ornamentation large echinated-verrucated.

Taxa included in this type:

- Sect. *Echinops* clade VIII: *E. albicaulis*^{2,5}
 Sect. *Psectra*: *E. elbursensis*⁵, *E. emiliae*⁵

Hololeucus

Pollen grains of medium size (P around 60 μm), subprolate in shape. Exine ornamentation sparsely verrucoid. Circular section in polar view.

Taxon included in this type:

- Sect. *Hololeuce*: *E. hololeucus*⁵

Perennial

Pollen grains large or very large ($P > 50 \mu\text{m}$), subprolate to prolate shape, in few cases spheroidal (*E. graecus*, *E. transcaucasicus*). Exine ornamentation microechinated/echinated-verrucated. Intercolpal zone raised, producing a pronounced bridge. Triangular section in polar view (Garnatje & Martín, 2007).

Taxa included in this type:

- Sect. *Cenchrolepis*: *E. giganteus*², *E. hispidus*²
 Sect. *Echinops* clade VIII: *E. bannaticus*⁵, *E. exaltatus*⁵, *E. freitagii*⁵, *E. graecus*⁵, *E. latifolius*⁵, *E. microcephalus*², *E. obliquilobus*², *E. ossicus*², *E. przewalskyi*⁵, *E. ritro*², *E. sphaerocephalus*², *E. talassicus*⁵
 Sect. *Echinops* clade IX: *E. transcaucasicus*⁵
 Sect. *Hamolepis*: *E. hoehnelii*⁵
 Sect. *Oligolepis*: *E. cornigerus*⁵, *E. dumanii*⁴, *E. echinatus*⁵, *E. griffithianus*⁵, *E. phaeocephalus*⁴
 Sect. *Phaeochaete*: *E. amplexicaulis*⁵, *E. cephalotes*⁵, *E. longifolius*⁵, *E. mildbraedii*²
 Sect. *Ritropsis*: *E. fontqueri*^{2,5}, *E. spinosissimus*⁵, *E. hystrichoides*⁵, *E. macrophyllus*⁵
 Unknown or doubtful sect.: *E. chlorophyllus*^{1**}, *E. eryngiifolius*⁵, *E. gracilis*⁵, *E. robustus*^{1**}

Table 3. Pollen types found in *Echinops* from ¹ Ikuse (1962), ² Garnatje & Martín (2007), ³ Jafari & Ghanbarian (2007), ⁴ Vural et al. (2010) and ⁵ this study. * Unpublished data. ** *E. chlorophyllus* Rech.f. and *E. robustus* Bunge have been traditionally ranged into sect. *Oligolepis*. However, a very similar species, *E. cephalotes*, was recently removed from this section and placed in sect. *Phaeochaete* (Sánchez-Jiménez et al., 2010). Pending molecular phylogenetic data for these species, we chose to let them unassigned.

pollen evolution within the tribe. However, on the base of pollen features, Petit et al. (1996) suggested a strong affinity of Echinopsinae with Cardopatiinae. Their analysis based on 40 pollen traits located *E. acantholepis* Jaub. & Spach close to *Cousiniopsis atractyloides* (C.Winkl.) Nevski and grouped *Echinops ritro* L. with

Cardopatium corymbosum Pers. The most widespread pollen type in Cardueae is however the *Saussurea* type s.l., present in the earlier-diverging subtribe Carlininae (e.g. *Carlina* L.), in earlier- and late-branched genera of Carduinae (e.g. *Xeranthemum* L., *Saussurea* DC.) and in the basal genera of Centaureinae (e.g. *Serratula* L.; Punt & Hoen, 2009, and references therein). It is the best candidate as ancestral type for Cardueae. Indeed, pollen with acaveate exine and well-developed spines –such as the *Saussurea* type– has arisen early in the Asteraceae history, as indicated by the 47.5 million-year-old pollen *Mutisiapollis telleriae* Barreda and Palazzesi that shows a similar morphological profile (Tellería et al., 2010). This fossil pollen presents strong affinities with Cardueae (Tellería et al., 2010), Dicomeae and Oldenburgieae (Barreda et al., 2012), suggesting that ancestor of Carduoideae –and Cardueae– is likely to present its characteristics.

Concluding remarks - The present study suggests two main steps concerning *Echinops* pollen evolution. One is the arisen of the annual type at the base of the genus or in an ancestor shared with Cardopatiinae. The other is the formation of the perennial type in the common ancestor of sect. *Echinops*, *Hamolepis*, *Oligolepis*, *Phaeochaete* and *Ritropsis*. As a consequence, it can be concluded that the two exceptional evolutionary novelties of *Echinops* were generated at different times, the syncephalia much preceding the pollen of huge size and triangular section.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank herbaria listed in Table 2 for providing material, personal technic of “Centros Científicos y Tecnológicos” for technical support, Joan Martín and Maruxa Suárez for helpful comments and Elisa Langley, who improved the English of the manuscript. This work has been supported by DGICYT (Spanish Government; projects CGL2010-22234-C02-01/BOS and CGL2010-22234-C02-02/BOS) and the Generalitat de Catalunya (“Ajuts a grups de recerca consolidats” project 2009SGR0439). I.S.-J. benefited from a FPU predoctoral grant and O.H. benefited from a Juan de la Cierva postdoctoral contract (Ministry of Science and Innovation of the Spanish government).

REFERENCES

- APSA Members. 2007.** The Australasian Pollen and Spore Atlas V1.0. Canberra: Australian National University. <http://apsa.anu.edu.au> [accessed Oct 2012].
- Avetissian, E.M. 1950.** Simplified method of pollen preparation by acetolysis. *Bot. Zhur.* 35: 385. [in Russian]
- Barreda, D.B., Palazzesi, L., Katinas, L., Crisci, J.V., Tellería, M.C., Bremer, K., Passala, M.G., Bechis, F. & Corsolini, R. 2012.** An extinct Eocene taxon of the daisy family (Asteraceae): evolutionary, ecological and biogeographical implications. *Ann. Bot.-London* 109: 127-134.
- Blackmore, S. 1990.** Sporoderm homologies and morphogenesis in land plants, with a discussion of *Echinops sphaerocephala* (Compositae). *Pl. Syst. Evol. Suppl.* 5: 1-12.
- Buchner, R. & Weber, M. 2000 onwards.** PalDat - a palynological database: Descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Published on the Internet <http://www.paldat.org> [accessed Oct 2012].
- Chaubal, P.D. & Deodikar, G.B. 1965.** Pollen morphotypes in the family Compositae from parts of Western Ghats (India). *Palynol. Bull.* 1: 56-58.
- Chester, P.I. & Raine, J.I. 2001.** Pollen and spore keys for Quaternary deposits in the northern Pindos Mountains, Greece. *Grana* 40: 199-387.
- Dakshini, K.M.M. & Singh, P. 1973.** Contributions to the palynology of Compositae (Asteraceae). *Palynol. Bull.* 6: 99-107.
- Díez, M.J. 1987.** Asteraceae (Compositae). Pp. 332-357 in: Valdés, B., Díez, M.J. & Fernández, I. (eds.), *Atlas Polínico de Andalucía Occidental*. Sevilla: Universidad de Sevilla y Excma. Diputación de Cádiz.
- Dimon, M.T. 1971.** Problèmes généraux soulevés par l'étude pollinique de Composées méditerranéennes. *Nat. Monsp.* 22: 129-144.
- Erdtman, G. 1952.** *Pollen Morphology and Plant Taxonomy: Angiosperms (An Introduction to Palynology. I)*. Stockholm: Almqvist & Wiksell.
- Garnatje, T., Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Vilatersana, R. & Vallès, J. 2005.** A first approach to the molecular phylogeny of the genus *Echinops* L. (Asteraceae): Sectional delimitation and relationships with the genus *Acantholepis* Less. *Folia Geobot.* 40: 407-419.
- Garnatje, T. & Martín, J. 2007.** Pollen studies in the genus *Echinops* L. and *Xeranthemum* group (Asteraceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 154: 546-557.
- Halbritter, H. 1998.** Preparing living pollen material for scanning electron microscopy using 2,2-dimethoxypropane (DMP) and critical-point drying. *Biotech. Histochem.* 73: 137-143.
- Hesse, M., Halbritter, H., Zetter, R., Weber, M., Buchner, R., Frosch-Radivo, A., & Ulrich, S. 2009.** *Pollen Terminology: An Illustrated Handbook*. Wien: Springer-Verlag/Wien.
- Hidalgo, O., Susanna, A., Garcia-Jacas, N. & Martín, J. 2008.** From acaveate to caveate: evolution of pollen types in the *Rhaponticum* group (Asteraceae, Centaureinae) related to extreme conditions. *Bot. J. Linn. Soc.* 158: 499-510.
- Ikuse, M. 1962.** On pollen grains of the Compositae collected by the Kyoto University scientific expedition to the Karakoram and Hindukush 1955. *Acta Phytotax. Geobot.* 20: 112-119.
- Jafari, E. & Ghanbarian, G. 2007.** Pollen morphological studies on selected taxa of Asteraceae. *Int. J. Plant. Sci.* 2: 195-201.
- Kuprianova, L.A. & Alyoshina, L.A. 1972.** *Pollen and Spores of Plants From the Flora of European Part of USSR, vol. 1*. Leningrad: The Academy of Sciences of the USSR, The Komarov Botanical Institute.
- Lee, S.L. 1989.** Some functional aspects of angiosperm pollen. *Korean J. Pl. Tax.* 19:

289-301.

- Meo, A.A. 2005.** *Palynological Studies of Selected Genera of the Tribes of Asteraceae from Pakistan*. Islamabad: Ph.D. Thesis, Department of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University.
- Mohl, H. 1835.** Sur la structure et les formes des graines de pollen. *Ann. Sci. Nat., Bot., Ser. 2*, 3: 148-180, 220-236, 304-346.
- Nair, P.K.K. & Lawrence, R. 1985.** *Pollen morphology of Indian Compositae. Advances in Pollen-Spore Research 14*. Lucknow: Scholar Publishing House.
- Parveen, F. & Bhandari, M.M. 1981.** Pollen morphology of desert Asteraceae. *J. Palynol.* 17: 121-130.
- Perveen, A. 1999.** Contributions to the pollen morphology of the family Compositae. *Turk. J. Biol.* 23: 523-535.
- Petit, D.P., Mathez, J. & Qaid, A. 1996.** Early differentiation of Cardueae sensu lato: morphology and pollen. Pp. 79-93 in: Hind, D.J.N., Jeffrey, C., Pope & G.V. (eds.) *Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994. Vol 2*. Kew: Royal Botanic Garden.
- Pla Dalmáu, J.M. 1965.** *Polen. Estructura y Características de los Granos de Polen. Precisiones Morfológicas Sobre el Polen de Especies Recolectadas en el N.E. de España. Polinización y Aeropalinología*. Gerona: Talleres Gráficos D.C.P.
- Punt, W., Hoen, P., Blackmore, S., Nilsson, S., & Lethomas, A. 2007.** Glossary of pollen and spore terminology. *Rev. Palaeobot. Palyno.* 143: 1-81.
- Punt, W. & Hoen, P.P. 2009.** The Northwest European Pollen Flora, 70. Asteraceae-Asteroidae. *Rev. Palaeobot. Palyno.* 157: 22-183.
- Reille, M. 1995.** *Pollen et Spores d'Europe et d'Afrique du Nord. Supplement 1*. Marseille: Laboratoire de Botanique Historique et Palynologie.
- Reille, M. 1998.** *Pollen et Spores d'Europe et d'Afrique du Nord. Supplément 2*. Marseille: Laboratoire de Botanique Historique et Palynologie.
- Sánchez-Jiménez, I., Lazkov, G.A., Hidalgo, O. & Garnatje, T. 2010.** Molecular systematics of *Echinops* L. (Asteraceae, Cynareae): A phylogeny based on ITS and *trnL-trnF* sequences with emphasis on sectional delimitation. *Taxon* 59: 698-708.
- Stix, E. 1960.** Pollenmorphologische Untersuchungen an Compositen. *Grana Palyno.* 2: 41-104.
- Stix, E. 1964.** Polarisationsmikroskopische Untersuchungen am Sporoderm von *Echinops banaticus*. *Grana* 5: 289-297.
- Stix, E. 1970.** Beitrag zur Morphogenese der Pollenkörner von *Echinops banaticus*. *Grana* 10: 240-242.
- Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Hidalgo, O., Vilatersana, R. & Garnatje, T. 2006.** The Cardueae (Compositae) revisited: Insights from ITS, *trnL-trnF*, and *matK* nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 93: 150-171.
- Tellería, M.C., Barreda, V., Palazzesi, L., Katinas, K. 2010.** Echininate fossil pollen of Asteraceae from the Late Oligocene of Patagonia: an assessment of its botanical affinity. *Pl. Syst. Evol.* 285: 75-81.
- Tomšovic, P. 1997.** Some palynological observations on the genus *Echinops* (Asteraceae) and their taxonomic implications. *Preslia* 69:150-171.
- Tormo, M.R. & Ubera, J.L. 1988.** Contribución a la palinología de *Echinops* L. (Compositae) en la Península Ibérica. *An. Asoc. Palin. Leng. Esp.* 4: 25-32.
- Tormo, M.R. & Ubera, J.L. 1995.** Tipos polínicos de la tribu Cardueae en la Península Ibérica. *Mg. Jard. Bot. Cord.* 2: 5-52.
- Vural, C., Biter, M.K., & Dadandi, M.Y. 2010.** A new species of *Echinops* (Asteraceae) from Turkey. *Turk. J. Bot.* 34: 513-519.
- Wodehouse, R.P. 1945.** *Hayfever Plants*. Waltham: Chronica Botanica Co.

