

**Relacions taxonòmiques i  
evolutives entre diverses espècies  
de saladines, endèmiques de Balears**

Josep A. Rosselló

Jardí Botànic  
Universitat de València  
C/Quart 80  
46008 València

# Índex

	pàgina
1. Introducció	3
1.1 Diversitat taxonòmica i fitogeografia	3
1.2 El sistema reproductiu: sexualitat i apomixis	6
1.3 Nombre de cromosomes	8
2. Objectius	12
3. Material i Mètodes	15
3.1 Material	15
3.2 Mètodes	15
3.2.1. Determinació del nombre de cromosomes	15
3.2.2. Hibridació fluorescent in situ (FISH)	17
3.2.3 Protocols d'extracció d'ADN genòmic	18
3.2.4 Els espaiadors ribosomals ITS	19
3.2.4.1 Condicions experimentals	19
4. Resultats	21
4.1 Nombre de cromosomes	21
4.2 Morfologia dels cromosomes	24

4.3 Distribució dels gens ribosomals 45S i 5S als cromosomes	<b>28</b>
4.4 Seqüències dels espaiadors ITS nuclears	<b>40</b>
5. Conclusions	<b>43</b>

## 1. Introducció

Fruit d'una assistència tècnica contractada per la Conselleria de Medi Ambient del Govern de les Illes Balears i desenvolupada pel Jardí Botànic de la Universitat de València s'ha procedit a efectuar una recerca encaminada a analitzar la singularitat taxonòmica i les relacions evolutives existents entre deu espècies de saladines considerades com a endemismes de Mallorca (*Limonium boirae* L. Llorens & Tebar, *L. carvalhoi* Rosselló, L. Sáez & Carvalho, *L. ejulabilis* Rosselló, Mus & Soler, *L. inexpectans* L. Sáez & Rosselló, *L. magallufianum* L. Llorens, *L. barceloi* Gil & L. Llorens, *L. pseudodyctyocladon* L. Llorens, *L. antoni-llorensii* L. Llorens, *L. leonardi-llorensii* L. Sáez, Carvalho & Rosselló, *L. migjornense* L. Llorens) o de Gimnèsies (*L. fontqueri* (Pau) L. Llorens).

Per a una millor comprensió dels resultats i les conclusions que s'exposaran més endavant, creiem oportú aportar una visió introductòria sobre la problemàtica de la taxonomia dels gènere a la Mediterrània Occidental, els mecanismes evolutius implicats en la seva diversificació, i el concepte d'espècie en *Limonium* a la llum de les dades citogenètiques i moleculars conegudes.

### 1.1 Diversitat taxonòmica i fitogeografia

Un dels gèneres d'angiospermes més rics en espècies de la conca mediterrània és *Limonium*. De fet, més de cent taxons (sexuals i apomíctics,

veure més abaix), de les aproximadament 500-700 espècies en que s'ha estimat la diversitat a nivell mundial, s'han indicat a les diferents illes i arxipèlags mediterranis. Aquestes espècies tenen un paper prou important en la composició i dinàmica dels ecosistemes litorals (penya-segats costers i saladars) a la conca mediterrània.

Les illes presenten la més diversitat d'espècies creixent a la conca mediterrània. Més d'un 50% de la diversitat del gènere en aquesta àrea es restringeix a territoris insulars. Els arxipèlags occidentals i centrals (Illes Balears, Còrsega, Sardenya, Sicília i illes menors) tenen una riquesa major d'espècies de *Limonium* que aquells que es troben situats a l'est, on la flora *Limonium* d'illes relativament grans com Creta o Xipre no arriba a 20 espècies. Tanmateix, les illes i els illots mediterrànies no només són destacables per a la seva riquesa d'espècies, sinó per la distribució molt restringida de la majoria d'espècies que hi són presents. Per exemple, més de quinze taxons [*L. parvifolium* (Tineo) Pignatti, *L. planesiae* Pignatti, *L. savianum* Pignatti, *L. gorgonae* Pignattii, *L. dianium* Pignatti, *L. tenuiculum* (Tineo) Pignatti, *L. albidum* (Guss.) Pignatti, *L. intermedium* (Guss.) Brullo, i *L. aegusae* Brullo a la Mediterrània Occidental, i *L. zacynthium* Artelari, *L. pithosianum* Artelari, *L. arcuatum* Artelari, *L. cephalonicum* Artelari, *L. antipaxorum* Artelari, i *L. damboldtianum* Phitos & Artelari a la Mediterrània oriental] creixen en petites illes i illots d'àrea molt reduïda. Típicament, altes taxes d'endemicitat molt caracteritzen la flora de

*Limonium* de moltes de les illes mediterrànies. La proporció d'endemismes illencs oscil·la, entre els valors més baixos de Xipre (un 25%) i els arxipèlags altament diversificats de les illes Balears, de Sardenya i Còrsega (81,1-86,5%). De fet, molt poques espècies són comunes a dos o més arxipèlags. Només *L. avei* (De Not.) Brullo & Erben, *L. echioides* (L.) Molí., *L. narbonense* Mill., *L. sinuatum* (L.) Mill., i *L. virgatum* (Willd.) Fourr. es troben presents en la majoria de les illes mediterrànies més grans.

L'altre element insular que no és endèmic es restringeix normalment a regions petites del continent europeu, com la península ibèrica [*L. cossonianum* Kuntze, *L. gibertii* (Sennen) Sennen]; Sud de França [*L. companyonis* (Gren. & Billot) Kuntze], la península italiana [*L. panormitanum* (Tod.) Pignatti], Anatòlia [*L. effusum* (Boiss.) Kuntze, *L. gmelinii* (Willd.) Kuntze, *L. meyeri* (Boiss.) Kuntze], la península Balcànica [*L. brevipetiolatum* Artelari & Erben, *L. frederici* (W. Barbey) Rech. fil., *L. graecum* (Poir.) Rech. fil., *L. hyssopifolium* (Girard) Rech. fil., *L. ocymifolium* (Poir.) Kuntze, *L. pigadiense* (Rech. fil.) Rech. fil., *L. sieberi* (Boiss.) Kuntze]. Amb només l'excepció de *L. zembrae* Pignatii, que és endèmic de la petita illa de Zembra (situada a 15 km de la costa africana) i Tunísia, no hi ha cap espècie que sigui comuna exclusivament de les illes mediterrànies i Àfrica del Nord.

A *Limonium*, l'endemisme illenc es restringeix només a la secció *Limonium*. Gairebé un 98% de la flora insular mediterrània de *Limonium*

pertany a aquesta secció. *Pterocladus*, *Myriolepis*, i *Schizhymenium*, que són les altres seccions del gènere presents a les illes, no han diversificat a ambients insulars.

## 1.2 El sistema reproductiu: sexualitat i apomixis

A *Limonium* conviuen dos tipus generals de reproducció, la reproducció sexual i la reproducció apomíctica, que es troben estretament relacionades amb el nivell de ploidia de les espècies. Així, les espècies diploides presenten exclusivament reproducció sexual i les espècies poliploides reproducció apomíctica. En general, les espècies de la secció *Limonium* presenten un sistema heteromòrfic d'incompatibilitat esporofítica que va associat a una morfologia diferent dels pol·lens i de l'estigma.

Els taxons sexuals de *Limonium* són diploides, i mostren un sistema autoincompatibilitat heteromòrfic altament elaborat. Les poblacions consten de dos tipus diferents de plantes. El primer inclou individus amb els grans de pol·len amb una exina reticulada ample (pol·len A) i estigmes amb un patró tipus bajoques de blat de moro, anomenat cob. L'altre grup inclou pol·lens amb exines amb reticles fins (Pol·len B) i estigmes amb papil·les. Només aquelles creus en les quals el pol·len A es posa a un estigma papil·lós, o es transfereix el pol·len B a un estigma cob, són compatibles i permet la formació de llavors d'origen sexual. Això vol dir que un individu diploide no és pot autofecundar i les poblacions d'aquestes espècies solen tenir aproximadament un 50% d'individus dels dos tipus.

Al contrari, la majoria dels taxons poliploides mostren una combinació d'autoincompatibilitat de pol·len/estigma única al si de les seves poblacions. En aquests casos, a més, els individus es caracteritzen normalment per presentar una fertilitat pol·línica molt reduïda (grans de pol·len anormals, amb poc material nuclear). Això indicaria que, al presentar una sola combinació de pol·len/estigma, els individus no haurien de produir llavors. Però no és això el que s'observa a la natura ja que la producció de llavors s'assegura l'existència d'apomixis. L'apomixis implica la formació d'ovocèl·lules diploides (sense la producció de meiosi) i el seu posterior desenvolupament embrionari fins a produir una llavor sense haver-hi fecundació per part dels gàmetes continguts en el pol·len.

Tot i això, les dades de fertilitat pol·línica suggereixen que les espècies poliploides poden presentar un cert grau residual de fertilitat, per la qual cosa podrien intervindre com a progenitors en creuaments amb altres espècies que presentin un sistema pol·len/estigma compatible. De fet, s'ha estimat que en algunes poblacions balears del poliploide *L. gibertii* els individus poden presentar fertilitats de fins a un 50% del pol·len. Aquests valors es troben en consonància en els detectats a *L. graecum* (ARTELARI 1989), un 86%, els obtinguts per INGROUILLE & STACE (1985) per a membres del complexa apomictic de *L. binervosum* a les illes britàniques (0-38%).



### 1.3 Nombre de cromosomes

Dins de la secció *Limonium*, els taxons diploides tenen dos nombres bàsics de cromosomes ( $x=8$  i  $x=9$ ), i presenten  $2n=16$  i  $2n=18$ , mentre que s'ha hipotetitzat que el complement cromosòmic de les espècies poliploides ha sorgit a través de combinacions dels genomes  $x=8$  i  $x=9$  (ERBEN 1978, 1979). Així, els nombres cromosòmics triploides [ $2n=24$  ( $8+8+8$ ),  $2n=25$  ( $9+8+8$ ),  $2n=26$  ( $8+9+9$ ),  $2n=27$  ( $9+9+9$ )] i tetraploides [ $2n=35$  ( $8+9+9+9$ ),  $2n=36$  ( $9+9+9+9$ )] que es troben presents a les espècies de Balears deriven d'ancestres diploides amb base  $x=8$  i  $x=9$  (Figura 1).

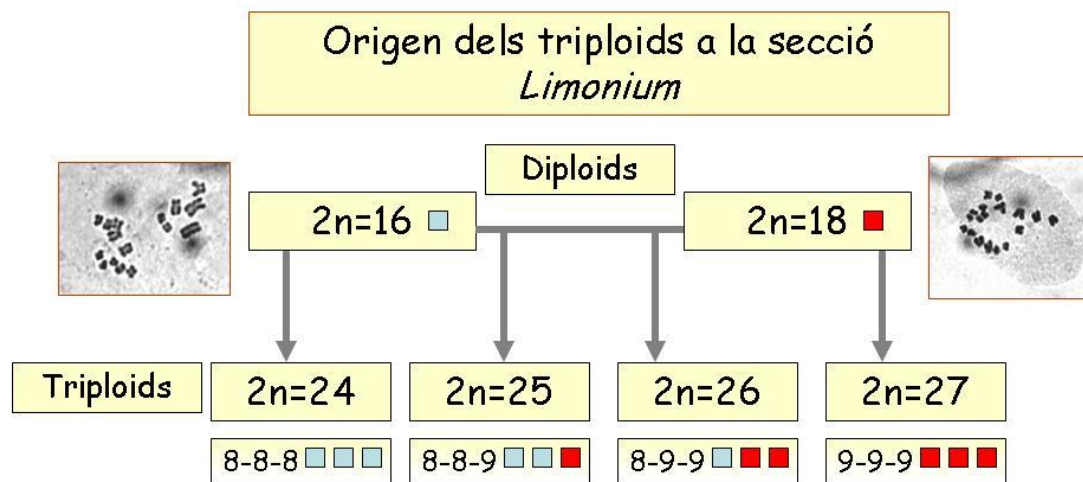


Figura 1. Relacions de les espècies triploides de *Limonium* a partir d'ancestres diploides amb  $x=8$  i  $x=9$  nombres de cromosomes.

Les espècies amb  $2n=16$  son endèmiques de la Mediterrània occidental i la seva distribució es troba centrada (encara que no és exclusiva) a la península Ibèrica (Figura 2): *L. cossonianum* (SE península ibèrica i

Formentera), *L. tabernense* (SE península ibèrica), *L. album* (SE península ibèrica), *L. estevei* (SE península ibèrica) i *L. ovalifolium* (inclòs *L. nydeggeri*; costa atlàntica europea, nord d'Àfrica i Canàries). Es remarcable el fet de que actualment sols es conegui a Balears una espècie del grup amb  $2n=16$ , *L. cossonianum*, que es troba localitzada a una petita àrea costanera del nord de Formentera.

