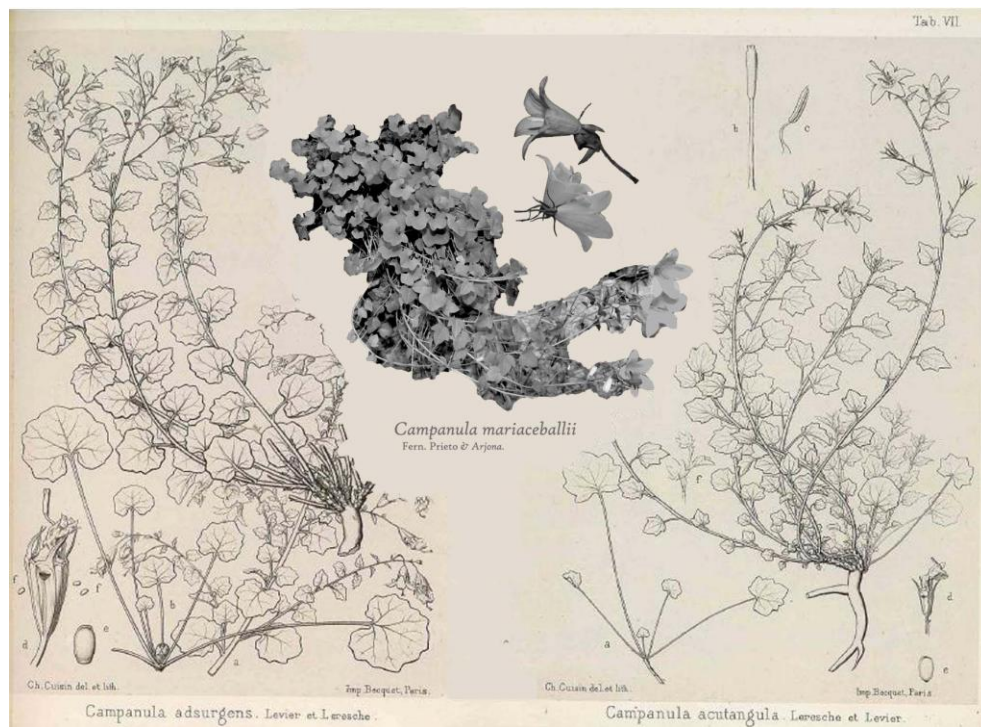




Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

DIVERSIDAD, FILOGEOGRAFÍA Y SISTEMÁTICA DE *CAMPANULA* GR. *ARVATICA*



José María Arjona Rodríguez
22/Julio/2013

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

DIVERSIDAD, FILOGEOGRAFÍA Y SISTEMÁTICA DE
CAMPANULA GR. ARVATICA

José María Arjona Rodríguez



Firma

José Antonio Fernández Prieto



Firma

Eduardo Cires Rodríguez



Firma

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen | 4 |
| Introducción | 5 |
| Antecedentes | 5 |
| Planteamiento y objetivos | 6 |
| Material y métodos | 7 |
| Muestras y accesiones usadas | 7 |
| Extracción y amplificación de ADN..... | 7 |
| Alineamiento de secuencias y análisis filogenético | 9 |
| Resultados..... | 11 |
| Análisis filogenético de las secuencias de ADN nuclear (ITS)..... | 11 |
| Análisis de la diversidad haplotípica de las secuencias cloroplásticas (<i>trnL-F</i> , <i>trnS-G</i> , <i>matK</i> y <i>rbcL</i>) | 13 |
| Región <i>trnL-trnF</i> | 13 |
| Región <i>trnS-trnG</i> | 14 |
| Gen <i>matK</i> | 15 |
| Gen <i>rbcL</i> | 16 |
| Discusión | 17 |
| Discusión taxonómica | 19 |
| Conclusiones | 23 |
| Referencias bibliográficas | 24 |
| Anexo I. | 26 |

Resumen:

Arjona Rodríguez JM. 2013. Diversidad, filogeografía y sistemática de *Campanula* gr *arvatica*

Campanula arvatica Lag., *Campanula adsurgens* Leresche & Levier y *Campanula mariaceballii* Fern. Prieto & Arjona son tres plantas que crecen en fisuras de roquedos calcáreos, la primera endémica de la cordillera Cantábrica, la segunda de la zona berciana y la tercera de Somiedo. En este trabajo se aborda el estudio de su diversidad mediante técnicas moleculares, utilizando tanto secuencias del ADN nuclear (región ITS) como ADN cloroplástico (*trnL-F*, *trnS-G*, *matK* y *rbcL*). Tal metodología se aplica a 40 muestras procedentes del todo el área de distribución de las plantas estudiadas. El análisis de tales secuencias, mediante diversas técnicas estadísticas, ha permitido concluir que: 1) Dentro del grupo *Campanula arvatica* se confirma la existencia de tres especies: *Campanula adsurgens*, *Campanula mariaceballii* y *Campanula arvatica*, .2) En *Campanula mariaceballii* y con estos marcadores moleculares no se aprecia diversidad interna siendo también baja en *Campanula adsurgens*, y 3) *Campanula arvatica* muestra la mayor diversidad; dentro de la cual se reconoce una nueva variedad *C. arvatica* var. *acutangula*.

Summary:

Arjona Rodríguez JM. 2013. Diversity, phylogeography and systematic of *Campanula* gr *arvatica*

Campanula arvatica Lag., *Campanula adsurgens* Leresche & Levier and *Campanula mariaceballii* Fern. Prieto & Arjona are three plants that grow in calcareous rock fissures, being the first one endemic from the Cantabrian Mountains, the second one from the Bierzo region and the last one from Somiedo. In this work we propose the study of the existing diversity with molecular techniques by using sequences from nuclear DNA (ITS region) as well as chloroplastic DNA (*trnL-F*, *trnS-G*, *matK* and *rbcL*). This methodology was applied to 40 samples from the whole distribution area of studied plants. The analysis of these sequences after using various statistical techniques has concluded that: 1) it is confirmed that species *Campanula adsurgens*, *Campanula mariaceballii* and *Campanula arvatica* are included in the *Campanula arvatica* group; 2) with the use of these molecular markers, no internal diversity is observed in *Campanula mariaceballii* neither in *Campanula adsurgens*; and 3) *Campanula arvatica* shows the highest diversity. Moreover, a new variety can be recognized: *C. arvatica* var. *acutangula*.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

Campanulaceae Juss. es una familia de distribución cosmopolita que incluye más de ochenta géneros, repartidos en cinco subfamilias de las cuales Campanuloideae es la más diversa incluyendo 50 géneros, entre ellos *Campanula* L. (Lammers 2007; Deyuan *et al.* 2011). Este género, que incluye más de cuatrocientas especies, reúne plantas herbáceas de distribución fundamentalmente holártica, aunque se extiende por el este y sur de África (Lammers 2007); presenta su mayor diversidad entre el Mediterráneo y el Cáucaso (Deyuan *et al.* 2011).

La sistemática del género *Campanula* ha sido objeto de numerosos trabajos (Candolle 1830, 1838; Boissier 1875) que no parecen haber conducido a un modelo sistemático definitivo. Boissier (1875) consideró en el género dos secciones: *Campanula* sect. *Medium* DC. (=sect. *Campanula*) -que incluye el tipo del género (*C. latifolia* L.) e integra plantas cuya cápsula es dehiscente por poros basales- y *Campanula* sect. *Rapunculus* Boiss. que reúne las plantas del género con cápsulas dehiscentes en la zona media o superior. Esta propuesta sistemática modificaba la realizada por Candolle (1830) que se atenía a otros criterios y es la seguida, entre otros, por Fedorov & Kovanda (1976).

En la flora ibérica, Sáez & Aldasoro (2001) reconocen veinte y seis especies, seis de ellas endémicas; entre ellas, en la sección *Rapunculus*, *Campanula adsurgens* Leresche & Levier y *Campanula arvatica* Lag., dos endemismos del norte de la península Ibérica (Sáez & Aldasoro 2001). *C. adsurgens* se distribuye por las calizas y dolomías de los montes de León, desde Peñalba de Santiago (León) hasta la sierra do Caurel (Lugo), llegando a As Nogais, en las estribaciones de los Ancares lucenses; Serra & Bueno 2011 indican su presencia en Somiedo (Asturias). Por su parte, *C. arvatica* crece en la cordillera Cantábrica, desde el puerto de Piedrasluengas, en el límite entre Cantabria y Palencia, hasta Somiedo. El principal carácter diferencial entre las plantas de ambas especies es que las flores de *C. adsurgens* presentan cáliz peloso y en ocasiones papiloso, mientras que en *C. arvatica* son glabros y lisos; además, *C. adsurgens* tiene tallos y hojas pilosos, en mayor o menor grado; en *C. arvatica* las hojas y los ápices de los tallos son glabros (Sáez & Aldasoro 2001).

Pese a múltiples estudios sobre la diversidad inter- e intraespecífica en estas campánulas (Losa & Montserrat 1953; Damboldt 1966), no hay acuerdo sobre su sistemática. Habitualmente se consideran especies independientes *Campanula arvatica* y *C. adsurgens* (Sáez & Aldasoro 2001), aunque algunos autores (Damboldt

1966; Fedorov & Kovanda 1976; Nieto Feliner 1985) las consideran dos razas geográficas sistematizables como subespecies: *C. arvatica* subsp. *arvatica* y *C. arvatica* subsp. *adsurgens* (Levier & Leresche) Damboldt.