Appendix. List of taxa and vouchers analyzed. Marked with ¹ have not been observed by SEM, whereas marked with ² do not have LM observations:

E. albicaulis Kar. & Kir.: KAZAKHSTAN: Mosoi Kulsk, between Khorlos and Peyaifiloviy, *Goloskokov*, 4.VII.1971 (GB); *E. amplexicaulis* Oliv.¹: CAMEROUN: Mayo Kelele-Sambulabo, 1120 m, *Jacques-Felix* 9083, 5.XI.1967 (YA); *E. bannaticus* Rochel ex Schrad.: MONTENEGRO: Limljani, 11 km from Vizpazar to Bar, 42°11'N 19°6'E, 470 m, *Garnatje & Sánchez-Jiménez* 14, 17.VIII.2009 (BC); *E. cephalotes* DC.: IRAN: 20 km N W of Tehran, 1550 m, *Babakanlou & Amin*, 13.VII. 1973 (W); *E. cornigerus* DC.: AFGHANISTAN: Badakhshan-Wakhan, E of Khandud, c. 9000 ft, *Grey-Wilson & Hewer* 1656, 22.VII.1971 (GB); *E. echinatus* Roxb.¹: PAKISTAN: Quetta, in parte inferiore faucium Torkhan supra Harnai, subst. calc., 900 m, 30°05'N 68°00'E, 15.V.1965 (W); *E. elbursensis* Rech.f.²: IRAN: Tehran, Karaj valley, Assemvarak, alt 2450 m. 25.VIII.1975 (W); *E. emiliae* Schwartz ex P.H.Davis: TURKEY: Antalya, 500 m from Ovacik, ca. 1900--2000 m, *Ertuğrul, Garcia-Jacas & Susanna* 2262, 30.VII.2002 (BC); *E. eryngiifolius* O.Hoffm.: RWANDA: Kibungo, Rukara, Kayonza-Nyamiyaga road, 1°52'S 30°33'E, 1600 m, *Raynal* 20690, 24.VI.1978 (B); *E. exaltatus* Schrad.: ESLOVENIA: Smrje, 5 km NE from Ilirska Bistrica, 45°36'N 14°12'E, 75 m, *Garnatje & Sánchez-Jiménez* 6, 14.VIII.2009 (BC); *E. fontqueri* Pau: MOROCCO: 20 km SE of Tanger, 100 m, *Gómiz*, 19.V.2002 (BC); *E. freitagii* Rech.f.: IRAN: Khorasan, Sharad, Ghazieh-je Tash towards Ghazieh-je Shah-Kuh, 10 Km NW of Tash (mountain), 2550 m, 1.VIII.1975 (W); *E. gmelini* Trautv.: CHINA: Inner Mongolia, Wuhai province, between Bayan Gol / Deng Gou and Wuhai, 70 km from the latter, sandy soils, *Vallès, Yan & Zhao*, 2.IX.2007 (BC); *E. gracilis* O.Hoffm.: CAMEROUN: 60 km Oso Banyo, peak of Hainare, 1744 m, *Letouzey* 8784, 5.VII.1967 (YA); *E. graecus* Mill.: GREECE: Evvoia island, 5-6 km from Kastelli to Mantoudi, 38°35'N 23°37'E, 30 m, *Garnatje & Sánchez-Jiménez* 35, 20.VIII.2009 (BC); *E. griffithianus* Boiss.: AFGHANISTAN: Kabul, Tang-e Gharu, roadside, *Jørgensen* 569, 31.V.1968 (GB); *E. hoehnelii* Schweinf.: KENYA: mount Kenya, near to Chogoria Park Gate, 2600 m, clear of Podocarpus forest, *Galbany & Arrabal*, 10.IX.2006 (BC); *E. hololeucus* Rech.f.: AFGHANISTAN, prov. Ghorat: Dolaini, Darreh Garmak, inter Qala Chanhrak (Sharak) et Naourak, 34°00'N 64°45'E, ca. 2540 m, 27.VII.1962 (W); *E. humilis* M.Bieb.: RUSSIA: Tyva Republic, Ovyurskiy, W slope Tannu-Ola range, *Tipokhina & Danilyuk*, 10.VIII.1973 (LE); *E. hystrioides* Kit Tan: YEMEN: road between Ta'izz and Ibb, 2 km S of the pass Napil as Sayyani, near the village Nadj al Ahmar, alt. 2250 m, 13°52'N 44°11'E, *Hein* 3806, 3.IV.1997 (BC); *E. latifolius* Tausch: CHINA: Inner Mongolia, Ulanqab province, Yin Shan, Da Qing Shan, 50 km N of Höhhöt, Wu Chan, 41°4'N, 111°48'E, *Liu, Cao & Vallès*, 29.VIII.2007 (BC); *E. longifolius* A.Rich.: TOGO: Aledjo-Kadara, *Ern, Hein & Pircher* 772, 21.XI.1976 (B); *E. przewalskyi* Iljin: CHINA: Inner Mongolia, Alxa province, SW slopes of Helan Shan, Tonguan, *Vallès & Zhao*, 5.IX.2007 (BC); *E. spinosissimus* Turra subsp. *spinosissimus*: GREECE: Creta., Agios Vasilios, *Rechinger* 12702, 30.VII.1973; *E. talassicus* Golosk.: KAZAKHSTAN: Shimir, Aksu-Zhabagly natural reserve, 1600 m, *Ivaschenko, Susanna* 2180 & *Vallès*, 29.VIII.2000 (BC); *E. transcaucasicus* Iljin²: ARMENIA: Sevan, Dara, from Samadagan to Kyzdarblag, *Avetisian, Arevschatian & Pogosian*, 30.VIII.1979 (W).

ANEXO

OTROS TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL

En este anexo se pretenden recoger otros productos derivados de los trabajos realizados para esta tesis. Éstos son, la presentación de una comunicación de tipo póster en un congreso internacional, y la elaboración de un artículo de revisión de los trabajos que se vienen realizando en el grupo de investigación en el cual se ha desarrollado esta tesis doctoral.

Tamaño del genoma en *Echinops* L. (Asteraceae, Cardueae) en los Balcanes occidentales: un intento de eludir el requisito del material fresco

[Genome size of *Echinops* L. (Asteraceae, Cardueae) in the west Balkans: an attempt to elude the fresh material requirement]

Ismael SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Oriane HIDALGO, Miguel Ángel CANELA, Sonja SILJAK-YAKOVLEV, Marija Edita ŠOLIC, Joan VALLÈS y Teresa GARNATJE

Presentación de un póster en el congreso XIII OPTIMA Meeting (Organization for the Phyto-Taxonomic Investigation of the Mediterranean Area), Antalya (Turquía), 2010.

GENOME SIZE OF *ECHINOPS* (ASTERACEAE, CARDUEAE) IN THE BALKANS: AN ATTEMPT TO ELUDE THE FRESH MATERIAL REQUIREMENT

Ismael SÁNCHEZ-JIMÉNEZ¹, Oriane HIDALGO², Miguel Ángel CANELA³, Sonja SILJAK-YAKOVLEV⁴, Marija Edita SOLIC⁵, Joan VALLÈS⁶, Teresa GARNATJE¹

¹Institut Botànic de Barcelona (CSIC-ICUB), Passeig del Migdia s.n., 08038 Barcelona, Catalonia, Spain ismasanchez83@gmail.com; ²Plant Development and Evolution, Department of Environmental and Plant Biology, Ohio University, 500 Porter Hall, Athens OH 45701, USA; ³Managerial Decision Sciences, IESE Business School, Universidad de Navarra, Av. Pearson 21, 08032 Barcelona, Catalonia, Spain; ⁴Ecologie, Systématique & Evolution, UMR CNRS 8079, Université Paris-Sud, Bât. 360, 91405 Orsay Cedex, France; ⁵Institute "Mountain and Sea", Franjevacki put 1, 21300 Makarska, Croatia; ⁶Laboratori de Botànica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s.n., 08028 Barcelona, Catalonia, Spain



INTRODUCTION

Echinops is a large genus comprising more than 100 species distributed in tropical Africa, the Mediterranean basin and other temperate regions of Eurasia. Seven species of this genus (with several subspecies) are present in the Balkan region.

Genome size is an important biodiversity character of great interest in ecological, taxonomical and evolutionary studies. Fresh material is generally required to estimate the genome size by flow cytometry (Suda & Trávníček, 2006), and therefore, once collected, the majority of plant species must be analyzed within a rather short time interval. This constitutes an important problem for determining the nuclear DNA amount of plants growing in remote places and/or collected during long expeditions. Chromosome number is an essential data in genome evolutionary studies. Karyological knowledge in *Echinops* is still rather poor, with chromosome number reports from less than 50 % of the taxa.

OBJECTIVES

The aims of this work are: i) to provide the first chromosome number determination for *Echinops graecus*, *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus*, and *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri*; ii) to assess the genome size from different material types, silica-gel dried and fresh tissues, with a view to test whether material collected in the field is suitable for genome size measurements when conserved in silica-gel; iii) to investigate ecological parameters that could influence the nuclear DNA amount within the group of species considered.

MATERIAL AND METHODS

We sampled 21 populations of nine taxa in the South and West of the Balkan peninsula and in three Aegean islands (Crete, Naxos and Thera). Both fresh and silica-gel dried leaves were collected, as well as achenes, when possible, but not all fresh material was in good condition once finalized the botanical expeditions. Achenes were sown and the plants grown in the Institut Botànic de Barcelona. Fig. 1 shows the provenance of all the populations investigated and Table 1 shows the type of material used for each population. *Petunia hybrida* 'PxC6' (2C=2.85 pg) and *Lycopersicon esculentum* 'Roma' (2C=1.99 pg), both provided by the Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette (France), were used as internal standards. The methods followed for DNA content measurement by flow cytometry and the chromosome counts are described in Garnatje et al. (2004a) and Sánchez-Jiménez et al. (2009), respectively. Statistical non parametrical analyses were performed by Stata v.10.



Fig. 1. A) Location of the populations studied. The taxon represented by each capital letter is shown in the Table 1. B) *E. spinosissimus* subsp. *bithynicus* (population N, Thera, Greece). C) *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus* (population F, Macedonia)

Populations and taxa	Type of material	2n	2C±SD (pg)	Latitude (°N)	Altitude (m)
A) <i>E. nitro</i> subsp. <i>ruthenicus</i>	SG	32*	7.97±0.07	43.282	1,165
B) <i>E. nitro</i> subsp. <i>ruthenicus</i>	FR, FC	32*	7.74±0.10; 7.97±0.10	43.288	1,230
C) <i>E. nitro</i> subsp. <i>nitro</i>	FC	32*	8.07±0.13	43.262	600
D) <i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>neumayeri</i>	SG, FC	28*	7.04±0.37; 6.75±0.39	42.620	75
E) <i>E. bannaticus</i>	FR	30*	8.92±0.36	42.183	470
F) <i>E. sphaerocephalus</i> subsp. <i>albidus</i>	SG, FC	ca. 34*	8.06±0.39; 8.84±0.17	41.382	750
G) <i>E. sphaerocephalus</i> subsp. <i>albidus</i>	FR	ca. 34*	8.59±0.27	40.156	745
H) <i>E. sphaerocephalus</i> subsp. <i>sphaerocephalus</i>	FC	30*	9.05±0.02	38.581	1,410
I) <i>E. graecus</i>	SG, FC	32*	7.97±0.31; 8.45±0.71	38.581	30
J) <i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>spinosissimus</i>	FC	28*	6.72±0.09	37.115	25
K) <i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>spinosissimus</i>	FR, FC	28*	6.81±0.19; 6.62±0.14	37.187	100
L) <i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>spinosissimus</i>	FR	28*	6.56±0.04	37.052	200
M) <i>E. graecus</i>	FR, FC	32*	8.20±0.45; 8.46±0.14	37.052	200
N) <i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>bithynicus</i>	SG, FR, FC	28*	8.82±1.51; 6.48±0.07; 6.56±0.18	36.463	40
O) <i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>spinosissimus</i>	FC	28*	6.56±0.14	36.359	75
P) <i>E. nitro</i> subsp. <i>ruthenicus</i>	FR	32*	7.82±0.06	38.029	1,265
Q) <i>E. nitro</i> subsp. <i>ruthenicus</i>	SG, FR	32*	6.99±0.87; 7.87±0.23	37.935	1,685
R) <i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>neumayeri</i>	FC	28*	6.71±0.13	39.289	175
S) <i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>bithynicus</i>	FR	28*	6.69±0.32	35.195	850
T) <i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>bithynicus</i>	FC	28*	6.61±0.19	35.053	100
U) <i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>bithynicus</i>	FC	28*	6.62±0.18	35.053	100

Table 1. Type of material: silica-gel dried (SG), fresh collected (FR) and fresh cultivated (FC) leaves. Chromosome numbers come from: *Garnatje et al., 2004b and references therein; †Sird & Franzen, 1981; ‡Rostovtseva 1979. Chromosome numbers in populations marked with * have been counted for this work

Taxon	Silica Gel		Collected		Cultivated	
	Obs.	Mean 2C	Obs.	Mean 2C	Obs.	Mean 2C
<i>E. bannaticus</i>	—	—	4	8.93	—	—
<i>E. graecus</i>	15	7.97	2	8.2	8	8.45
<i>E. nitro</i> subsp. <i>ruthenicus</i>	10	7.48	6	7.81	5	7.97
<i>E. sphaerocephalus</i> subsp. <i>albidus</i>	14	8.06	3	8.59	4	8.85
<i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>bithynicus</i>	2	8.82	9	6.6	15	6.6
<i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>spinosissimus</i>	—	—	7	6.74	15	6.62
<i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>neumayeri</i>	7	7.04	—	—	14	6.73
K-W test	p < 0.001		p < 0.001		p < 0.001	

Table 2. Kruskal-Wallis equality of populations ranks test and 2C value means per taxa for each material type (Obs. = number of observations).