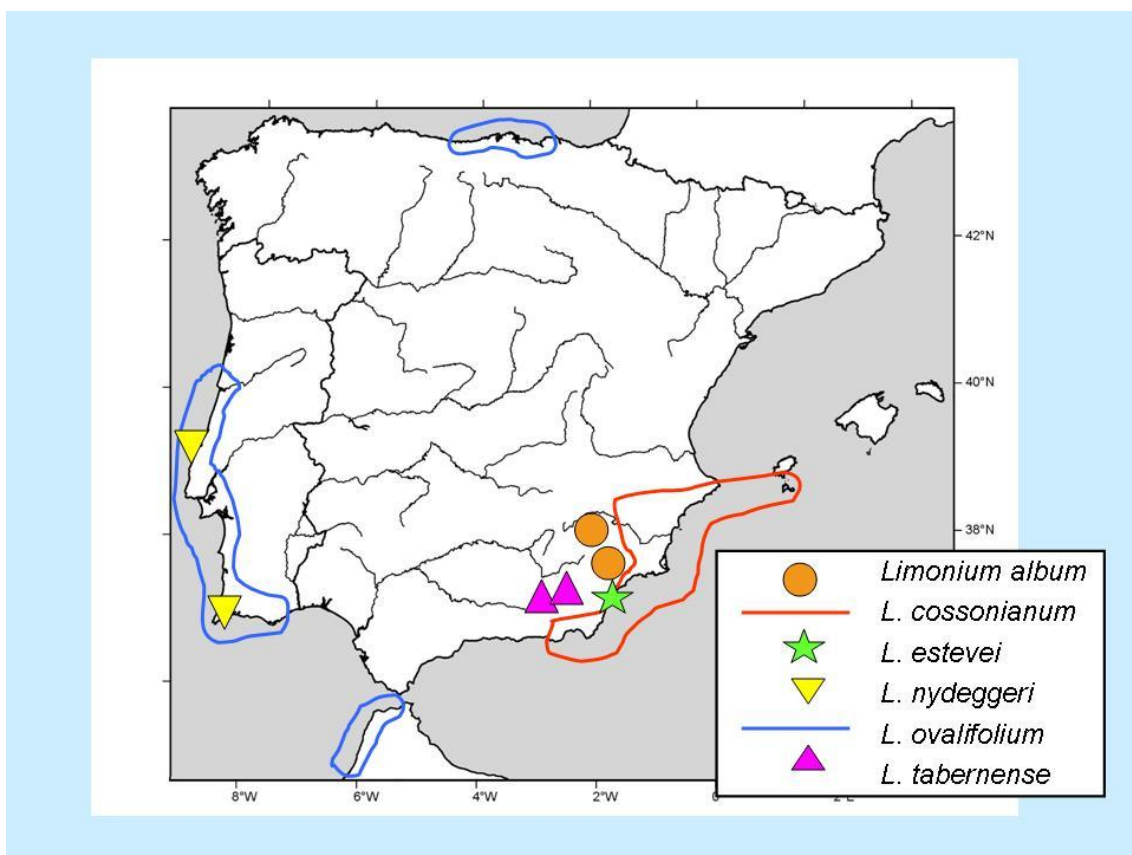
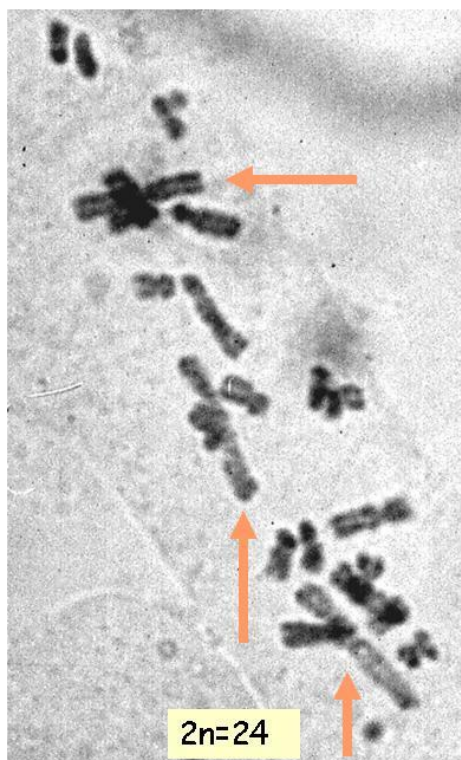


Figura 2. Distribució a la península Ibèrica i Balears de les espècies de la secció *Limonium* amb  $2n=16$  cromosomes.

D'altre banda, les espècies amb  $2n=18$  són molt més nombroses i es troben centrades a la Mediterrània Occidental. A Balears, tenim *L. echioides* (força distribuït per tota la Mediterrània) i el grup de *L. minutum* (que inclou a espècies descrites com *L. ebusitanum*, *L. pseudoebusitanum*, *L.*

*scorpiodes*, *L. portopetranum*, *L. dragonericum*, *L. caprariense* i *L. tenuicaule*, de difícil distinció i que cal considerar com a variants d'una sola espècie) es molt abundant a totes les illes i forma part del conjunt d'espècies rupícoles que viuen vora la mar.

Des del treball de ERBEN (1978, 1979) dedicats als *Limonium* de la Mediterrània Occidental s'ha posat de manifest que les descripcions dels cromosomes eren evolutivament informatives. Segons aquest autor, els dos grups d'espècies diploides es podrien distingir sobre la base de la presència ( $2n=16$ ) i absència ( $2n=18$ ) d'un parell de cromosomes metacèntrics llargs. A més, suggeria que la presència variable de tals cromosomes (0, 1, 2 i 3) en taxons poliploides era indicativa del nombre de genomes de  $n=8$  implicats en la seva gènesi (Figura 3).



Cromosomes metacèntrics típics dels genomes  $x=8$

	Cromosomes	Constitució
$2n=16$	● ●	□ □
$2n=18$		■ ■
$2n=24$	● ● ●	□ □ □
$2n=25$	● ●	□ □ ■
$2n=26$	●	□ ■ ■
$2n=27$		■ ■ ■

Figura 3. Cèl·lula de *L. wiedmannii* (Formentera) amb  $2n=24$  cromosomes. Les fletxes mostren als cromosomes metacèntrics llargs característics dels genomes  $2n=16$  ( $x=8$ ). A la dreta es mostren els nombres de cromosomes metacèntrics presents a les espècies triploides i la seva constitució genòmica, segons els nombre de genomes  $x=8$  (en blau) i  $x=9$  (en vermell) que han intervingut a la seva gènesis.

## 2. Objectius

Els objectius de la present recerca és determinar la singularitat taxonòmic i establir les relacions evolutives de les espècies *L. barceloi* Gil & L. Llorens (endemisme de Ses Fontanelles), *L. boirae* L. Llorens & Tebar (endemisme des Prat de Magalluf), *L. carvalhoi* Rosselló, L. Sáez & Carvalho (endemisme des Prat de Magalluf), *L. ejulabilis* Rosselló, Mus & Soler (endemisme des Prat de Magalluf), *L. inexpectans* L. Sáez & Rosselló (endemisme des Prat de Magalluf), *L. magallufianum* L. Llorens (endemisme des Prat de Magalluf), *L. pseudodyctyocladon* L. Llorens (endemisme des Carregador de Capdepera), *L. antoni-llorensii* L. Llorens (endemisme de Ses Salines de Campos), *L. leonardi-llorensii* L. Sáez, Carvalho & Rosselló (endemisme dels voltants de Cas Català i es Cap Negre, desapareguda d'aquesta darrera localitat), *L. migjornense* L. Llorens (endemisme de Ses Salines de Campos), *L. fontqueri* (Pau) L. Llorens (endemisme de la costa est de Mallorca i Menorca).

S'ha utilitzat una quadruple aproximació metodològica:

(i) Determinació del nombre de cromosomes i observació morfològica dels cromosomes

(ii) Ubicació en els cromosomes dels gens ribosomals 45S i 5S mitjançant tècniques d'hibridació fluorescent *in situ* (FISH)

(iii) Anàlisi de les seqüències dels espaiadors ITS de l'ADN ribosomal nuclear, i

(iv) Anàlisi de les seqüències de l'ADN cloroplàstic, en concret de la regió trnL-trnF, que inclou l'intró trnL i l'espaiador intergenic trnL- trnF.

### 3. Material i mètodes

#### 3.1 Material

A part de les deu espècies de saladines objecte de l'estudi, s'han incorporat altres espècies a fi de poder ser utilitzades a efectes comparatius (veure apartat de resultats). Les saladines varen ser recol·lectats al camp, o be a partir de les col·leccions vives o llavors mantingudes al Jardí Botànic de València. Les poblacions mostrejades s'especifiquen a continuació en la següent taula.

Espècie	Població
<i>L. antoni-llorensii</i>	Es Trenc
<i>L. barceloi</i>	Ses Fontanelles
<i>L. boirae</i>	Prat de Magalluf
<i>L. carvalhoi</i>	Prat de Magalluf
<i>L. ejulabilis</i>	Prat de Magalluf
<i>L. fontqueri</i>	Cala Murada
<i>L. inexpectans</i>	Prat de Magalluf
<i>L. leonardi-llorensii</i>	Cas Català
<i>L. magallufianum</i>	Prat de Magalluf
<i>L. migjornense</i>	Ses Salines de Campos
<i>L. pseudodyctyocladon</i>	Es Carregador

Taula 1. Enumeració de les poblacions i tamany de mostres utilitzats

#### 3.2 Mètodes

##### 3.2.1 Determinació del nombre de cromosomes

Germinació de les llavors

Les llavors varen ser germinades en agar sòlid en plaques Petri a temperatura constant de 20 °C i amb 12 hores diàries de llum blanca. També s'utilitzaren plantes vives conreades en tests al Jardí Botànic de la Universitat de València.

#### Preparacions cromosòmiques i anàlisi cariotípic

Els àpex de les arrels joves i blanquinoses es varen tractar amb una solució aquosa 0,002 M de 8-hydroxyquinoline durant 2 h a 4 °C i 2 h a temperatura ambient, després es rentaren amb aigua destil·lada, es fixaren en una solució Carnoy (etanol absolut: àcid acètic glacial; 3:1 v/v) al menys 24 hores i finalment s'emmagatzemaren en etanol al 70% a 4 °C fins al seu processat posterior.

Per als recomptes dels cromosomes i la determinació del cariotip, les arrels varen ser hidrolitzades durant 5 minuts en 1 M HCl a 60 °C, es rentaren amb aigua destil·lada i es tenyiren en orceïna acètica entre 4-6 hores. El squash es va fer en una gota d'àcid acètic al 45% i les preparacions permanents es muntaren en bàlsam del Canadà. Les fotografies de les metafases es prengueren amb una càmera digital Olimp Camedia C-2000-Z.

En aquells casos en que les preparacions cromosòmiques varen ser de prou qualitat es va procedir a la obtenció dels idiogrames. Per això, es mesuraren els cromosomes de, al menys, cinc plaques metafàsiques. Per a cada placa, les llargàries dels braços curt (S) i llargs (L) varen ser expressades en valors relatius (% de = 100 del conjunt de cromosomes haploide). Per a



posició de centròmers, la nomenclatura de Levan, Fredga & Sandberg (1964) es va seguir.

### 3.2.2 Hibridació fluorescent in situ (FISH)

Les dues famílies multigèniques de rDNA varen ser localitzades amb dues diferents sondes d'ADN (el clon pTa71, que és un fragment de 9 kb *Eco RI* que té els gens i l'espaiador intergenic 18S -5.8S- 26S rDNA obtinguts de *Triticum aestivum*; i el clon pTa794, que conté un fragment de 410bp *Bam HI* del gen 5S rDNA i l'espaiador intergenic obtinguts de *Triticum aestivum*. Les sondes pTa71 i pTa794 varen ser marcades amb digoxigenin-11dUTP o biotin-11-dUTP. Les preparacions cromosòmiques es guardaren a 37°C tot el vespre i s'incubaren en RNase A (1µg/ml) en 2X SSC durant 1 hora a 37°C. Després, es rentaren tres vegades durant 5 min en 2X SSC, es fixaren en 4% paraformaldehide en 1X SSC durant 10 min a temperatura ambient, es rentaren tres vegades 5 min en 2X SSC, i posteriorment es deshidrataren en etanol i secaren a l'aire. La hibridació in situ es va dur a terme tot el vespre a 37°C en una cambra humida. Les sondes marcades amb Digoxigenina es detectaren amb anticossos anti-digoxigenina conjugats a fluorescein isothiocyanate (Roche). Les sondes marcades amb Biotina es detectaren amb streptavidina conjugats amb Texas Red (Vector Laboratories).