Recientemente Arjona Rodríguez (2012) mediante el uso de secuencias de ADN nuclear (ITS) y cloroplástico (*rbcL* y *trnL-F*) ha reconocido la existencia de una tercera especie en el grupos en cuestión: *C. mariaceballii* Fern. Prieto & Arjona, que crece en el extremo oriental (Somiedo) del área de distrución de *C. arvatica*; las plantas asimiladas a *C. mariaceballii* presenta gran variabilidad en cuanto a pilosidad siendo desde glabra a blanco tomentosa con cápsulas glabras, papilosas o pilosas; siendo la principal diferencia con *C. adsurgens* y *C. arvatica* el que la corola presenta un tubo tan largo o más que los dientes, mientras que en las otras dos especies del grupos los lóbulos son nétamente más largos que el tubo. Además en el citado trabajo se obtuvieron resultados que evidencian una cierta diversidad en *Campanula adsurgens* y, sobre todo, en *C. arvatica*, de la que se detectaron haplotipos distintos a las de las poblaciones del entorno de su localidad clásica en el valle del río Trubia (Asturias) y sobre todo en la zona oriental de su área de distribución.

Tal diversidad detectada mediante análisis de secuencias de DNA puede estar en relación la diversidad descrita con criterios morfológicos. Así, Leresche & Levier (1879) describieron de los Picos de Europa *Campanula acutangula*; la mayoría de los autores (Fedorov & Kovanda 1976; Sáez & Aldasoro 2001) consideran que es coespecífica de la especie descrita por Lagasca (1805), por tanto que el nombre es un mero sinónimo de *C. arvatica*. Además varios autores señalan que *C. arvatica* es polimórfica y Losa & Montserrat (1953) describen en su seno la forma *minorifolia*, presente en el desfiladero de Los Beyos (Asturias) y en el Mampodre (León) y caracterizada por su tamaño reducido, y la forma *longisepala*, del Coriscao (Cantabria).

Planteamiento y objetivos

En el presente trabajo se refuerza el muestreo en aquellas zonas en que en Arjona (2012) se habían detectado déficits importantes y se incorporan al análisis otras secuencias de DNA. Los objetivos que pretende son:

- analizar la diversidad de *C. adsurgens*, *C. arvatica* y *C. mariaceballii* y elaborar un modelo filogeográfico para el grupo *C. arvatica* acorde con la diversidad de secuencias de ADN nuclear (ITS) y cloroplástico (*rbcL*, *trnL-F*, *trnS-G* y *matK*).
- proponer el modelo sistemático adecuado para el grupo *C. arvatica* y la nomenclatura a usar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras y accesiones usadas

Para realizar este estudio se han utilizado 41 muestras de las cuales 35 ya fueron utilizadas en un trabajo previo (Arjona 2012) al que se le han añadido 6 muestras para representar mejor el área de distribución (Anexo I). En una primera identificación, las muestras se corresponden una con *Campanula rotundifolia* L, que se ha utilizado como grupo externo, diecisiete con *C. adsurgens*, cinco con *C. mariaceballii*, y dieciocho con *C. arvatica*. con una distribución de las muestras representativa de todo el área de distribución (Figura1); incluyendo dentro del muestreo individuos de las localidades clásicas, así como de la de *C. acutangula*.

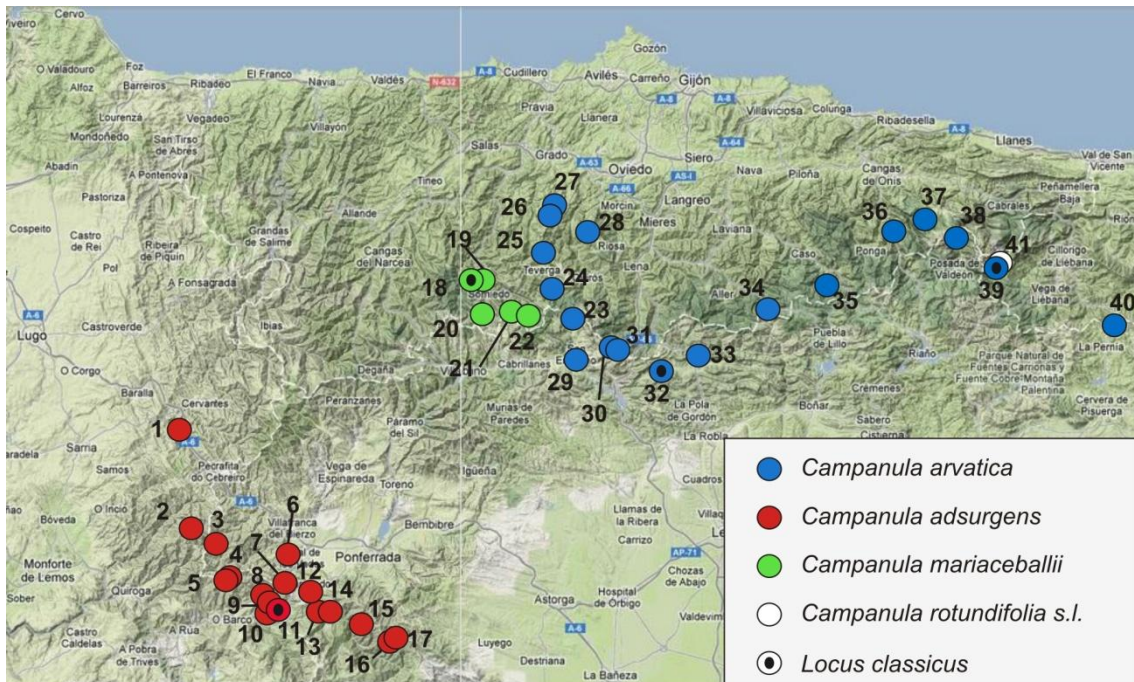


Figura 1. Distribución de las muestras estudiadas *Campanula adsurgens*, *C. arvatica* y *C. mariaceballii*, incluyendo la localidad clásica de todas ellas.

Extracción y amplificación de ADN

Se ha partido de entre 35 y 55 mg de material conservado en gel de sílice. Para la extracción de ADN se ha utilizado un kit comercial [DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN)] siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del ADN extraído se analizó mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% con 0.5 µg/mL de GeLRed™ empleando para la visualización y cuantificación un sistema Gel Logic 100 (KODAK) asociado al programa informático KODAK 1D Image Analysis.

Para el estudio se han utilizado cebadores para diferentes marcadores de ADN (Tabla 1), tanto de regiones correspondientes a ADN nuclear (ADNn) como de regiones de ADN cloroplástico (ADNcl).

Tabla 1. Resumen de los cebadores utilizados en este trabajo.

| Cebador | Región | Secuencia | Referencia |
|-------------------|--------------------|-----------------------------|--|
| Z1F | <i>rbcl</i> | ATGTCACCACAAACAGARACTAAAGC | Primeras 26 bases del gen <i>rbcl</i> en <i>Zea Mays</i> (McIntosh <i>et al.</i> 1980) |
| 640R | <i>rbcl</i> | GCTTCGGCACAAAATAAGAAACG | Fernández Prieto <i>et al.</i> (2013) |
| c | <i>Intron trnL</i> | CGAAATCGGTAGACGCTACG | Taberlet <i>et al.</i> (1991) |
| d | <i>Intron trnL</i> | GGGGATAGAGGGACTTGAAC | Taberlet <i>et al.</i> (1991) |
| e | <i>trnL-F</i> | GGTTCAAGTCCCTCTATCCC | Taberlet <i>et al.</i> (1991) |
| f | <i>trnL-F</i> | ATTTGAACTGGTGACACGAG | Taberlet <i>et al.</i> (1991) |
| *N 16 F [17SE] | ITS | CGATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTT | Fernández Prieto <i>et al.</i> (2013) [Sun <i>et al.</i> (1994)] |
| *N 16 R1 [26SE] | ITS | GGTTCGCTCGCCGTTACTARGGGAATC | Fernández Prieto <i>et al.</i> (2013) [Sun <i>et al.</i> (1994)] |
| <i>trnS</i> | <i>trnS-G</i> | GCCGCTTTAGTCCACTCAGC | Hamilton 1999 |
| <i>trnG</i> | <i>trnS-G</i> | GAACGAATCACACTTTTACCAC | Hamilton 1999 |
| <i>MatK_390f</i> | <i>MatK</i> | CGATCTATTCATTCAATATTTT | Cuénoud <i>et al.</i> 2002 |
| <i>MatK_1326r</i> | <i>MatK</i> | TCTAGCACACGAAAGTGAAGT | Cuénoud <i>et al.</i> 2002 |

(*) cebadores sobre los que se han hecho modificaciones a partir del original; se indica la referencia del cebador modificado y, entre corchetes, del original

Para la amplificación de los citados marcadores se ha utilizado el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) optimizando previamente los parámetros de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) y temperatura de anillamiento (Tabla 2). La reacción se ha llevado a cabo en un volumen final de 25 μL , 2,5 μL de tampón de reacción estándar 10X (Biotools), entre 15 y 30 ng de ADN ya extraído, 1 U de Taq DNA polimerasa (Biotools), 0.2 mM de cada nucleótido y 0.8 μM de cada cebador, en algunos casos se ha utilizado DL-Dithiothreitol (DTT) para evitar la formación de dímeros en la cadena de ADN y facilitar el acoplamiento de la Taq polimerasa. En cuanto al programa utilizado en el termociclador se ha realizado un pretratamiento a 94° durante 5 min, y 40 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94° 1 min., una temperatura de anillamiento específica para cada región (Tabla 2) durante 1 min., y una extensión a 72° 1min.; utilizando una extensión final a 72° durante 10 min

Tabla 2: Condiciones óptimas de PCR para los diferentes marcadores moleculares.