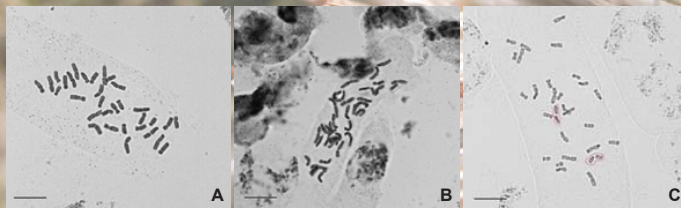


Fig. 2. Somatic metaphases: A) *Echinops graecus* (2n=32); B) *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus* (2n=ca. 34); C) *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri* (2n=28). Chromosomes with centromeric fragility are marked. Scale bars = 10 µm.

RESULTS AND DISCUSSION

This work provides the first genome size reports for 21 populations of nine taxa, and the first chromosome number determination for *Echinops graecus* (2n=32), *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus* (2n=ca. 34) and *E. spinosissimus* subsp. *neumayeri* (2n=28) (Fig. 2). Although we have not still pictured any plate where chromosome number of *E. sphaerocephalus* subsp. *albidus* remains undoubted, is clearly higher than chromosome numbers observed in other infraspecific taxa of *E. sphaerocephalus* (Garnatje et al., 2004b, and references therein). Dysploidy in *Echinops* is relatively common and further studies concerning FISH and other cytogenetic methods would be of great interest to elucidate chromosome evolution in the genus. Statistical analysis shows that each taxon is characterized by its own DNA amount, regardless of the type of material considered (Table 2). Although some of the analyses have been done with very few samples, some interesting results can be noted. Considering the type of material analyzed with different material conservation methods, there are statistically significant differences between genome size assessments obtained for each one (Tables 3-4). The differences are significant if considering three categories (fresh collected, fresh cultivated and silica-gel dried leaves) or only two (grouping the fresh material). In this sense, it seems that silica-gel dried material gives 2C values not comparable to those obtained from fresh leaves. Actually, there is no clear tendency for the DNA amount variation, with in some cases genome size assessments higher for silica-gel dried material, and in others, lower. Differences between coefficients of variation are not significant in all cases. Anyway, coefficients of variation are below three in all cases but one, showing that peaks obtained by flow cytometry are well defined and could be useful for other purposes as e.g. for addressing the polyploidy (Suda & Trávníček, 2006). Finally, for *E. nitro* subsp. *ruthenicus* there is no difference between fresh and dried material measurements. In *E. spinosissimus* subsp. *bithynicus* the difference is only significant when considering two categories, probably due to the lack of silica-gel dried leaves data.

The preparation method of the material (suspensions of nuclei for flow cytometry obtained by chopping with a razor blade or by 'bead beating', [Roberts, 2007]) and the conservation method of the standard (silica-gel dried or not) do not significantly affect genome size measurements (analyses not shown). Genome size is correlated with altitude and latitude. Notwithstanding this correlation is not linear, but quadratic with a negative coefficient. This means that genome size is higher at middle altitudes and latitudes. However, if we consider only silica-gel dried material, there is no correlation between both variables, neither quadratic nor linear. This is an additional evidence that silica-gel dried material seems to be not suitable to provide DNA amounts and to analyze them.

	<i>E. graecus</i>			<i>E. nitro</i> subsp. <i>ruthenicus</i>			<i>E. sphaerocephalus</i> subsp. <i>albidus</i>			<i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>bithynicus</i>		
	Obs.	Mean 2C	Mean CV	Obs.	Mean 2C	Mean CV	Obs.	Mean 2C	Mean CV	Obs.	Mean 2C	Mean CV
Cultivated	8	8.45	1.96	5	7.97	1.79	4	8.85	2.04	15	6.6	2.92
Collected	2	8.2	0.31	6	7.81	1.07	3	8.59	1.02	9	6.6	2.25
Silica-gel dried	15	7.97	1.74	10	7.48	1.85	14	8.06	3.61	2	8.82	0.30
K-W test	p < 0.05		p < 0.05	p > 0.95		p > 0.05	p < 0.01		p > 0.05	p > 0.05		

Table 3. Comparison of 2C values and coefficient of variation (CV) obtained by different type of material for each one of the analyzed taxa (Obs. = number of observations).

	<i>E. graecus</i>			<i>E. nitro</i> subsp. <i>ruthenicus</i>			<i>E. sphaerocephalus</i> subsp. <i>albidus</i>			<i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>bithynicus</i>			<i>E. spinosissimus</i> subsp. <i>neumayeri</i>		
	Obs.	Mean 2C	Mean CV	Obs.	Mean 2C	Mean CV	Obs.	Mean 2C	Mean CV	Obs.	Mean 2C	Mean CV	Obs.	Mean 2C	Mean CV
Fresh	10	8.40	1.63	11	7.88	1.79	7	8.73	1.60	24	6.6	2.97	14	6.74	3.01
Silica-gel dried	15	7.97	1.74	10	7.48	1.85	14	8.06	3.61	2	8.82	0.30	7	7.04	2.04
K-W test	p < 0.01		p >	p >		p >	p < 0.01		p < 0.05	p < 0.05			p < 0.05		

Table 4. Comparison of 2C values and coefficient of variation (CV) obtained by two different type of material (fresh one, considering cultivated and collected together, and silica-gel dried) for each one of the analyzed taxa (Obs. = number of observations).

LITERATURE CITED: Garnatje T, Vallès J, García S, Hidalgo O, Sanz M, Canela MA & Siljak-Yakovlev S. 2004a. Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Carduoideae): karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biol Cell* 96: 117-124; Garnatje T, Vilatersana R, Susanna A, Vallès J & Siljak-Yakovlev S. 2004b. Contribution to the karyological knowledge of *Echinops* (Asteraceae, Carduoideae) and related genera. *Bot J Linn Soc* 145: 337-344; Roberts AV. 2007. The Use of Bead Beating to Prepare Suspensions of Nuclei for Flow Cytometry from Fresh Leaves, Herbarium Leaves, Petals and Pollen. *Cytom Part A* 71A: 1039-1044; Rostovtseva TS. 1979. Chromosome numbers of some species of family Asteraceae Dumort. *Bot Zhurn* 64: 382-389; Sánchez-Jiménez I, Pellicer J, Hidalgo O, García S, Garnatje T & Vallès J. 2009. Chromosome Numbers in Three Asteraceae Tribes from Inner Mongolia (China), with Genome Size Data for Carduoideae. *Folia Geobot* 44:307-322; Sird A & Franzen R. 1981. IOPB chromosome number reports LXXIII. *Taxon* 30: 843-844; Suda J & Trávníček P. 2006. Reliable DNA Ploidy Determination in Dehydrated Tissues of Vascular Plants by DAPI Flow Cytometry — New Prospects for Plant Research. *Cytom Part A* 69A: 273-280.

We thank to Dr. K. Tan, Dr. J. Vigo and F. Pustahija for their help in collecting material, Miquel Viny for taking care of the living plants and M. Mumburú, Dr. J. Comas and Dr. R. Álvarez for their support in the flow cytometry assessments. This work was supported by MICINN- Spanish Government (projects CGL2007-64839-C02-01 and CGL2007-64839-C02-02) and GRdB (Grup de Recerca en Biodiversitat i Biosistemes vegetals, Generalitat de Catalunya, project 2009 SGR 438).

Poliploidía y otros cambios a los niveles cromosómicos y de tamaño del genoma: su papel en la sistemática y la evolución ejemplificada en algunos géneros de *Anthemideae* y *Cardueae* (*Asteraceae*).

Joan VALLÈS, Jaume PELLICER, Ismael SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Oriane HIDALGO, Daniel VITALES, Sònia GARCIA, Joan MARTÍN & Teresa GARNATJE

Taxon 61 (4): 841–851 (2012).

La poliplodía es una de las mayores fuerzas evolutivas en plantas y, particularmente, en la familia de angiospermas con mayor número de especies, *Asteraceae*. La multiplicación cromosómica impacta directamente sobre el contenido de ADN nuclear, en términos de variación a nivel holoploide y monoploide. Otros cambios cariológicos como la aneuploidía o disploidía también pueden producir variaciones en el tamaño del genoma, jugando, por tanto, un papel relevante como fuerza evolutiva. Todos estos factores pueden promover la especiación, dando lugar a implicaciones sistemáticas. En este artículo revisamos los mecanismos asociados con la variación en el tamaño del genoma, así como sus consecuencias evolutivas filogenéticas, sistemáticas e incluso taxonómicas. Para ello, se han recopilado el valor C y los números cromosómicos, que han sido complementado con otros datos citogenéticos para ser discutidos dentro de sus correspondientes marcos evolutivos. Los casos estudiados proceden de diversos géneros pertenecientes a las tribus *Anthemideae* (*Artemisia*) y *Cardueae* (*Cheirolophus*, *Echinops* y miembros del grupo *Rhaponticum*), cubriendo un amplio espectro de estrategias de vida (p.e. ciclos vitales, ecología, distribución geográfica).

Polyploidy and other changes at chromosomal level and in genome size: Its role in systematics and evolution exemplified by some genera of Anthemideae and Cardueae (Asteraceae)

Joan Vallès,¹ Jaume Pellicer,² Ismael Sánchez-Jiménez,³ Oriane Hidalgo,¹ Daniel Vitales,¹ Sònia Garcia,¹ Joan Martín¹ & Teresa Garnatje³

¹ Laboratori de Botànica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s.n., 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

² Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AB, U.K.

³ Institut Botànic de Barcelona (IBB-CSIC-ICUB), Passeig del Migdia s.n., 08038 Barcelona, Catalonia, Spain

Author for correspondence: Joan Vallès, joanvalles@ub.edu

Abstract Polyploidy is one of the major evolutionary forces in plants and in particular in the largest angiosperm family, the Asteraceae. This chromosome set multiplication directly impacts the nuclear DNA contents, in terms of variation at holoploid and monoploid levels. Other karyological changes such as aneuploidy or dysploidy might produce genome size alterations as well, therefore playing also a relevant role as evolutionary forces. All these factors may promote speciation, thus having systematic implications. In this paper we review the mechanisms associated with genome size variation, as well as their evolutionary consequences at phylogenetic, systematic and even taxonomic levels. To do so, C-values and chromosome numbers have been compiled and complemented with other molecular cytogenetic data to be discussed within their respective molecular phylogenetic frameworks. The case studies come from several genera of the Asteraceae belonging to tribes Anthemideae (*Artemisia*) and Cardueae (*Cheirolophus*, *Echinops* and members of *Rhaponticum* group), which cover a wide range of life strategies (e.g., life cycles, ecology, geographical distribution).

Keywords aneuploidy; *Artemisia*; *Cheirolophus*; Compositae; dysploidy; *Echinops*; genome size variation; polyploidy; *Rhaponticum* group

Supplementary Material Table S1 is available in the free Electronic Supplement to the online version of this article (<http://www.ingentaconnect.com/content/iapt/tax>).

■ INTRODUCTION

Amongst the mechanisms inducing chromosome number variation, polyploidy is probably the most important and certainly the most studied one. In fact, genome multiplication episodes are considered key factors in plant diversification (Jiao & al., 2011, and references therein). This phenomenon has occurred throughout the history of the vast majority (around 70%) of extant angiosperms (Masterson, 1994). Indeed, taxa with very small genomes have been claimed to be ancient polyploids (such as the putative paleohexaploid *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Blanc & al., 2003). Dysploidy and aneuploidy describe karyotype changes less frequent and less studied in plants (Siljak-Yakovlev, 1996). Dysploidy is a change (increase or decrease) of basic chromosome number usually coupled with chromosomal rearrangements, and is stable within populations and taxa, whereas aneuploidy is the loss or addition of one to a few (most frequently one or two) chromosomes to a chromosomal complement by abnormalities in cell division, and is usually unstable, even lethal, within taxa (Ehrendorfer, 1980; Rieger & al., 1982; Guerra, 2008). Other more marginal

(in terms of evolutionary significance) chromosomal change events are aneusomaty (mixoploidy), i.e., unequal chromosome numbers in the cells of one individual (Duncan, 1945), and the presence of B-chromosomes (Jones & Rees, 1982; Camacho & al., 2000; Camacho, 2005).

