



Facultat de ciències

Memòria Del Treball Final de Grau

Títol del Treball: Aplicació de la taxonomia integrativa per la delimitació de noves espècies. Un exemple dins el grup *Rhaponticum*

Estudiant: Marta Galceran Sánchez

Grau en Biologia

Correu electrònic: maruta.galceran@gmail.com

Tutor: Lluís Vilar

Cotutors: Núria Garcia Jacas i Roser Vilatersana

Empresa/institució: Institut Botànic de Barcelona (IBB, CSIC-ICUB)

Vistiplau tutor (i cotutors):

Nom del tutor: Lluís Vilar

Noms dels cotutors: Núria Garcia Jacas
Roser Vilatersana

Empresa/institució: Institut Botànic de Barcelona

Correus electrònics: lluis.vilar@udg.edu
ngarciajacas@ibb.csic.es
vilatersana@ibb.csic.es

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 19/07/2018

AGRAÏMENTS

Estic molt agraïda a les doctores Núria Garcia i Roser Vilatersana per presentar-me aquest treball tan interessant i per la seva paciència a l'hora de solucionar els meus dubtes. Aquest Treball de Final de Grau m'ha permès adquirir nous coneixements i mètodes d'anàlisi que espero poder utilitzar en un futur. També al Dr. Alfonso Susanna per les seves aportacions i correccions.

Vull agrair a en Toni Forés per haver-me ajudat tant en el laboratori, mentre també preparava el seu Treball de Final de Grau. I a la Sònia Herrando pel temps que m'ha dedicat ha ensenyar-me i ajudar-me a fer les anàlisis. Per últim a en Julià Molero per les seves fotografies.

Finalment vull agrair a la meva família i amics que han estat sempre presents i que m'han recolzat en els millors i pitjors moments.

Moltes gràcies a tots, de tot cor.

RESUM

El grup *Rhaponticum* inclou actualment, entre d'altres, l'antic gènere *Leuzea* que des de fa temps ha sigut difícil definir les relacions taxonòmiques entre les espècies que comprèn. La taxonomia entre *Rhaponticum coniferum*, *R. berardioides* i *R. font-queri* no està aclarida. A més, al 2011 es va recol·lectar una població a L'Atlas Mitjà (Marroc) amb característiques morfològiques que la diferencien de *R. coniferum*.

En aquest estudi s'implementa l'ús de la taxonomia integrativa utilitzant mètodes morfològics i moleculars per aclarir les relacions en l'antic gènere *Leuzea*. S'han examinat 28 caràcters morfològics en 112 individus de plecs d'herbari. Per l'estudi molecular s'ha seleccionat la regió nuclear ETS (*External Transcribed Spacer*) i s'han clonat diversos individus dels taxons.

Morfològicament les tres espècies prèviament descrites són diferents. Genèticament, *R. berardioides* es separa clarament de les altres. En quant a la població problema, té certes característiques morfològiques pròpies, però genèticament és molt propera a *R. coniferum*.

En la nostra proposta taxonòmica mantenim *R. coniferum*, *R. berardioides* i *R. font-queri* com tres espècies diferents, i apuntem a subordinar la població problema com a subespècie de *R. coniferum*.

Paraules clau: anàlisi de components principals, anàlisi morfològic, ETS, *Leuzea*

RESUMEN

El grupo *Rhaponticum* incluye, entre otros, el antiguo género *Leuzea* que desde hace tiempo ha sido difícil definir las relaciones taxonómicas entre las especies que comprende. La taxonomía entre *Rhaponticum coniferum*, *R. berardioides* y *R. font-queri* no está aclarada. Además, en 2011 se recolectó una población en el Atlas Medio (Marruecos) con características morfológicas que la diferencian de *R. coniferum*.

En este estudio se implementa el uso de la taxonomía integrativa usando métodos morfológicos y moleculares para esclarecer las relaciones en el antiguo género *Leuzea*. Se han examinado 28 caracteres morfológicos en 112 individuos de pliegos de herbario. Para el estudio molecular se ha seleccionado la región nuclear ETS (*External Transcribed Spacer*) y se han clonado varios individuos de los taxones.

Morfológicamente las tres especies previamente descritas son distintas i genéticamente *R. berardioides* se separa claramente de las otras. En cuanto a la población problema, tiene ciertas características morfológicas propias, pero genéticamente es muy cercana a *R. coniferum*.

En nuestra propuesta taxonómica mantenemos *R. coniferum*, *R. berardioides* y *R. font-queri* como tres especies distintas, y apuntamos a subordinar la población problema como subespecie de *R. coniferum*.

Palabras clave: análisis de componentes principales, análisis morfológico, ETS, *Leuzea*

ABSTRACT

The *Rhaponticum* group includes, among others, the old genus *Leuzea* and for a long time it has been difficult to define taxonomic relationships between the species. The taxonomy of *Rhaponticum coniferum*, *R. berardioides* and *R. font-queri* is unclear. In addition, in 2011 it was collected a population in the Middle Atlas (Morocco) with some morphological characteristics that differentiate it from *R. coniferum*.

In this study we implemented the use of integrative taxonomy using morphological and molecular methods to clarify the relationships of the old genus *Leuzea*. Twenty-eight morphological characters in 112 individual herbarium vouchers have been examined. For the molecular study the nuclear region ETS (*External Transcribed Spacer*) was chosen and several individuals of each taxa were cloned.

The three species previously described are morphologically different. Genetically, *R. berardioides* clearly separates of others. In terms of the problem population, it has its own morphological characters, but is genetically very close to *R. coniferum*.

In our taxonomic proposal we suggest to keep *R. coniferum*, *R. berardioides* and *R. font-queri* as three different species, and to subordinate the problem population as a subspecies of *R. coniferum*.

Keywords: ETS, *Leuzea*, morphological analysis, principal component analysis

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	6
2. AIMS	10
3. MATERIAL I MÈTODES	11
3.1. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI MORFOLÒGIC.....	11
3.2. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI MOLECULAR	15
3.3. ÈTICA I SOSTENIBILITAT.....	20
4. RESULTATS.....	21
4.1. ESTUDI MORFOLÒGIC	21
4.2. ESTUDI MOLECULAR.....	23
5. DISCUSSIÓ	26
6. CONCLUSIONS	28
7. BIBLIOGRAFIA	29

1. INTRODUCCIÓ

El grup *Rhaponticum*

El grup *Rhaponticum* pertany a la tribu *Cardueae* de la família de les Compostes, concretament a la subtribu *Centaureinae* (Garcia-Jacas et al., 2001). Està format per set gèneres amb unes 40 espècies. A més del gènere *Rhaponticum* Vaill. (= *Stemmacantha* Cass.; cf. Greuter et al., 2005) inclou *Acroptilon* Cass., *Callicephalus* C.A. Mey, *Centaurothamnus* Wagenitz & Dittrich, *Leuzea* DC., *Myopordon* Boiss., *Ochrocephala* Dittrich i *Oligochaeta* (DC.) K. Koch (Hidalgo et al., 2006).

El gènere *Rhaponticum* comprèn aproximadament 25 espècies distribuïdes des d'Àfrica del nord, a Europa i fins l'est d'Àsia, fins i tot hi ha una espècie present a Austràlia. Les distribucions geogràfiques i requisits ambientals són força diversos en *Rhaponticum* i els gèneres relacionats.

Des de fa temps ha sigut difícil definir les relacions taxonòmiques entre *Leuzea* i *Rhaponticum* (Holub, 1973; Dittrich, 1984) degut a que les espècies d'aquests dos gèneres presenten caràcters morfològics en comú i estructures similars. Hidalgo et al. (2006) confirma per mètodes moleculars que *Leuzea* i *Rhaponticum* han de fusionar-se, com va suggerir Holub (1973) per raons morfològiques, quedant combinats dins del nom genèric *Rhaponticum*.

L'antic gènere *Leuzea* en el sentit més estricte inclou tres espècies (Hidalgo et al., 2006) distribuïdes a l'oest del Mediterrani, des de Portugal i Marroc fins a Itàlia. Aquestes espècies són les examinades en aquest treball: *Rhaponticum coniferum* (L.) Greuter, *Rhaponticum berardioides* (Batt.) Hidalgo i *Rhaponticum font-queri* (Sauvage) Hidalgo, aquesta última estretament relacionada amb *R. coniferum* que presenta una ampla distribució i variabilitat morfològica. En la Figura 1 es representen les distribucions de les espècies de *Rhaponticum* estudiades en aquest treball.

Rhaponticum coniferum mostra una ampla distribució per la regió mediterrània a l'Europa sud-occidental (Portugal, Espanya, França i Itàlia), les Illes Balears, Còrsega, Sardenya, i Sicília, i l'Àfrica nord-occidental (Marroc, Algèria i Tunísia). *Rhaponticum font-queri* és endèmica del massís calcari de Chechouene (Marroc) (Sauvage, 1968), i *R. berardioides* és un endemisme de l'Alt Atlas del Marroc (Battandier, 1919; Fennane, 2007).

Trets morfològics de les tres espècies de l'antic grup *Leuzea*

Els exemplars del gènere *Rhaponticum* són herbes perennes que presenten, generalment, un únic i gran capítol terminal amb bràctees enteres o lacerades.