### 3.2.3 Protocol d'extracció de l'ADN genòmic

Es va procedir a la conservació del material vegetal recol·lectat i posteriorment dessecat emmagatzemant les mostres en ultracongeladors a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A fi d'obtenir ADN pur i d'alta qualitat les mostres s'extraguieren i purificaren amb columnes de resines (Qiagen), el qual s'explica a continuació

1. Pesar uns 50 mg de teixit sec
2. Triturar el material en un morter amb 400  $\mu\text{l}$  de AP1 i 4  $\mu\text{l}$  de RNasa A
3. Transferir homogenitzat a un tub de microcentrifuga de 1.5 ml
4. Agitar breument en un vòrtex
5. Incubar a  $65^{\circ}\text{C}$  durant 10 minuts. Durant el procés se mescla per inversió 2 -3 vegades
6. Afegir 130  $\mu\text{l}$  de AP2, mesclar el contingut i incubar durant 5 minuts en gel
7. Col·locar en el tub lila subministrat el contingut del tub i centrifugar durant 2 minuts a 13000 rpm
8. Transferir la fase inferior a un nou tub
9. Afegir 1.5 del volum recuperat de AP3 i mesclar
10. Afegir com a màxim 650  $\mu\text{l}$  a la columna blanca subministrada, centrifugar durant un 1 minut a 8000 rpm i descartar la fase inferior
11. Repetir el pas 10 fins acabar tot el volum
12. Ubicar la columna sobre un tub de recol·lecció i afegir 500  $\mu\text{l}$  de Buffer AW; centrifugar durant 1 minut a 8000 rpm. Descartar la fase inferior
13. Nou afegiment de 500  $\mu\text{l}$  de AW i centrifugació 2 minuts a 13000 rpm
14. Eixugar a temperatura ambient durant 5 minuts
15. Transferència de la columna a un tub nou i adició de 50  $\mu\text{l}$  de Buffer AE (prèviament encalientit a  $65^{\circ}\text{C}$ ) directament a la membrana. Incubació durant 5 minuts i centrifugació 1 minut a 8000 rpm
16. Retirada de la columna i tancament del tub

Els ADN que varen ser purificats amb les columnes Qiagen es conservaren a -20°C fins a la seva utilització.

### **3.2.4 Els espaiadors ribosomals ITS**

Els ribosomes son els orgànuls encarregats de la síntesis de proteïnes en el citoplasma cel·lular, en el que l'ARN missatger es traduït a una seqüència d'aminoàcids. Els ribosomes, presents en tots els organismes vius, estan constituïts per proteïnes i àcids nuclèics (ARN). Aquest ARN és l'anomenat ARN ribosomal, el qual procedeix de la transcripció de la unitat ribosomal 45S. Els ADN ribosomals se troben codificats per unitats de entre 5-12 kilobases (kb), que se troben repetides en tàndem i presenten milers de còpies en cada nucli. Això fa que sigui factible estudiar aquesta regió del genoma quan es disposa d'escadusser material, com es el cas d'espècies rares o amenaçades.

En cada unitat de transcripció apareixen tres gens que codifiquen per a las tres subunitats d' ARN que formaran part dels ribosomes madurs: el gen 18S, el 5.8S i el 25S. Aquests tres gens es troben molt conservats en el si de les espècies, per el que son pràcticament de nul·la utilitat a l'hora d'avaluar els nivells de divergència genètica intraespecífica. En contrast, aquests gens, se troben separats per dos espaiadors intergenics, que son co-transcrits i posteriorment eliminats durant el procés de maduració dels ARN missatgers. Tals espaiadors, ITS-1 i ITS-2 (Internal Transcribed Spacer), solen presentar seqüències d'ADN que són específiques d'espècies o d'unitats evolutives.

#### **3.2.4.1 Condicions experimentals**

L'amplificació dels dos espaiadors ITS nuclears se realitzà amb primers universals (ITS1, ITS4) i se va procedir a optimitzar les reaccions

d'amplificació en un termociclador en gradient (Icycler, BioRad) junt a la utilització d'un Kit de optimització de PCR (Roche).

Les millors condicions d'amplificació (realitzades en volums de 50 µl i que tenien 75 mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), 5 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.0001% BSA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% DMSO, 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP i dTTP, 10 µM de cada cebador, aproximadament tres microlitres d'una dilució 1: 10 de l'ADN genòmic i 1 unitat de *Taq* polimerasa) s'obtingueren amb el següent programa:

- 1) Desnaturalització inicial a 94°C durant 5 minuts
- 2) 35 cicles de 30 segons a 94°C,  
30 segons a 57°C  
60 segons a 72°C
- 3) Extensió final a 72°C durant 8 minuts

Els productes de PCR obtinguts se fraccionaren en gels d'agarosa al 1.0% en tampó TBE i se purificaren amb Agarase (Roche Diagnostics), Kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics), o columnes Millipore Ultrafree-DA. Per a seqüenciar, els productes de PCR o clonats se incorporaren al BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) utilitzant els cebadors d'amplificació. En total s'ha conseguit seqüenciar 700 parells de bases (bp) , que inclouen l'espaiador ITS-1, el gen 5.8S, i l'espaiador ITS-2.

## 4. Resultats

### 4.1 Nombre de cromosomes

Els nombres cromosòmics obtinguts, alguns prèviament obtinguts per l'autor, però dels que s'ha tornat a obtenir noves preparacions de més individus, es presenta a continuació. A efectes comparatius es presenta la informació coneguda d'altres espècies illenques de saladines.

	2n	Nivell de ploidia	Illa	Població	Referència
<i>L. antoni-llorensi</i>	27	3x	MA	Colonia Sant Jordi	Erben (1988)
	27	3x	MA	Es Trenc	
<i>L. barceloi</i>	36	4x	MA	Ses Fontanelles	
<i>L. boirae</i>	35	4x	MA	Prat de Magalluf	
<i>L. carvalhoi</i>	26	3x	MA	Prat de Magalluf	
<i>L. ejulabilis</i>	24	3x	MA	Prat de Magalluf	
	ca. 25	3x	MA	Prat de Magalluf	Rosselló et al. (1994)
<i>L. fontqueri</i>	27	3x	MA	Cala Murada	
<i>L. inexpectans</i>	26	3x	MA	Son Maties	
	26	3x	MA	Sa Porrassa	
<i>L. leonardi-llorensi</i>	26	3x	MA	Cala Major	Sáez et al. (1998a)
	26	3x	MA	Cala Major	
	26	3x	MA	Punta Negra	Sáez et al. (1998a)
<i>L. magallufianum</i>	26	3x	MA	Prat de Magalluf	Erben (1988)
	26	3x	MA	Prat de Magalluf	
<i>L. migjornense</i>	25	3x	MA	Colònia Sant Jordi	Erben (1988)
	25	6x	MA	Colònia Sant Jordi	
<i>L. pseudodictyocladum</i>	16	2x	MA	Carregador Capdepera	
	27	3x	MA	No indicada	Erben (1993)
	27	3x	MA	Carregador Capdepera	Erben (1989), sub <i>L. pseudoarticulatum</i>

#### ALTRES RECOMPTE CROMOSÒMICS DE LIMONIUM DE BALEARS

<i>L. alcludianum</i>	26	3x	MA	Albufera d'Alcudia	
	27	3x	MA	Albufera d'Alcudia	Erben (1989)
<i>L. biflorum</i>	25	3x	MA	Ca'n Simoneta	Erben (1988)
	25	3x	MA	Illetes	
<i>L. bonafei</i>	26	3x	MA	Porto Colom	
	27	3x	MA	Not reported	Erben (1993)
<i>L. camposanum</i>	26	3x	MA	Prat de Magalluf	
	27	3x	MA	Colònia Sant Jordi	Erben (1989)

<i>L. companyonis</i>	26	3x	MA	Sóller	
	27	3x	EI	Platja d'en Bossa	Erben (1981)
	27	3x	MA	Carregador Capdepera	Erben (1989), sub <i>L. connivens</i>
	27	3x	MA	No indicada	Erben (1989), sub <i>L. bianorii</i>
	27	3x	MA	No indicada	Erben (1993), sub <i>L. orellii</i>
	27	3x	MA	Prat Magalluf	Erben (1989), sub <i>L. validum</i>
<i>L. cossonianum</i>	16	2x	FO	Punta Pedrera	
	16	2x	FO	Punta Pedrera	Mayol et al. (1998)
<i>L. gibertii</i>	26	3x	MA	Cala Major	
	26	3x	MA	Es Carnatge	
	26	3x	MA	Porto Pi	
	26	3x	EI	Cala Llonga	
	26	3x	EI	Sant Francesc	
	26	3x	FO	Ses Illetes	
	27	3x	MA	Coll d'en Rebassa	Erben (1989), sub <i>L. bonnetii</i>
<i>L. grosii</i>	36	4x	FO	No indicada	Erben (1993)
	36	4x	FO	Estany des Peix	
<i>L. marisoliai</i>	25	3x	MA	Cap Blanc	Erben (1988)
	27	3x	MA	No indicada	Erben (1993)
	27	3x	MA	Cap Blanc	Sáez et al. (1998a)
	27	3x	MA	Pas de sa Senyora	Sáez et al. (1998a)
	54	6x	MA	Cap Blanc	
<i>L. minoricense</i>	25	3x	ME	Cala de Sant Esteban	
	27	3x	ME	No indicada	Erben (1993)
	27	3x	ME	No indicada	Erben (1993), sub <i>L. artruchium</i>
<i>L. minutum</i>	18	2x	MA	No indicada	Erben (1993), sub <i>L. balearicum</i>
	18	2x	CA	Estells	Erben (1988), sub <i>L. caprariense</i>
	18	2x	CA	Cala Sta Maria	
	18	2x	MA	Porto Colom	
	18	2x	MA	Ternelles	
	18	2x	MA	Cap Blanc	
	18	2x	MA	Cala Sant Vicenç	
	18	2x	CA	Estells	Erben (1989), sub <i>L. pseudebusitanum</i>
	18	2x	ME	Cala Escorxada	Erben (1989), sub <i>L. tenuicaule</i>
	18	2x	EI	Cap Nonó	Erben (1989), sub <i>L. pseudebusitanum</i>
	18	2x	FO	No indicada	Erben (1988), sub <i>L. caprariense</i>
	18	2x	FO	Punta Pedrera	
	27	3x	MA	Cala Sant Vicenç	Erben (1989), sub <i>L. pseudebusitanum</i>
	27	3x	CA	No indicada	Erben (1988), sub <i>L. caprariense</i>
	27	3x	-	No indicada	Erben (1989), sub <i>L. pseudebusitanum</i>
				Erben (1988), sub <i>L.</i>	

					<i>ebusitanum</i>
					Erben (1989), sub <i>L.</i>
					<i>scorpioides</i>
					Mayol et al. (1998)
					Erben (1988), sub <i>L.</i>
					<i>balearicum</i>
					Erben (1989), sub <i>L.</i>
					<i>caprariense</i>
					Erben (1993), sub <i>L.</i>
					<i>caprariense</i>
<i>L. virgatum</i>	27	3x	MA	Es Trenc	
	36	4x	MA	Ca' s Català	Nilsson & Lassen (1971)
<i>L. wiedmannii</i>	24	3x	FO	Salines Marroig	Erben (1986)
	24	3x	FO	Ses Illetes	

**Tabla 1.** Nombre de cromosomes i nivell de ploïdia de les espècies de saladines de Balears, incloent referències d'estudis anteriors.

En negreta es destaquen les espècies objecte del present estudi. MA= Mallorca; ME= Minorca; EI= Eivissa; FO= Formentera; CA= Cabrera.

Dels resultats obtinguts cal destacar:

1) La singularitat del nombre de *L. ejulabilis*, sols conegut en tot el gènere a Europa a l'endemisme de Formentera *L. wiedmannii*.

2) La presència de dos taxons tetraploïdes, *L. barceloi* i *L. boirae*, que son els únics coneguts a Mallorca amb aquest nivell de ploïdia. Aquest és força rar a la Mediterrània Occidental i a la resta de Balears sols el te *L. grosii*, endemisme d'Eivissa i Formentera. D'altre banda, els dos diferents nombres posen de manifest la singularitat d'ambdós poliploïds.

3) L'existència d'instabilitat cromosòmica a *L. pseudodyctyocladon*, ja que s'han determinat individus amb nombres anòmals ( $2n=16$ ) als prèviament determinats ( $2n=27$ )

4) La distinció cariològica constant entre *L. marisoliai* i *L. leonardi-llorensi*, espècies confoses prèviament.