All these chromosome number changes impact genome size, through variation in the holoploid nuclear DNA content (the so-called C-value, see Swift, 1950 and Greilhuber & al., 2005, for accurate genome size terminology) and frequently in the monoploid value as well (Pellicer & al., 2010a, and references therein). Assessing changes that affect chromosomes and/or genome size, the mode and tempo of their occurrence across a phylogeny, and relationships with morphological, ecological and other plant traits, is a powerful tool for deciphering evolutionary histories (Favarger, 1984; Crawford, 2000; Stace, 2000; Dobigny & al., 2004; Buggs & al., 2011). Besides alterations of chromosome number, differential chromosome staining and mapping methods provide valuable insights in biosystematic issues. Intraspecific variation at the genomic level often precedes interspecific variation, which makes it crucial for the understanding of microevolutionary processes and speciation

This paper was a contribution to the XI Symposium of the International Organization of Plant Biosystematists, held in Aurangabad, India from 2 to 4 September 2010 (see Taxon 60: 298–299, 2011).

phenomena (Favarger, 1978, 1981; Siljak-Yakovlev, 1996; Crawford, 2000). For all these reasons we believe that cytotoxic and cytobiogeographic approaches are invaluable for evolutionary studies (Stebbins, 1971; Stace, 2000; Guerra, 2008, and references therein).

The present paper is based on talks delivered at the XI IOPB congress (International Organization of Plant Biosystematists, Aurangabad, India, September 2010) on the “Evolution of plants from tropical to high mountain ecosystems” and at the XIII OPTIMA meeting (Organisation for the PhytoTaxonomic Investigation of the Mediterranean Area, Antalya, Turkey, March 2010) on “The role of Irano-Turanian elements in the evolution of Mediterranean Flora”. Following Grant (1984) in the IOPB seminal book *Plant Biosystematics* based on the symposium held in Montréal in 1983, we here emphasize the importance of cytogenetics as one of the sustaining pillars of biosystematic studies. We focused on several representatives of the Asteraceae, since this large plant group—the largest family of angiosperms—has been widely studied cytogenetically (Watanabe, 2002, 2004; Garnatje & al., 2010, 2011). The following case studies have been selected from tribes Anthemideae Cass. and Cardueae Cass. *Artemisia* L., with more than 500 species, has a Central Asian origin, and is distributed across the whole Northern Hemisphere, including some landscape-dominating species; it is closely related to a dozen small genera, many of them of unclear taxonomy (Vallès & al., 2011). *Echinops* L. comprises more than 100 species distributed in tropical Africa, the Mediterranean basin and other temperate regions of Eurasia (Sánchez-Jiménez & al., 2010). The *Rhaponticum* Vaill. group contains ca. 40 species distributed in Eurasia, Africa and Australia (Hidalgo & al., 2006). Finally, *Cheirolophus* Cass. includes around 20 western Mediterranean and Macaronesian species (Garnatje & al., 2007).

■ POLYPLOIDY

Polyploidy, present in all the major clades of the Asteraceae, has been reported for ca. 570 genera of the family (58.3% of the 978 genera with chromosome counts), and an astonishing range of ploidy levels, from $2x$ to $48x$, has been found (Semple & Watanabe, 2009).

Particularly *Artemisia* is a karyologically rather well-known genus. With 1400 chromosome counts, it is 12th in the family ranking (Semple & Watanabe, 2009). Of the species counted, 44% are exclusively diploid, 30% exclusively polyploid, and approximately 26% are known to be both diploid and polyploid (Pellicer & al., 2010a, and references therein). This means that more than 50% of the species show polyploidy. To date, 42 different chromosome numbers have been reported for the genus (see Fig. 1; Table S1 in the Electronic Supplement for tribe Artemisiinae). Categorized by base chromosome number, we find taxa from $2x$ to $16x$ —one single report, $2n = 144$, in *Artemisia medioxima* Krasch. (Pellicer & al., 2007)—for $x = 9$ and from $2x$ to $6x$ for $x = 8$. Within these ranges, every even ploidy level has been documented with the exception of $14x$, whereas odd levels have rarely been reported (and only $3x$, $5x$ and $7x$).

Polyploidy is highly prevalent in some species, such as *Artemisia dracunculoides* L., with ploidy levels ranging up to $10x$, including $3x$, which is uncommon in the genus (Kreitschitz & Vallès, 2003; Eisenman & Struwe, 2011, and references therein). Much more frequent are polyploid series involving three levels, such as those of the North American endemics *A. arbuscula* Nutt., *A. cana* Pursh and *A. rothrockii* A. Gray (McArthur & Sanderson, 1999) and the *A. vulgaris* L. complex (Vallès, 1987; James & al., 2000). Polyploidy appears also in taxa that are basically diploid: in *A. absinthium* L. 70 diploid chromosome counts ($2n = 18$) are available and one polyploid ($2n = 4x = 36$) record exists (Watanabe, 2002; Kreitschitz & Vallès, 2003). This exceptional tetraploid population may represent the starting point of an evolutionary differentiation in this species. Findings such as these strongly demonstrate the need for extensive chromosome counts as a general procedure, even in taxa considered well-known, in which new cytotypes can still be detected (e.g., *Melampodium* L.; Stuessy & al., 2004).

All *Artemisia* subgenera have undergone polyploidy, and several of the closely related genera also contain polyploids (Vallès & al., 2005; Garcia & al., 2006a; Sánchez-Jiménez & al., 2009), some of which have been re-included in *Artemisia* (*Mausolea* Poljakov, *Neopallasia* Poljakov and *Turaniphytum* Poljakov of subgenus *Dracunculoides* (Besser) Rydb.). However, other segregate genera are still recognized on the basis of molecular studies (such as *Ajanía* Poljakov, *Hippolytia* Poljakov and *Leucanthemella* Tzvelev; Sanz & al., 2008, and references therein). Polyploid representatives of the genus are scattered throughout its phylogeny, and do not form strictly polyploid lineages, thus confirming that genome duplications have arisen in independent episodes (Sánchez-Jiménez & al., 2009).

While some of these closely related genera such as *Artemisiella* Ghafoor (1 sp.), *Brachanthemum* DC. (10 spp.) and *Nipponanthemum* (Kitam.) Kitam. (1 sp.), among others, have $2n = 18$ as the only chromosome number (Watanabe, 2004), others such as *Ajanía* (39 spp.), with six different chromosome numbers recorded, contain polyploid series (Fig. 1). The remaining genera of Artemisiinae with polyploid representatives reported to date exhibit large polyploid series. These are *Chrysanthemum* L. and *Dendranthema* (DC.) Des Moul. (together 37 species, sometimes merged; Oberprieler & al., 2009), with 55 and 15 different chromosome numbers known, respectively. Aneuploid numbers have been noticed within this group, possibly due to the existence of several cultivars, the relatively high frequency of mixoploidy/aneusomy, B-chromosomes and hybridisation.

In contrast to the Anthemideae discussed above, polyploidy characterizes whole genera and even subtribes of Cardueae. Its base number of $x = 10$ is considered ancestral (Semple & Watanabe, 2009), but the first-diverging genera in Cardueae have other base numbers, with $x = 9–12$ in Carliniinae Dumort., $x = (7)13–18$ in Echinopsinae (Cass.) Dumort. and $x = 18$ in Cardopatiinae Less. Such high numbers suggest a polyploidy event in the early evolution of the tribe. Barker & al. (2008) indicated a single paleopolyploidisation event predating the Cardueae. This implies that no additional polyploidisation took place between the root of Cardueae and Centaureinae (Cass.) Dumort.

Especially, a closer view at *Echinops*, with all but one species having around $2n = 30$ chromosomes, suggests an ancient polyploidisation event at the base of the genus (Sánchez-Jiménez & al., 2009). However, the single exception to this chromosome number, *E. acantholepis* Jaub. & Spach (= *Acantholepis orientalis* Less.) with $2n = 14$ chromosomes, can be interpreted differently. It can either be the only strict diploid in the genus, or $2n = 14$ may have arisen through strong descendent dispolidy, which is supported by the derived position of *E. acantholepis* within a clade of annual species (Sánchez-Jiménez & al., 2009, 2010). Annuals tend to have diverging features, including reduced chromosome numbers (e.g., within Cardueae, *Oligochaeta divaricata* (Fisch. & C.A. Mey.) K. Koch, Hidalgo & al., 2007, 2008; *Xeranthemum* L. group, Garnatje & al., 2004b), which is also the case in the sister species of *E. acantholepis*, *E. gmelinii* Turcz., that has the second lowest chromosome number of the genus, $2n = 26$ (Sánchez-Jiménez & al., 2009, 2010).

Polyploidy also is an important evolutionary mechanism in other Cardueae genera, with ploidy levels ranging from $4x$ to $7x$ ($2n = 112$ – 114 in *Cirsium quercetorum* Jeps.), $9x$ ($2n = 80$ in *Carduus pycnocephalus* L.), $10x$ to $11x$ ($2n = 110$ in

Centaurea kunkelii N. Garcia), $11x$ ($2n = 110$ in *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr.). The most important genera in terms of species number such as *Centaurea* L. and *Cirsium* Mill. (both with ca. 250 species) display frequent polyploidy, as does to a lesser extent *Cousinia* Cass. (600–700 species; Watanabe, 2002, 2004). Polyploid series span two ploidy levels, less frequently three (e.g., *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. $x = 17$ [$2x$, $4x$, $6x$]; *Carthamus lanatus* L. $x = 11$ [$4x$, $5x$, $6x$]), four (e.g., *Centaurea toletana* Boiss. & Reut. $x = 10$ [$2x$, $4x$, $5x$, $6x$]), or even six (e.g., *Carduus pycnocephalus* $x = 9$ [$2x$, $3x$, $4x$, $6x$, $7x$, $9x$]) (Watanabe, 2002, 2004).

Soltis & Soltis (1999) hypothesised that polyploidy is followed by a period of transience similar to what Templeton (1980) proposed for diploid speciation, during which the genome is more amenable to change. Polyploidy is related to different biological parameters, of which ecological adaptation is particularly relevant for evolutionary processes. Polyploid taxa apparently have new evolutionary potential, allowing them to colonise new habitats and consequently expand geographically (Stebbins, 1971; Levin, 1983; Stuessy & al., 2004; Pellicer & al., 2010a, b, and references therein).

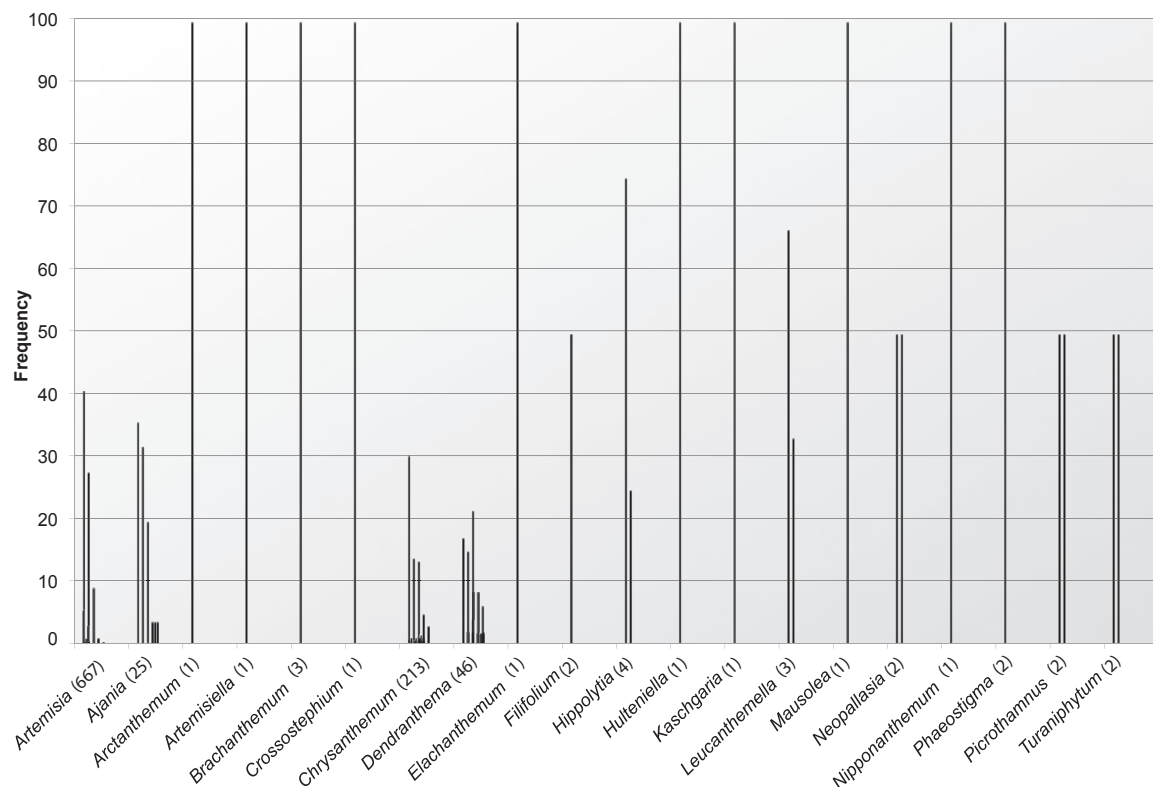


Fig. 1. Frequency plot of chromosome numbers in the genera of subtribe Artemisiinae. For every genus, each bar represents a published chromosome number, and its height represents the frequency (%) of this count in that genus (i.e., genera with one known chromosome count have a single bar of maximum height, 100). The numbers of observations are in brackets behind genus names. Data extracted from the Index to Chromosome Numbers in Asteraceae (Watanabe, 2002; http://www.lib.kobe-u.ac.jp/infolib/meta_pub/G0000003asteraceae_e, accessed 4–7 Oct. 2011) and other available literature. Data for hybrids, cultivars or breeding lines have been excluded. A summary of the numerical data can be found in Table S1 (Electronic Supplement).