Rhaponticum coniferum (Figura 2) és una espècie molt polimòrfica. Presenta tiges simples (de 5–40 cm) o ramificades des de la base, rarament a mitja altura, amb capítols terminals i solitaris ovoides o globosos. Les bràctees estan disposades en 9 a 15 sèries, gradualment majors cap a l'interior del capítol, en forma de cullera, de color verd o palla en la cara externa, lacerades i glabres. Les bràctees més internes tenen forma el·líptica de color palla o púrpura, també glabres, amb àpex agut i senceres. Els flòsculs són de color rosat o blanquinós (Figura 2B). Presenta dimorfisme foliar, i fulles alternes i menors cap a la part superior de la tija, el·líptiques, pinnatipartides o pinnatisectes, menys freqüentment enteres, normalment amb l'àpex

mucronat i indument dens amb pèls araneosos. Es troba en clars de boscos, matollars i talussos, entre 0 i 1900 metres sobre el nivell del mar, en sòls preferentment bàsics (Fennane, 2007; López Martínez et al., 2014).



Figura 1. Àrea de distribució de *R. coniferum* (blau), *R. berardioides* (taronja), *R. font-queri* (verd) i la mostra problema (vermell).

Rhaponticum berardioides (Figura 3) presenta una tija simple acaule o subacaule, amb capítols terminals, grans i solitaris, amb bràctees intermèdies grans, daurades o blanques i les superiors violàcies, més amples a la base que en *R. coniferum*, pubescents o tomentoses a l'apex. Els flòsculs són de color porpra. Les fulles són grans, el·líptiques o cordiformes, tomentoses, més densament en el revers. Es una planta que viu en tarteres calcàries d'alta muntanya entre 1700–3300 m (Jahandiez & Maire, 1934).

Rhaponticum font-queri (Figura 4) és acaule o subacaule amb tija simple, i capítol terminal i solitari, amb les bràctees externes blanques i més o menys lacerades. Els flòsculs són de color porpra. Les bràctees internes tenen l'apèndix glabre o amb pubescència molt fina i curta i són de color porpra. Les fulles radicals estan disposades en roseta i són enteres i cordiformes, amb l'apex obtús o arrodonit, araneosotomentoses, més densament en el revers. Es troba en sòls rocosos en clars de pinedes entre 1700–1800 m (Sauvage, 1968).

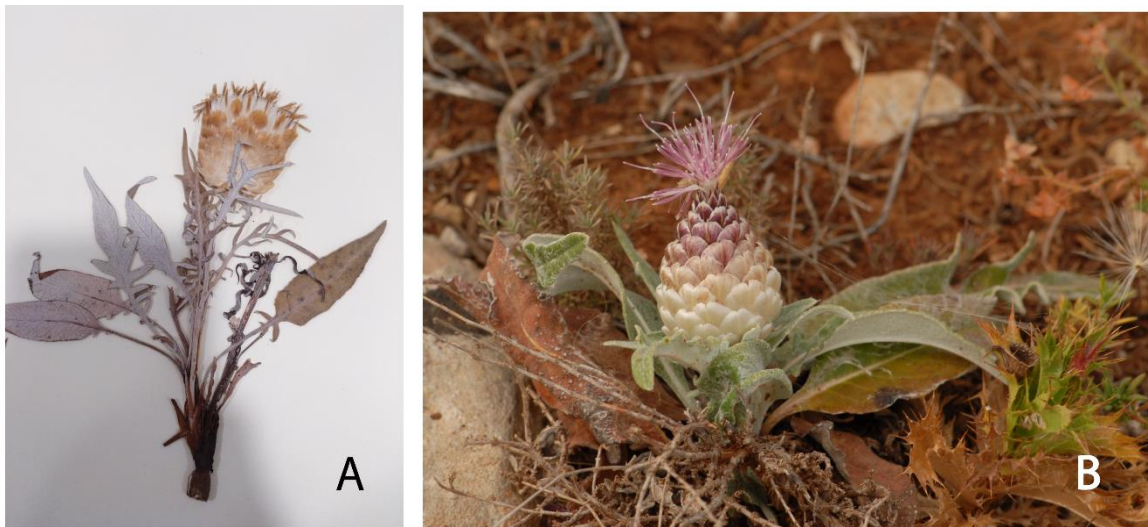


Figura 2. Exemples de *Rhaponticum coniferum*. **A**, plec d'herbari (BC 33888). **B**, individu al medi natural (fotografia de J. Molero).



Figura 3. Plec d'herbari de *R. berardioides* (MGC 39008).



Figura 4. Plec d'herbari de *R. font-queri* (MA 782476).

Problemes taxonòmics

La delimitació de les espècies de l'antic grup *Leuzea* no està del tot resolta, les tres espècies no són acceptades per tots els autors. Hi ha autors que consideren *R. berardioides* com una espècie separada, però inclouen *R. font-queri* dins de *R. coniferum* (Jahandiez & Maire, 1934; Holub, 1973; Fennane, 2007); altres inclouen *R. berardioides* com a subespècie de *R. coniferum*, sense considerar l'existència de *R. font-queri* (Greuter 2003). I hi ha autors que sí que accepten les tres espècies com a diferents (Sauvage, 1968; Hidalgo et al. 2006).

A més, al juny de 2011, en una sortida a l'Atles Mitjà (Marroc) (veure Figura 1) es va trobar una població (a partir d'aquí anomenada població problema) propera de *R. coniferum*, però diferent

morfològicament. Es va procedir a la seva recol·lecció per el seu futur estudi (Figura 5). La població problema, a diferència de *R. coniferum*, presenta ramificació a mitja altura, tot i que alguns individus de *R. coniferum* també la presenten, però en molts pocs casos. No presenta dimorfisme foliar, les fulles són lanceolades enteres o lleugerament pinnatisectes, el capítol és més amplament oval, és més gran, i les flors són blanques.



Figura 5. Exempler de la població problema. **A**, plec d'herbari (GC 2225; herbari BC). **B**, al medi natural (fotografia de J. Molero).

Eines: ús de la taxonomia integrativa

A meitats del segle XX els taxònoms es van adonar que la diversitat d'espècies no podia ser descrita només utilitzant trets morfològics, així doncs es proposa l'ús de diferents línies d'evidències per oferir hipòtesis taxonòmiques més estables (Dayrat, 2005; Padial, 2007), donant lloc a la taxonomia integrativa. Aquest mètode millora el rigor de les delimitacions entre les entitats taxonòmiques. La taxonomia integrativa s'ha usat anteriorment per la delimitació d'espècies en diferents estudis, per exemple Su et al. (2015) i Herrando-Moraira et al. (2017).

En aquest treball s'ha utilitzat un enfocament tan des del punt de vista morfològic com molecular per descobrir si la nova població trobada a l'Atles Mitjà és diferenciable de *R. coniferum* i per aclarir l'estatus taxonòmic de les tres espècies del grup *Leuzea*.

Per aquest estudi s'han utilitzat 28 trets morfològics, els més distintius de les diferents espècies examinades i per l'estudi molecular s'ha seleccionat la regió ETS (*External Transcribed Spacer*) del DNA ribosòmic nuclear (nrDNA; Baldwin & Marcos, 1998). La regió ETS ha estat àmpliament utilitzada per aclarir les relacions filogenètiques en gèneres de les Compostes i també en els gèneres basals de la subtribu de les *Centaureinae*, com per exemple en el mateix grup *Rhaponticum* (Hidalgo et al., 2006) i en el grup *Volutaria* (Calleja et al., 2016).

2. AIMS

This research work focuses on two objectives:

1. To confirm the suitability of the integrative taxonomy methods within the *Rhaponticum* group.
2. To check if the problem population from the Middle Atlas (Morocco) deserves taxonomic entity.
3. To verify the taxonomy of the three species of the *Leuzea* group.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI MORFOLÒGIC

Per l'anàlisi morfològic s'han examinat 81 plecs procedents de diferents herbaris: l'herbari de l'Institut Botànic de Barcelona (BC), del *Real Jardín Botánico* de Madrid (MA), de la Universitat de Granada (GDA), de la Universitat de Màlaga (MGC), i de la Universitat de València (VAL), amb un total de 112 individus: 63 individus de *Rhaponticum coniferum*, 36 individus de *R. fontqueri*, 9 individus de *R. berardioides* i 4 individus de la mostra problema.

Els individus inclosos en el treball s'han escollits per representar tota l'àrea de distribució de cada una de les espècies. El material estudiat està especificat en la Taula 1.

S'han examinat aquells plecs que presenten tots els caràcters que es volen analitzar i amb prou conservació. Amb el capítol obert per poder examinar les bràctees internes i les fulles prou esteses per poder mesurar la llargada i l'amplada amb precisió. Per cada individu s'han examinat 28 caràcters entre qualitatiu, quantitatiu i semiquantitatiu (especificats a la Taula 2); pels caràcters quantitatius s'ha fet la mitjana de tres mesures i s'han establert categories de cada caràcter qualitatiu i semiquantitatiu per poder mesurar la variabilitat entre mostres (Taula 2).

Hi ha altres caràcters que no s'han pogut examinar; són la forma del capítol i el color de les flors, ja que al premsar-se els plecs els capítols queden aixafats i s'obren, i el color de les flors es perd en assecar-se. Per prendre les mesures s'ha utilitzat un peu de rei. Es va examinar l'indument de fulles i bràctees, i la forma dels àpex sota una lupa binocular *Olympus KL 1500 LCD*.

A partir de les dades obtingudes s'han realitzat les anàlisis PCA (*Principal Components Analysis*) utilitzant el programa *IBM SPSS Statistics 24 v.17.0* (SPSS, Chicago, IL, USA). L'objectiu de la PCA és resumir la major part de la variació que es troba en el conjunt de variables de les mostres (Herrando-Moraira et al., 2017).