| Región | Cebadores | $MgCl_2$ (mM) | DTT [10mM] | Temperatura de anillamiento |
|---------------|------------------|---------------|------------|-----------------------------|
| <i>rbcl</i> | Z1F-640R | 1.5 | - | 54° |
| <i>trnL-F</i> | c-d | 1.5 | - | 56° |
| <i>trnL-F</i> | e-f | 1.5 | - | 56° |
| <i>trnS-G</i> | <i>trnS-trnG</i> | 4 | 1uL | 50° |
| <i>MatK</i> | 390f-1326r | 5 | 1uL | 45° |
| ITS | N16F-N16R1 | 1.5 | - | 63° |

Como marcador del ADNn se ha utilizado los ITS 1 y 2 (*Internal transcribed spacer*: espaciador interno no transcrito) y el componente 5.8S de la subunidad grande del ribosoma, que se encuentra entre ambos espaciadores. Dicho marcador molecular es utilizado habitualmente en filogenia (Eddie *et al.* 2003) y con él se han obtenido buenos resultados en diversos grupos, incluyendo especies de este mismo género (Cano-Maqueda *et al.* 2008). En cuanto al ADNcl se han utilizado diferentes regiones; por un lado se han amplificado regiones codificantes, de forma parcial, como el *matK* (maturasa K) y el *rbcL* (subunidad grande del enzima RUBISCO) (Haberle *et al.* 2009), aunque del segundo de los citados marcadores cloroplásticos solo se utilizó el primer fragmento, ya que en un estudio preliminar se comprobó que en el resto de la región no aparecía variación; ambas regiones se delimitaron con los cebadores indicados en la Tabla 2. Además, se utilizaron regiones no codificantes del ADNcl, tales como el marcador molecular conocido como *trnL-F* que se corresponde con el intrón del *trnL* (gen que codifica el ARN de transferencia de la Leucina); el espaciados entre el *trnL* y el *trnF* (gen que codifica el ARN de transferencia de la Fenilalanina) que comienza a ser más utilizado en la familia (Wendling *et al.* 2011; Zhou *et al.* 2011); y el *trnS-G* que corresponde al espaciador entre el *trnS* (gen que codifica el ARN de transferencia de la Serina) y el *trnG* (gen que codifica el ARN de transferencia de la Glicina). Para la amplificación de todos ellos se han utilizado los cebadores indicados y las condiciones descritas con anterioridad (Tabla 2).

Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Previamente a la secuenciación de las muestras, se comprobó que los fragmentos amplificados tuvieran suficiente calidad mediante el mismo sistema que se utilizó para evaluar la calidad de la extracción de ADN. Posteriormente, las muestras fueron secuenciadas en un servicio externo (Macrogen).

Las secuencias han sido alineadas mediante el programa MEGA versión 5.1 (Tamura *et al.* 2011) usando el método Clustal W (Higgins *et al.* 1994) y sobre el alineamiento obtenido se realizaron correcciones manuales. Las ambigüedades presentes en la secuencia fueron sustituidas por los símbolos del código internacional de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

En los análisis de las secuencias de los ITS, tanto para el análisis de máxima parsimonia (MP) como para el de máxima probabilidad (ML) se utilizó el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). En el primero de aquellos (MP) se utilizó el método de aleatorización de los datos "Bootstrap" con 10000 réplicas, los *gaps* fueron considerados en el análisis y el método de búsqueda de la máxima parsimonia fue el

TBR (*Tree-Bisection-Reconnection*). En el segundo (ML) se utilizó el mismo método de aleatorización de los datos y el mismo número de réplicas (10000); el método de sustitución seleccionado era el que presentaba un menor índice de BIC (*Bayesian Information Criterion*) en el análisis de elaborado con el MEGA 5, resultando el más adecuado el Kimura de 2 parámetros (Kimura 1980) y en este caso también fueron considerados los *gaps*.

En el resto de marcadores moleculares (*rbcL*, *matK*, *trnL-F*, y *trnS-G*) se realizaron genealogías de haplotipos con el programa TCS versión 1.21 (Clement *et al.* 2000).

RESULTADOS

Análisis filogenético de las secuencias de ADN nuclear (ITS)

Se dispone de secuencias ITS completas de 40 muestras, variando en longitud entre 698 y 701 pares de bases (pb). El archivo final de alineamiento, incluyendo el grupo externo contiene, 703 pb por secuencia, de las cuales 40 son variables y 14 resultan ser parsimoniosamente informativas; el porcentaje medio de contenido en Guanina (G) más Citosina (C) es de un 52.4%. La reconstrucción filogenética mediante Máxima Parsimonia (MP) se presenta en la Figura 2; el árbol obtenido evidencia dos clados principales, el primero de los cuales (A) incluye la mayoría de las muestras analizadas (28), de procedencia geográfica y morfología variada, mientras que el segundo (B) está formado exclusivamente por 12 muestras inicialmente identificadas como *Campanula adsurgens*, tanto atendiendo a su origen geográfico (Figura 3) como a su caracterización morfológica. La diversidad de las muestras incluidas en el clado A se evidencia en el análisis realizado, aunque los subclados identificados son de una baja robustez; la mayoría de las muestras constituyen un subgrupo basal y son todas originarias del núcleo central de distribución de *Campanula arvatica*, incluyendo su *locus classicus*. Frente a este grupo basal se pueden reconocer: un subgrupo A1 formado por las muestras de *C. arvatica* procedentes de la zona más oriental de su área de distribución; un subgrupo A2, formado por cinco muestras inicialmente identificadas como *C. adsurgens* y procedentes de la zona núcleo de la distribución de esta especie; y un tercer subgrupo (A3) integrado por cuatro muestras de *C. mariaceballii*.

La reconstrucción filogenética mediante Máxima Probabilidad (ML) se presenta también en la Figura 2 y sus resultados coinciden con los obtenidos mediante Máxima Parsimonia, salvo en lo que se refiere al subclado A2 al que se incorpora otra muestra de *C. mariaceballii* de la misma zona de Somiedo pero de mayor altitud (Anexo I: muestra 22).

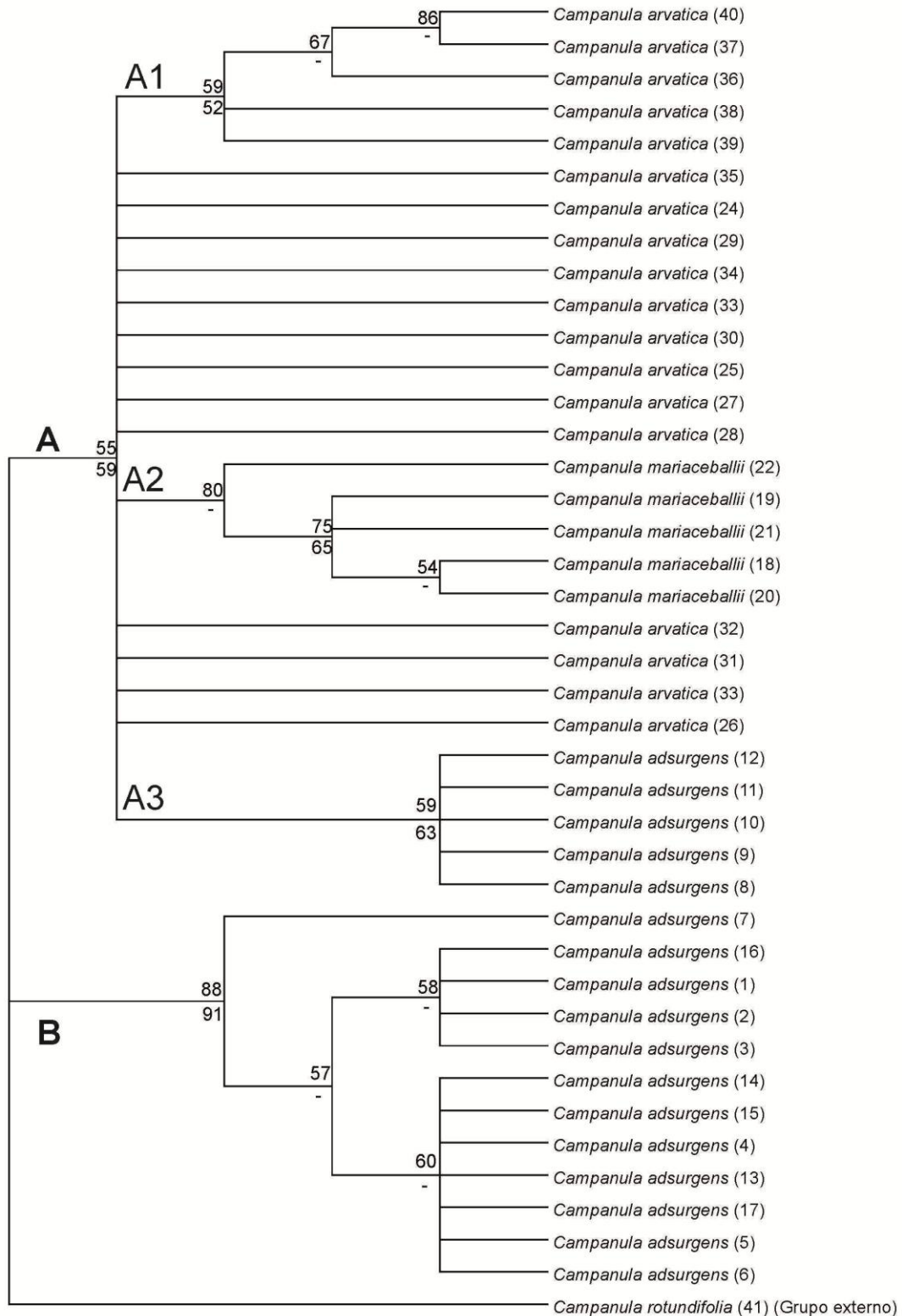


Figura 2: Árbol filogenético de máxima parsimonia (MP) representando la robustez en la parte inferior del agrupamiento, método de aleatorización "Bootstrap" de 10000 réplicas, se utilizaron todos los lugares de cambio y método de búsqueda "Tree-Bisection-Reconnection"(TBR). Y máxima probabilidad (ML), robustez del agrupamiento en la parte superior, mismo método de aleatorización con 10000 réplicas utilizando todos los lugares de cambio y método de sustitución *Kimura 2 parametros*.