■ DYSPLOIDY (WITH ANEUPLOIDY AND ANEUSOMATY CASES)

Dysploidy is another powerful evolutionary mechanism in Asteraceae, although to a much lesser extent than polyploidy. It affects 214 genera, i.e., 21.9% of the genera with chromosome counts available (Semple & Watanabe, 2009). Solbrig (1977) stated that roughly 30% of chromosome numbers known for Asteraceae species are based on $x = 9$, but that whether this base number was the ancestral one in the family would require further study. Semple & Watanabe (2009) showed that the basal clades of Asteraceae and its sister families also are based on $x = 9$, supporting Solbrig's (1977) assumption, and hypothesised that ascending dysploidy to $x = 10$ should have occurred, coupled with geographical changes. Tribes Anthemideae and Cardueae are considered to have $x = 10$ as ancestral base number, although $x = 9$ has also been postulated as base number in the former, where it is the most frequent chromosome number (Heywood & Humphries, 1977; Schweizer & Ehrendorfer, 1983).

The largely predominating base number in *Artemisia* (lacking the postulated ancestral $x = 10$) is $x = 9$, which is present in all *Artemisia* subgenera and is the only base number in the closely related genera forming subtribe Artemisiinae as well as in close subtribes, such as Handeliinae Bremer & Humphries and Tanacetinae Bremer & Humphries. The minority number $x = 8$ is restricted to subgenera *Absinthium* DC., *Artemisia* and *Dracunculus*. So, in contrast to polyploidy, dysploidy is neither present in all *Artemisia* subgenera nor in any of its closest relatives.

Kawatani & Ohno (1964) postulated descending dysploidy in *Artemisia* based only on the observation that a much larger number of taxa has the highest base number ($x = 9$) in the genus, which is in agreement with the fact that the most common direction of dysploidy in plants is descending (Siljak-Yakovlev, 1996). Vallès & Siljak-Yakovlev (1997) provided experimental evidence for this descending dysploidy. *Artemisia vulgaris*, a $2n = 16$ species ($x = 8$ -based), has a chromosome pair clearly larger than all others, with pericentromeric heterochromatin (telomeric heterochromatin is the most common situation in the genus) and with centromeric fragility, as both chromosome arms appeared quite separated in metaphase plates, probably recalling their earlier condition as independent chromosomes. These chromosomal features support the idea of descending dysploidy as a result of a centric or Robertsonian fusion, from $2n = 18$ to $2n = 16$ chromosomes, meaning a change in base number from $x = 9$ to $x = 8$. Guerra (2008) reported Robertsonian exchanges (either fission or fusion) as important causes of dysplid variation in plants. Robertsonian exchanges are common in the $x = 8$ -based *Artemisia* species, both at diploid and tetraploid levels. Taxa such as *A. granatensis* Boiss., *A. judaica* L., *A. lucentica* O. Bolòs & al., *A. reptans* C. Smith ex Link., and *A. splendens* Willd. also show them (Vallès & Garnatje, 2005; Matoba & al., 2007; Vallès & al., 2011, and references therein). The restriction of this dysplid base number to *Artemisia* and closely related genera may even be useful for taxonomic decisions. Recently, *Tanacetum paradoxum* Bornm.

has been transferred to *Artemisia* (as *A. paradoxa* (Bornm.) Sonboli) on the basis of karyological data together with morphological and molecular evidence (Sonboli & al., 2011). Concerning the chromosomal aspects, this is a $2n = 16$ taxon with a larger pair of chromosomes, clearly indicating descending dysploidy. The fact that dysploidy does not occur in *Tanacetum* L., a strictly $x = 9$ -based genus, supports the taxonomic rearrangement consistent with other data. The same applies to another *Tanacetum* species (*T. incanum* L.) that had already been transferred to *Artemisia* (*A. incana* (L.) Druce) and also has $2n = 16$ chromosomes, two of which are larger and show centromeric fragility (Torrell & al., 2001).

In addition to the two main base numbers, two more have been reported to occur in *Artemisia*. One, $x = 7$, could be a continuation of the descending dysplid series. However, this base number has only been counted in a single species, although in eight populations (*A. pattersonii* A. Gray; Wiens & Richter, 1966). The other base number, $x = 17$, is secondary, of polyploid origin, and occurs in a few taxa with $2n = 34$ chromosomes such as *A. umbelliformis* Lam. Autopolyploidisation of a $2n = 18$ ancestor (most likely *A. eriantha* Ten.) followed by the loss of two chromosomes by hypoaneuploidy, or allopolyploidy involving the mentioned $2n = 18$ species and a $2n = 16$ parent (probably *A. glacialis* L.) have been proposed as potential ways to have given rise to this cytotype (Gutermann, 1979; Ehrendorfer, 1980; Vallès & Oliva, 1990; Oliva & Vallès, 1994). The count of $2n = 34$ has also been reported for populations of *A. vulgaris*, *A. dubia* Wall. ex Besser and *A. momiyamae* Kitam. and an English taxon described as a hybrid (*A. × wurzellii* C.M. James & Stace). Besides, cases of aneusomaty/mixoploidy are not rare in *Artemisia* and other Artemisiinae, and can be found in *Chrysanthemum* and *Dendranthema*. These phenomena can be linked to vegetative reproduction (Vallès & al., 2011, and references therein), which is particularly common in genera with many cultivated species.

Dysploidy is a very frequent phenomenon in Cardueae at all taxonomic levels, and Centaureinae are especially noteworthy (Fig. 2). Dysploidy accompanies the diversification of *Echinops* and the *Rhaponticum* group, but it remains unclear whether divergent counts within *Cheirolophus* (Watanabe, 2002, 2004) are due to dysploidy or represent counting errors. In any case, the diversity in chromosome numbers among and within Cardueae tribes, genera, and even species makes it hard to disentangle the effects of polyploidy and dysploidy. For example, in *Echinops*, the difficulties in locating putative polyploidisation event(s) hamper drawing a clear picture of the contribution of dysploidy in the annual clade, which contains chromosome number variation from $x = 7$ to $x = 14$ (Sánchez-Jiménez & al., 2010). In the remaining Echinopsinae, $x = 14$, 15 and 16 are the most frequent base numbers (Fig. 2), and $x = 17$ and 18 are sporadically found (Sánchez-Jiménez & al., 2010). Dysploidy is particularly apparent in Centaureinae, and no chromosome base number(s) emerge(s) as obviously dominant (Fig. 2). Within Centaureinae, *Rhaponticum* and related genera display a descending dysplid series with three base chromosome numbers, $x = 14$, 13 and 12. These may be derived from a plesiomorphic condition of $x = 15$ based on

outgroup comparison with likely sister groups from Centaureinae (Hidalgo, 2006; Hidalgo & al., 2007). Among chromosomal restructuring, there is evidence of chromosomal fusions similar to those described in *Artemisia*. *Oligochaeta divaricata* and *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin are the only species with $2n = 24$ chromosomes, the lowest chromosome number in the group. In both, one chromosome pair is longer than the others, and displays centromeric heterochromatin and centromeric fragility implying recent chromosomal fusion (Hidalgo & al., 2007, 2008).

■ CHANGES AND EVOLUTION IN CHROMATIN TYPES AND rDNA REGIONS

Karyological variations involving changes in chromosome structure rather than in chromosome number are also relevant to plant speciation and evolution (Fukuda, 1984). Different types of heterochromatic regions, chromosome areas rich in GC or AT bases, and hybridisation of DNA probes containing repetitive elements, ribosomal DNA and other specific regions revealed by so-called chromosome painting (Sharma & Sharma, 2001), are useful for comparative genomics, providing data for detecting evolutionary mechanisms and phylogenetic affinities (Matsuda & al., 2008; Raskina & al., 2008; Liehr, 2009).

Physical mapping of certain heterochromatic regions, different base-rich fragments and rDNA loci, has been performed for many species of *Artemisia* (Vallès & al., 2011, and references therein). Most species show a common banding pattern with mostly telomeric and subtelomeric bands. This pattern is typical across tribe Anthemideae (Schweizer & Ehrendorfer,

1983; Kondo & al., 2003; Abd El-Twab & Kondo, 2006; Hoshi & al., 2006, and references therein). As expected since they are GC-rich, rRNA genes co-localize with CMA positive regions (CMA stains preferably GC-rich heterochromatin), although not all CMA-positive regions contain rRNA genes. Despite the general constancy of the physical map of Anthemideae chromosomes, there are some characters of taxonomic and phylogenetic value. The North American endemics of subgenus *Tridentatae* (Rydb.) McArthur emend. S. Garcia & al. show a basic CMA banding and FISH pattern with six bands at the diploid level, whereas those of the Old World subgenus *Seriphidium* Besser show mostly four bands (Torrell & al., 2003; Garcia & al., 2009a). This is consistent with the results of molecular phylogenetic analyses (McArthur & al., 1998a, b; Sanz & al., 2008; Garcia & al., 2011) which considered the two subgenera as independent, in contrast to evidence (Watson & al., 2002) from molecular phylogenetic data as well. Furthermore, the banding/FISH pattern supported exclusion of some North American taxa from the core of subgenus *Tridentatae* (Garcia & al., 2007), which was later confirmed by molecular data (Garcia & al., 2011).

Changes in heterochromatin and rDNA loci number with polyploidy are also interesting and may have value in evolutionary studies. To predict the evolution of the number of rDNA signals, similar to genome downsizing—a frequent finding in plants (Lim & al., 2000; Leitch & Bennett, 2004)—an “rDNA loci downsizing” with polyploidy could be expected. Weak rDNA loci signals and proportionally less sites in *A. lagoccephala* (Fischer ex Besser) DC. suggested a loss of both rDNA loci and gene copies in hexaploid populations of this taxon (Pellicer & al., 2010b). A similar situation would explain the $16x$ *A. medioxima* karyotype, containing 20 rDNA loci instead

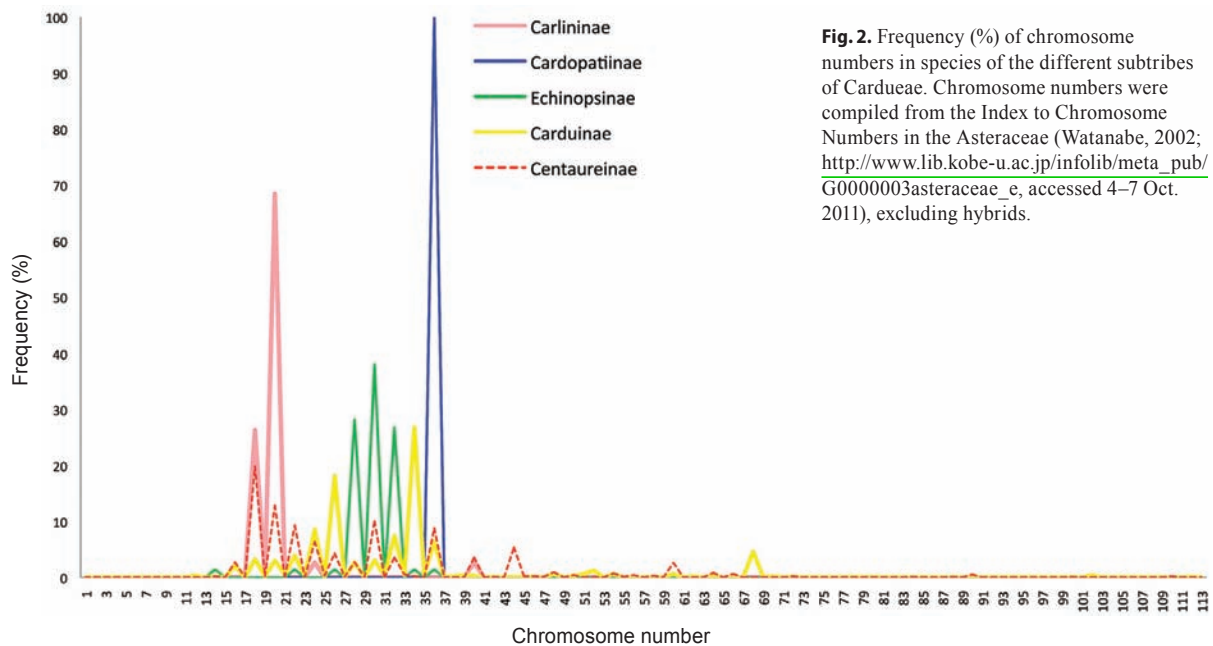


Fig. 2. Frequency (%) of chromosome numbers in species of the different subtribes of Cardueae. Chromosome numbers were compiled from the Index to Chromosome Numbers in the Asteraceae (Watanabe, 2002; http://www.lib.kobe-u.ac.jp/infolib/meta_pub/G0000003asteraceae_e, accessed 4–7 Oct. 2011), excluding hybrids.

of the 32 expected by a proportional loci increase in polyploids (Pellicer & al., 2010b). *Artemisia tridentata* Nutt. and *A. tripartita* Rydb. also show loci loss with increasing polyploidy; nevertheless, no rDNA loci loss, but an exactly additive pattern with respect to diploid progenitors was described for *Artemisia bigelovii* A. Gray and *A. nova* A. Nelson polyploids, and almost an exact addition in *A. argilosa* Beetle (García & al., 2009a). The same situation was found among the South American polyploid endemic complex of *Artemisia* (Pellicer & al., 2010c). A precise multiplication of the diploid karyotype has also been found, within the Asteraceae, in *Tragopogon* L. (Pires & al., 2004). Concerning heterochromatin only, the third possible scenario has also been reported, i.e., an increase of heterochromatic sites in polyploids with respect to diploids, as detected in *A. argilosa* (García & al., 2007) and more abundantly in *A. lagocephala*, from two DAPI sites at $2x$ to 78 in the $6x$ cytotype (Pellicer & al., 2010b).