S'han realitzat dues PCA independents. La primera inclou les quatre entitats que volem comparar: *Rhaponticum coniferum*, *R. font-queri*, *R. berardioides* i la mostra problema. La segona s'ha fet per comparar la mostra problema amb *R. coniferum*, ja que en la primera anàlisi no s'aprecia diferenciació.

Va ser necessari ometre certs caràcters perquè no representaven variabilitat entre les mostres. Per la primera anàlisi es va ometre la forma de les bràctees intermèdies i la forma de l'àpex de les bràctees internes i per la segona PCA, a més, es va ometre la forma de la base de les fulles, ja que totes tenien la mateixa forma, i l'indument de l'apèndix de les bràctees internes. Un cop omesos aquells caràcters que no representen variabilitat entre les mostres es realitzen les anàlisis i es generen els gràfics representatius.

Taula 1. Espècimens inclosos en les anàlisis morfològiques, identificats per espècie. S'inclou la localització, els recol·lectors i la data de recol·lecció.

Rhaponticum berardioides (Batt.) Hidalgo

MARROC:

Azilal: Alt Atlas, ascens des de Amezquer de Arriba fins Tizi-n-Aït-Hamed, 31° 29' 51" N 6° 15' 51" W, 2800 m, glera, 3-VII-1997, J. Güemes 1547 & al. (VAL 41100); ascens des de Amezquer d'Arriba fins a Tizi-n-Aït-Hamed, glera, 31° 29' 51" N 6° 15' 51" W, 2800 m, 3-VII-1997, Güemes 1547 & al. (MA 594448). **Midelt:** Gran Atlas Oriental: Jebel Ayachi, casa forestal de Mitkane, 2200-3000 m, 17-VI-1994, Cabezudo, Nieto, Navas & Toro (MGC 39008); Ari Ayachi, pedra calcària, 3000 m, 29-VII-1923, Humbert (BC 137392); sòl calcàri, 30SUA19, 3000 m, 29-VII-1923, Humbert (BC 137392). **Uarzazate:** El Kelaa des Mgouna, Amesker, Tizi N'Aït Hamad, lleres i penyals calcaris, 2850-3080 m, 17/18-VII-1984, G. López & Muñoz Garmendia (MA 446305).

Rhaponticum coniferum (L.) Greuter

ESPANYA:

Alacant: Torreveija, Almadén cap a la Mata, vessants bosc de *Quercus* (BC 33882). **Albacete:** Alcaraz, 29-IX-1923, Cuatrecasas (BC 33860); Villaverde de Guadalimar, 15-VII-1923, Cuatrecasas (BC 33861); Tobarra, garrigues, 14-VII-1919, Civit com. Font i Quer (BC 33887); Calar del Mundo, 1300 m, 10-VII-1923, Cuatrecasas (BC 33862). **Almeria:** Sierra de Gádor, carretera de Aguadulce a Alhama de Almería (A-391), entre Énix i Alhama de Almería, al nord de Collado, 30SWF34428418, 1002 m, 10-VI-2005, Romo 12998 & Soriano (BC 911940). **Barcelona:** Esparraguera, Masdengall, al voltant de Can Fosalba, 24-VI-1967, Barrau Andreu (BC 612146); Anoia: el Bruc, Serral de les Arnes, CG9085, 620 m, 2-VI-1981, Nuet Badia (BC 918466); Montseny, camí de Vallcarca a Tagamanent, 1,8 km al sud de Tagamanent, camí d'un bosc de pins, 41° 43' 49" N 2° 17' 39" E, 600-700 m, Hilpold 20104036 & Mitterrutzner (BC); Borredà, Riera de Merlès al costat del Pont de Roma, vora la carretera, 31TDG210636, 742 m, prat sec assolellat al costat del talús, 15-VI-2011, Ibáñez s.n. & al. (BC); Parc Natural del Garraf, pel camí, 31TDF07, 20-V-2007, Boršić & Gutiérrez (BC 868024); Terrassa, Sant Julià d'Alta, 7-VII-1976, Ex. Herb. A. Costa (BC 11394); Sant Julià de Vilatorra, VII-1967, Ex. Herb. Masferrer (BC 33870). **Burgos:** Santo Domingo de Silos, erms calcaris, 12-VII-1914, Font i Quer (BC 33867); **Cadis:** Lomas de Higueroa, c. Grazalema, *in Quercetis ilicis*, 1300 m, 14-VII-1925, Font i Quer (BC 76002); Sierra de Cabras, en sòl calcàri, 2-VI-1925, Font i Quer (BC 76001). **Castelló:** Adzeneta del Maestrat, 800 m, 10-VII-1957, A. Bolòs, O. Bolòs & Vives (BC 144789); Sèquia de Castelló, 24-VI-1954, Calduch (BC 128818). **Eivissa:** Puig Sirer, garrigues, 300 m, 18-V-1919, Font i Quer (BC 33888). **Girona:** Cerdanya Pirineus: pendents seques a l'oest d'Isòvol, prats secs sobre esquists, 42° 22' 32" N 1° 48' 50" E, 1050 m, 19-VI-2011, Hilpold 20113286 & Wilham (BC); Roses, Cala Montjoi, brolla, 31TEG17, 145 m, 23-V-1995, del Castillo (BC 914047). **Granada:** Huéscar, pujant a l'Ermida de Las Santas, 30SWG4494, 1100 m, 5-VII-2014, Massó 141 & López-Pujol (BC 941235); Pinos Genil, en pendent argilosa, 800 m, 22-VI-1952, Roivainen (BC 143690). **Jaén:** Siles, passat Las Acebeas, marge del bosc, 38° 22' 01,9" N 2° 34' 45,6" W, 15-VI-2011, Vilatersana 2322 & Garcia-Jacas (BC). **La Rioja:** 0,3 km a l'oest de San Felices de Bilbio, al nord de Haro, hàbitat sec, bosc obert de pins en sòl calcari, 42° 37' 2" N 2° 51' 24" W, 30 m, 2-VII-2009, Hilpold 20093006, Garcia-Jacas & Vilatersana (BC). **Lleida:** Congost de Terradets, riu Noguera Pallaresa, a prop de gran cova, al sud de Tremp, 31TCG2557-2556, 350-400 m, 6-VII-1986, J.M. Montserrat (BC 857031). **Oscà:** part més occidental de Montsec a 0,4 km NNW de Litera, garriga de sòl calcàri, 42° 7' 55" N 0° 38' 22" E, 740 m, 1-VII-2010, Hilpold 201040499 & López-Alvarado (BC). **Ourense:** O'Barco, 19-VII-2011, López-Alvarado s.n. (BC). **Màlaga:** carretera MA-5401 cap al nord de Casarabonela, al sud de la Sierra Alcaparain, 5-VII-2010, Vilatersana 2162, Garcia-Jacas & A. Moreno (BC). **Mallorca:** al nord de Valldemosa, 39° 34' 37,8" N 2° 36' 35,1" E, pineda de pi blanc, 5-VI-2012, López-Pujol 1 & Ren (BC); al nord de Valldemosa, 39° 43' 13,0" N 2° 36' 15,5" E, 6-VI-2012, López-Pujol 4 & Ren (BC). **Múrcia:** entre Cañada de la Cruz i Puerto Hondo, al peu de Revolcadores, 28-VI-2007, Vilatersana 1003 & del Rey (BC). **Sevilla:** Esparteros, Juxta Morón, 24-V-1925, Font i Quer (BC 75985). **Tarragona:** vers Mont-ral, brolla de sòl calcari, 850 m, 29-VI-1953, Masclans & Batalla (BC 598367); Amposta, Tortosa, 1-VI-1934, Font i Quer (BC

82060); Ribera de l'Ebre: Garcia, Pas de l'Ase, 31TCF05, 75 m, herbei prop del riu, marge de la carretera, 30-V-1993, del Castillo (BC 913875). **Teruel:** Serra d'Albarracín, Orihuela del Tremedal, 1936, Sales (BC 642583). **Toledo:** Los Yébenes, 5-VI-2006, Susanna 2639 & Garcia-Jacas (BC). **València:** Xaresa, 28-V-1923, Font i Quer (BC 33902).

FRANÇA:

Còrsega: pujant a la Bocca di Serna des de Ponte Leccia, pendent rocós al costat de la carretera, alzinar esclarissat, 19-07-2012, Carnicero 436 (BC). **Occitània:** entre Lauzerte i Montcuq (França), 44° 18' 12,4" N 1° 10' 39,7" E, bosc de *Quercus* sp., a les esclarissades, 17-VI-2012, López-Pujol 15 & Ren (BC); St. Germain, molt a prop de Millau, 44° 07' 59,2" N 3° 03' 25,5" E, brolla, 18-VI-2012, López-Pujol 17 & Ren (BC). **Roine-Alps:** Lyon, 4-IX-1890, col-lecció Emile Balle Vire (Calv.), Goulard (BC 133013).

ITÀLIA:

Ligúria: Bordighera: en una pineda, 300 m, 27-VII-1905, Bicknell (BC 33876). **Piàmonte:** entre Foresto i Bussoleno, 45° 8' 50" N 7° 7' 36,6" E, sobre una mina de calç, 1-VI-2012, Vilatersana 2400 & Galian (BC). **Sardenya:** Monte Tuttavista, 4 km aprox. de Galtelli, 400 m, vessants pedregosos vora la carretera, 28-V-2011, Susanna 2763 & Garcia-Jacas (BC).