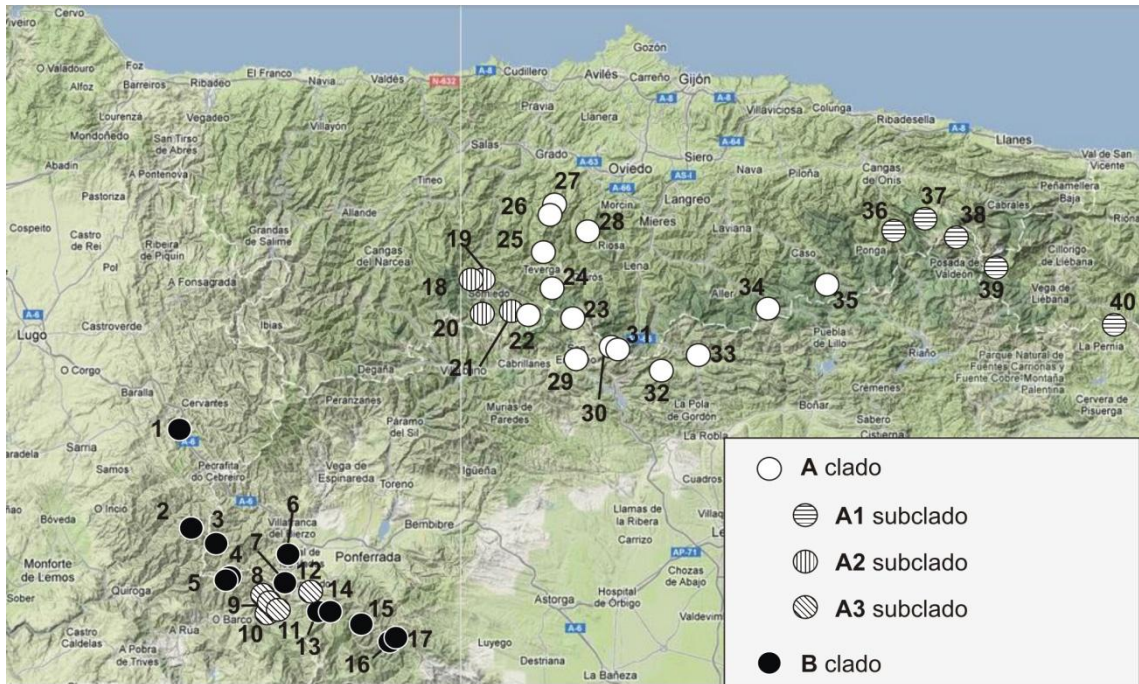


Figura 3. Distribución geográfica de las muestras atendiendo a los grupos obtenidos en el análisis de máxima parsimonia (MP) mostrado en la Figura 2.

Análisis de la diversidad haplotípica de las secuencias cloroplásticas (*trnL-F*, *trnS-G*, *matK* y *rbcL*)

Región *trnL-trnF*

Se dispone de secuencias *trnL-trnF* completas de 40 muestras, variando en longitud entre 834 y 836 pb. El archivo final de alineamiento contiene 836 pb por secuencia, de las cuales 19 son variables y 11 de ellas resultan ser parsimoniosas el porcentaje medio de contenido en Guanina (G) más Citosina (C) es de un 34.5%.

En el análisis genealógico de haplotipos (Figura 4) se observa que aparecen tres grupos de haplotipos, alguno de ellos con variaciones menores. Uno de ellos integra dos haplotipos: el H2 que es el que presentan todas las muestras de distribución más occidental e identificadas como *Campanula adsurgens*; una sola muestra –la H1- presenta un solo cambio respecto a él. El segundo grupo corresponde a un solo haplotipo –el H3- que es el que presenta mayor número de cambios respecto a todos los demás: cinco respecto al H2 y seis respecto tanto al H4 como al H6; este haplotipo corresponde a las muestras de la cuenca del río Somiedo sistematizadas como *C. mariaceballii*. El tercer grupo es el que presentan la mayoría de las muestras sistematizadas como *C. arvatica* e integra tres haplotipos; uno de ellos (H4) es el que aparece en las muestras del núcleo central del área de distribución de la citada especie, incluida la muestra 29 procedente de su *locus classicus*; otro, el H5, presenta un solo cambio de base respecto al H4 y corresponde exclusivamente a las muestras

distribuidas por la cuenca del río Trubia; un tercer haplotipo (H6) se diferencia en tres bases del H4 y corresponde a las muestras de la zona más oriental del área de distribución de *C. arvatica*, desde la cuenca del río Nalón hasta el puerto de Piedrasluengas.

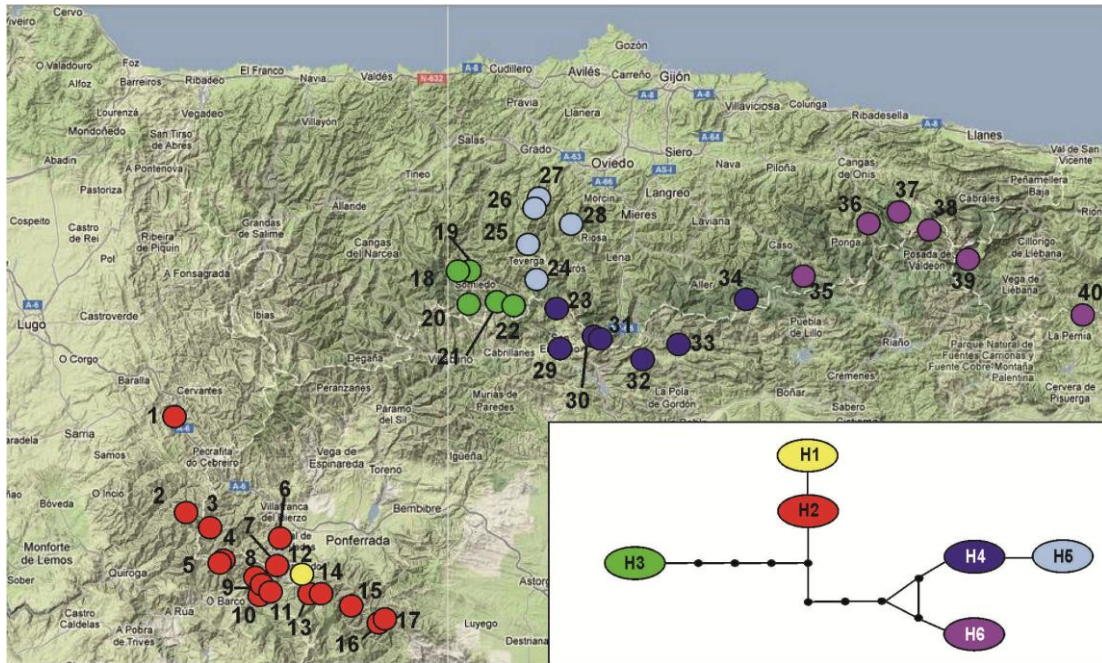


Figura 4. Haplotipos reconocidos en *trnL-trnF* para 40 muestras de *Campanula gr. arvatica* indicándose con un segmento continuo cada cambio.

Región *trnS-trnG*

Se dispone de secuencias *trnS-trnG* completas de 36 muestras, variando en longitud entre 680 y 845 pb. El archivo final de alineamiento contiene 846 pb por secuencia, de las cuales aparecen 4 regiones variables que se pueden considerar de dos tipos: tres de estas regiones contienen variaciones en cuanto a cambios de base, consideradas dos de ellas parsimoniosas; la otra región presenta variaciones en cuanto a número de repeticiones de una duplicación. El porcentaje medio de contenido en G+C es de un 32%.

Como consecuencia del análisis de estas secuencias se reconocen cinco grupos de haplotipos (Figura 5); la variación entre 4 de ellos es la presencia, en distinto número de repeticiones consecutivas, de un fragmento de 55 pares de bases (TTTATCTAAAAGGGTAAAAGGAATTGCTACTAACGTTTTACATATCTAGATCTA).

En el primero de los grupos –que integra los haplotipos H1 y H2- este fragmento aparece una sola vez; presentándose estos haplotipos en las muestras de *Campanula adsurgens*; el haplotipo H1 presenta un cambio con respecto al H2, y este aparece, fundamentalmente, en las muestras localizadas en el centro del área de distribución de

la citada especie. Un segundo grupo presenta un solo haplotipo –el H4– que contiene dos copias del fragmento, y se presenta en la mayoría de las muestras occidentales de *C. arvatica*. El tercer grupo está formado por los haplotipos H5 y H3 que presentan tres repeticiones del citado fragmento; el haplotipo H3, correspondiente a muestras de *C. mariaceballii*, presenta además tres cambios de base; las dos muestras que presentan el haplotipo H5 aparecen de forma disyunta en ambos extremos del área central de *C. arvatica*. Finalmente, el cuarto grupo integra un solo haplotipo H6 que presenta cuatro repeticiones de dicho fragmento y aparece en las muestras de *C. arvatica* más orientales.