## 4.2 Morfologia dels cromosomes

Les anàlisi de la morfologia dels cromosomes i la ordenació del seu cariotip (veure pàgines següents) han posat de manifest l'existència de dos tipus d'espècies:

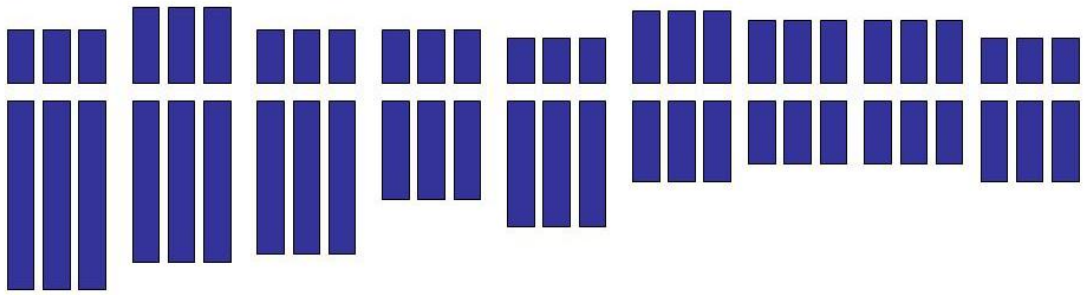
(i) Aquelles que mostren al menys dos jocs de cromosomes diferents (*L. carvalhoi*, *L. inexpectans*, *L. leonardi-llorensii*, *L. magallufianum*, *L. migjornense*) amb nombres de base  $x=8$  i  $x=9$  i que evidencien el seu origen híbrid a partir d'ancestres com *L. cossonianum* i *L. minutum* (aquesta darrera espècie confirmada per les dades moleculars).

(ii) Altres que sols mostren un sols tipus de dotacions cromosòmiques, bé siguin múltiples de  $x=8$  (*L. ejulabilis*) o  $x=9$  (*L. antoni-llorensii*, *L. barceloi*, *L. fontqueri*). El primer cas lliga directament el seu origen a *L. cossonianum*, mentres que en segon cas l'únic que es pot confirmar amb molta certesa és que aquesta espècie no va participar en la seva gènesis.

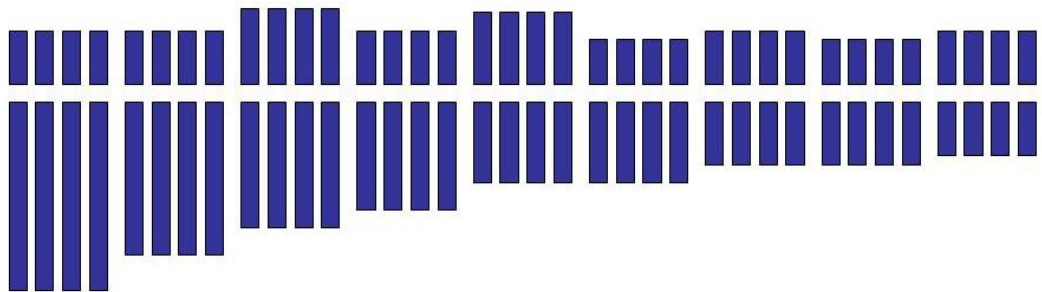
Les dificultats tècniques a l'hora d'esbrinar el cariotip de *L. boirae* no impedeixen confirmar que en el seu genotip apareixen cromosomes marcadors dels ancestres  $x=8$  i  $x=9$  i per tant ressalten el seu origen híbrid, amb, al menys la participació directa o indirecta, de progenitors lligats a *L. cossonianum*.

En el cas de *L. pseudodyctyocladon* és aparent que els individus han sofert reordenacions cromosòmiques notables donant lloc a configuracions singulars. De fet la comparació dels seus cromosomes ( $2n=16$ ) amb els que presenten *L. cossonianum* i espècies afines ( $2n=16$ ) mostra moltes diferències.

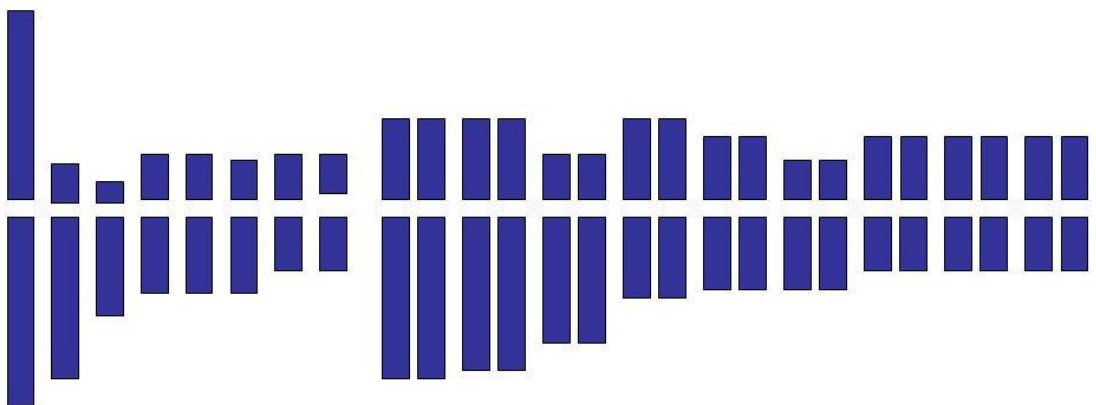




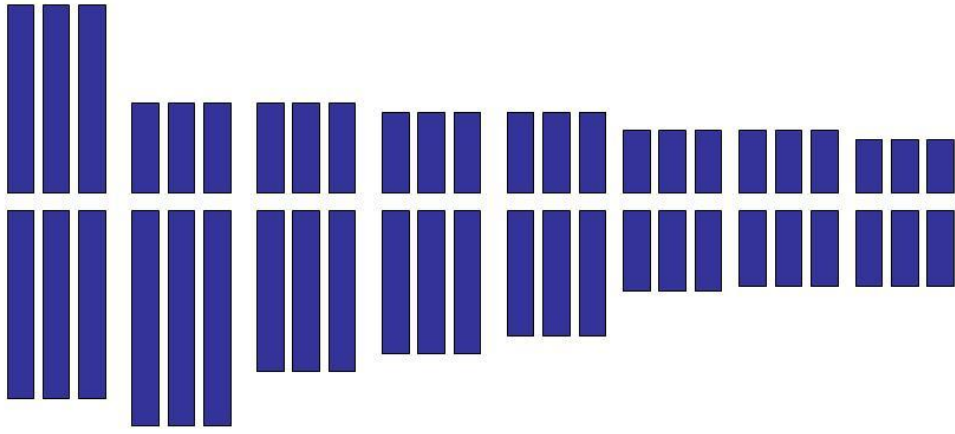
*L. antonii-llorensii* (2n=27)



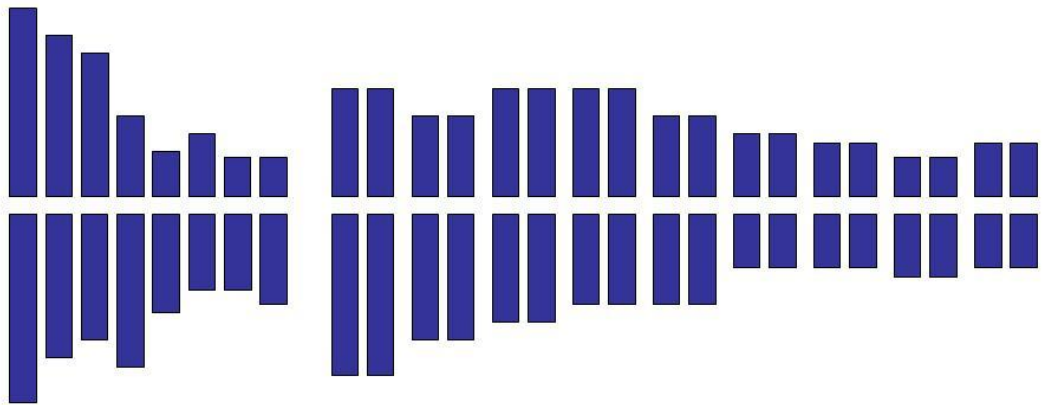
*L. barceloi* (2n=36)



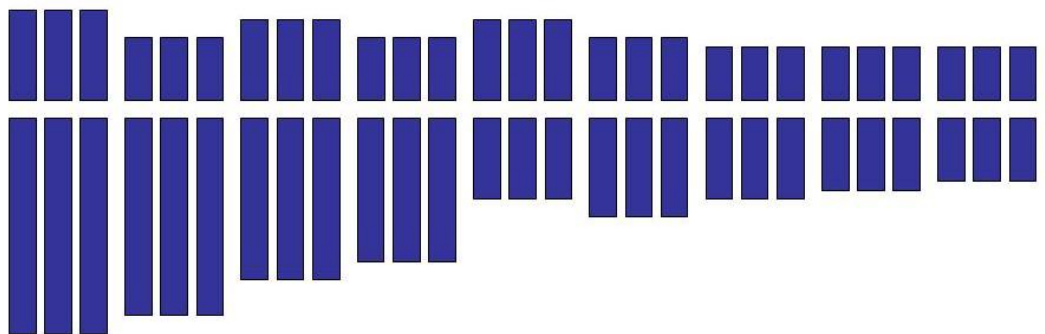
*L. carvalhoi* (2n=26)



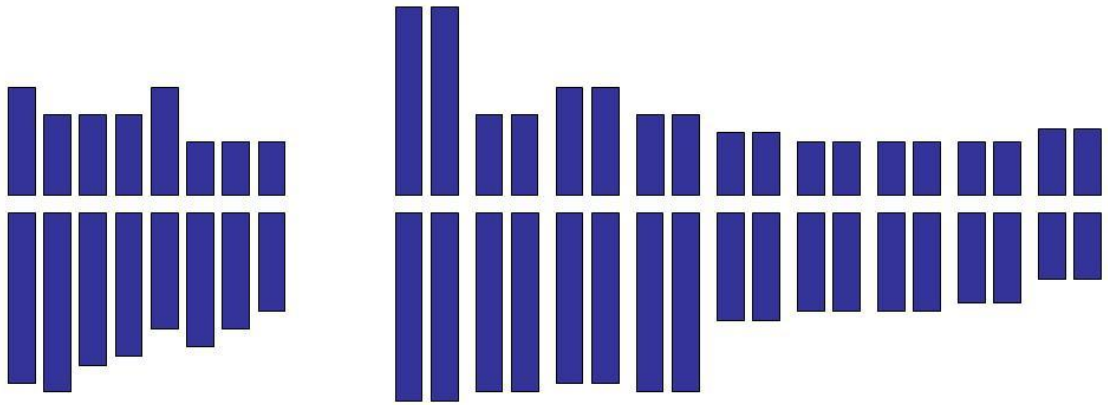
*L. ejulabilis* (2n=24)



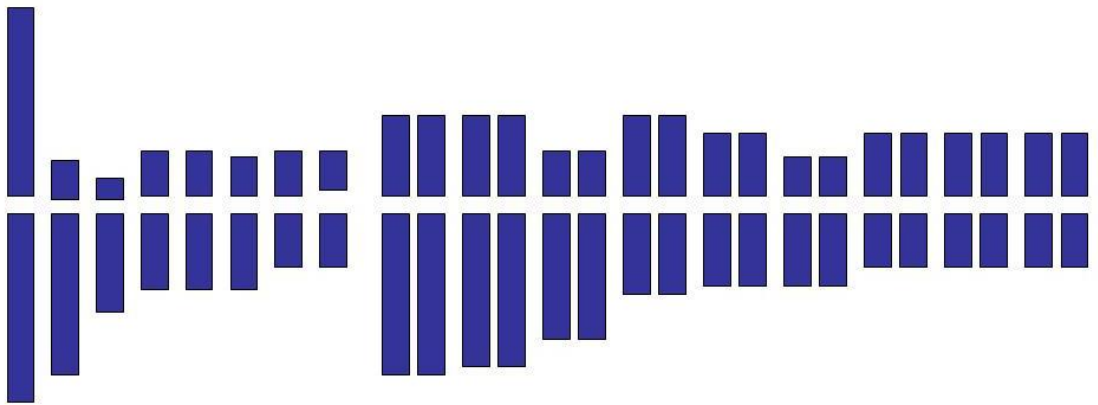
*L. inexpectans* (2n=26)



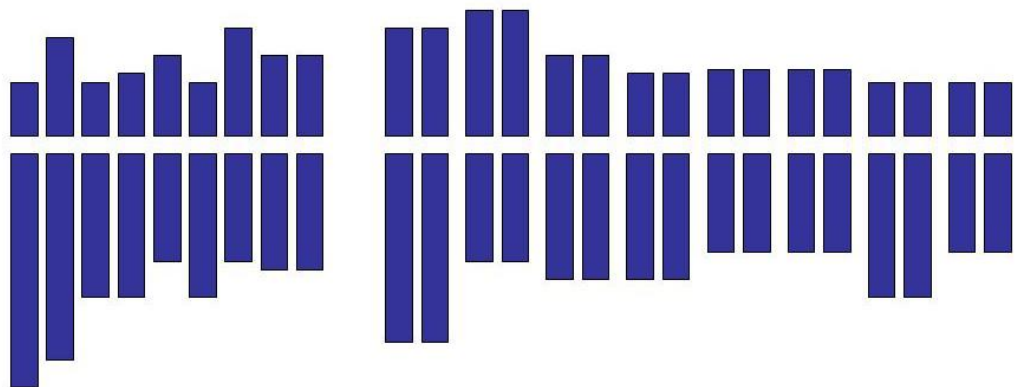
*L. fontqueri* (2n=27)