MARROC:

Alhucemas: Al-Hoceima: entre Targust i Beni Hadifa, a 5 km de Beni Hadifa, 35° 01' N 4° 10' W, 1150 m, sòls àcids, vegetació amb *Arbutus unedo* i *Quercus coccifera*, 30-VI-1993, M.J. Díaz 828103, Etlafski & Valdés (BC); Atlas Rifain: Targuist: 34° 57' N 4° 18' W, 5-VI-1924, Font i Quer (BC 814301); entre Targuist i Al Hoceima, vessant nord del Jbel Tarist, pinars clars amb pastures terofítiques silícòles, 35° 30' N 4° 11' 12" W, 1187 m, 5-VI-2004, Romo 12535 & Soriano (BC 910822); Ketama: Badú, 34° 55' N 4° 36' W, 1600 m, 6-VII-1927, Font i Quer (BC 814302). **Azilal:** Beni M'hamed: 35° 8' N 5° 7' W, 5-VII-1932, Font i Quer (BC 814295). **Chefchaouen:** Talembote, Jbel Tazaut, alzinar culminal i pinasapar aclarit a l'obaga, 35° 16' 00" N 5° 7' 24" W, 1650-1720 m, 21-VI-1993, J.M. Montserrat 4229/1, Pallàs & Veny (BC 828104); Rif Oest: Jbel Lakraa, afloraments de roca calcària, 35° 8' 19" N 5° 9' 18" W, 1800-1900 m, 10-VI-1995, Romo 8549/1 & Boratynski (BC 828101); Beni Zekken: el Kreien d'Iest, 35° 13' N 5° 9' W, 11-VII-1930, Font i Quer (BC 814304). **Driouch:** Imoxourene, Jbel Boukhoukhene: 34° 55' 8" N 3° 47' 12" W, 1200-1250 m, matollars clars basòfils, 15-VI-1995, Romo 8747/2 & Boratynski (BC 828102). **Ifrane:** sobre Dayet Iffer, 33° 36' 49" N 4° 55' 18" W, 158m, 2-VII-1996, Romo 10145, Cirujano, Peris, Roselló & Stübing (BC 939200). **Ketama:** Atlas Rifain: Azib de Ketama, 34° 53' N 4° 33' W, 1400 m, 14-VI-1929, Font i Quer (BC 814306); 34° 53' N 4° 33' W, 1600 m, 12-VII-1929, Font i Quer (BC 814307). **Taurit:** Atlas Oriental: a 8 km NE de Debdou, turons entre Sellaouit i Lalla Mimouna, 1 km al sud de Sellaouit, hàbitat mediterrani càlid, màquia pasturada amb *Tetraclinis*, sobre pedra calcària, 34° 1' 10" N 2° 57' 54" W, 200 m, 4-VI-2010, Hilpold 20103117 & Calleja (BC). **Tetuan:** carretera cap a la fàbrica de ciment Lafarge, monticle calcàri a la dreta de la carretera, passat el trencall de Semsá, 35° 35,506' N 5° 25,366' W, 272 m, timoneda amb *Citrus clusii* i *Chamaerops humilis*, 24-VI-2012, Massó 113, Molero & Vilatersana (BC); Djebel Dersa, 35° 36' N 5° 24' W, 20-V-1930, Font i Quer (BC 814303); Djebel Dersa, 35° 36' N 5° 24' W, 5-VI-1924, Font i Quer (BC 814305).

PORTUGAL:

Algarve: Vale do Judeu, 37° 7' 8,3" N 8° 4' 34,4" W, 101 m, 21-VI-2011, Vilatersana 2350 & Garcia-Jacas (BC). **Estremadura:** Sierra del Risco, extrem Oriental, Cabeço do Cabo Alfonso, cresta de roca, formació rupestre, sòl calcari, 200 m, 23-V-1942, Pedro, Fontes & Silva (BC 96681). **Leiria:** Serro Ventoso, Covoa de Fonte-Codoçal, darrera una cantera de marbre, 39° 32' 3,49" N 8° 49' 6,05" W, 550 m, 6-VII-2012, Vilatersana 2424 & del Rey (BC).

Rhaponticum font-queri (Sauvage) Hidalgo

MARROC:

Alhucemas: Tetuan, Bab Taza, refugi de Jbel Lakraa, substrat calcari dolomític, 35° 8' 11,7" N 5° 8' 13,6" W, 16-VI-2008, Quintanar 2719, Andrés, Calvo, Rico & Santos (MA 782476); sobre Bab Taza, alzar esclerissat, pedra calcària, 1640 m, 23-VI-192, Fernández Casas 7251, Muñoz Garmendia, Susanna & Telleria (MA 242771). **Chefchaouen:** Talassemtane, a la fàcies edàfica d'arenisca de Talassemtane, 1510 m, 27-VI-1950, Muñoz (GDA 4998); Hafa Tarira, 35° 6' N 5° 5' W, 10-VII-1993, Font i Quer (BC 814293); Beni Derkul, Bab Ruida, 35° 7' N 5° 9' W, 23-VI-1928, Font i Quer (BC 814297); parc nacional de Talassemtane, pinasapar, 1700 m, 6-VI-2005, Cabezudo & Pérez (MGC 70566). **Gomara:** Djebel Lechchab, Hauta el-Kasdir prop de Lechchab, 35° 8' N 5° 9' W, 1800 m, 9-VII-1932, Font i Quer (BC 814294); Hauta el-Kasdir, prop de Lechchab, 35° 8' N 5° 9' W, 1800 m, 16-VII-1932, Font i Quer (BC 814299).

Població Problema

MARROC:

Azilal: a 15 km al nord d'Azilal per la carretera cap a Afourer, camps de blat a l'esquerra de la carretera, en contacte amb una garriga, 32° 5,411' N 6° 30,170' W, 900 m, 18-VI-2012, Massó 35, J. Molero & Vilatersana (BC); a uns 18 km d'Azilal arribant des del N, brolla oberta de *Cistus*, *Pistacia*, *Tetraclinis* camps no treballats 32° 5' 35,7" N 6° 29' 35,7" W, 1447 m, 3-VI-2011, Galbany-Casals 2225, Carnicero, J.M. Blanco & E. Blanco (BC).

Taula 2. Caràcters morfològics utilitzats en les anàlisis morfològiques del grup *Leuzea* indicant el tipus de variable i el rang establert (QL, qualitatives; QN, quantitatives; SQN, semiquantitatives).

Caràcters morfològics	Tipus	Rang establert
Port	SQN	1: acaule; 2: subacaule; 3: semiescapós; 4: escapós; 5: molt escapós
Ramificació	SQN	1: no; 2: basal; 3: mitja
Número de capitols	QN	
Fulles		
Mitjana de la llargada de les fulles (cm)	QN	
Mitjana de l'amplada de les fulles (cm)	QN	
Mitjana llargada/amplada de les fulles	QN	
Dimorfisme foliar	QL	1: no; 2: sí
Forma de les fulles	QL	1: cordiforme arrodonida; 2: cordiforme allargada; 3: el·líptica; 4: espatulada; 5: lanceolada
Grau de divisió de les fulles	QL	1: enteres; 2: lleugerament pinnatífida; 3: pinnatífida; 4: pinnatipartida; 5: pinnatisecta
Forma de l'àpex de les fulles	QL	1: emarginat; 2: truncat; 3: arrodonit; 4: obtús; 5: agut; 6: acuminat; 7: mucronat
Forma de la base de les fulles	QL	1: atenuada; 2: cordada
Pilositat de l'anvers	SQN	1: glabre; 2: pubescència fina i curta; 3: pubescents; 4: tomentulosa; 5: tomentosa; 6: llanosa
Pilositat del revers	SQN	1: glabre; 2: pubescència fina i curta; 3: pubescents; 4: tomentulosa; 5: tomentosa; 6: llanosa

Capítol		
Mitjana de la llargada dels capítols (cm)	QN	
Mitjana de l'amplada dels capítols (cm)	QN	
Mitjana de la llargada/amplada dels capítols	QN	
Bràctees intermèdies		
Mitjana de la llargada de l'apèndix (cm)	QN	
Mitjana de l'amplada de l'apèndix (cm)	QN	
Mitjana de la llargada/amplada de l'apèndix	QN	
Forma de l'àpex de l'apèndix	QL	1: emarginat; 2: truncat; 3: arrodonit; 4: obtús; 5: agut; 6: acuminat; 7: mucronat
Divisió de l'apèndix	SQN	1: sencer; 2: un parell de talls; 3: lleugerament lacerat; 4: lacerat; 5: dividit
Color de l'apèndix	QL	1: palla clar; 2: palla fosc; 3: palla tacat de violeta; 4: marró clar; 5: marró; 6: marró fosc o vermellós; 7: marró tacat de violeta; 8: violeta; 9: violeta fosc
Indument de l'apèndix	SQN	1: glabre; 2: pubescència fina i curta; 3: pubescents; 4: tomentulosa; 5: tomentosa; 6: llanosa
Bràctees internes		
Mitjana de la llargada de l'apèndix (cm)	QN	
Mitjana de l'amplada de l'apèndix (cm)	QN	
Mitjana de la llargada/amplada de l'apèndix	QN	
Color de l'apèndix	QL	1: palla clar; 2: palla fosc; 3: palla tacat de violeta; 4: marró clar; 5: marró; 6: marró fosc o vermellós; 7: marró tacat de violeta; 8: violeta; 9: violeta fosc
Indument de l'apèndix	SQN	1: glabre; 2: pubescència fina i curta; 3: pubescents; 4: tomentulosa; 5: tomentosa; 6: llanosa

3.2. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI MOLECULAR

Material analitzat

S'han analitzat un total de 7 individus de les diferents espècies i poblacions: 3 individus de *Rhaponticum coniferum*, 2 individus de *R. font-queri*, 1 individu de *R. berardioides* i 1 individu de la mostra problema (Taula 4).