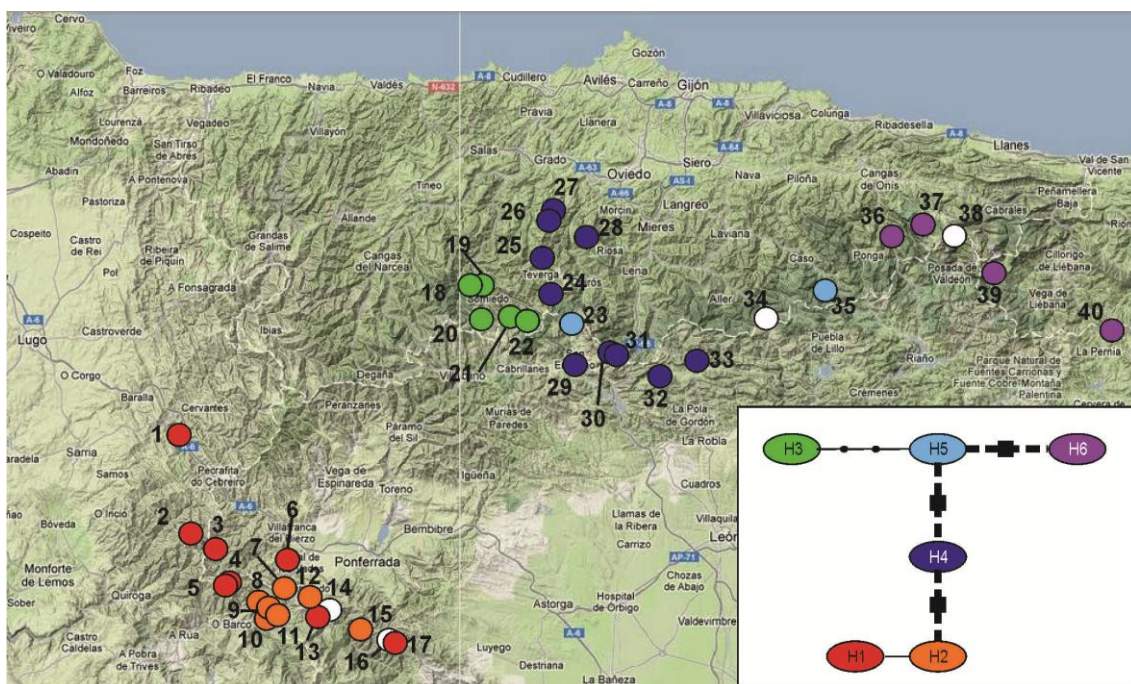


Figura 5: Haplotipos reconocidos en *trnS-trnG* para 36 muestras de *Campanula gr. arvatica*. Las separaciones representadas con línea continua indican un aumento de una copia en el fragmento repetido, partiendo de una copia en H2 hasta cuatro copias en H6. Los segmentos continuos indican un cambio de base. Los círculos blancos indican muestras de las que no se dispone de información para este marcador.

Gen *matK*

Se dispone de secuencias parciales del gen *matK* de 17 muestras; la longitud total de las secuencias, tanto en el archivo de alineamiento como sin alinear, es de 836 pb; donde aparecen 6 regiones variables de las cuales resultan ser parsimoniosas las 6. El porcentaje medio de G+C es de 35,2%.

El análisis realizado pone en evidencia tres de haplotipos distintos (Figura 6). Por un lado, el haplotipo H1 que presentan las muestras de los extremos de distribución, tanto oriental como occidental, de *Campanula adsurgens*; el haplotipo H2 presenta un cambio de una base respecto al anterior y es de más amplia distribución, apareciendo

tanto en las muestras de la zona central del área de distribución de *C. adsurgens* como en todo el área de distribución de *C. arvatica*. Finalmente, el haplotipo H3 es el más diferente, presentando cinco cambios de base con respecto al H2 y seis frente al H1, y corresponde a las muestras de *C. mariaceballii*.

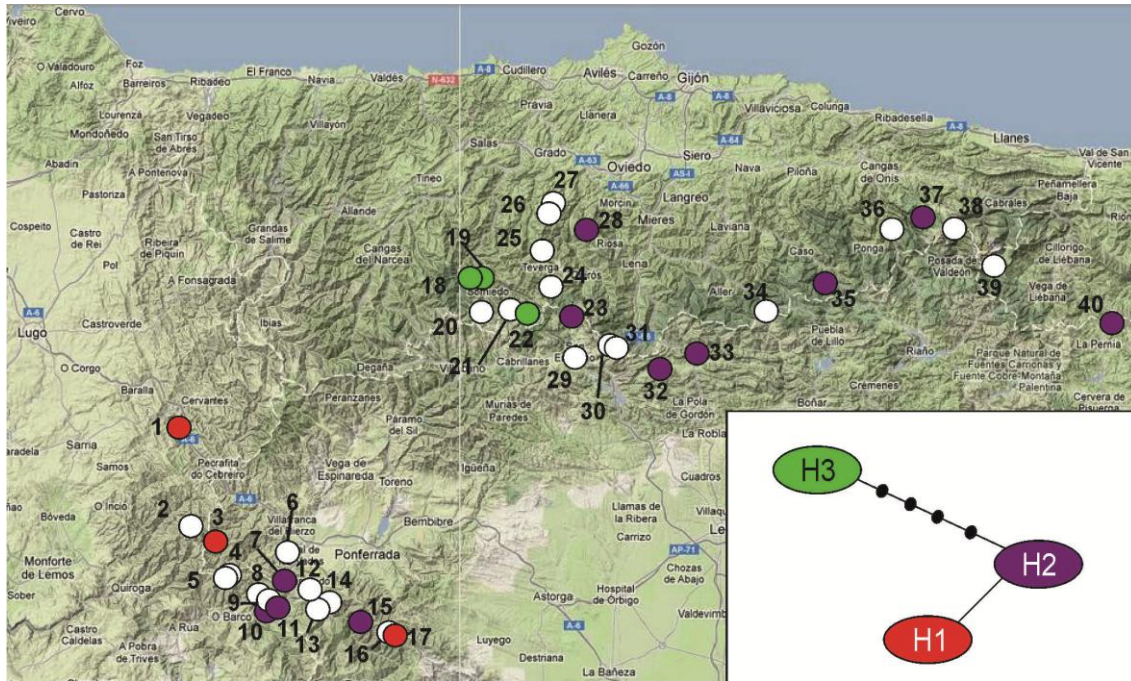


Figura 6: Haplotipos reconocidos en *matK* para 17 muestras de *Campanula gr. arvatica*. indicándose con un segmento continuo cada cambio. Los círculos blancos indican muestras de las que no se dispone de información para este marcador.

Gen *rbcL*

Se dispone de secuencias parciales del gen *rbcL* de 40 muestras; la longitud total de las secuencias, tanto en el archivo de alineamiento como sin alinear, es de 619 pb. De todas ellas solo aparece un sitio variable y parsimonioso. Presenta un contenido medio de G+C de 43,2%.

El análisis de secuencias *rbcL* evidencia ser poco variables, apareciendo únicamente dos haplotipos: uno presente en las 17 muestras de *Campanula adsurgens* y 18 de *C. arvatica*, y otro, que presenta un cambio con respecto al anterior, presente en las 5 muestras de *C. mariaceballii*.

DISCUSIÓN

Al analizar la diversidad dentro del grupo *Campanula arvatica* nos decantamos por la utilización de cinco marcadores moleculares: uno del ADNn (ITS) y cuatro del ADNcl (*rbcL*, *matK*, *trnL-F* y *trnS-G*). A la hora de analizar estos resultados hay que tener en cuenta las diferencias que existen entre los diferentes marcadores moleculares, en cuanto a su procedencia y presunta funcionalidad.

Al respecto conviene reseñar implicaciones derivadas que estemos hablando de ADN nuclear o de ADN cloroplástico, ya que su transmisión en la reproducción sexual es diferente; el ADNn es transmitido por ambos parentales y una de ellas es transportada en el polen; sin embargo el ADN cloroplástico solo es transmitido por vía materna en la mayoría de las angiospermas (Corriveau & Coleman 1988). Por ello hay que tener en cuenta las diferencias entre la dispersión de semillas y la dispersión de polen, que resulta tener vías bastante diferentes; además de que la tasa de variación es menor en el ADNcl con respecto al ADNn (Wolfe et al 1987). También cabe resaltar la diferencia entre que un marcador molecular se corresponda con el exón de un gen o que, por el contrario, el fragmento constituya una zona espaciadora entre genes o a un intrón de los mismos; en este caso la diferencia radica en las tasas de mutación, siendo esta inferior en las regiones codificantes frente a las regiones no codificantes (Gielly & Taberlet 1994). Una vez señaladas estas diferencias se puede analizar los resultados obtenidos.

Al analizar el *rbcL* se observa que, como antes se indicaba, la variabilidad es baja, distinguiéndose solo dos grupos, uno formado por las muestras de *Campanula mariaceballii* que presenta un cambio frente al resto de muestras que integran el otro. Esto parece indicar que partiendo de una distribución continua y un origen común, *C. mariaceballii* quedó aislada en una fase inicial del resto del grupo. Estos indicios se confirman a la hora de analizar el resto de marcadores cloroplásticos, donde se observa que ese primer grupo siempre presenta las mayores diferencias, cinco cambios en *matK*, tres en *trnS-G* y seis en *trnL-F*.