Changes in chromosome structure also provide valuable information on the evolution at different taxonomic levels within the Cardueae. Some of the evolutionary patterns of differentiation of chromatin and DNA regions in Anthemideae discussed above also appear in Cardueae. This is the case in *Xeranthemum*, where Garnatje & al. (2004b) reported the loss of rDNA loci in polyploid congeners. In *X. longipapposum* Fish. & C.A. Mey. and *X. inapertum* (L.) Mill. the authors suggested a mechanism of amphiplasty by which the activity of the missing rDNA locus was silenced, lost or suppressed during the genome duplication process.

Four patterns of rDNA loci evolution are found in *Rhaponticum* and allied genera with a descending dysploid series with three basic chromosome numbers (Hidalgo, 2006). *Myopordon* Boiss. species have a characteristic CMA and DAPI telomeric banding pattern differing strongly from that of other representatives of the *Rhaponticum* group (Hidalgo & al., 2008). This unusual pattern is correlated with extreme, high-mountain environmental conditions where the species occur. The FISH pattern of *Oligochaeta divaricata* contrasts with that of *Callicephalus* C.A. Mey., *Myopordon* and *Rhaponticum* species by a much higher number of 18S-5.8S-26S (hereafter abbreviated as 35S) sites. In *Oligochaeta*, a switch in life cycle, breeding system, and environmental conditions probably induced a series of chromosomal rearrangements in order to reduce its genome size, promoting the fragmentation of 35S regions and their scattering in the genome (Hidalgo & al., 2008). In *Rhaponticum* species, two main events involving changes in genome structure explain rDNA locus diversity. Instead of four 35S sites—the typical number in the *Rhaponticum* group—some species of the genus present six sites (Hidalgo, 2006). Chromosome restructuring likely explains the two additional 35S sites. They may result from hybridisation and introgression in *R. heleniifolium* Godr. & Gren. and *R. scariosum* Lam., whereas they are coupled with dysploidy in *R. carthamoides*, the only member of the genus with 24 chromosomes (Hidalgo & al., 2008).

In tribe Cardueae, *Cheirolophus* shows a remarkable pattern of rDNA loci evolution since an unusual high number of 35S sites—constantly in terminal position—has been found in continental and Canary Islands species (Garnatje & al., in press).

As *Cheirolophus* is the only member of Centaureinae to have radiated in the Canary Islands, a possible relationship between this island radiation and the increase in 35S sites could be envisaged. Interestingly, insular species have the lowest genome sizes (Garnatje & al., 2007) and the highest numbers of 35S sites.

Intraspecific variation in chromatin type and rDNA regions has also been observed in Cardueae. In a cytogenetic study of polyploid *Centaurea jacea* L. populations (Dydač & al., 2009), FISH revealed polymorphism in the number of 35S rDNA loci, with five to six pairs observed. The deletion of one rDNA locus in some populations as a result of polyploid genome reorganisation might explain intraspecific variation, showing that the number of rDNA copies can evolve very fast (Dydač & al., 2009).

■ TWO MODELS OF rDNA LOCI STRUCTURE AND DISTRIBUTION

The organisation of rRNA genes in the Asteraceae is very diverse and worth reporting. Although most groups in the family show the typical separate 5S and 35S rDNA arrays, an alternative rDNA organisation has recently been described, first in species of *Artemisia* (García & al., 2009a, b) and lately in some other groups of the family (García & al., 2010). It consists in a new kind of rDNA operon, which integrates all rRNA genes in a single unit in the order: 18S-5.8S-26S-5S; here, the 5S rRNA gene is inserted in inverted orientation in the long IGS region of rDNA proximal to the 26S gene (García & al., 2009a, b). This feature is directly visible by FISH of rRNA genes in metaphase plates, where probes co-localise at the same loci (Torrell & al., 2003; García & al., 2007, 2009b). This assembly of rRNA genes is similar to that of some other eukaryotes including yeast (Rubin & Sulston, 1973) or the liverwort *Marchantia polymorpha* L. (Sone & al., 1999) although in the latter case the 5S insertion apparently occurred in the forward orientation. Recently, Galián & al. (2012) described a comparable linkage in the rDNA of *Ginkgo biloba* L. There are scattered (although not rare) cases reported in the literature in which rDNA-FISH also suggests linkage between these genes (García & al., 2009a, and references therein), although this has only been proven, to date (i.e., the genic regions have been sequenced), in the cases discussed above. These findings disproved the common assumption that rRNA genes in eukaryotes always occur in separated arrays, and exceptions continue to be found in different plant and animal groups.

It has been calculated that around 25% of species of the Asteraceae might display the linked rDNA configuration, including most members of tribes Anthemideae and Gnaphalieae (Cass.) Lecoq & Juillet as well as some groups of the Heliantheae alliance, all of them belonging to subfamily Asteroideae, which accounts for approximately 70% of the species of the family (García & al., 2010). Nevertheless, there exist exceptions: for example, *Elachanthemum* Y. Ling & Y.R. Ling, very closely related to *Artemisia* and clearly within the Artemisiinae clade (Sanz & al., 2008), has the “typical” eukaryotic arrangement, as do species of *Dendranthema*, another Anthemideae

genus; in both cases, however, there might be minor linked rDNA arrays as shown by PCR and RT-PCR (García & al., 2010), although these are imperceptible by *in situ* hybridisation. This suggests that concerted evolution has been effective in homogenising one or the other kind of rRNA gene arrangement in this group. Species showing both configurations in more or less equal proportions have not been found (although a 5S solo locus was detected in *Coreopsis* L. of the Heliantheae alliance; García & al., 2010). With regard to the rest of the family, and in particular to tribe Cardueae, the only rDNA configuration is the classical one with 5S and 35S rDNA in separate arrays (García & al., 2012). The mobility in the genome of a retroelement which contains the 5S gene, named *Cassandra* (Kalendar & al., 2008), has been related to the alternative positions of 5S outside or inside the major rDNA array, although the available evidence is not conclusive in this respect.

■ GENOME SIZE CHANGES AND EVOLUTION

Most chromosomal changes discussed above imply genome size variation. Additional causes are minor, such as the occurrence of B-chromosomes (Levin & al., 2005), and there is size variation not always detectable at the cytogenetic level, such as the presence or absence of repetitive DNA and transposable elements (Kidwell, 2002, 2005). Nuclear DNA amount variation has strong relationships with many biological factors and implications in plant differentiation and evolution (Bennett & Leitch, 2011, and references therein).

Asteraceae are relatively well known regarding genome size, with 3% of the species investigated (Garnatje & al., 2010, 2011) as compared to 1.8% for the angiosperms (Bennett & Leitch, 2011). *Artemisia* is one of the genera particularly well covered in this respect, with data for 24.3% of the taxa investigated (Vallès & al., 2011, and references therein). Nuclear DNA content in this genus varies 9-fold, from $2C = 3.5$ (*A. annua* L., Torrell & Vallès, 2001) to 31.51 pg (*A. copa* Philippi, Pellicer & al., 2010c). The two lowest $2C$ values are found in two annual taxa: *A. annua* and *A. scoparia* Waldst. & Kit. ($2C = 3.54$ pg, García & al., 2004). However, the equally annual *A. leucodes* Schrenk ($2C = 15.39$ pg; García & al., 2004) shows the largest genome size of diploid taxa in the genus. Interestingly, together with its outlier genome size, the species also has an unexpected placement in molecular phylogenies. This situation is not restricted to *A. leucodes* but also found in *A. judaica* (Torrell & Vallès, 2001; Vallès & al., 2003; García & al., 2004), where both phylogenetic placement and genome size clearly differ from those of its subgeneric (*Artemisia*) counterparts.

Examples of agreement between genomes, molecular phylogenetic and other systematic data are abundant. At the supra-generic level, *Artemisia* and closely related genera constitute a monophyletic lineage characterised by the so-called *Artemisia* pollen type. The remaining genera that clearly separate from this *Artemisia* clade have the so-called *Anthemis* pollen type. Both pollen types differ in their exine ornamentation (Martín & al., 2001, 2003; Sanz & al., 2008; Pellicer & al., 2009b). Genome size is also significantly different between the two

clades, in agreement with their separation based on both pollen type and DNA sequences (García & al., 2004). At the infra-generic level, the three subgenera of *Artemisia* with the clearest delimitation in molecular analyses, *Dracunculus*, *Seriphidium* and *Tridentatae*, show more homogeneous genome sizes than subgenera *Absinthium* and *Artemisia* which are still not clearly structured and differentiated in traditional classifications and molecular phylogenetic analyses. Evolutionary changes resulting from artificial selection and domestication may also be found in genome size. This might be the case in the *A. arborescens* L. group, in which wild, cultivated and domesticated populations show significantly different nuclear DNA contents (García & al., 2006b).

Genome size can be evaluated in relation to geographical expansion processes, which may be particularly interesting in island colonisations. At the specific level, this has been studied in the above-mentioned *A. arborescens*, where the insular populations of this Mediterranean taxon have significantly higher nuclear DNA amounts than the continental ones (García & al., 2006b), and in *A. crithmifolia* L., very abundant along the European Atlantic coast from the southern Iberian peninsula to the Netherlands, with only two populations in the British Isles. These insular populations also have higher genome sizes than continental ones (Pellicer & al., 2009a). When considering variation between different species from the continent and oceanic islands, the opposite pattern is found. This is the case in another genus of Asteraceae, *Cheirolophus* (Garnatje & al., 2007) and is common in a large group of Macaronesian angiosperms (Suda & al., 2003, 2005). Thus, genome size data can help to elucidate how oceanic islands were colonised; in *Cheirolophus* the DNA content of *Ch. massonianus* (Lowe) A. Hansen & Sunding (1.44 pg, the highest value of all insular *Cheirolophus* species DNA) suggests that the colonisation of Madeira preceded that of the Canary Islands (where mean nuclear DNA content is 1.38 pg, Garnatje & al., 2007). In this case, the insular populations have lower nuclear DNA amounts than the continental ones, indicating a reduction in genome size during island colonisation.

Genome size may be also influenced by area fragmentation, as is the case in the above-mentioned *A. crithmifolia*, where continental populations are structured in two groups with significantly different genome sizes, separated by a discontinuity in its distribution area in the northern Iberian Peninsula (Pellicer & al., 2009a). In this respect, *Cheirolophus intybaceus* (Lam.) Dostál shows a different behaviour. This species, occupying a 50 km belt along the French and Iberian coasts, shows a significantly positive correlation between DNA content and latitude, so that its genome size decreases in drier and warmer habitats (lower latitudes); however, there are no significant differences between insular and continental populations, and the overall amount of DNA variation is so small in this taxon that no differentiated geographical groups can be established (Garnatje & al., 2009).

Of the causes inducing genome size variation, polyploidy deserves special attention. As discussed before, genome downsizing with polyploidy is very frequent (Leitch & Bennett, 2004). Pellicer & al. (2010a) established that genome size increase with ploidy level in *Artemisia* followed an asymptotic

model with a saturation behaviour. However, it seems clear that other genera of Asteraceae with polyploid series do not follow this pattern (Vallès & al., unpub. res.), and even in *Artemisia* some groups behave differently. For example, the South American endemic polyploid *A. mendozana* DC. does not show DNA loss, possibly due to the recent formation of this taxon (Pellicer & al., 2010c). Examples of both genome size relative decrease and proportional increase have been reported in subgenus *Tridentatae* as well (García & al., 2009a).

In *Echinops*, the comparison between the genome size of *E. acantholepis* ($2n = 14$, $2C = 6.52$ pg, Garnatje & al., 2004a) and its sister species *E. gmelinii* ($2n = 26$, $2C = 9.73$ pg, Sánchez-Jiménez & al., 2009), does not help to explain the evolutionary process that resulted in different ploidy levels, with dysploidy and polyploidy being equally plausible, but does indicate genome downsizing (Garnatje & al., 2004a; Sánchez-Jiménez & al., 2009). Genome downsizing is also well documented in other Cardueae, associated both with polyploidy and dysploidy (in *Carthamus* L., Garnatje & al., 2006 and in the *Rhaponticum* group, Hidalgo & al., 2008, respectively).