Extracció

L'extracció de DNA s'ha fet seguint dos mètodes: CTAB (Doyle & Dickson, 1987) modificat per Cullings (1992) i Tel-Zur et al. (1999), per a les mostres de *R. coniferum* i *R. berardioides*; i amb *E.Z.N.A.® SP Plant DNA Kit* (Omega Bio-tek Inc., Norcross, GA, USA) per les mostres de *Rhaponticum font-queri*.

Per iniciar l'extracció es pesen entre 16 i 20 mg de fulla assecada en silica-gel o de plec d'herbari de cadascun dels individus i s'elimina el seu indument per tal que la mostra quedi neta i sense impureses. Es tritura les mostres amb un molinet de boles Retsch MM301 (Retsch GmbH, Haan,

Alemanya) de manera que el tampó pugui penetrar a les cèl·lules. El mètode CTAB modificat inclou tres rentats amb tampó de sorbitol (Tel-Zur et al., 1999) per extreure el DNA d'un trosset de fulla. L'extracció amb *kit* consisteix en una sèrie de rentats amb els *buffers* SP1, SP2 i SP3.

En tots dos casos és necessària l'addició de *RNAase* (Omega Bio-tek) per degradar el RNA en ribonucleics més petits i que no siguin detectats en l'electroforesi (Tel-Zur et al., 1999).

Per analitzar les mostres de DNA es requereix l'ús de l'espectofotòmetre (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), d'on s'obté la concentració de DNA en ng/ μ l, l'absorbància del DNA mesurada amb la ràtio DO_{260}/DO_{280} i l'absorbància de les proteïnes amb DO_{260}/DO_{230} , aquestes relacions determinen la puresa d'àcids nucleics de la mostra.

DNA Clean & Concentrator

El protocol de neteja *DNA Clean & Concentrator* (Zymo Research, Irvine, CA, USA) serveix per eliminar les impureses de la mostra de DNA. S'utilitza quan el nivell de DNA és baix o el nivell de proteïnes i metabòlits secundaris, que poden intervenir en el procés d'amplificació, és alt.

Tot i haver fet servir aquest protocol per a una de les mostres de *R. berardioides* (MGC 39008), l'amplificació no va donar resultat i per això només tenim l'anàlisi molecular d'una mostra d'aquesta espècie en l'estudi.

Amplificació de la regió ETS del DNA ribosòmic nuclear (nrDNA)

La regió ETS (*External Transcribed Spacer*, Figura 6) és un espaiador intergènic i, per tan, no s'expressa.

Es realitza una amplificació per una PCR, reacció en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*) mitjançant un *mix* de volum final 25 μ l. La composició del *mix* és: 14,3 μ l aigua destil·lada, 2,5 μ l 10x *AmpliTaQ Buffer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2,5 μ l 25mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems), 2,5 μ l 2mM dNTPs (Applied Biosystems), 1 μ l d'ambdós encebadors *forward* ETS1F i *reverse* 18S-2L (Linder et. al., 2000; veure la Taula 3), 1 μ l de BSA (*Bovine Serum Albumine*; New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) i 0,2 μ l *AmpliTaQ DNA polymerase* (Applied Biosystems).

Amb 3 μ l de mostra enrasem amb el *mix* fins a 25 μ l, i seguidament es posen les mostres al termociclador amb cicles de temperatura d'inici a 95°C, 30 repeticions de 45 segons a 94°C, 45 segons a 50°C i 45 segons a 72°C; i un cicle final de 10 minuts a 72°C.

Un cop acabada la PCR es passa a la comprovació de les mostres, tenyides amb blau de metilè, amb una electroforesi amb gel d'agarosa 1,2%. El marcador de parelles de bases és *HyperLadder 1kb* (Bioline, Londres, Regne Unit) i es revelen amb el transil·luminador.

Per a la preparació del gel d'agarosa s'utilitzen 25 ml de solució d'agarosa al 1,2%, a la qual s'afegeixen 2,5 μ l de *SYBR Safe* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); substància quelant del DNA que permet que es vegi amb llum ultraviolada.



Figura 6. Esquema i posició de la regió ETS i dels encebadors usats (*External Transcribed Spacer*) (segons esquema de Linder et al., 2000).

Clonatge

Els productes de la PCR són utilitzats per fer un clonatge amb el *TOPO TA Cloning*[®] Kit (Invitrogen). Amb la reacció de transformació s'introdueixen les mostres amplificades en cèl·lules d'*Escherichia coli* (*E. coli*), mitjançant el TOPO vector.

Per al clonatge és necessària la preparació del medi de cultiu per les cèl·lules en plaques de Petri amb LB-agar.

S'inicia el procés amb una incubació partir d'una *Taq-mix* de 0,9 µl *AmpliTaq DNA polymerase* (Applied Biosystems) i 5,4 µl d'aigua destil·lada, per a 8 mostres. S'afegeix 0,5 µl de *mix* a cada mostra i es deixen al termociclador durant 15 minuts a 72°C.

El lligament del DNA dins del plasmidi es fa amb 0,5 µl de TOPO vector, 0,5 µl de *Salt Solution* (1,2 M NaCl i 0,06 M MgCl₂) i 1 µl de producte de PCR amb 1 µl d'aigua destil·lada. Es deixa reposar durant 30 minuts.

En la reacció de transformació s'afegeix 1 µl de producte de reacció en 25 µl de cèl·lules d'*E. coli* i es deixa reposar en gel durant 20 minuts. Passat aquest temps es realitza un xoc tèrmic de 45 segons a 42°C per permetre la inserció del DNA dins del plasmidi, i es deixa en gel 2 minuts.

A cada mostra s'afegeix 125 µl de medi nutritiu SOC (Invitrogen) i s'incuben a 37°C durant una hora i mitja a 200 rpm. Un cop passat aquest temps, es procedeix a la sembra de les cèl·lules en les plaques LB-agar, que es treuen de l'estufa. Per cada espècie s'utilitzen dues plaques on es sembren 50 µl i 80 µl de cèl·lules respectivament. Es deixen incubar 24 hores a l'estufa a 37°C.

Només creixeran les cèl·lules que hagin incorporat el vector, perquè el TOPO vector conté gens de resistència a l'ampicil·lina (*Ampicillin Sodium Salt*, Sigma-Aldrich Company, Schnelldor, Alemanya), antibiòtic que s'ha afegit en la preparació de les plaques LB-agar.

Es piquen 8 colònies de cada placa amb una punta, 16 colònies de cada espècie, i es realitza una PCR amb un *mix* format per 14,3 µl d'aigua destil·lada, 2,5 µl 10x *AmpliTaq Buffer* (Applied Biosystems), 2,5 µl 25mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 2,5 µl 2mM dNTPs (Applied Biosystems), 1 µl d'encebador M13 i 1 µl d'encebador T7 (veure Taula 3), 1 µl de DMSO (Dimetil sulfòxid 99,9%) i 0,2 µl *AmpliTaq DNA polymerase* (Applied Biosystems).

Els cicles de temperatura d'aquesta PCR són: un inici de 10 minuts a 94°C, 30 repeticions del cicle: 30 segons a 94°C, 1 minut a 55°C i 2 minuts 72°C; i un cicle final de 10 minuts a 72°C.

Es comproven els resultats amb gel d'agarosa 1,2%, i amb marcador de bases *HyperLadder 1kb* (Bioline) i es revela al transil·luminador.

Com que la vida útil de les plaques de Petri és limitada, es realitzen alíquotes per poder repetir, si calgués, les PCR. S'utilitzen 8 colònies per placa, 16 colònies per espècie, i en aquest cas es barregen amb 10 µl d'aigua destil·lada, per conservar al congelador a -20°C.

Taula 3. Parelles d'encebadors utilitzats en aquest estudi per la regió ETS i en la reacció de clonatge.

Reacció	Primers	Direcció	Seqüències (5' - 3')	Referència
ETS	ETS1F	<i>Forward</i>	CTT TTT GTG CAT AAT GTA TAT ATA GGG GG	Linder et al. (2000)
	18S-2L	<i>Reverse</i>	ACT TAC ACA TGC ATG GCT TAA TCT	Linder et al. (2000)
Clonatge	T7	<i>Forward</i>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	T7 promotor (Encebador universal)
	M13	<i>Reverse</i>	CAG GAA ACA GCT ATG AC	M13 <i>reverse</i> (Encebador universal)

Purificació

Es purifiquen les mostres amplificades en la PCR de la clonació amb el *kit* QIAquick® PCR Purification (QIAGEN Group, Hillde, Alemanya). Es realitzen tres rentats amb buffer PBI, buffer PE i buffer EB en una *spin column*, és una columna que conté una membrana selectiva que permetrà separar els diferents components.

Seqüenciació

Les mostres purificades s'envien a l'empresa MacroGen (Amsterdam, Països Baixos) que en realitzarà la seqüenciació mitjançant el mètode Sanger (Sanger et al., 1977), on es marca cada monòmer de DNA amb una molècula fluorescent diferent de manera que es pot determinar l'ordre dels nucleòtids.

Anàlisi de les seqüències

Un cop rebudes les seqüències es procedeix a l'ajustament manual utilitzant el programa *BioEdit* v.7.0.5.3 (Hall, 1999). Amb aquest programa s'inclouen insercions i deleccions (*gaps*) per que les bases quedin aparellades, i així crear una matriu per a una posterior anàlisi. Amb la matriu creada es poden observar els canvis entre les seqüències de les diferents espècies i els clons d'una mateixa espècie.