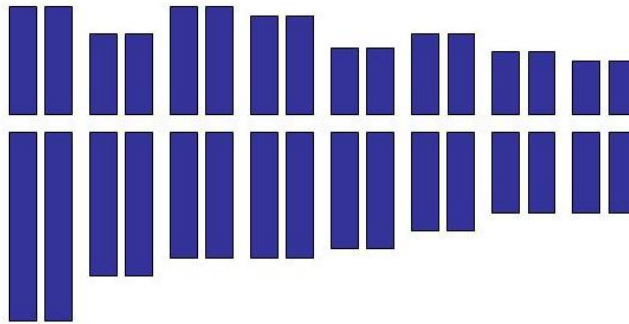
*L. leonardi-llorensii* (2n=27)



*L. magallufianum* (2n=26)



*L. migjornense* (2n=25)

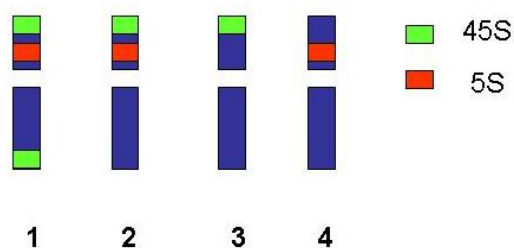


*L. pseudodyctyocladon* (2n=16)

### 4.3 Distribució dels gens ribosomals 45S i 5S als cromosomes

La ubicació física als cromosomes dels gens ribosomals permet un anàlisi encara molt més acurat de quines són les semblances i divergències entre les espècies en base a la seva disposició dins el genoma.

Les anàlisis han posat de manifest l'existència de quatre tipus de ubicació dels gens als cromosomes:



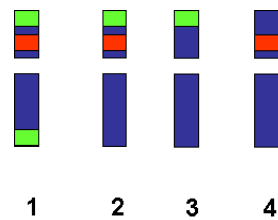
El tipus de cromosoma 1 porta dues ubicacions dels gens 45S (als extrems dels braços dels cromosomes) i una dels gens 5S.

El tipus de cromosoma 2 es semblant a l'anterior, però manca la senyal del 45S present al braç llarg del cromosoma.

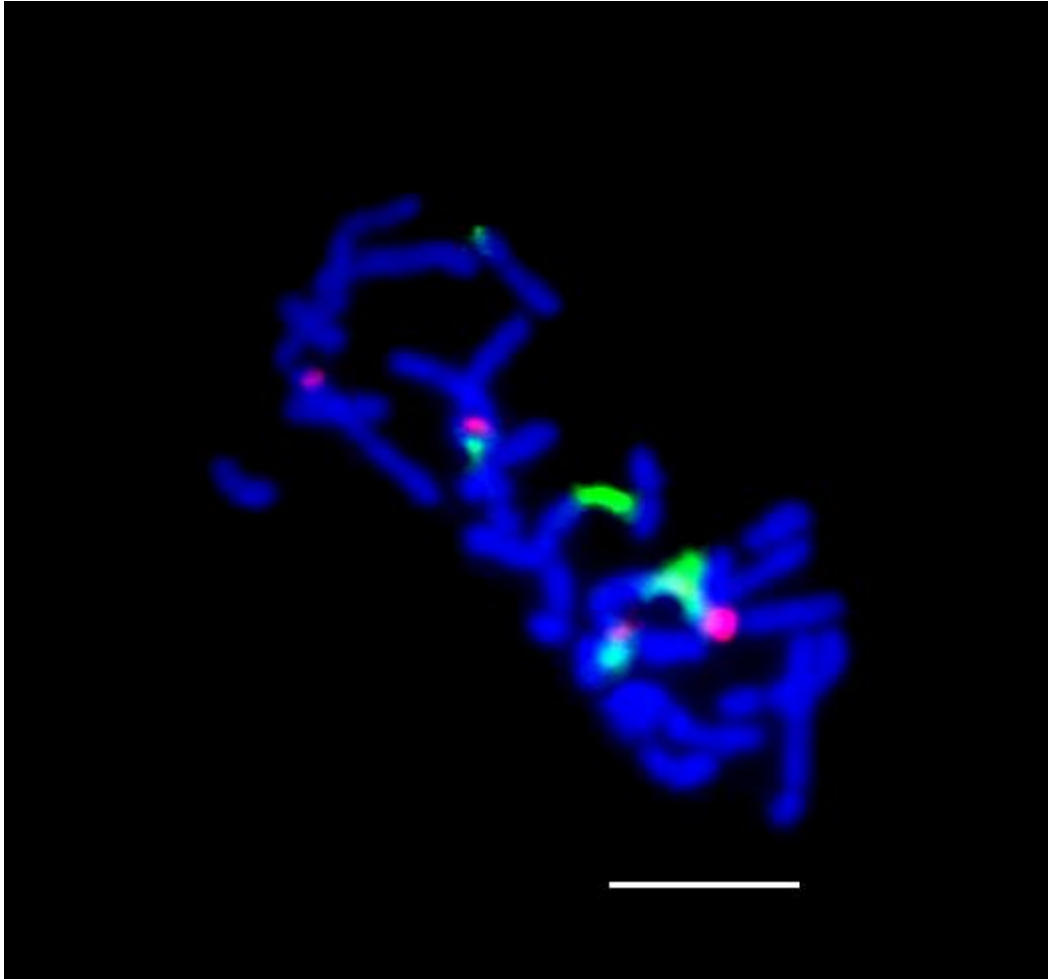
El tipus de cromosoma 3 sols presenta una senyal 45S al braç curt.

Finalment, el tipus de cromosoma 4 sols presenta un lloc dels gens 5S.

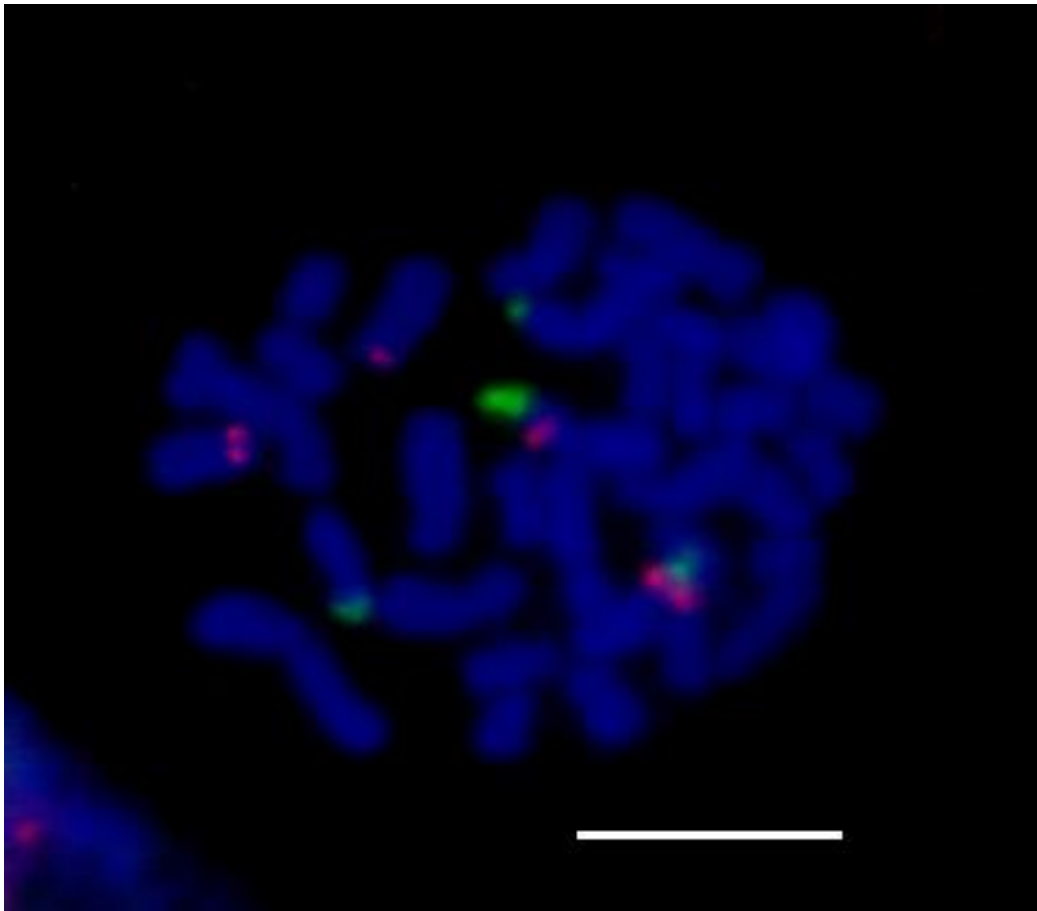
Els resultats obtinguts pel que fa al nombre de cromosomes que presenten cada una d'aquestes configuracions a les espècies objecte del estudi i la seva comparança amb altres saladines baleàriques es presenta a la següent taula i figures.



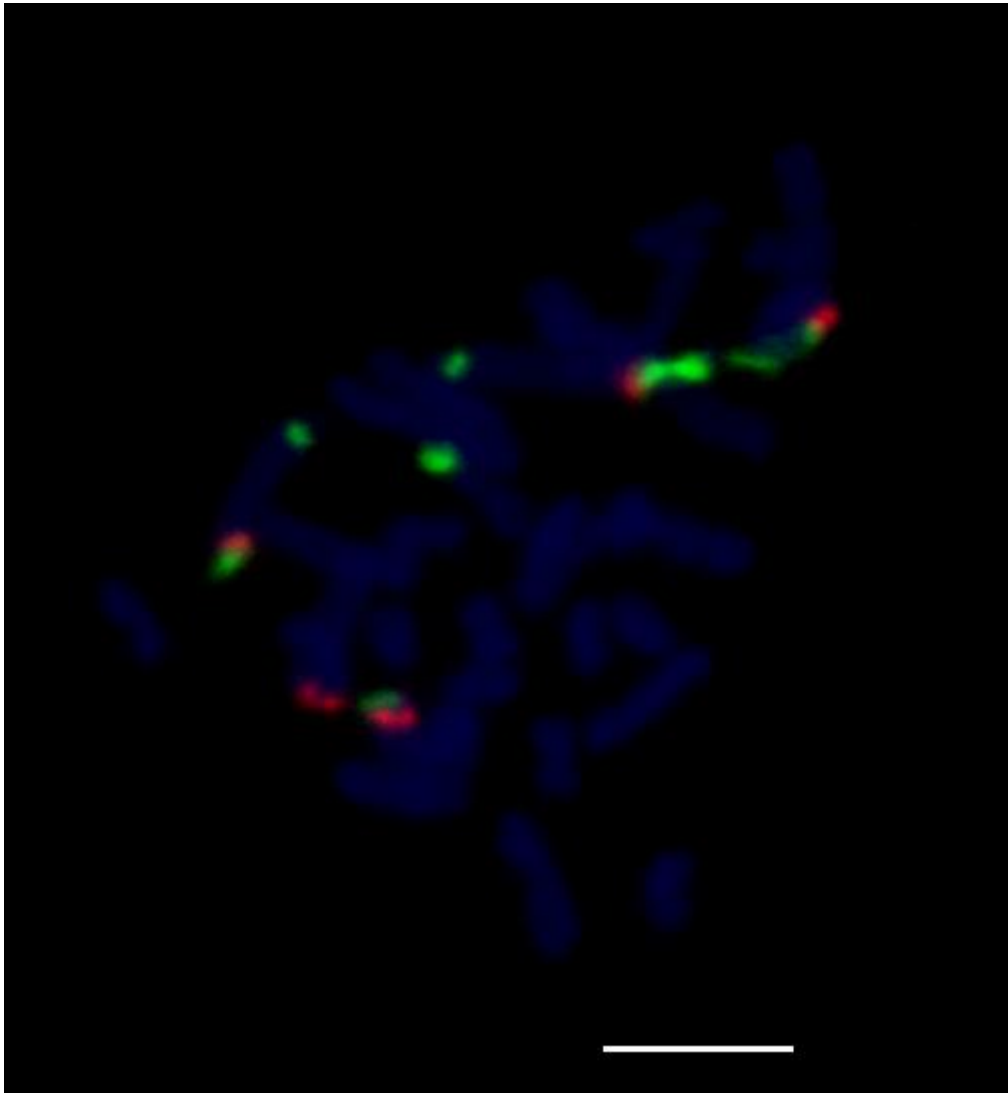
	2n				
Diploids					
<i>L. cossonianum</i>	16	-	2	1	1
<i>L. minutum</i>	18	-	2	2	-
Triploids					
<i>L. ejulabilis</i>	24	-	3	2	1
<i>L. wiedmannii</i>	24	-	3	2	1
<i>L. biflorum</i>	25	-	3	2	1
<i>L. formenterae</i>	25	-	2	2	3
<i>L. migjornense</i>	25		3	2	1
<i>L. alcudianum</i>	26	1	2	3	-
<i>L. bonafei</i>	26	1	1	3	-
<i>L. camposanum</i>	26	1	2	3	-
<i>L. carvalhoi</i>	26	-	3	1	2
<i>L. companyonis</i>	26	-	1	4	2
<i>L. gibertii</i>	26	-	3	3	1
<i>L. inexpectans</i>	26		3	3	2
<i>L. leonardi-llorensii</i>	26	1	2	3	1
<i>L. magallufianum</i>	26	1	2	3	1
<i>L. antoni-llorensi</i>	27	1	1	2	2
<i>L. gymnesicum</i>	27	1	2	3	-
<i>L. marisolii</i>	27		1	2	1
<i>L. pseudodictyocladon</i>	27	-	-	2	2
<i>L. virgatum</i>	27	-	1	2	2
<i>L. fontquerii</i>	27	1	2	1	
Tetraploids					
<i>L. boirae</i>	35	2	2	2	1
<i>L. barceloi</i>	36	-	2	2	2
<i>L. grosii</i>	36	-	2	2	2



