



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

TRABAJO FIN DE MÁSTER

DIVERSIDAD, FILOGEOGRAFÍA Y SISTEMÁTICA DE *SAXIFRAGA HIRSUTA* S. L.



Mauro Sanna

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
SAXIFRAGA HIRSUTA S. L.

Mauro Sanna



Firma

José Antonio Fernández Prieto



Firma

Álvaro Bueno Sánchez



Firma

ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	5
Antecedentes.....	5
Planteamiento y objetivos.....	7
Material y métodos	8
Muestras estudiadas	8
Métodos.....	9
Extracción de ADN genómico	9
Amplificación de regiones	9
Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético	11
Resultados	12
Análisis filogenético de las secuencias de ADN nuclear (ITS)	12
Análisis de la diversidad haplotípica de las secuencias <i>rbcl</i>	14
Análisis de la diversidad haplotípica de la región cloroplástica <i>trnL-F</i>	16
Conclusiones	24
Referencias bibliográficas.....	25
Anexo I.....	28

Resumen:

Sanna M. 2013. Diversidad, filogeografía y sistemática de *Saxifraga hirsuta s. l.*

Saxifraga hirsuta subsp. *hirsuta* L. (Saxifragaceae, sección *Gymnopera*) es una planta perenne que crece en el norte de la Península Ibérica y en Irlanda, *Saxifraga hirsuta* subsp. *paucicrenata* (Gillot) D. A. Webb (Saxifragaceae) es una planta perenne orófila de la cordillera Cantábrica y de los Pirineos. Este estudio se plantea evaluar la diversidad genética de las dos plantas y construir un modelo filogeográfico mediante técnicas moleculares, confrontándolas también con todas las especies de la sección *Gymnopera* y de otras secciones del género. ADN nuclear (región ITS) y ADN cloroplástico (*rbcL* y *trnL-F*) han sido utilizados como marcadores genéticos. El análisis de la red de haplotipos y la construcción de árboles filogenéticos ha permitido evaluar que no existe ningún patrón altitudinal en *S. hirsuta s. l.* y su similitud genética con la especie pirenaica *S. umbrosa* L. permite considerar las dos especies como una única unidad taxonómica. Otra especie de la misma sección, *S. spathularis* Brot., forma un robusto clado hermano con *S. hirsuta s. l.* hecho que permite teorizar sobre la existencia de un ancestro común distribuido geográficamente desde Irlanda hasta la Península Ibérica. La otra especie de la sección, *S. cuneifolia* L., parece tener un origen más próximo a otras secciones. Este trabajo plantea las bases para un estudio más detallado de toda la sección *Gymnopera*.

Summary:

Sanna M. 2013. Diversity, phylogeography and systematic of *Saxifraga hirsuta s. l.*

Saxifraga hirsuta subsp. *hirsuta* L. (Saxifragaceae, section *Gymnopera*) is a perennial plant that grows in the North of the Iberian Peninsula and Ireland, *Saxifraga hirsuta* subsp. *paucicrenata* (Gillot) D. A. Webb (Saxifragaceae) is a perennial and orophilous plant that lives in the Cantabrian Mountains and the Pyrenees. In this study we suggest the evaluation of the genetic diversity of both species and the construction of phylogeographical models by using molecular techniques as well as the comparison with other species from the section *Gymnopera* and other sections of the genus. Nuclear DNA (ITS region) and chloroplastic DNA (*rbcL* and *trnL-F*) have been used as genetic markers. The analysis of the haplotype networks as well as the construction of phylogenetic trees has allow us to set that there is not any altitudinal zonation related to *S. hirsuta s. l.* Moreover, its genetic similarity with the Pyrenean species *S. umbrosa* L. indicates that both species belong to the same taxonomic unit. The fact that *S. spathularis* Brot., from the same section performs a strong sister clade with *S. hirsuta s. l.* allow us to theorize about the existence of a common ancestor geographically distributed from Ireland to the Iberian Peninsula while the other species of the section, *S. cuneifolia* L., seems to have a more close origin to other sections. This work is the basis for further studies on the whole *Gymnopera* section.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El género *Saxifraga* L. -familia Saxifragaceae, orden Saxifragales (APG 2009)- comprende, si se excluye de él *Micranthes* Haw., entre 370 y 390 especies distribuidas fundamentalmente por los territorios templados, mediterráneos y árticos del hemisferio norte, aunque algunas crecen en Sudamérica (Brouillet & Elvander 2007; Soltis 2007).