El análisis de las secuencias del gen *matK*, además del grupo de *C. mariaceballii*, genera dos grupos coherentes con el resto de marcadores. Por un lado el que presenta el haplotipo H1, que coincide con la distribución del H1 en *trnS-G*, y que corresponde a las muestras de los extremos oriental y occidental de la distribución de *C. adsurgens*. Esta distribución disyunta hace pensar que en un principio pudieron llegar, a la zona central, individuos de otras localidades septentrionales, siendo la teoría más razonable la de la llegada de individuos de *C. arvatica* o de un ancestro de la misma, dada la proximidad genética con este grupo; y que la llegada fuera facilitada

por el curso del río Sil, cuyo curso alto está relativamente próximo a zonas de la Babia leonesa donde medran individuos de *C. arvatica*; la llegada de estos individuos explicaría esta distribución y el porqué los individuos del otro grupo -haplotipo H2 en *matK*- aparecen en el centro de la distribución de *C. adsurgens* y en todo el área de distribución de *C. arvatica*. Estos resultados parecen ser coherentes con los derivados del análisis de secuencias ITS.

Esta llegada de individuos del norte no se aprecia mediante el análisis del marcador *trnL-F*, lo que puede ser debido a que tales individuos tenían el mismo haplotipo. Lo que sí parece existir es una relación geográfica de los tres haplotipos que aparecen con *trnL-F* en *C. arvatica*, donde se observa un haplotipo general en la zona central de su área de distribución, otro en el valle del Trubia, lo que podría ser explicado por la existencia de algún tipo de barrera que haya generado un aislamiento no muy acusado; una barrera de aislamiento mas fuerte explicaría las diferencias más acusadas del haplotipo presente en las muestras más orientales de *C. arvatica*, que presentan, respecto al haplotipo central, tres cambios en *trnL-F* y dos copias más del fragmento repetido en *trnS-G*; esta diferenciación genética de las muestras orientales es coherente con ciertos cambios morfológicos que llevaron a Losa & Montserrat (1953) a describir formas exclusivas del territorio. Llama la atención la presencia, en *trnS-G*, de un haplotipo que dispone de 3 copias, del mencionado fragmento repetido, en dos muestras bastante alejadas geográficamente (Figura 5: muestras 23 y 35); pudiera deberse a que en ambos casos corresponden a situaciones, independientes, de transición hacia haplotipos con una mayor número de copias: en el caso de la muestra occidental (23) el paso de las dos copias del haplotipo central a las tres de la *C. mariaceballi*, y en oriental (35) el paso del haplotipo central a las cuatro copias de la *C. arvatica* en el haplotipo de las muestras del extremo oriental de la distribución de esta especie.

La región conocida como ITS (1 y 2), como ya se ha mencionado, se corresponde con una zona espaciadora en el ADN nuclear, esto implica una tasa de variación relativamente alta y la transmisión por ambos parentales. En consecuencia, esta región resulta ser de alto interés en los análisis de diversidad y permiten elaborar modelos filogenéticos y propuestas taxonómicas en taxa de rango genérico o específico (Cano-Maqueda & Talavera 2011, Schilling et al 1998).

En los resultados obtenidos se observa mayor variación (Figura 2) que en el resto de marcadores, aunque la información no tiene una interpretación sencilla de su distribución geográfica. Se evidencia la existencia de dos grandes grupos (Figura 2) y el grupo B integra únicamente individuos de *C. adsurgens*; en el seno del mismo,

aparecen, por el método de ML, unas agrupaciones que parecen no estar relacionadas con un modelo geográfico claro, lo que puede deberse a un efecto del muestreo ya que las localidades parecen mostrarse bastante diversas. La afirmación anterior no se puede aplicar al grupo de muestras de *C. adsurgens* que se incluye en el grupo A y que se analizará con él.

En el grupo A se pueden reconocer tres grandes subgrupos A1, A2 y A3. El tercer subgrupo (A3) integra muestras de *C. adsurgens* de la zona central de su área de distribución y es al que se ha hecho referencia en el párrafo anterior. Como se discutió al tratar de los marcadores ADNcl su existencia se podría explicar por la llegada de individuos de localidades más próximas genéticamente a *C. arvatica*, pudiendo ser posible una llegada de polen más prolongada en el tiempo que la llegada de semillas. Pudiera haber sucedido que las poblaciones de esta zona central se hubieran aislado reproductivamente de las de los extremos; tal aislamiento pudiera haberse producido como consecuencia de que tales poblaciones localizadas en áreas más térmicas - menor altitud, influencia del río Sil, ...- presentara un desfase en la floración respecto a los individuos de las otras zonas. El subgrupo A2 está formado por muestras de *C. mariaceballii* que, además de permanecer aislado frente a la llegada de individuos, parece mantener un aislamiento de tipo reproductor, no viéndose tan claro este aislamiento en la muestra de mayor altitud (22) y más próxima a las poblaciones de *C. arvatica*. De nuevo, el tercer subgrupo (A1) aglutina los individuos más orientales lo que también hace indicar un aislamiento del resto de muestras de *C. arvatica*, que se agruparían todas en el mismo conjunto del grupo A.

Finalmente se puede decir que existe un aislamiento del conjunto de muestras de *C. mariaceballii* que presentan una identidad propia y bien diferenciada del resto. La *C. adsurgens* presenta un grupo de muestras en los extremos que conservan las características más propias de la especie, frente al grupo central que parece haber sido influenciado en algún momento pero también dispone de unas características propias. La mayor diversidad aparece en *C. arvatica* donde podemos encontrarnos con diversas agrupaciones con cierta identidad propia, pareciendo la más clara el grupo formado por las muestras que se distribuyen del valle alto del Nalón hasta el puerto de Piedrasluengas.

Discusión taxonómica

Del análisis de los resultados obtenidos se puede concluir que *Campanula gr. arvatica* es diverso y se pueden distinguir en él tres taxones vicariantes, de los que la distribución geográfica de las muestras analizadas se indica en la Figura 1. Tales

taxones, que proponemos sean sistematizados como especies autónomas, son reconocibles por su morfología y diferenciables mediante marcadores moleculares, tanto ADNn como DNAcl.

Campanula adsurgens Levier & Leresche, *J. Bot.* 17: 199 (1879). (Figura 8A).

= *Campanula arvatica* subsp. *adsurgens* (Levier & Leresche) Damboldt, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 79: 305 (1966)

- Localidad clásica: "Typus: E. Boissier - L. Leresche - E. Levier: Voyage en Espagne et Portugal, Juillet et Août 1878, Entre el Puente et Val de Oreas [sic] en Galice dans les broussailles, 21.Juillet, Leresche" [sec. Damboldt in *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 79: 305 (1966)]

- Diagnósis: tallos desde casi glabros en toda su longitud hasta cubiertos con abundantes pelos largos y patentes; hojas con peciolo desde glabro a provisto de abundantes pelos patentes y limbo desde glabro a cubierto de pelos adpresos; flores desde solitarias o binadas, hasta numerosas en inflorescencia racemosa de longitud variable, con pedúnculos densamente hirsutos; cáliz, con dientes de lineares a estrechamente triangulares y sin dientes laterales, densamente hirsuto; corola infundibuliforme muy abierta, con tubo de longitud igual o menor que los lóbulos, exteriormente cubierta de pelos cortos; cápsula densamente hirsuta.

- Distribución: crece en fisuras secas de roquedos calcáreos o dolomíticos en el noroeste de España: León Lugo y Orense.

Campanula arvatica Lag., *Varied. Ci.* 2(19): 40 (1805) (Figura 8B).

- Localidad clásica: "Venit ad saxorum rimas en el Puerto Pajares et Peñafurada" [sec. Lag., *Elench. Pl.*: [12] (1816)]

- Diagnósis: tallos desde casi glabros en toda su longitud hasta con pelos largos y patentes en la parte basal y media, glabros en la superior; peciolo y limbo foliares glabros; flores desde solitarias o binadas, hasta numerosas en inflorescencias racemosas de longitud variable, con pedúnculos glabros; cáliz, con dientes estrechamente lineares con dientes laterales variables en tamaño y número, glabro; corola glabra, infundibuliforme muy abierta, con tubo de longitud igual o menor que los lóbulos; cápsula glabra.

- Distribución: crece en fisuras secas de roquedos calcáreos en el noroeste de España: Asturias, León, Cantabria and Palencia.

- Diversidad: como señalaron Losa and Montserrat (1953), este taxon muestra una cierta variabilidad tanto en las partes vegetativas como en las florales. En particular en los territorios más orientales es donde tal diversidad aparece más consolidada

(Losa & Montserrat 1953) y apoyada por los resultados de los análisis de marcadores moleculares; atendiendo a ello se puede reconocer una variedad distinta exclusiva de tales territorios: *C. arvatica* var. *acutangula* (Leresche & Levier) Fern. Prieto & Arjona (Basionimo: *Campanula acutangula* Leresche & Levier, *J. Bot.* 17: 198, 1879) (incl.: *C. arvatica* fma. *minorifolia* Losa & P.Monts., *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 11(2): 435,1953; *C. arvatica* fma. *longisepala* Losa & P.Monts., *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 11(2): 435,1953).

Campanula mariaceballii Fern. Prieto & Arjona, **sp. nova** (Figura 8C).

= *Campanula arvatica* Somiedo *plantarum sensu auct. pl., non* Lag. in *Varied. Ci.* 2(19): 40 (1805)

= *Campanula adsurgens sensu* Serra & Bueno in *Flora Montiberica* 47: 27 (2011), *non* Levier & Leresche in *J. Bot.* 17: 199 (1879)

- Holotipo: La Malva, entre Castro y Pola de Somiedo, 684 m (Somiedo, Asturias, España); N 43° 05' - W 06° 12'; crece en fisuras de roquedos calcáreos; 00.VII.2008; *Legit.* Víctor M. Vázquez & José Antonio Fernández Prieto; Herbarium FCO: 33463.