Per a tots els anàlisis s'han utilitzat dos *outgroups*: *Rhaponticum exaltatum* (Willk.) Greuter i *Rhaponticum acaule* (L.) DC. Aquestes dues espècies s'han escollit seguint el treball d'Hidalgo et al. (2006), sent les espècies més properes genèticament al grup estudiat, anteriorment considerat un gènere diferent, *Leuzea*, format per *R. berardioides*, *R. coniferum* i *R. font-queri*. Les seqüències dels dos *outgroups* s'han obtingut de *GenBank* (Taula 4).

Per l'anàlisi en xarxa (*network*) s'ha utilitzat el programa *SplitsTree4 v.4.13.1* (Huson & Bryant, 2008), aquesta anàlisi agrupa les seqüències, de 876 bases, segons les seves similituds genètiques mitjançant el mètode *Neighbor-net* (Bryant & Moulton, 2004) i usant les distància genètica *uncorrected-p*.

L'anàlisi filogenètica de màxima parsimònia (MP) s'ha fet amb el programa *PAUP* v.4.0a* (Swofford, 2002), excloent els caràcters no informatius. La recerca heurística s'ha fet amb 1.000 rèpliques d'addició de tàxons a l'atzar, TBR (*Tree bisection reconnection*) i *branch swapping*. Per avaluar la robustesa de l'arbre consens (*strict consensus*), s'han computat els valors descriptius següents: l'índex de consistència (CI), l'índex de retenció (RI) i l'índex d'homoplàsia (HI) i l'índex de consistència reescalada (RC). Després de calcular l'arbre més parsimoniós, s'ha fet l'anàlisi *bootstrap* (BS; Felsenstein, 1985). El valor de suport del *bootstrap* es consideren significatius en els nodes amb $BS \geq 70\%$.

L'anàlisi de inferència bayesiana (IB) s'ha dut a terme amb *MrBayes v.3.2.5 x64* (*Bayesian analysing for phylogeny*; Ronquist et al., 2012). S'ha hagut d'esbrinar el millor model d'evolució molecular per l'anàlisi utilitzant els criteris AIC (*Akaike Information Criterion*) i BIC (*Bayesian information criterion*), implementats en el programa *JModelTest v.0.1.1* (Guindon & Gascuel, 2003; Posada, 2008) Es van iniciar les anàlisis d'IB amb arbres aleatoris i es van executar durant 15×10^6 generacions. Es van córrer dues anàlisis de quatre cadenes *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) i hem salvat un arbre de cada 1.000 generacions, que ha donat lloc a 15.000 arbres de mostra. Les dades de les primeres 3.750 generacions es van descartar (*burn in* del 25%), després d'haver confirmat que els valors de verosimilitud s'havien estabilitzat abans de la generació 3.750. Per la resta d'arbres, s'ha calculat l'arbre consens 50% *majority rule* i la probabilitat posterior (PP), es consideren significatius els nodes amb una $PP \geq 0,95$.

Taula 4. Poblacions usades del gènere *Rhaponticum* grup *Leuzea* en l'estudi molecular de la regió ETS, on s'especifica l'origen del material, el número de població, el recol·lector, l'herbari i el número de *GenBank*.

Espècie	Població	Dades testimoni	ETS <i>accession</i>
<i>R. font-queri</i> (Sauvage) Hidalgo	1	MARROC: Hidalgo & Romo 12621 (BC)	aquest estudi
<i>R. font-queri</i> (Sauvage) Hidalgo	2	MARROC: Cabezudo & Pérez (MGC 70566)	aquest estudi
<i>R. berardioides</i> (Batt.) Hidalgo	---	MARROC: Hidalgo & Romo 12749 (BC)	aquest estudi
<i>R. coniferum</i> (L.) Greuter	1	FRANÇA: Galian & Vilatersana 2409 (BC).	aquest estudi
<i>R. coniferum</i> (L.) Greuter	2	ALGÈRIA: Aldasoro 20039 (BC)	aquest estudi
<i>R. coniferum</i> (L.) Greuter	3	MARROC: Massó 113, Molero & Vilatersana (BC)	aquest estudi
Problema	---	MARROC: Galbany-Casals 2225, Carnicero, J.M. Blanco & E. Blanco (BC).	aquest estudi
Outgroups	Dades testimoni		ETS <i>accession</i>
<i>R. exaltatum</i> (Willk.) Greuter	ESPANYA: Garcia-Jacas & Susanna 2434 (BC)		DQ311003
<i>R. acaule</i> (L.) DC.	ALGÈRIA: J.M. Montserrat 2331 (BC)		DQ310995

3.3. ÈTICA I SOSTENIBILITAT

Tot el material utilitzat en el laboratori ha estat prèviament esterilitzat i els residus s'han tractat de forma correcta. Els materials amb substàncies biològiques, aquells utilitzats en el clonatge, s'han autoclavat dins de bosses de plàstic per evitar vessaments, abans de llençar-los al contenidor. Els dissolvents utilitzats en les extraccions són emmagatzemats i cada sis mesos una empresa especialitzada els recull i en fan el tractament oportú.

El material d'herbari ha estat recol·lectat i premsat prèviament, qualsevol plec nou o provinent d'un altre herbari s'ha de congelar durant tres setmanes abans de poder examinar, per evitar l'expansió d'insectes i fongs.

4. RESULTATS

4.1. ESTUDI MORFOLÒGIC

A partir de l'anàlisi PCA fet amb el programa *IBM SPSS Statistics* s'han realitzat uns gràfics per interpretar la variabilitat entre espècies.

La primera anàlisi (PCA1) es va realitzar per a les tres espècies del grup *Leuzea* i la mostra problema, obtenint la Figura 7. Aquest gràfic expressa un 46% de la variabilitat total entre les espècies estudiades, i es revelen tres grups diferenciats: *Rhaponticum font-queri*, *R. berardioides* i el complex format per *R. coniferum* i l'espècie problema. El primer eix explica la separació entre el complex format per *R. coniferum* i l'espècie problema amb les altres dues espècies, explicant un 33,6% de la variabilitat total. Els caràcters que expliquen la variabilitat en aquest primer eix són la llargada i l'amplada de l'apèndix de les bràctees intermèdies, la llargada del capítol, el port i el grau de divisió de les fulles. El segon eix comptabilitza un 13,6% de la variabilitat total i permet separar *R. berardioides* de *R. font-queri*, principalment a causa de l'indument de les bràctees intermèdies i de les internes.

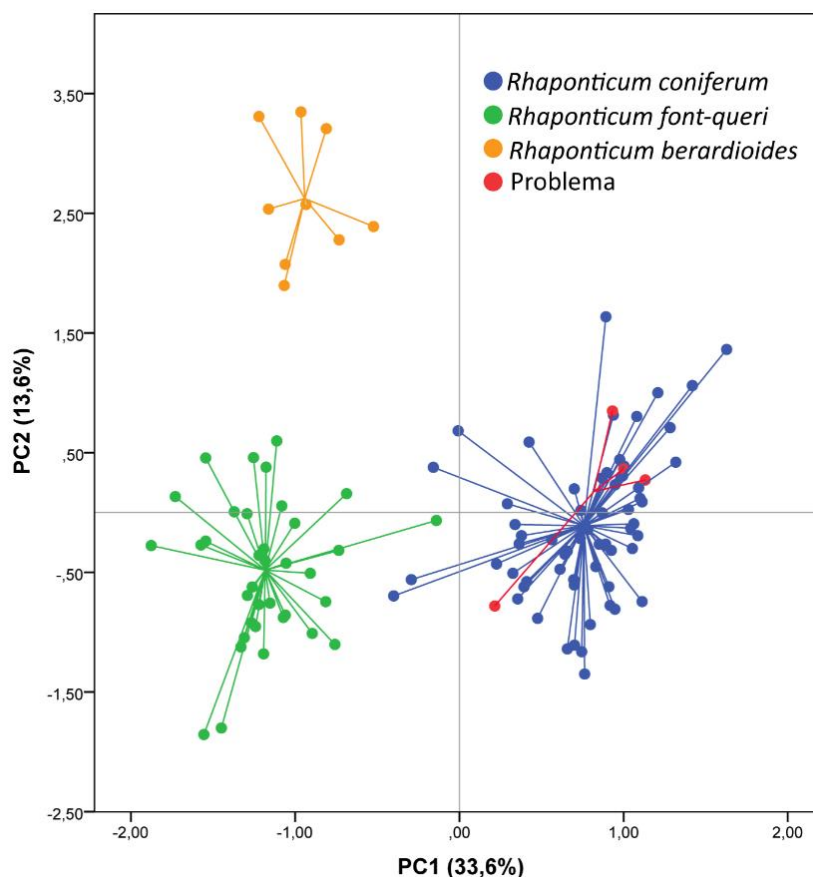


Figura 7. Anàlisi de Component Principal (PCA1) que mostra la variabilitat morfològica entre *R. coniferum*, *R. font-queri*, *R. berardioides* i la mostra problema.

La segona anàlisi (PCA2) s'ha centrat en *R. coniferum* i la mostra problema, obtenint la Figura 8A que explica un 31,1% de la variabilitat total. Els caràcters que expliquen la variabilitat en el primer eix (17,2% de la variabilitat) són la llargada i l'amplada dels apèndixs de les bràctees intermèdies, l'amplada del capítol i l'amplada de l'apèndix de les bràctees internes. El segon eix explica un 13,9% de la variabilitat total deguda a la forma de les fulles, la pilositat del revers de les fulles i el color de l'apèndix de les bràctees internes.