*L. antonii-llorensii* (2n=27)

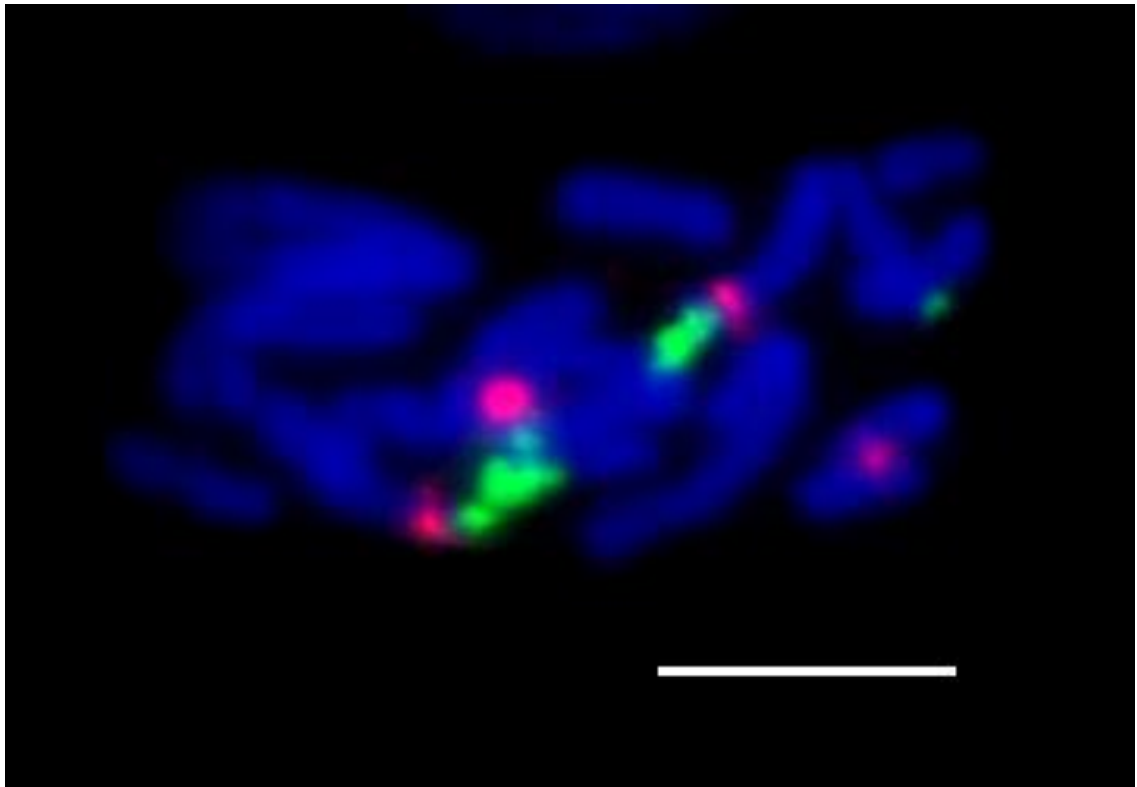


*L. barceloi* (2n=36)

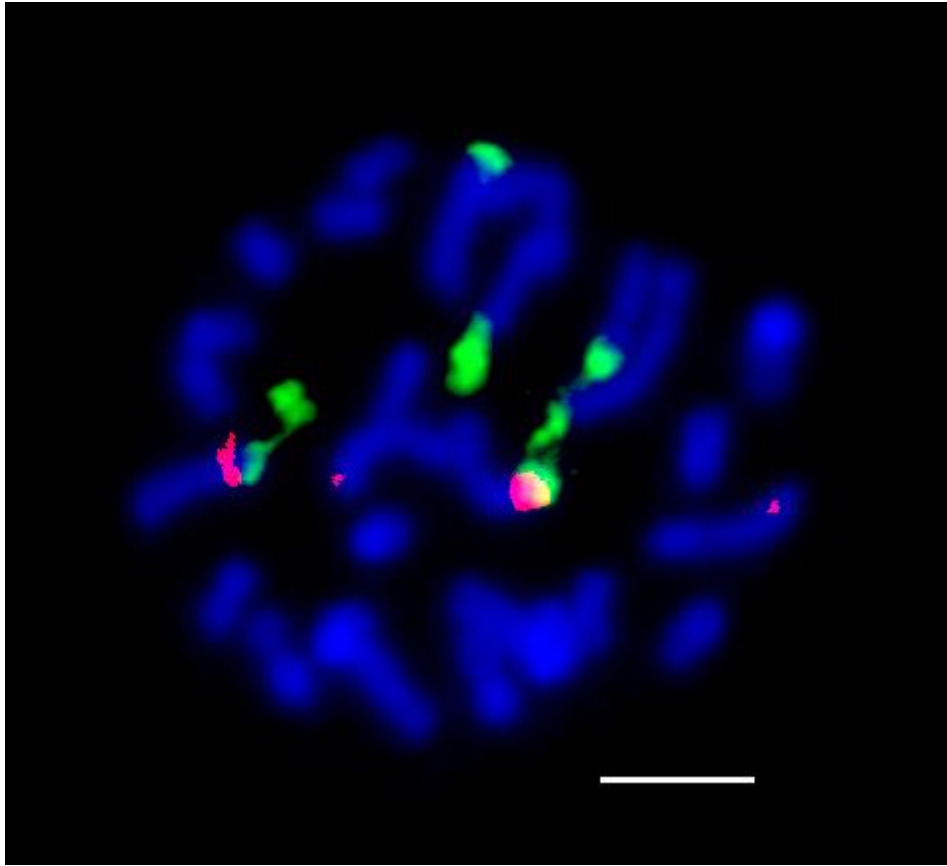


*L. boirae* (2n=35)

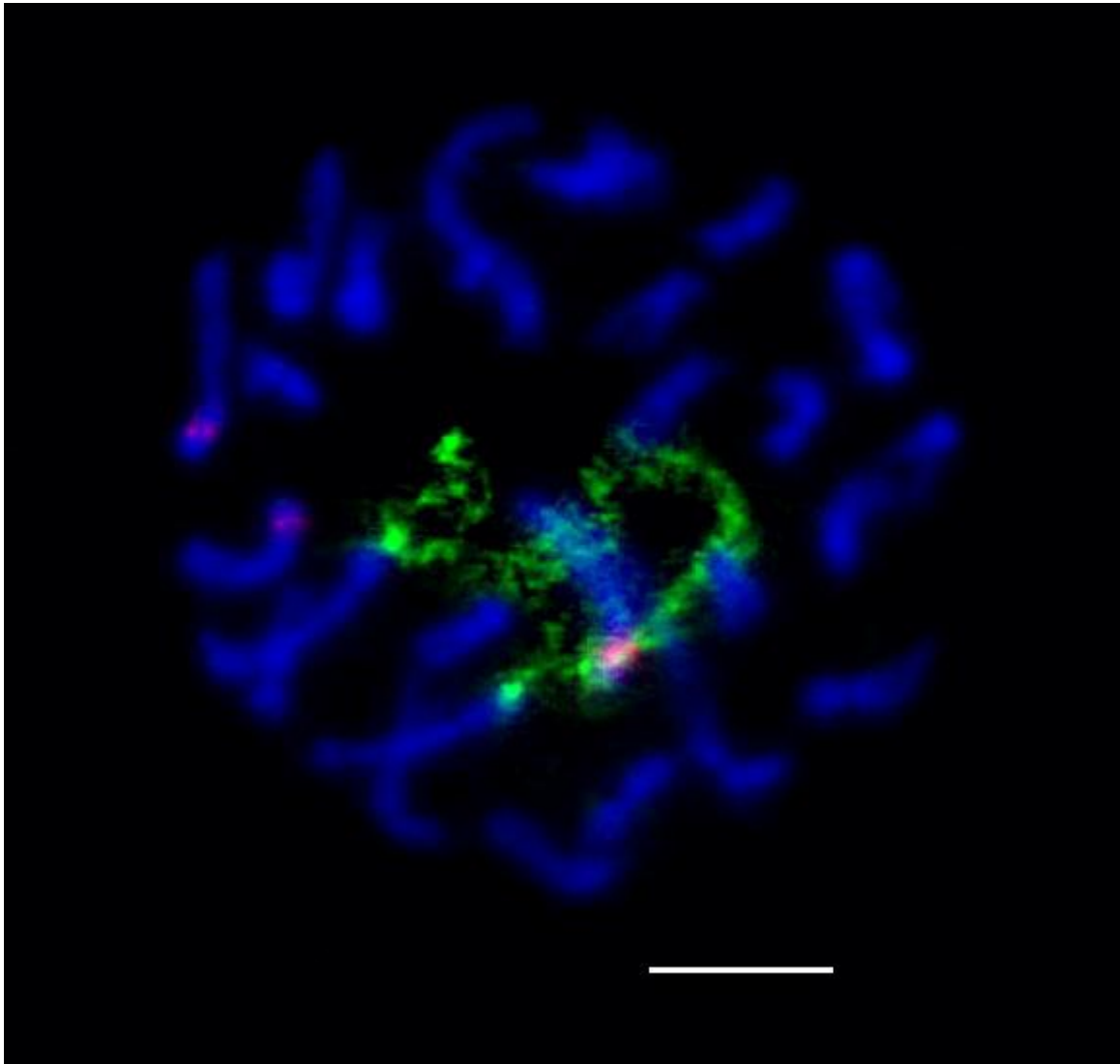




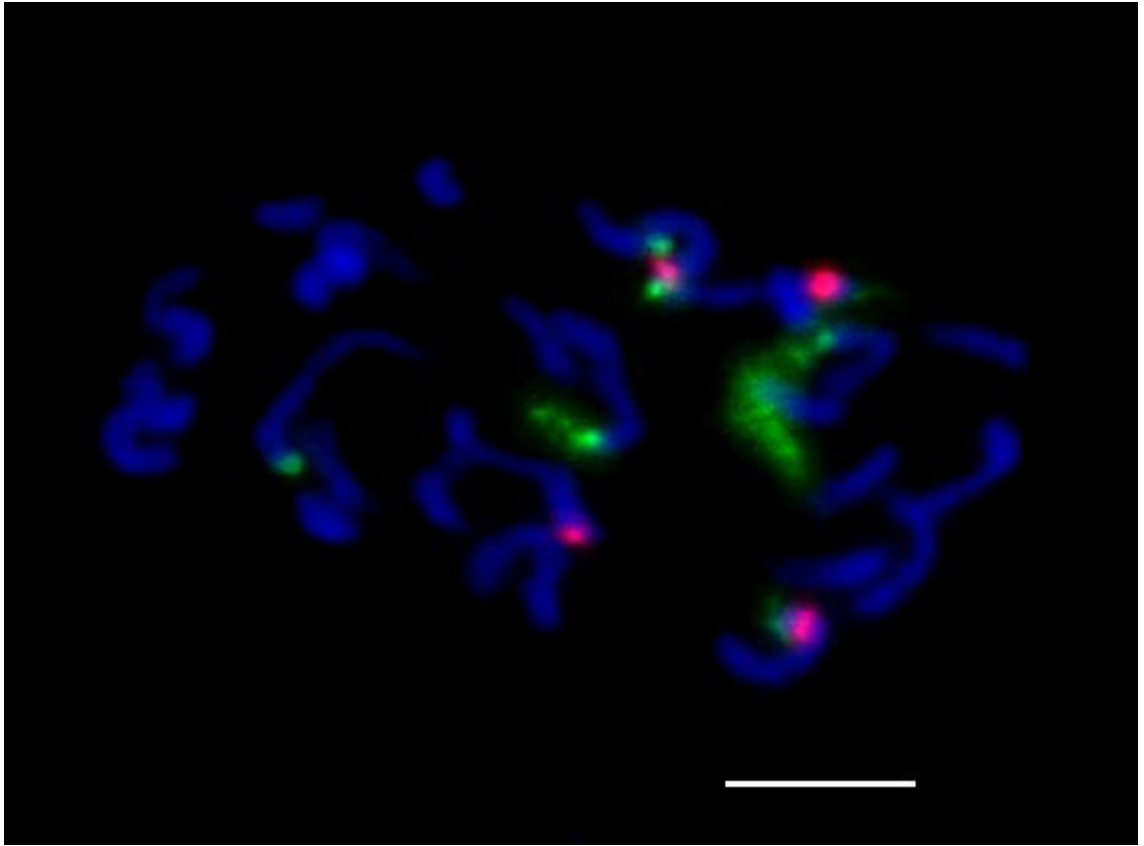
*L. carvalhoi* (2n=26)