- Diagnósis: tallos desde casi glabros en toda su longitud hasta con pelos largos y patentes en la parte basal y media, glabros en la superior; peciolo y limbo foliares en general glabros, aunque algunos individuos de algunas poblaciones los presentan con pilosidad de densidad variable; flores desde solitarias o binadas, hasta numerosas en inflorescencia racemosa de longitud variable, con pedúnculos glabros o cubiertos de pelos cortos; cáliz, con dientes estrechamente lineares sin dientes laterales, glabro o cubierto de pelos cortos; corola campanulada, con tubo al menos el doble de largo que los lóbulos, glabra o con abundantes pelos cortos en el exterior; cápsula glabra o cubierta de pelos cortos.

- Etimología: El epíteto específico deriva del nombre y apellido María Ceballos de Horna, compañera de vida y bióloga (J.A. Fernández Prieto).

- Distribución: crece en roquedos calcáreos, con diverso grado de humedad en áreas del este de Somiedo (Asturias), en los valles del río Somiedo y su afluente el Saliencia.

- Diversidad: como las otras especies del grupo, esta muestra una fuerte variabilidad en particular en lo que se refiere al indumento tanto de las partes vegetativas como de las florales. Tal diversidad se manifiesta en todas las poblaciones estudiadas; algunas plantas de las poblaciones del valle de la Bobia (afluente del Saliencia) presentan un indumento especialmente abundante y son las que fueron

identificadas como *Campanula adsurgens* por Serra and Bueno (2011); la forma de la corola permite interpretar tales plantas como un extremo de la variación de la polimorfa especie aquí descrita lo que está apoyado por los resultados del análisis de la diversidad del grupo mediante marcadores moleculares.



A: *Campanula adsurgens* Levier & Leresche ; Peñalba de Santiago, Ponferrada, León, España (Foto de José María Arjona Rodríguez).

B: *Campanula arvatica* Lag.; *locus classicus*: Peñafurada, Viadangos de Arbás, Villamanin, León, España (Fotografía de José María Arjona Rodríguez).



C: *Campanula mariaceballii* Fern. Prieto & Arjona; *locus classicus*: La Malva, Somiedo, Asturias, España) (Fotografía de José María Fernández Díaz-Formentí).

Figura 8: Imágenes de plantas de *Campanula gr. arvatica*.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y su análisis se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- 1) Dentro del grupo *Campanula arvatica* se confirma la existencia de tres especies: *Campanula adsurgens*, *Campanula mariaceballii* y *Campanula arvatica*.
- 2) En *Campanula mariaceballii* y con estos marcadores moleculares no se aprecia diversidad interna siendo también baja en *Campanula adsurgens*.
- 3) *Campanula arvatica* muestra la mayor diversidad, dentro de la cual se reconoce una nueva variedad *C. arvatica* var. *acutángula*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arjona Rodríguez JM. 2012.** Filogeografía de dos endemismos cantábricos del género *Campanula* L. (Campanulaceae Juss.): *C. adsurgens* Leresche & Levier y *C. arvatica* Lag. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, Universidad de Oviedo, 24 pp.
- Boissier E. 1875.** *Flora orientalis* 3. Geneva and Basel.
- Candolle A-P de. 1830.** *Monographie des Campanulées*. Paris.
- Candolle A-P de. 1838.** *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* 7. Paris.
- Cano Maqueda J & Talavera S. 2011.** A taxonomic revision of the *Campanula lusitanica* complex (Campanulaceae) in the Western Mediterranean region. *Anales Jard. Bot. Madrid* 68(1): 15-47.
- Cano-Maqueda J, Talavera S, Arisa M, Catalán P. 2008.** Speciation and biogeographical history of the *Campanula lusitanica* complex (Campanulaceae) in the Western Mediterranean region. *Taxon* 57: 1252–1266.
- Clement M, Posada D and Crandall K. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*: 9 (10): 1657-1660.
- Corriveau JL, Coleman AW. 1988.** Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Amer. J. Bot.* 75(10): 1443-1458
- Cuénoud P, Savolainen V, Chatrou LW, Powell M, Grayer RJ & Chase MW. 2002** Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18s rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* dna sequences. *Amer. J. Bot.* 89(1): 132–144.
- Damboldt J. 1966.** Zur Systematik und Cytologie von *Campanula arvatica* Lagasca. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 79: 299-308.
- Deyuan H, Lammers TG & Klein LL. 2011.** *Campanulaceae* L. *Flora China* 19: 505–563.
- Eddie WM, Shulkin T, Gaskin J, Haberle RC & Jansen RK. 2003.** Phylogeny of Campanulaceae s. str. inferred from ITS sequence of nuclear ribosomal DNA. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 90: 554–575.
- Fedorov AA & Kovanda M. 1976.** *Campanula* L. In: Tutin G, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (Ed.) *Flora Europaea* 4. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 74-93.
- Fernández Prieto, JA, Arjona, JM, Sanna, M, Pérez, R & Cires E. 2013.** Phylogeny and systematics of *Micranthes* (Saxifragaceae): an appraisal in European territories. *J. Pl. Res.* DOI 10.1007/s10265-013-0566-2
- Gielly L & Taberlet P. 1994** The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: Noncoding versus *rbcL* sequences. *Mol. Biol. Evol.* 11(5):769-777.
- Haberle RC., Dang A, Lee T, Peñafior C, Cortes-Burns H, Oestreich A, Raubeson L, Cellinese N, Edwards EJ & Kim S-T, 2009.** Taxonomic and biogeographic implications of a phylogenetic analysis of the Campanulaceae based on three chloroplast genes. *Taxon* 58 (3): 715-734.
- Hamilton M. 1999.** Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 521–523.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Molec. Evol.* 16:111-120.
- Lagasca M. 1805.** Descripción de dos géneros nuevos de plantas y de varias especies nuevas, ó poco conocidas. *Varied. Ci.* 2(19): 35-40.
- Lammers TG. 2007.** Campanulaceae. Flowering plants - Eudicots. *Fam. & Gen. Vasc. Pl.* (ed. K.Kubitzki) 8: 25-56.

- Leresche L & Levier E. 1879.** Decas plantarum novarum in Hispania collectarum. *J. Bot.* 17: 196-201.
- Losa MT & Montserrat P. 1953.** Nueva aportación al estudio de la flora de los montes cántabro-leones. *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 11: 385-462.
- McIntosh L, Poulsen C, Bogorad L. 1980.** Chloroplast gene sequence for the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase of maize. *Nature* 288: 556-560.
- Nieto Feliner G. 1985.** *Estudio crítico de la flora orófila del suroeste de León: Montes Aquilianos, Sierra del Teleno y Sierra de la Cabrera.* *Ruizia* 2: 1-240.
- Sáez L & Aldasoro JJ. 2001.** *Campanula* L. In: Paiva J, Sales F, Hedge IC, Aedo C, Aldasoro JJ, Castroviejo S, Herrero A, Velayos M, (Ed.). *Flora Ibérica* 14. C.S.I.C., Madrid, pp 105-136.
- Schilling EE, Linder CR, Noyes RD & Rieseberg LH. 1998.** Phylogenetic relationship in *Helianthus* (Asteraceae) based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region Sequence Data. *Sys. Bot.* 23: 177-187.
- Serra L & Bueno A. 2011.** *Campanula adsurgens*, novedad para Asturias. *Flora Montiber.* 47: 27-28.
- Sun Y, Skinner DZ, Liang GH & Hulbert SH. 1994.** Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genet.* 89: 26-32.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G & Bouvet J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S. 2011** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molec. Biol. Evol.* 28: 2731-2739;
- Wendling BM, Galbreath KE & DeChaine EG. 2011.** Resolving the Evolutionary History of *Campanula* (Campanulaceae) in Western North America. *PLoS ONE* 6(9): e23559. doi:10.1371/journal.pone.0023559
- Wolfe KH, Li W-H & Sharp PM. 1987.** Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 9054-9058.
- Zhuo Zhou, Jun Wen, Guodong Li & Hang Sun. 2011.** Phylogenetic assessment and biogeographic analyses of tribe Peracarpeae (Campanulaceae). *Plant Syst Evol.* doi: 10.1007/s00606-011-0547-7

ANEXO I.