A més s'ha realitzat un tercer gràfic (Figura 8B) afegint un tercer eix que explica un 9,9% de la variabilitat obtinguda deguda principalment al dimorfisme foliar, el grau de divisió de les fulles i la forma de l'àpex de les fulles.

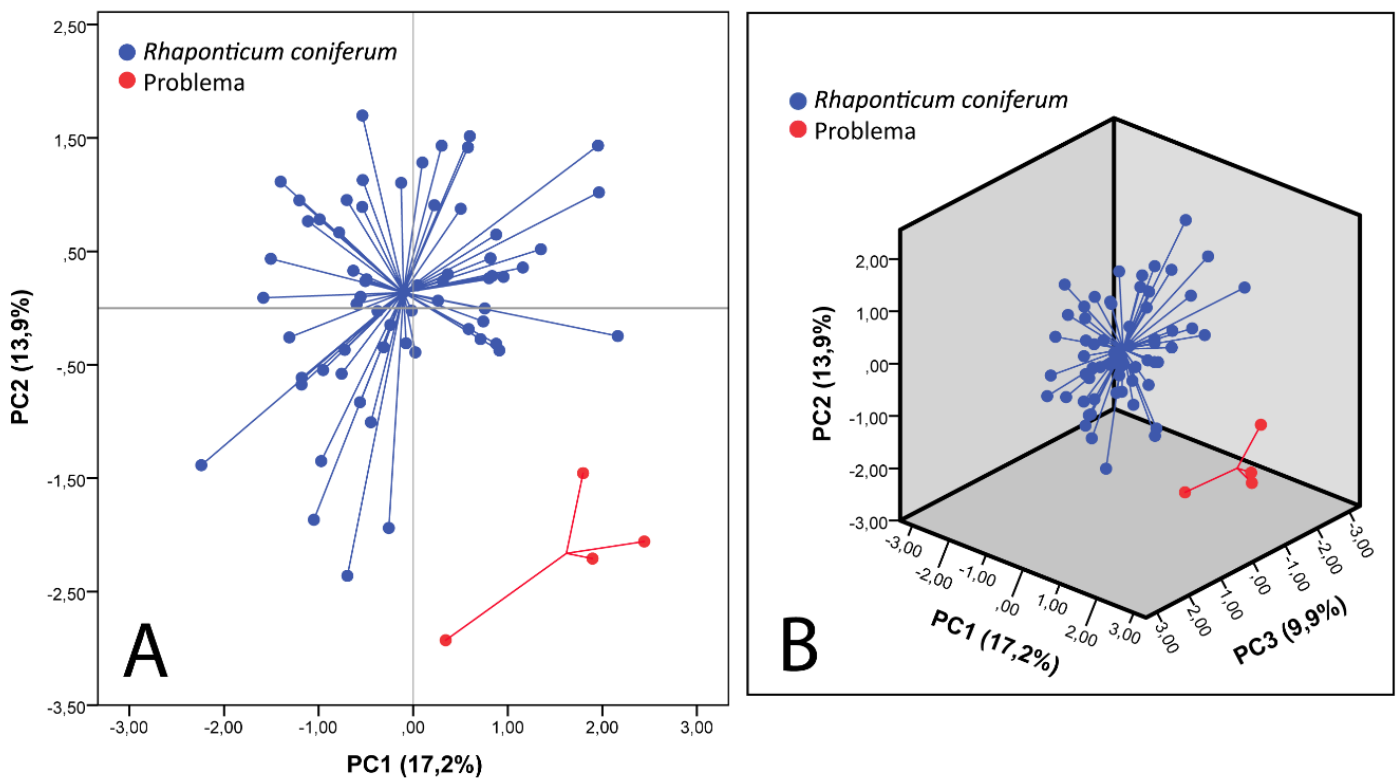


Figura 8. Anàlisi de Components Principals (PCA2) on es mostra la variabilitat morfològica entre *R. coniferum* i la població problema. **A**, gràfic en dos eixos. **B**, gràfic en tres eixos.

4.2. ESTUDI MOLECULAR

Representació en xarxa i anàlisi filogenètica

Les relacions filogenètiques entre les mostres s'han representat en una xarxa mitjançant el mètode *Neighbor-net* (Figura 9).

S'observen cinc grups: el primer format per les dues espècies utilitzades com a *outgroups*, el segon grup format per *R. berardioides* clarament diferenciat de la resta; i per altra banda es poden diferenciar tres grups més, el primer amb les poblacions de *R. coniferum* i la mostra problema, el segon amb *R. font-queri* i un clon tan de la mostra problema com de la població de *R. coniferum* del Marroc (població 3); i per últim els altres dos clons de *R. coniferum* de Marroc que queden separats de la resta.

Amb les anàlisis filogenètiques de Inferència Bayesiana (IB) i de Màxima Parsimònia (MP) s'ha obtingut un filograma (Figura 10).

Segons el criteri AIC implementat amb *JModelTest* el model evolutiu que millor s'ajusta a les dades obtingudes és el model GTR+I+G. L'anàlisi MP ha proporcionat 231 arbres de 92 passos en una illa, amb 56 caràcters informatius, a més dels següents paràmetres: l'índex de consistència (CI) és de 0,652, l'índex d'homoplàsia (HI) és de 0,348, l'índex de retenció (RI) equival a 0,859 i l'índex de consistència reescalada (RC) és de 0,560. L'arbre més parsimoniós de PAUP presenta una tipologia similar a la obtinguda amb la Inferència Bayesiana.

El filograma obtingut amb l'anàlisi de inferència bayesiana (Figura 10) amb els suports de la probabilitat posterior (PP) i els valors de *bootstrap* (BS), revela cinc clades amb les mostres estudiades, a part de les dues espècies utilitzades com a *outgroups*. S'observen dos grups clarament diferenciats: el de *R. berardioides* i els dos clons de *R. coniferum* de Marroc (població 3), tots dos amb suport. A més, veiem tres clades sense suport, un clade únicament format per clons de *R. font-queri*, un altre grup format per clons de la mostra problema i de *R. coniferum*; i per últim un clade format tan per clons de la mostra problema, com clons de *R. font-queri* i un clon de *R. coniferum* marroquí. Amb aquest últim clade es pot percebre que l'espècie de *R. font-queri* a part de tenir una còpia pròpia té una còpia que comparteix amb *R. coniferum* i amb la mostra problema.

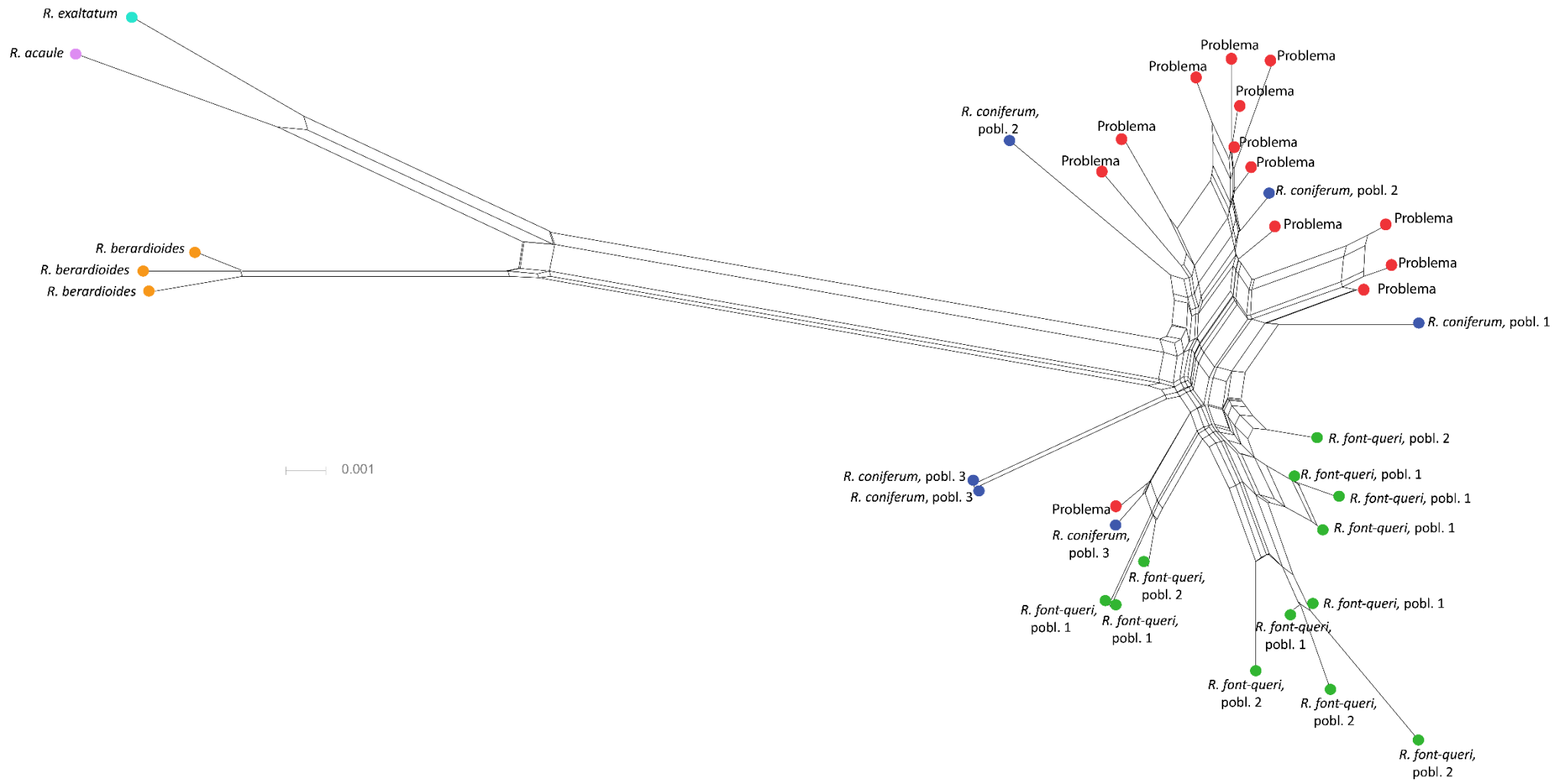


Figura 9. Gràfic en xarxa obtingut amb el mètode *Neighbor-net* dels 34 clons analitzats del grup *Leuzea* i dues espècies addicionals com a *outgroup*, *Rhaponticum acaule* i *Rhaponticum exaltatum*.