Genome size variation in annual *Echinops* species is high: apart from the above *E. acantholepis* and *E. gmelinii*, the annual *E. nanus* Bunge ($2n = 28$, $2C = 3.86$ pg) has a particularly low value. This variability between closely related species in chromosome number and DNA amount has also been documented in other Irano-Turanian species with an annual life cycle, such as the *Xeranthemum* (Garnatje & al., 2004a) and *Rhaponticum* (Hidalgo & al., 2008) complexes. The Mediterranean species of the *Rhaponticum* group, although more numerous, were much more homogeneous in karyological-cytogenetic characters. Especially noteworthy is the huge genome size expansion at the base of and within the *Myopordon* lineage, that does involve neither polyploidy, nor chromosome number change nor divergent FISH pattern, but which is coupled with an increased number of telomeric CMA (in all studied species) and DAPI (*M. pulchellum* (C. Winkl. & Barbey) Wagenitz) banding signals (Hidalgo & al., 2008). Further studies are needed to describe and compare relationships between genome size and polyploidy.

■ CONCLUDING REMARKS

Polyploidy and dysploidy are key processes in the evolution of genera considered in this review, as in general in Asteraceae and other flowering plants. These mechanisms, coupled with variation in genome size and the organisation of different chromosomal regions (types of chromatin, rDNA loci), are major contributors to plant diversification. The high number of chromosome counts available for some of the taxa discussed in this paper (Watanabe, 2002) allows us to state that while some plant groups have many different chromosome numbers and more or less long polyploid series (such as *Artemisia*, *Chrysanthemum* and *Dendranthema* in the Artemisiinae and *Carduus* L., *Carthamus*, *Centaurea* and *Cirsium* in the Cardueae), in others chromosome numbers are quite constant (such as *Ajanía* of the Artemisiinae and *Cheirolophus* of the

Cardueae). Although a considerable part of the evolutionary history of the taxa considered is well-known and clear, further studies dealing with karyological and cytogenetic (including genome size assessments) aspects are necessary. Although two out of 13 genera with more than 1000 chromosome counts reported in the Asteraceae, *Artemisia* and *Centaurea* (Semple & Watanabe, 2009), have been included here, many genera in the subtribes considered still lack such data completely, and others are only poorly covered at the species level. Counting chromosome numbers in these genera and performing further karyological and cytogenetic research in the less known taxa will allow a deeper knowledge of the systematics, phylogeny and evolution of these groups.

■ ACKNOWLEDGEMENTS

Samuel Pyke is thanked for the revision of the English language. This work was supported by the Spanish government (project CGL2010-22234-C02-01 and 02/BOS), the Catalanian government (2009SGR00439) and the Ministerio de Educación and MICINN research grants received by D.V. and I.S.-J. O.H. benefited from a Juan de la Cierva postdoctoral contract of MICINN, and S.G. benefitted from a Beatriz de Pinós postdoctoral contract of the Comissionat per a Universitats i Recerca (CUR), Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (Catalonian government). Joachim W. Kadereit (editor-in-chief), Hans Peter Comes (associate editor) and anonymous referees are thanked for their advice, which improved the manuscript.

■ LITERATURE CITED

- Abd El-Twab, M.H. & Kondo, K. 2006. FISH physical mapping of 5S, 45S and *Arabidopsis*-type telomere sequence repeats in *Chrysanthemum zawadskii* showing intra-chromosomal variation and complexity in nature. *Chromosome Bot.* 1: 1–5.
- Barker, M., Kane, N., Matvienko, M., Kozik, A., Michelmore, R.W., Knapp, S.J. & Rieseberg, L.H. 2008. Multiple paleopolyploidizations during the evolution of the Compositae reveal parallel patterns of duplicate gene retention after millions of years. *Molec. Biol. Evol.* 25: 2445–2455.
- Bennett, M.D. & Leitch, I.J. 2011. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Targets, trends and tomorrow. *Ann. Bot. (Oxford)* 107: 467–590.
- Blanc, G., Hokamp, K. & Wolfe, K.H. 2003. A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. *Genome Res.* 13: 137–144.
- Buggs, R.J.A., Soltis, P.S. & Soltis, D.E. 2011. Biosystematic relationships and the formation of polyploids. *Taxon* 60: 324–332.
- Camacho, J.P.M. 2005. B chromosomes. Pp. 223–286 in: Gregory, T.R. (ed.), *The evolution of the genome*. Amsterdam: Elsevier.
- Camacho, J.P.M., Sharbel, T.F. & Beukewoom, L.W. 2000. B-chromosome evolution. *Philos. Trans., Ser. B* 355: 163–178.
- Crawford, D.J. 2000. Plant macromolecular systematics in the past 50 years: One view. *Taxon* 49: 479–501.
- Dobigny, G., Ducroz, J.F., Robinson, T.J. & Volobouef, V. 2004. Cytogenetics and cladistics. *Syst. Biol.* 53: 470–484.
- Duncan, R.E. 1945. Production of variable aneuploid numbers of chromosomes within the root tips of *Paphiopedilum wardii* Summerhayes. *Amer. J. Bot.* 32: 506–509.

- Dydak, M., Kolano, B., Nowak, T., Siwinska, D. & Maluszynska, J. 2009. Cytogenetic studies of three European species of *Centaurea* L. (Asteraceae). *Hereditas* 146: 152–161.
- Ehrendorfer, F. 1980. Polyploidy and distribution. Pp. 45–60 in: Lewis, W.H. (ed.), *Polyploidy: Biological relevance*. New York, London: Plenum Press.
- Eisenman, S.W. & Struwe, L. 2011. The global distribution of wild tarragon (*Artemisia dracunculus* L.; Asteraceae) cytotypes with twenty-seven new records from North America. *Genet. Resources Crop Evol.* 58: 1199–1212.
- Favarger, C. 1978. Philosophie des comptages de chromosomes. *Taxon* 27: 441–448.
- Favarger, C. 1981. Some recent progress and problems in cytotaxonomy of higher plants. *Nucleus* 24: 151–157.
- Favarger, C. 1984. Cytogeography and biosystematics. Pp. 453–475 in: Grant, W.F. (ed.), *Plant biosystematics*. Toronto: Academic Press.
- Fukuda, I. 1984. Chromosome banding and biosystematics. Pp. 97–116 in: Grant, W.F. (ed.), *Plant biosystematics*. Toronto: Academic Press.
- Galián, J.A., Rosato, M. & Rosselló, J.A. 2012. Early evolutionary colocalization of the nuclear ribosomal 5S and 45S gene families in seed plants: Evidence from the living fossil gymnosperm *Ginkgo biloba*. *Heredity* 108: 640–646.
- García, S., Garnatje, T., Dariiama, Sh., Tsooj, Sh. & Vallès, J. 2006a. New or rarely-reported chromosome numbers in taxa of subtribe Artemisiinae (Anthemideae, Asteraceae) from Mongolia. *Bot. J. Linn. Soc.* 150: 203–210.
- García, S., Garnatje, T., Hidalgo, O., Siljak-Yakovlev, S. & Vallès, J. 2007. Extensive ribosomal DNA (18S-5.8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. *Pl. Syst. Evol.* 267: 79–92.
- García, S., Garnatje, T. & Kovařík, A. 2012. Plant rDNA database: ribosomal DNA loci information goes online. *Chromosoma*, doi: 10.1007/s00412-012-0368-7.
- García, S., Garnatje, T., McArthur, E.D., Pellicer, J., Siljak-Yakovlev, S. & Vallès, J. 2009a. Ribosomal DNA, heterochromatin, and correlation with genome size in diploid and polyploid North American endemic sagebrushes (*Artemisia*, Asteraceae). *Genome* 52: 1012–1024.
- García, S., Garnatje, T., Twibell, J.D. & Vallès, J. 2006b. Genome size variation in the *Artemisia arborescens* complex (Asteraceae, Anthemideae) and cultivars. *Genome* 49: 244–253.
- García, S., Lim, K.Y., Chester, M., Garnatje, T., Pellicer, J., Vallès, J., Leitch, A.R. & Kovařík, K. 2009b. Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): First evidence from angiosperms. *Chromosoma* 118: 85–97.
- García, S., McArthur, E.D., Pellicer, J., Sanderson, S.C., Vallès, J. & Garnatje, T. 2011. A molecular phylogenetic approach to western North America endemic *Artemisia* and allies (Asteraceae): Untangling the sagebrushes. *Amer. J. Bot.* 98: 638–653.
- García, S., Panero, J.L., Siroky, J. & Kovařík, A. 2010. Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *B. M. C. Pl. Biol.* 10: 176; doi: 10.1186/1471-2229-10-176.
- García, S., Sanz, M., Garnatje, T., Kreitschitz, A., McArthur, E.D. & Vallès, J. 2004. Variation of DNA amount of 47 populations of the subtribe Artemisiinae and related taxa (Asteraceae, Anthemideae): Karyological, ecological and systematic implications. *Genome* 47: 1004–1014.
- Garnatje, T., Canela, M.A., García, S., Hidalgo, O., Pellicer, J., Sánchez-Jiménez, I., Siljak-Yakovlev, S., Vitales, D. & Vallès, J. 2010. GSAD: A genome size database in the Asteraceae. Release 1.0, July. Database environment by F. Gálvez. <http://www.asteraceae-genomesize.com> (accessed 12 Oct. 2011).
- Garnatje, T., Canela, M.A., García, S., Hidalgo, O., Pellicer, J., Sánchez-Jiménez, I., Siljak-Yakovlev, S., Vitales, D. & Vallès, J. 2011. GSAD: A genome size in the Asteraceae database. *Cytometry* 79A: 401–404.
- Garnatje, T., García, S. & Canela, M.Á. 2007. Genome size variation from a phylogenetic perspective in the genus *Cheirolophus* Cass. (Asteraceae): Biogeographic implications. *Pl. Syst. Evol.* 264: 117–134.
- Garnatje, T., García, S., Hidalgo, O., Pellicer, J., Sánchez, I. & Vallès, J. 2009. *Cheirolophus intybaceus* (Asteraceae, Centaureinae) o la constància del valor 2C. *Collect. Bot. (Barcelona)* 28: 7–17.
- Garnatje, T., García, 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., Hidalgo, O., Vitales, D., Pellicer, J., Vallès, J., Robin, O., García, S. & Siljak-Yakovlev, S. In press. Swarm of terminal 35S in *Cheirolophus* (Asteraceae, Centaureinae). *Genome*.
- Garnatje, T., Vallès, J., García, S., Hidalgo, O., Sanz, M., Canela, M.A. & Siljak-Yakovlev, S. 2004a. Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): Karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biol. Cell* 96: 117–124.
- Garnatje, T., Vallès, J., Vilatersana, R., García-Jacas, N., Susanna, A. & Siljak-Yakovlev, S. 2004b. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). *Pl. Biol.* 6: 140–146.
- Grant, W.F. (ed.) 1984. *Plant biosystematics*. Toronto: Academic Press.
- Greilhuber, J., Doležel, J., Lysák, M.A. & Bennett, M.D. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents. *Ann. Bot. (Oxford)* 95: 255–260.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotoxicity: Concepts and implications. *Cytogenet. Genome Res.* 120: 339–350.
- Gutermann, W. 1979. Systematik und Evolution einer alten, dysploidy-polyploiden Oreophyten-Gruppe: *Artemisia mutellina* und ihre Verwandten (Asteraceae: Anthemideae). Ph.D. thesis, Universität Wien, Vienna, Austria.
- Heywood, V.H. & Humphries, C.J. 1977. Anthemideae—systematic review. Pp. 851–898 in: Heywood, V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L. (eds.), *The biology and chemistry of the Compositae*, vol. 2. London, New York, San Francisco: Academic Press.
- Hidalgo, O. 2006. *El grupo Rhaponticum (Asteraceae, Cardueae, Centaureinae): Delimitación y filogenia*. Ph.D. thesis, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.
- Hidalgo, O., García-Jacas, N., Garnatje, T., Susanna, A. & Siljak-Yakovlev, S. 2007. Karyological evolution in *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae) and related genera. *Bot. J. Linn. Soc.* 153: 193–201.
- Hidalgo, O., García-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.
- Hidalgo, O., García-Jacas, N., Garnatje, T. & Susanna, A. 2006. Phylogeny of *Rhaponticum* (Asteraceae, Cardueae-Centaureinae) and related genera inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data: Taxonomic and biogeographic implications. *Ann. Bot. (Oxford)* 97: 705–714.
- Hoshi, Y., Matoba, H. & Kondo, K. 2006. Physical mapping of ribosomal RNA genes in the genus *Artemisia* L. (Asteraceae). *Caryologia* 59: 312–318.
- James, C.M., Wurzell, B.S. & Stace, C.A. 2000. A new hybrid between a European and a Chinese species of *Artemisia* (Asteraceae). *Watsonia* 23: 139–147.
- Jiao, Y., Wickett, N.J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A.S., Landherr, L., Ralph, P.E., Tomsho, L.P., Hu, Y., Liang, H., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Clifton, S.W., Schlarbaum, S.E., Schuster,