Muestras utilizadas en el estudio de la diversidad de *Campanula* gr. *arvatica*.

| Código | Identificación | Localidad |
|--------|-------------------------|---|
| 1 | <i>C. adsurgens</i> | Junto al río Navia en A Ferrería, As Nogais, 533 m (Lugo, España). 29 T, 654053 E/4742147 N; J. M ^a . Arjona & Paula Mtnez. Cuesta; FCO 33449. |
| 2 | <i>C. adsurgens</i> | Carretera Visuña-Moreda, Alto do Couto, Folgoso do Courel, 1317 m (Lugo, España). 29 T, 656164 E/4719929 N; J. M ^a . Arjona & Paula Mtnez. Cuesta; FCO 33450. |
| 3 | <i>C. adsurgens</i> | Villarrubín, dirección Lugo; Oencia, 883 m (León, España), 29 T, 661498 E/4715308 N; J. M ^a . Arjona & Paula Mtnez. Cuesta; FCO 33451. |
| 4 | <i>C. adsurgens</i> | Entre San Tirso de Cabarcos, Sobrado (León) y Oulego, Rubiá (Orense), 860 m (España), 29 T, 670106 E/4708738 N; J. M ^a . Arjona & Paula Mtnez. Cuesta; FCO 33452. |
| 5 | <i>C. adsurgens</i> | Entre San Tirso de Cabarcos, Sobrado (León) y Oulego, Rubiá (Orense), 860 m (España), 29 T, 670094 E/4708732 N; J. M ^a . Arjona & Paula Mtnez. Cuesta; FCO 33453. |
| 6* | <i>C. adsurgens</i> | Entre Peón y Valiña, Toral de los Vados, 430 m (León, España), 29 T, 681264 E/4710203 N; J.M ^a Arjona, Adrián Cabeza & Oscar Gutiérrez; FCO: 33585 |
| 7* | <i>C. adsurgens</i> | Carretera La Barosa-Lago de Carucedo, Carucedo 515 m (León, España), 29 T, 679012 E/4707149 N; J. M ^a Arjona & José Arjona Mantas; FCO: 33584 |
| 8 | <i>C. adsurgens</i> | Covas, Rubiá, 451 m (Orense, España), 29 T, 678497 E/4704657 N; A. Fedz. Ceballos & J.A. Fedz. Prieto; FCO 33454. |
| 9 | <i>C. adsurgens</i> | Covas, camino paralelo a la vía del ferrocarril en dirección a Peñarrubia, Rubiá, 483 m (Orense, España), 29 T, 678325 E/4704405 N; J. M ^a Arjona & José Arjona Mantas; FCO 33455. |
| 10* | <i>C. adsurgens</i> | Por encima de Vilardesilva, Rubiá, 785 m (Orense, España), 29 T, 677689 E/4703473 N; J. M ^a Arjona Rquez.; FCO: 33583 |
| 11 | <i>C. adsurgens</i> | Junto al muro del pantano de Peñarrubia, Puente de Domingo Flórez, 433 m (León, España), 29 T, 679397 E/4702645 N; J. M ^a Arjona & José Arjona Mantas; FCO 33456. |
| 12 | <i>C. adsurgens</i> | Frente a castillo Cornatel, Villavieja, Priaranza del Bierzo, 818 m (León, España), 29 T, 689986 E/4706587 N; J. M ^a Arjona & José Arjona Mantas; FCO 33457. |
| 13 | <i>C. adsurgens</i> | Peñas de Ferradillo, Ferradillo, Priaranza del Bierzo, 1413 m (León, España), 29 T, 692550 E/4703665 N; José M ^a Arjona; FCO 33458. |
| 14 | <i>C. adsurgens</i> | Peñas de Ferradillo, Ferradillo, Priaranza del Bierzo, 1451 m (León, España), 29 T, 693010 E/4703851 N; A. Fedz. Ceballos & J.A. Fedz. Prieto; FCO 33459. |
| 15 | <i>C. adsurgens</i> | Ladera del pico La Aquiana en Los Doce Apóstoles, Valdueza, Ponferrada, 1483 m (León, España), 29 T, 697440 E/4702161 N; José M ^a Arjona; FCO 33460. |
| 16 | <i>C. adsurgens</i> | Cueva San Genadio, Peñalba de Santiago, Ponferrada, 1125 m (León, España), 29 T, 701416 E/4700044 N; J. M ^a Arjona & José Arjona Mantas; FCO 33461. |
| 17 | <i>C. adsurgens</i> | Valle del Silencio, frente a la cueva de San Genadio, Peñalba de Santiago, Ponferrada, 1086 m (León, España), 29 T, 701607 E/4700050 N; J. M ^a Arjona & José Arjona Mantas; FCO 33462. |
| 18 | <i>C. mariaceballii</i> | Entre Castro y Pola de Somiedo, área recreativa de La Malva, Somiedo, 645 m (Asturias, España), 29 T 723467 E/4777344 N; V. Vázquez & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33463. |
| 19 | <i>C.</i> | Principio del Valle de Saliencia, Somiedo, 691 m (Asturias, |

| Código | Identificación | Localidad |
|--------|-------------------------|---|
| | <i>mariaceballii</i> | España), 29 T, 723838 E/4777441 N; R. Pérez Vallines, J.M ^a Arjona & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33464. |
| 20 | <i>C. mariaceballii</i> | Entre Pola de Somiedo y Coto de Buenamadre, Somiedo, 794 m (Asturias, España), 29 T, 723842 E/4774672 N; R. Pérez Vallines, J.M ^a Arjona & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33465. |
| 21 | <i>C. mariaceballii</i> | La Redibobia, Somiedo, 1209 m (Asturias, España), 29 T, 727362 E/4773574 N; V. Vázquez, T. Sánchez Corominas & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33466. |
| 22 | <i>C. mariaceballii</i> | Cerca del Lago de La Mina, Saliencia, Somiedo, 1625 m (Asturias, España), 29 T, 736235 E/4771380 N; V. Vázquez & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33467. |
| 23 | <i>C. arvatica</i> | Puerto de Ventana, Teverga-San Emiliano, 1614 m (Asturias-León, España), 29 T, 744196 E/4771867 N; M. Fdez. Ceballos & J. A. Fdez. Prieto; FCO 33468. |
| 24 | <i>C. arvatica</i> | Fresnedo, Teverga, 692 m (Asturias, España), 29 T, 739254 E/4778784 N; E. Cires & J.A. Fedz. Prieto; FCO 33469. |
| 25 | <i>C. arvatica</i> | Desfiladero de Valdecerezales, entre Las Ventas y Entrago, Teverga, 455 m (Asturias, España), 29 T, 737166 E/4785199 N; R. Pérez Vallines, J.M ^a Arjona & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33470. |
| 26 | <i>C. arvatica</i> | Desfiladero de las Xanas, Villanueva, Santo Adriano, 206 m (Asturias, España), 30 T, 256574 E/4795316 N; J.A. Fdez. Prieto; FCO 33471. |
| 27 | <i>C. arvatica</i> | Senda del Oso, Tuñón, Santo Adriano, 160 m (Asturias, España), 30 T, 257969 E/4797797 N; R. Pérez Vallines, J.M ^a Arjona & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33472. |
| 28 | <i>C. arvatica</i> | Subida a El Angliru, Grandiella, Riosa, 1223 m (Asturias, España), 30 T, 261544 E/4791059 N; M. Ceballos & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33473. |
| 29 | <i>C. arvatica</i> | Entre Puente Orugo y San Emiliano, San Emiliano, 1148 m (León, España), 29 T, 744453 E/4761086 N; R. Pérez Vallines, J.M ^a Arjona & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33474. |
| 30 | <i>C. arvatica</i> | Puerto de la Cubilla, Lena, 1575 m (Asturias, España), 30 T, 262988 E/4764278 N; A. Fdez. Ceballos & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33475. |
| 31 | <i>C. arvatica</i> | Puerto de la Ballota, Lena, 1723 m (Asturias, España), 30 T, 264424 E/4763305 N; V. Vázquez & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33476. |
| 32 | <i>C. arvatica</i> | Peñafurada, Viadangos de Arbás, Villamanin, 1310 m (León España), 30 T, 275916 E/4759060 N; José M ^a Arjona; FCO 33477. |
| 33 | <i>C. arvatica</i> | Entre Villanueva de la Tercia y Millaró de la Tercia, Villamanin, 1398 m (León, España), 30 T, 283736 E/4761392 N; M. Fdez. Ceballos & J. A. Fdez. Prieto; FCO 33478. |
| 34 | <i>C. arvatica</i> | Cerca del Puerto de San Isidro, Aller, 1352 m (Asturias, España), 30 T, 302129 E/4771587 N; M. Ceballos & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33479. |
| 35 | <i>C. arvatica</i> | Valle del Nalón, entre Bezanes y Tarna, Caso, 846 m (Asturias, España), 30 T, 317005 E/4777241 N; M. Ceballos & J.A. Fdez. Prieto; FCO 33480. |
| 36* | <i>C. arvatica</i> | Desfiladero de los Beyos, entre Ceneya, Amieva, y San Ignacio, Ponga, 317 m (Asturias, España), 30 T, 330149 E/4787861 N; J.A. Fdez. Prieto, J.M ^a Arjona, Manuel Menéndez Puertas; FCO 33587. |
| 37* | <i>C. arvatica</i> | Vega 'La Piedra', Subiendo al Refugio de Vegaredonda. Macizo Occidental. Picos de Europa, Cangas de Onis, 1100 m (Asturias, España); 30T, 336955 E/4791311 N; Á. Bueno; JBAG 5069. |
| 38* | <i>C. arvatica</i> | Desfiladero de Caín, Posada de Valdeón, 716 m (León, España), 30 T, 345401 E/4785673 N; J.A. Fdez. Prieto, J.M ^a Arjona, Manuel Menéndez Puertas; FCO 33586. |

| Código | Identificación | Localidad |
|---------------|---|--|
| 39 | <i>C. arvatica</i> | Cuetos de Juan Torivio, Fuente Dé, Camaleño, 1949 m (Cantabria, España), 30 T, 353235 E/4780421 N; M. Fdez. Ceballos, M. Ceballos & J. A. Fdez. Prieto; FCO 33481. |
| 40* | <i>C. arvatica</i> | Subiendo al Pto. Piedrasluengas pasado Camasobres, La Pernía, 1196m (Palencia, España), 30 T, 379357 E/4763747 N; J.A. Fdez. Prieto, J.M ^a Arjona, Manuel Menéndez Puertas; FCO 33588 |
| 41 | <i>C. rotundifolia</i> (grupo externo) | Cuetos de Juan Torivio, Fuente Dé, Camaleño, 1949 m (Cantabria, España), 30 T, 353235 E/4780421 N; M. Fdez. Ceballos, M. Ceballos & J. A. Fdez. Prieto; FCO 33482. |

(*) Muestras nuevas en este trabajo.