5. DISCUSSIÓ

La taxonomia integrativa ens ha permès aclarir les relacions del grup *Leuzea* i establir una categoria taxonòmica per a la població problema. Aquesta eina multidisciplinària, ens ha ajudat a establir els límits i l'evolució de l'especiació dins del grup *Leuzea* d'una forma més clara i amb més rigor, ja que hem pogut suplir les deficiències que cada mètode, de forma individual, pugui tenir. Dins de les plantes superior la idoneïtat de la taxonomia integrativa ja s'havia usat en el gènere *Orinus* (Su et al., 2015), en el complex *Helichrysum pendulum* (Herrando-Moraira et al., 2017) i en *Cynara baetica* (Massó et al., in prep).

Rhaponticum berardioides es separa clarament de la resta d'espècies tan morfològica com genèticament. Els trets més distintius que la diferencien de *R. coniferum* és el port, i la mida (llargada i amplada) de l'apèndix de les bràctees intermèdies i del capítol. En comparació amb *R. font-queri*, té les fulles més grans i presenta indument dens en les bràctees. En les anàlisis moleculars es confirma la separació de *R. berardioides* en un clade totalment diferenciat de la resta, tan en la xarxa *Neighbor-net* (Figura 9) com en el filograma (Figura 10).

Rhaponticum font-queri es separa morfològicament de les altres dues espècies, el que més la diferencia de *R. coniferum* és el port, la mida més petita dels capítols i el color blanquinós de les bràctees. En l'anàlisi molecular les seqüències de *R. font-queri* formen un clade propi, malgrat que en el filograma (Figura 10) els suports són baixos, ja que la probabilitat posterior (PP) és menor de 0,95. També observem un cert grau d'introgressió amb la població de *R. coniferum* de Marroc (població 3) i la població problema, ja que comparteixen seqüències, com es veu de forma clara en la xarxa *Neighbor-net* (Figura 9).

En el nostre estudi s'ha comprovat que *Rhaponticum coniferum* és una espècie molt polimòrfica, encara que forma una entitat específica independent dels altres dos taxons estudiats.

La població problema té trets morfològics propis i diferenciables de *R. coniferum*, però que no li confereixen una independència total (Figura 8), aquests són la ramificació de la tija i la forma de les fulles. Generalment, *R. coniferum* té una tija simple o ramificada des de la base, però la mostra problema està ramificada des de mitja altura en nombroses tiges. Les fulles són lanceolades mentre que en *R. coniferum* són el·líptiques. Molecularment no són diferenciables, tan en la xarxa *Neighbor-net* (Figura 9) com en el filograma (Figura 10) les trobem en un mateix grup.

Proposta taxonòmica

Amb els resultats obtinguts en aquest estudi, considerem que el criteri taxonòmic més adient és el proposat per Hidalgo et al. (2016), és a dir, mantenir *R. coniferum*, *R. berardioides* i *R. font-queri* com espècies separades, tan per la seva morfologia com genèticament.

Respecte a la població problema, els nostres resultats suggereixen la seva subordinació dins de *R. coniferum* amb el rang de subespècie. Creiem que no li podem conferir un rang específic, donat que genèticament no la podem diferenciar de *R. coniferum*, ja que les seqüències comparteixen clade (Figures 9 i 10) i que la majoria dels caràcters morfològics s'engloben dins

el rang de *R. coniferum* (Figura 7). No obstant, al analitzar-la solament amb *R. coniferum* (Figures 8A i 8B) sí trobem certes diferències sobretot a nivell de fulles i de ramificació.

En una futura publicació en una revista científica es descriurà la població problema com a subespècie de *R. coniferum*.

6. CONCLUSIONS

The results of this study using integrative taxonomy show that:

1. The three species are maintained as proposed by Hidalgo et al. (2006).
2. *Rhaponticum coniferum* (L.) Greuter is a very polymorphic species with a large distribution.
3. *Rhaponticum berardioides* (Batt.) Hidalgo is a separate entity from the other species both molecularly as morphologically, mainly because of the size of middle bracts and indument of bracts.
4. *Rhaponticum font-queri* (Sauvage) Hidalgo is not separated entirely from *R. coniferum*, but tends towards a speciation. Morphologically, it is different by the size of the capitulum and the whitish colour of bracts.
5. We propose a subspecies rank subordinate to *R. coniferum* to the problem population.

7. BIBLIOGRAFIA

Baldwin, B.G. & Markos, S. (1998). Phylogenetic utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10, 449–463.

Battandier, J.A. (1919). *Contributions à la Flore Atlantique*. Paris: Librairie Klincksieck.

Bryant, D. & Moulton, V. (2004). Neighbor-net: An agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 255–256.

Calleja, J.A., Garcia-Jacas, N. Roquet, C. & Susanna, A. (2016). Beyond the Rand Flora pattern: Phylogeny and biogeographical history of *Volutaria* (Compositae). *Taxon*, 65, 315–332.

Cullings, K.W. (1992). Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology*, 1, 233–240.

Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of Linnean Society*, 85, 407–415.

Dittrich, M. (1984). Neukombinationen in der Gattung *Stemmacantha* Cass. (Compositae) mit Bemerkungen zur Typisierung einigen ihrer Arten. *Candollea*, 39, 45–49.

Doyle, J.J. & Dickson, E.E., (1987). Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*, 36, 715–722.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.

Fennane, M. (2007). *Rhaponticum* Vaill. Dins *Flore pratique du Maroc: Manuel de détermination des plantes vasculaires, v. 3 Dicotyledones (p.p), Monocotyledones* (p. 127–130). Agdal, Rabat: Institut Scientifique, Université Mohammed V.

Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Garnatje, T., Vilatersana, R. (2001). Generic delimitation and phylogeny of the subtribe Centaureinae (Asteraceae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Annals of Botany*, 87, 503–515.

Greuter, W. (2003). The Euro+Med treatment of Cardueae (Compositae): generic concepts and required new names. *Willdenowia*, 33, 49–61.

Greuter, W., Aghababian, M., Wagenitz, G. (2005). Vaillant on Compositae: systematic concepts and nomenclatural impact. *Taxon*, 54, 149–174.

Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696–704.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.

Herrando-Moraira, S., Carnicero, P., Blanco-Moreno, J.M., Sáez, L., Véla, E., Vilatersana, R. & Galbany-Casals, M. (2017). Systematics and phylogeography of the Mediterranean *Helichrysum*

pendulum complex (Compositae) inferred from nuclear and chloroplast DNA and morphometric analyses. *Taxon*, 66, 909–933.

Hidalgo, O., Garcia-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. *Annals of Botany*, 97, 705–714.

Holub, J. (1973). Contribution to the taxonomy and nomenclature of *Leuzea* DC. and *Rhaponticum* auct. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 8, 377–395.

Huson, D.H., Bryant, D. & Loepper, T. (2008). SplitsTree 4.0: Computation of phylogenetic trees and networks. *Bioinformatics*, 14, 68–73.

Jahandiez, E. & Maire, R. (1934). *Leuzea* DC. Dins *Catalogue des plantes du Maroc* (p. 820–821). Alger: Imprimerie Minerva.

Linder, C.R., Goertzen, L.R., Heuvel, B.V., Francisco-Ortega, J. & Jansen, R.K. (2000). The complete External Transcribed Spacer of 18S-26S rDNA: Amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in Asteraceae and closely allied families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14, 285–303.

López Martínez, J., Devesa, J.A. & Crespo, M.B. (2014). *Rhaponticum* Vaill. Dins *Flora Iberica*, v. XVI (I) (p. 279–289). Madrid: CSIC.

Padial, J.M. (2007). *Taxonomía integrativa de las especies de Eleutherodactylus y Oreobates de Bolivia*. Tesis doctoral Universidad de Granada. Recuperat de <http://digibug.ugr.es/handle/10481/1567>

Posada, D. (2008). JModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253–1256.

Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74, 5463–5467.

Sauvage, C. (1968). Notes de floristique rifane. *Collectanea Botanica*, 7, 1091–1104.

Su, X., Wu, G., Li, L. & Liu, J. (2015). Species delimitation in plants using the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Orinus* (Poaceae: Tridentinae) as an example. *Annals of Botany*, 116, 35–48.

Swofford, D.L. (2002). PAUP*: *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates.

Tel-Zur, N., Abbo, S., Mysladbodksi, D. & Mizrahi, Y. (1999). Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter*, 17, 249–254.