- S.C., Ma, H., Leebens-Mack, J. & dePamphilis, C.W. 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473: 97–100.
- Jones, R.N. & Rees, H. 1982. *B chromosomes*. London: Academic Press.
- Kalendar, R., Tanskanen, J., Chang, W., Antonius, K., Sela, H., Peleg, O. & Schulman, A.H. 2008. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 5833–5838.
- Kawatani, T. & Ohno, T. 1964. Chromosome numbers in *Artemisia*. *Bull. Natl. Inst. Hyg. Sci., Tokyo* 82: 183–193.
- Kidwell, M.G. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49–63.
- Kidwell, M.G. 2005. Transposable elements. Pp. 165–221 in: Gregory, T.R. (ed.), *The evolution of genome*. Amsterdam: Elsevier.
- Kondo, K., Abd El-Twab, M.H., Idesawa, R., Kimura, S. & Tanaka, R. 2003. Genome phylogenetics in *Chrysanthemum* sensu lato. Pp. 117–200 in: Sharma, A.K. & Sharma, A. (eds.), *Plant genome. Biodiversity and evolution*, vol. 1, pt. A, *Phanerogams*. Enfield, New Hampshire: Plymouth, U.K.: Science Publishers.
- Kreitschitz, A. & Vallès, J. 2003. New or rare data about chromosome numbers in several taxa of the genus *Artemisia* L. (Asteraceae) in Poland. *Folia Geobot.* 38: 333–343.
- Leitch, I.J. & Bennett, M.D. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 82: 651–663.
- Levin, D.A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *Amer. Naturalist* 122: 1–25.
- Levin, D.A., Palestis, B.G., Jones, R.N. & Trivers, R. 2005. Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. *Evolution* 59: 962–929.
- Liehr, T. (ed.) 2009. *Fluorescence in situ hybridization (FISH): Application guide*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Lim, K.Y., Matyasek, R., Lichtenstein, C.P. & Leitch, A.R. 2000. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae*. *Chromosoma* 109: 245–258.
- Martín, J., Torrell, M., Korobkov, A.A. & Vallès, J. 2003. Palynological features as a systematic marker in *Artemisia* L. and related genera (Asteraceae, Anthemideae) II: Implications for subtribe Artemisiinae delimitation. *Pl. Biol.* 5: 85–93.
- Martín, J., Torrell, M. & Vallès, J. 2001. Palynological features as a systematic marker in *Artemisia* L. and related genera (Asteraceae, Anthemideae). *Pl. Biol.* 3: 372–387.
- Masteron, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264: 421–423.
- Matoba, H., Nagano, K. & Hoshi, Y. 2007. The tendency of chromosomal evolution in some Japanese *Artemisia* using numerical analysis of karyotypes. *Cytologia* 72: 181–188.
- Matsuda, Y., Shibusawa, M., Matsubara, K. & Nishida-Umehara, C. 2008. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as a tool for comparative genomics: application of FISH to studies of chromosome evolution in vertebrates. Pp. 63–78 in: Fukui, K. & Ushiki, T. (eds.), *Chromosome nanoscience and nanotechnology*. Boca Raton, London, New York: CRC Press.
- McArthur, E.D. & Sanderson, S.C. 1999. Cytogeography and chromosome evolution of subgenus *Tridentatae* of *Artemisia* (Asteraceae). *Amer. J. Bot.* 86: 1754–1775.
- McArthur, E.D., Buren, R.V., Sanderson, S.C. & Harper, K.T. 1998a. Taxonomy of *Sphaeromeria*, *Artemisia*, and *Tanacetum* (Compositae, Anthemideae) based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Great Basin Naturalist* 58: 1–11.
- McArthur, E.D., Mudge, J., Buren, R.V., Andersen, W.R., Sanderson, S.C. & Babbel, D.G. 1998b. Randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of *Artemisia* subgenus *Tridentatae* species and hybrids. *Great Basin Naturalist* 58: 12–27.
- Oberprieler, C., Himmelreich, S., Källersjö, M., Vallès, J., Watson, L.E. & Vogt, R. 2009. Anthemideae. Pp. 632–666 in: Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F. & Bayer, R.J. (eds.), *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*. Vienna: International Association for Plant Taxonomy.
- Oliva, M. & Vallès, J. 1994. Karyological studies in some taxa of the genus *Artemisia* (Asteraceae). *Canad. J. Bot.* 72: 1126–1135.
- Pellicer, J., Garcia, S., Canela, M.A., Garnatje, T., Korobkov, A.A., Twibell, J.D. & Vallès, J. 2010b. Genome size dynamics in *Artemisia* L. (Asteraceae): Following the track of polyploidy. *Pl. Biol.* 12: 820–830.
- Pellicer, J., Garcia, S., Garnatje, T., Hidalgo, O., Korobkov, A.A., Dariiama, Sh. & Vallès, J. 2007. Chromosome counts in Asian *Artemisia* L. (Asteraceae) species: From diploids to the first report of the highest polyploid in the genus. *Bot. J. Linn. Soc.* 153: 301–310.
- Pellicer, J., Garcia, S., Garnatje, T. & Vallès, J. 2009a. Changes in genome size in a fragmented distribution area: The case of *Artemisia crithmifolia* L. (Asteraceae, Anthemideae). *Caryologia* 62: 152–160.
- Pellicer, J., Garnatje, T., Hidalgo, O., Tagashira, N., Vallès, J. & Kondo, K. 2010c. Do polyploids require proportionally less rDNA loci than their corresponding diploids? Examples from *Artemisia* subgenera *Absinthium* and *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae). *Pl. Biosystems* 144: 841–848.
- Pellicer, J., Garnatje, T., Moleró, J., Pustahija, F., Siljak-Yakovlev, S. & Vallès, J. 2010a. Origin and evolution of the South American endemic *Artemisia* species (Asteraceae): Evidence from molecular phylogeny, ribosomal DNA and genome size data. *Austral. J. Bot.* 58: 605–616.
- Pellicer, J., Hidalgo, O., Garcia, S., Garnatje, T., Korobkov, A., Vallès, J. & Martín, J. 2009b. Palynological study of *Ajanía* and related genera (Asteraceae, Anthemideae). *Bot. J. Linn. Soc.* 161: 171–189.
- Pires, J.C., Lim, K.Y., Kovarik, A., Matyasek, R., Boyd, A., Leitch, A.R., Leitch, I.J., Bennett, M.D., Soltis, P.S. & Soltis, D.E. 2004. Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (Asteraceae) allopolyploids reveal a karyotype that is additive of the diploid progenitors. *Amer. J. Bot.* 91: 1022–1035.
- Raskina, O., Barcher, J.C., Nevo, E. & Belyayev, A. 2008. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: Speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 120: 351–357.
- Rieger, R., Michaelis, A.M. & Green, M.M. 1982. *Diccionario de genética y citogenética clásica y molecular*. Madrid: Alhambra.
- Rubin, G.M. & Sulston, J.E. 1973. Physical linkage of the 5S cistrons to the 18S and 28S ribosomal RNA cistrons in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Molec. Biol.* 79: 521–530.
- Sánchez-Jiménez, I., Lazkov, G.A., Hidalgo, O. & Garnatje, T. 2010. Molecular systematics of *Echinops* L. (Asteraceae, Cynareae): A phylogeny based on ITS and *trnL-trnF* sequences with emphasis on sectional delimitation. *Taxon* 59: 698–708.
- Sánchez-Jiménez, I., Pellicer, J., Hidalgo, O., Garcia, S., Garnatje, T. & Vallès, J. 2009. Chromosome numbers in three Asteraceae tribes from Inner Mongolia (China), with genome size data for Cardueae. *Folia Geobot.* 44: 307–322.
- Sanz, M., Vilatersana, R., Hidalgo, O., Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Schneeweiss, G.M. & Vallès, J. 2008. Molecular phylogeny and evolution of floral characters of *Artemisia* and allies (Anthemideae, Asteraceae): Evidence from nrDNA ETS and ITS sequences. *Taxon* 57: 66–78.
- Schweizer, D. & Ehrendorfer, F. 1983. Evolution of C-band patterns in Asteraceae-Anthemideae. *Biol. Zentralbl.* 102: 637–655.
- Sample, J.C. & Watanabe, K. 2009. A review of chromosome numbers in Asteraceae with hypotheses on chromosomal base number evolution. Pp. 61–72 in: Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F. & Bayer, R.J. (eds.), *Systematics, evolution and biogeography of Compositae*. Vienna: International Association for Plant Taxonomy.
- Sharma, A.K. & Sharma, A. 2001. *Chromosome painting: Principles, strategies and scope*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Siljak-Yakovlev, S. 1996. La dysplodie et l'évolution du caryotype. *Bocconea* 5: 211–220.

- Solbrig, O.T.** 1977. Chromosomal cytology and evolution in the family Compositae. Pp. 269–281 in: Heywood, V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L. (eds.), *The biology and chemistry of the Compositae*, vol. 1. London, New York, San Francisco: Academic Press.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S.** 1999. Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution. *Trends Ecol. Evol.* 14: 348–352.
- Sonboli, A., Osaloo, S.K., Vallès, J. & Oberprieler, C.** 2011. Systematic status and phylogenetic relationships of the enigmatic *Tanacetum paradoxum* Bornm. (Asteraceae, Anthemideae): Evidences from nrDNA ITS, micromorphological, and cytological data. *Pl. Syst. Evol.* 292: 85–93.
- Sone, T., Fujisawa, M., Takenaka, M., Nakagawa, S., Yamaoka, S., Sakaida, M., Nishiyama, R., Yamato, K.T., Ohmido, N., Fukui, K., Fukuzawa, H. & Ohyama, K.** 1999. Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Pl. Molec. Biol.* 41: 679–685.
- Stace, C.A.** 2000. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon* 49: 451–477.
- Stebbins, G.L.** 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. London: Arnold.
- Stuessy, T.F., Weiss-Schneeweiss, H. & Keil, D.J.** 2004. Diploid and polyploid cytotype distribution in *Melampodium cinereum* and *M. leucanthum* (Asteraceae, Heliantheae). *Amer. J. Bot.* 91: 889–898.
- Suda, J., Kyncl, T. & Freiová, R.** 2003. Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. *Ann. Bot. (Oxford)* 92: 153–164.
- Suda, J., Kyncl, T. & Jarolímová, V.** 2005. Genome size variation in Macaronesian angiosperms: Forty percent of the Canarian endemic flora completed. *Pl. Syst. Evol.* 252: 215–238.
- Swift, H.** 1950. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 36: 643–654.
- Templeton, S.R.** 1980. The theory of speciation via the founder principle. *Genetics* 94: 1011–1038.
- Torrell, M. & Vallès, J.** 2001. Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome* 44: 231–238.
- Torrell, M., Cerbah, M., Siljak-Yakovlev, S. & Vallès, J.** 2003. Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): Fluorochrome banding and fluorescence in situ hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Pl. Syst. Evol.* 239: 141–153.
- Torrell, M., Vallès, J., Garcia-Jacas, N., Mozaffarian, V. & Gabriellian, N.** 2001. New or rare chromosome counts in the genus *Artemisia* L. (Asteraceae, Anthemideae) from Armenia and Iran. *Bot. J. Linn. Soc.* 135: 51–60.
- Vallès, J.** 1987. Aportación al conocimiento citotaxonomico de ocho táxones ibéricos del género *Artemisia* L. (Asteraceae-Anthemideae). *Anales Jard. Bot. Madrid* 44: 79–96.
- Vallès, J. & Garnatje, T.** 2005. *Artemisia* and its allies: Genome organization and evolution and their biosystematic, taxonomic and phylogenetic implications in the Artemisiinae and related subtribes (Asteraceae, Anthemideae). Pp. 255–285 in: Sharma, A. (ed.), *Plant genome: Biodiversity and evolution*, vol. 1B, *Phanerogams*. Enfield: Science Publishers.
- Vallès, J. & Oliva, M.** 1990. Contribution à la connaissance du groupe d'*Artemisia umbelliformis* Lam. (Asteraceae) dans les Pyrénées. *Monogr. Inst. Piren. Ecol.* 5: 321–330.
- Vallès, J. & Siljak-Yakovlev, S.** 1997. Cytogenetic studies in the genus *Artemisia* L.: Fluorochrome banded karyotypes of five taxa, including the Iberian endemic species *A. barrelieri* Besser. *Canad. J. Bot.* 75: 595–606.
- Vallès, J., Garcia, S., Hidalgo, O., Martín, J., Pellicer, J., Sanz, M. & Garnatje, T.** 2011. Biology, genome evolution, biotechnological issues, and research including applied perspectives in *Artemisia* (Asteraceae). *Advances Bot. Res.* 60: 349–419.
- Vallès, J., Garnatje, T., Garcia, S., Sanz, M. & Korobkov, A.A.** 2005. Chromosome numbers in the tribes Anthemideae and Inuleae (Asteraceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 148: 77–85.
- Vallès, J., Torrell, M., Garnatje, T., Garcia-Jacas, N., Vilatersana, R. & Susanna, A.** 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). *Pl. Biol.* 5: 274–284.
- Watanabe, K.** 2002. Index to chromosome numbers in the Asteraceae. http://www.lib.kobe-u.ac.jp/infolib/meta_pub/G0000003asteraceae_e (accessed 12 Oct. 2011).
- Watanabe, K.** 2004. Index to chromosome numbers in the Asteraceae on the web. *Compositae Newsl.* 41: 64.
- Watson, L.E., Bates, P.L., Evans, T.M., Unwin, M.M. & Estes, J.R.** 2002. Molecular phylogeny of subtribe Artemisiinae (Asteraceae), including *Artemisia* and its allied and segregate genera. *B. M. C. Evol. Biol.* 2: 17, doi: 10.1186/1471-2148-2-17.
- Wiens, D. & Richter, J.A.** 1966. *Artemisia pattersonii*: A 14-chromosome species of alpine sage. *Amer. J. Bot.* 53: 981–986.

*Alpinista es quien conduce su cuerpo allá
donde un día sus ojos lo soñaron*

Gastón Rébuffat