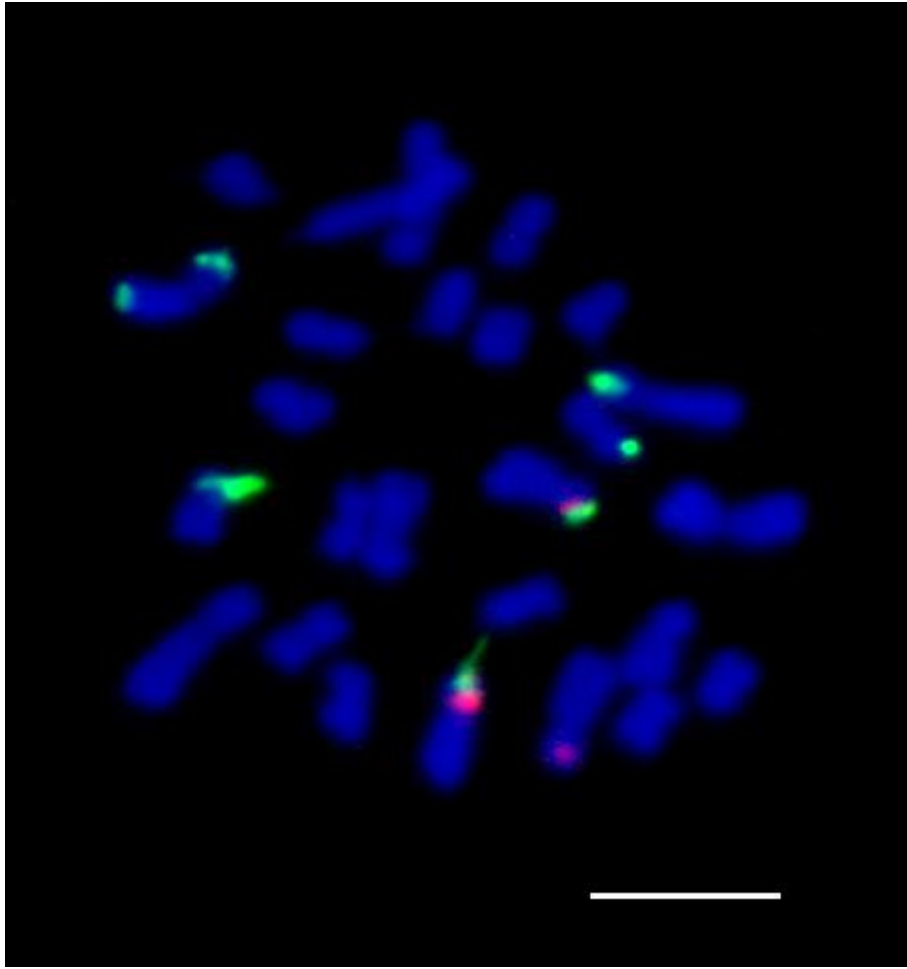
*L. ejulabilis* (2n=24)



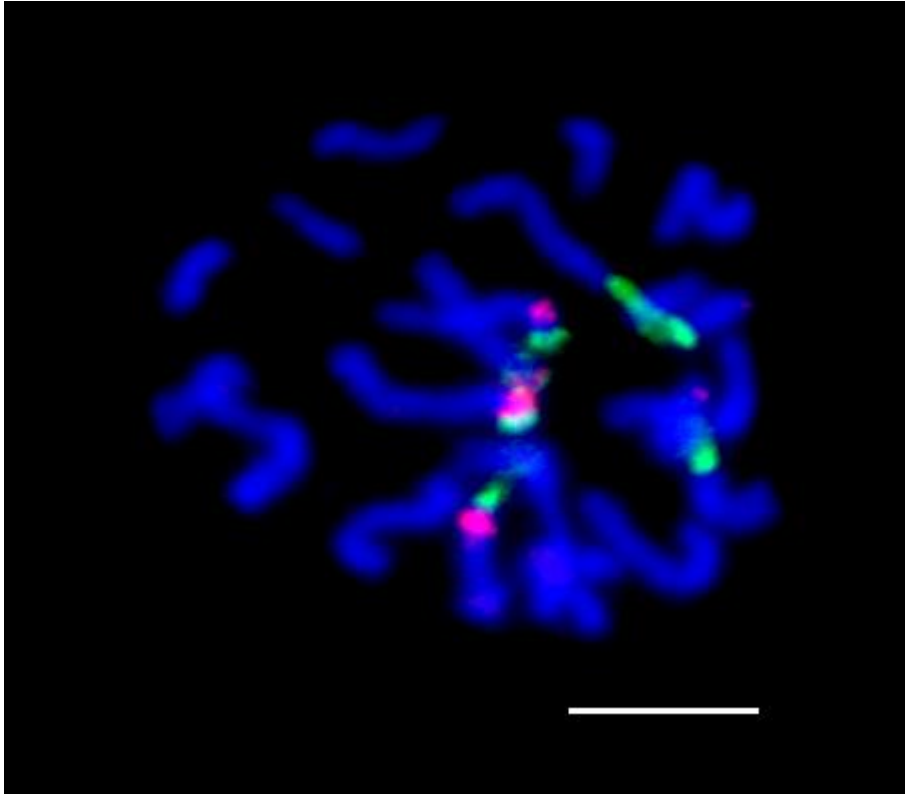
*L. fontquerii* (2n=27)



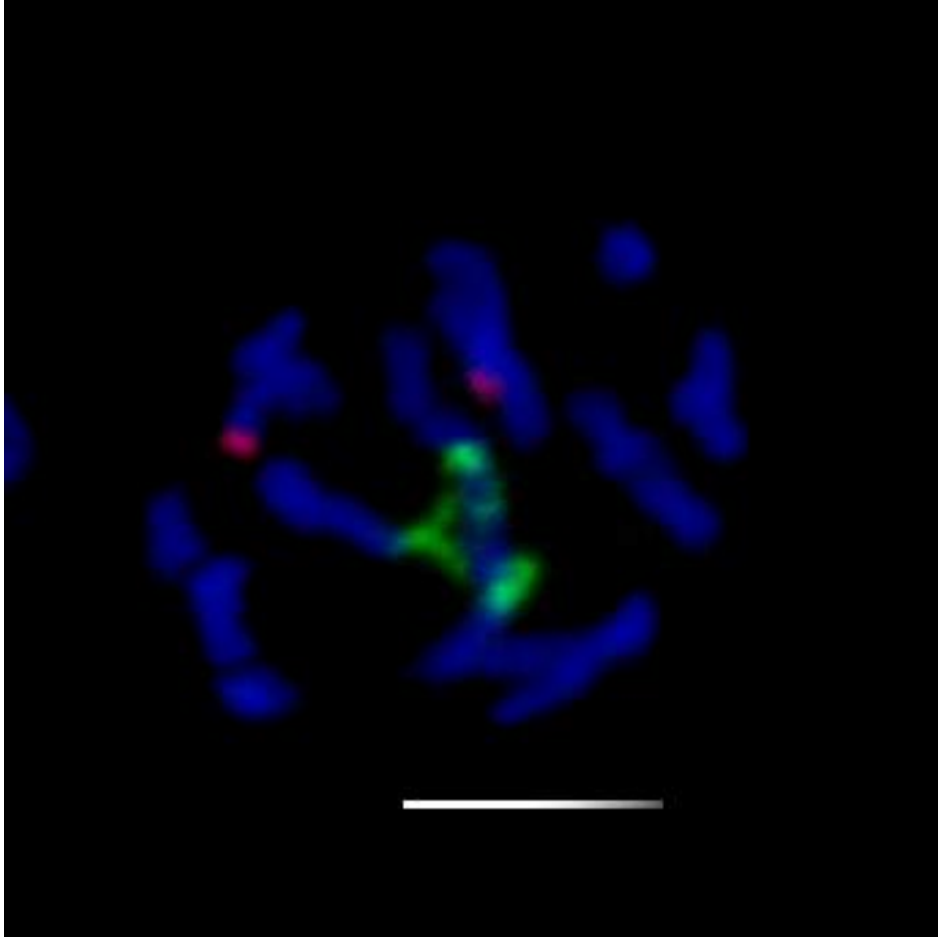
*L. leonardii-llorensii* (2n=27)



*L. magallufianum* (2n=26)



*L. migjornense* (2n=26)



*L. pseudodictyocladon* (2n=16)

Els resultats han posat de manifest

(i) la notable semblança dels triploides *L. ejulabilis* i *L. migjornense* amb *L. cossonianum* i espècies poliploides relacionades (*L. biflorum*, *L. wiedmanii*, *L. formenterae*) amb  $2n=24$  i  $2n=25$

(ii) la diferenciació entre els membres poliploides de saladines presents al Prat de Magalluf (*L. carvalhoi*, *L. inexpectans*, *L. magallufianum*, *L. boirae*, *L. ejulabilis* i *L. camposanum*)

(iii) la diferenciació entre els poliploides *L. barceloi* i *L. boirae*, que tenen nombres cromosòmics semblants, però no idèntics

(iv) la discriminació entre *L. leonardi-llorensii* i *L. marisolii*

(v) la proximitat genòmica entre *L. fontquerii* i el grup de *L. virgatum*

(vi) la singularitat del citòtip  $2n=16$  de *L. pseudodictyocladon*, en que manquen cromosomes marcadors tant dels genomes  $x=8$  com  $x=9$

(vii) la presència de cromosomes marcadors no presents a cap dels integrants dels genomes  $x=8$  i  $x=9$ , que han pogut aparèixer com a conseqüència de dràstiques reordenacions cromosòmiques

#### **4.4 Seqüències dels espaiadors ITS nuclears del ADN ribosomal 45S**

La seqüenciació directa de totes les espècies objectes de l'estudi va posar de manifest l'existència de al menys dos tipus de seqüències, que feien impossible la lectura i interpretació de les mateixes. Per resoldre aquest fet, resolguérem aïllar les seqüències individuals que hi poguessin estar presents amb la tècnica de la clonació. Una vegada obtinguts els clons, es procedí a la seqüenciació de nombroses colònies a fi d'identificar els components de les mateixes i comparar-les amb les presents a les espècies diploides.



Els resultats mostraren que totes les espècies presentaven seqüències que eren idèntiques a *L. cossonianum* i *L. minutum*, com queda reflexat a la taula següent.

Tipus seqüència	Cossonianum	Minutum
Diploids		
<i>L. cossonianum</i>	X	-
<i>L. minutum</i>	-	X
Triploids		
<b><i>L. ejulabilis</i></b>	<b>X</b>	-
<i>L. wiedmannii</i>	X	-
<i>L. biflorum</i>	X	X
<i>L. formenterae</i>	X	X
<b><i>L. migjornense</i></b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<i>L. alcuadianum</i>	-	X
<i>L. bonafei</i>	-	X
<i>L. camposanum</i>	-	X
<b><i>L. carvalhoi</i></b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<i>L. gibertii</i>	X	X
<b><i>L. inexpectans</i></b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b><i>L. leonardi-llorensii</i></b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b><i>L. magallufianum</i></b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b><i>L. antoni-llorensi</i></b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<i>L. gymnesicum</i>	-	X
<i>L. marisoliai</i>	X	X
<b><i>L. pseudodictyocladon</i></b>	-	<b>X</b>
<b><i>L. fontquerii</i></b>	-	<b>X</b>
Tetraploids		
<b><i>L. boirae</i></b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b><i>L. barceloi</i></b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<i>L. grosii</i>	X	X

Aquests resultats són rellevants, i estan en consonància amb les dades cariològiques, que apunten a que

(i) alguns taxons s'han originat i deriven exclusivament de *L. cossonianum* (com *L. ejulabilis* i *L. wiedmannii*)

(ii) la major part d'espècies objecte d'aquest treball s'ha originat per hibridacions entre espècies que contenen genomes de *L. cossonianum* i *L. minutum* (com *L. migjornense*, *L. leonardi-llorensii*, *L. inexpectans*, *L. carvalhoi*, *L. magallufianum*, *L. antoni-llorensi*, *L. boirae* i *L. barceloi*)

(iii) encara que sols s'ha detectat la presència d'un sol tipus de seqüències a *L. fontqueri* i *L. pseudodictyocladon*, existeix la possibilitat de que es trobin altres que no han estat mostrejades, per atzar, durant el procés de clonació. En qualsevol cas sí hem comprovat per tècniques de RFLP i podem afirmar que a aquestes espècies no hi cap evidència de la intervenció de *L. cossonianum* en la seva gènesis.

## 5. Conclusions

### *Limonium pseudodyctyocladon* L. Llorens

Aquesta espècie és morfològicament propera al grup de *L. articulatum* de Còrsega i que a Balears presenta relacions amb *L. fontqueri* i taxons afíns del complex *L. virgatum* que es troben a Menorca. La seva singularitat és que el seu nombre cromosòmic ha resultat ser diploid ( $2n=16$ ) i no triploid ( $2n=27$ ) com altres autors havien indicat. Els resultats obtinguts en diversos individus de la població confirmen aquestes dades i posen de manifest la seva independència taxonòmica front a la resta d'espècies de saladines de Balears. No ha estat possible trobar diferències significatives entre *L. pseudodyctyocladon* i *L. pseudarticulatum* Erben (descrit també del Carregador) i creiem per tant que es tracta d'una sola entitat. Des del punt de vista evolutiu les dades apunten a que el nombre diploid de cromosomes ( $2n=16$ ) s'ha originat per reordenacions cromosòmiques a partir d'ancestres triploids (amb probablement  $2n=27$ ) avui desapareguts de Mallorca, en els que es trobava present el genoma de *L. minutum*. Aquest mecanisme d'especiació no havia estat prèviament descrit a *Limonium* i dona un valor afegit a la necessitat de la seva preservació, ja que és troba en greu perill d'extinció (menys de 50 individus a la zona costanera de Es Carregador).

### *Limonium ejulabilis* Rosselló, Mus & Soler

Espècie estretament emparentada amb l'endemisme *L. wiedmannii* Erben, present als voltants de les salines i saladars de Formentera. Ambdues espècies comparteixen un nombre cromosòmic gairebé únic dins *Limonium* ( $2n=24$ ). Els resultats certifiquen, sense dubtes, que tant *L. ejulabilis* com *L. wiedmannii* s'han originat a partir de l'endemisme diploid ibèrico-balear *L. cossonianum* ( $2n=16$ ), molt probablement per

autopoliploidia. Aquestes dades donen ferm suport a la hipòtesi de que *L. ejulabilis* és una espècie que no s'ha originat com a conseqüència de processos d'hibridació entre les altres espècies que actualment viuen al Prat de Magalluf. Al contrari, és amb tota seguretat un dels progenitors que ha donat lloc a bona part de la diversitat de *Limonium* d'aquest indret. Així com *L. cossonianum* és encara present a Formentera, l'espècie sembla avui extingida de Mallorca. *Limonium ejulabilis* n'és un testimoni de la seva anterior presència a l'illa i constitueix, junt amb *L. wiedmanii*, una singularitat taxonòmica i evolutiva de primer ordre.

#### ***Limonium carvalhoi* Rosselló & L. Sáez**

Espècie endèmica del Prat de Magalluf que ha tengut un origen secundari per hibridació entre altres espècies poliploids de saladines. Les dades cromosòmiques i moleculars estan en consonància en un origen per entrecreuament entre *L. ejulabilis* (encara que no es pot eliminar la hipòtesi que fos el seu ancestre, *L. cossonianum*) i (amb menor certesa), *L. magallufianum*. Així com no hi ha dubtes en la identificació de *L. ejulabilis* o *L. cossonianum* com a un dels seus pares, la contribució del segon progenitor és provisional, doncs *L. magallufianum* és, al seu torn, híbrid, i per tant és difícil concloure si va ser aquesta espècie la que directament va contribuir a l'origen del *L. carvalhoi* o bé un dels progenitors de *L. magallufianum*.

#### ***Limonium magallufianum* L. Llorens**

Espècie endèmica del Prat de Magalluf que ha tengut un origen secundari per hibridació entre altres espècies poliploids de saladines. Les dades cromosòmiques i moleculars estan en consonància en un origen per entrecreuament entre *L. ejulabilis* (encara que no es pot eliminar la hipòtesi que fos el seu ancestre, *L. cossonianum*) i una espècie molt probablement relacionada amb *L. camposanum*, també present al Prat de Magalluf. Cap de les altres espècies presents al Prat pot haver intervingut en la seva gènesis.

### *Limonium inexpectans* L. Sáez & Rosselló

Endemisme del Prat de Magalluf, present als indrets amb menys continguts de sals edàfiques i amb sòls poc o gens inundats durant la major part de l'any. És una espècie molt emparentada amb *L. gibertii* (endemisme de Mallorca, Eivissa, Formentera i la costa sud de Tarragona) i probablement ha evolucionat a partir d'ell, per aïllament geogràfic i ecològic. L'origen de *L. inexpectans* (i també *L. gibertii*) és conseqüència de la hibridació ancestral entre els diploids *L. minutum* i *L. cossonianum*. Amb tota probabilitat les hibridacions que donaren lloc a *L. inexpectans* no es varen formar in situ a Magalluf.

### *Limonium boirae* L. Llorens & Tebar

Una de les poques espècies tetraploids que presenta la flora de saladines de Balears. Les dades cariològiques i moleculars indiquen que és una espècie d'origen híbrid, probablement formada in situ a Magalluf, d'on és endèmica. Un dels seus progenitors és versemblantment *L. camposanum* (també present al Prat; sovint exemplars minsos poden ser confosos amb aquesta espècie) però les dades no són concloents respecte a la segona espècie involucrada. Presenta un genoma de *L. cossonianum*, però per la morfologia no sembla probable que ni *L. cossonianum* ni *L. ejulabilis* intervinguessin en la seva gènesi. L'única hipòtesi raonable és considerar que hagi estat *L. magallufianum* l'altre progenitor, ja que cap de les altres espècies que actualment viuen al Prat ha pogut intervindre.

### *Limonium leonardi-llorensii* L. Sáez, Carvalho & Rosselló

Les dades obtingudes posen de manifest que malgrat el seu nombre cromosòmic ( $2n=27$ ) en la seva gènesi han intervingut espècies amb el nombre cromosòmic de base  $x=8$ , contràriament a les hipòtesis de Erben. Les seqüències d'ADN ribosomal indiquen clarament que *L. leonardi-llorensii*

combina els genomes de *L. minutum* i *L. cossonianum*. Tot i això, les evidències de com es fa formar aquesta espècie romanen elusives. Una hipòtesi compatible amb les dades de que es disposen seria postular que *L. gibertii* (amb el que conviu A Cas Català, però del que s'allunya molt morfològicament) fos un dels seus progenitors; però no hi ha cap signatura citogenètica i molecular que apunti cap a una altre espècie actual de Balears, llevat de *L. cossonianum*, avui extint a l'illa, o una de les seves espècies derivades, com *L. biflorum*. Ja que el genoma de *L. cossonianum* es troba present a *L. gibertii* i *L. biflorum* és impossible comprovar aquesta hipòtesi amb les dades d'ADN o cariològiques. Tot i això sembla evident que *L. leonardi-llorensii* no s'ha originat sols a partir de sols una de les espècies esmentades morfològicament més semblant, fins i tot per fenòmens de reordenació cromosòmiques (de  $2n=26$  o  $2n=25$ , a  $2n=27$ ).

#### *Limonium barceloi* Gil & L. Llorens

Junt amb *L. boirae* i *L. grosii* (endemisme d'Eivissa i Formentera) és una de les tres espècies tetraploides del gènere a Balears, si bé no presenten clares semblances morfològiques amb cap d'elles. Les dades cariològiques indiquen que l'espècie és un autopoliploide originat a partir d'un ancestre amb  $2n=18$  cromosomes. Tot i això, no hi ha cap espècie diploid actual amb  $2n=18$  cromosomes que pugui ser identificada com a possible ancestre de *L. barceloi*. D'altra banda, les dades de l'ADN ribosomal clarament apunten a que *L. cossonianum* es troba dins el seu genoma i es troba directa o indirectament implicat en la seva gènesis. L'única manera de reconciliar aquestes dades és assumir que *L. barceloi* es va originar per reordenacions cromosòmiques d'una espècie triploid, derivada de l'entrecreuament de *L. cossonianum* i *L. minutum*, que originaren un ancestre amb  $2n=18$  cromosomes en un procés anàleg al que ha produït a *L. pseudodictyocladon* i posterior duplicació del genoma. Aquests processos degueren ocorre en temps no recents, ja que cap de les espècies presents al

salobrar de Ses Fontanelles es troba directament relacionada amb el seu origen.

#### ***Limonium migjornense* L. Llorens**

Espècie endèmica de les Salines de Campos que es troba molt relacionada amb l'endemisme gimnèsic *L. biflorum*. Al igual que passa amb aquesta darrera espècie, *L. migjornense* s'ha originat per hibridacions ancestrals entre *L. cossonianum* i *L. minutum*, o espècies relacionades. Les evidències de que es disposa suggereixen que *L. migjornense* es va originar a partir de *L. biflorum*, per adaptació a viure en saladars. De fet, les formes de *L. biflorum* presents a les Salines de Fornells (Menorca) tenen una morfologia molt semblant a les de *L. migjornense*. Aquests procés de diferenciació és anàleg al descrit per *L. inexpectans*.

#### ***Limonium antoni-llorensii* L. Llorens**

Les dades obtingudes posen de manifest que malgrat el seu nombre cromosòmic ( $2n=27$ ) en la seva gènesi han intervingut espècies amb el nombre cromosòmic de base  $x=8$  (contràriament a les hipòtesis de Erben) malgrat el seu cariotip suggereix un origen exclusivament autopoliploide a partir d'ancestres  $2n=18$ . Les seqüències d'ADN ribosomal indiquen clarament que *L. antoni-llorensii* combina els genomes de *L. minutum* i *L. cossonianum*. Una hipòtesi que no pot ser rebutjada amb les dades moleculars de que es disposa seria que *L. antoni-llorensii* fos el resultat de l'hibridació entre *L. migjornense* i *L. camposanum*, amb posteriors i profundes reordenacions cromosòmiques. El fet de que totes tres espècies convisquin al salobrar de les Salines de Campos, i en els mateixos hàbitats, reforça aquesta hipòtesi.

#### ***Limonium fontqueri* (Pau) L. Llorens**

Endemisme de la costa Sud (Marina de Lluçamajor) i Est de Mallorca (entre Cala D'Or i Cala Murada) així com de la costa nord de Menorca (de Cala Morell fins al Cap Negre). L'abundància de les seves poblacions fa que sigui una espècie no amenaçada. En alguns indrets de la costa nord de Menorca (Sa Mesquida, d'on va ser descrita originalment) es troben formes híbrides amb *L. virgatum*. D'igual manera s'han vist exemplars intermedis entre *L. fontqueri* i *L. minutum* (Mallorca, S'Algar; Menorca, Favaritz), que posen de manifest la capacitat d'aquesta espècie per formar híbrids, si bé aquests no semblen estabilitzats ja que no solen formar poblacions pures. Les dades de que es disposa indiquen que *L. fontqueri* s'ha originat entre una espècie del grup *L. virgatum* i *L. minutum*, amb probables reordenacions genòmiques. Les formes del grup *L. virgatum* presents a Menorca són nombroses i encara no es troben prou estudiades com per apuntar sense dubtes a alguna espècie que visqui actualment com a probable progenitor. Morfològicament, *L. fontqueri* s'assembla a *L. articulatum*, de Còrsega i a *L. pseudodyctyocladon* de Mallorca. Aquesta darrera espècie sembla que no ha intervingut en l'origen de *L. fontqueri*, però no hi ha base sòlida per dir el mateix de *L. articulatum*. L'hipòtesi d'un origen híbrid de *L. fontqueri* entre *L. articulatum* i *L. minutum* és congruent amb les dades que es disposa (que clarament rebutgen la intervenció de *L. cossonianum* o espècies afins en la seva gènesi), però hi ha formes del complex *L. virgatum* de la costa nord de Menorca (a hores d'ara innominades) que podrien haver aportat la morfologia semblant a la de *L. articulatum*. *Limonium tamarindanum*, espècie descrita del sud de Menorca, no es troba directament emparentada amb *L. fontquerii* i sembla que s'ha produït per l'entrecreuament de formes típiques de *L. virgatum* i *L. minutum*.