El modelo sistemático actual del género distingue unas quince secciones (Gornall 1987; Webb 1987a), entre ellas *Saxifraga* sect. *Gymnopera* descrita por Don (1822) incluyendo alguna especie más de las actualmente incluidas en este taxon que, tal como se delimita actualmente, agrupa fundamentalmente plantas europeas occidentales (Webb 1987a, 1993; Vargas 1997):

- *Saxifraga cuneifolia* L., *Sp. Pl.*, ed. 2: 574 (1762), que se distribuye desde el Pirineo Oriental hasta los Cárpatos orientales. De acuerdo con Webb (1988, 1993) se distinguen dos razas con categoría subespecífica: *S. cuneifolia* subsp. *cuneifolia* y *S. cuneifolia* subsp. *robusta* D.A.Webb, *Bot. J. Linn. Soc.* 97: 355 (1988).
- *Saxifraga hirsuta* L., *Syst. Nat.*, ed. 10, 2: 1026 (1759) designada por Gornall (1987) tipo de la sección y distribuida desde la cordillera Cantábrica hasta los Pirineos centrales e Irlanda. Se distinguen en su seno dos subespecies: *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* y *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* (Gillot) D.A.Webb, *Feddes Repert.* 68: 201 (1963), esta última una raza orófila de la cordillera Cantabrica y los Pirineos (Webb 1993; Vargas 1997).
- *Saxifraga spathularis* Brot., *Fl. Lusit.* 2: 172 (1805), de distribución ibérica noroccidental e ibérica.
- *Saxifraga umbrosa* L., *Sp. Pl.*, ed. 2: 574 (1762), distribuida por los Pirineos occidentales y centrales.

Además, se han descrito tres híbridos entre especies de esta sección: *Saxifraga xpolita* (Haw.) Link, *Enum. Hort. Berol. Alt.* 1: 414 (1821) (*S. hirsuta* x *S. spathularis*), *Saxifraga xgeum* L., *Sp. Pl.*: 401 (1753) (*S. hirsuta* x *S. umbrosa*) y *S. xurbium* D.A.Webb, *Feddes Repert.* 68: 199 (1963) (*S. spathularis* x *S. umbrosa*).

La sistemática tradicional del género (Haworth 1812, 1821; Don 1822; Engler & Irmscher, 1919) ha sufrido escasos cambios, salvo la ya indicada segregación de *Micranthes* Haw. que ha sido consecuencia, fundamentalmente, de las conclusiones derivadas del uso de marcadores moleculares (Soltis *et al.* 1996, 2001; Fernández

Prieto *et al.* 2013). Estos criterios sistemáticos, apoyados en el análisis de secuencias de ADN tanto nuclear como cloroplástico (Soltis *et al.* 1996, 2001; Conti *et al.* 1999; Vargas *et al.* 1999; Vargas 2000), han permitido confirmar, en la mayoría de los casos, la sistemática seccional establecida básicamente por Gornall (1987) y comúnmente aceptada (Webb 1987a, 1993; Vargas 1997; Gornall *et al.* 2000; Jintang *et al.* 2001; McGregor 2008).

El estudio de *Saxifraga* sect. *Gymnopera* mediante marcadores moleculares se ha desarrollado escasamente, aunque secuencias de muestras de especies de esta sección han sido incluidas en estudios de otros grupos del género; el análisis de secuencias ITS de muestras de *S. cuneifolia*, *S. hirsuta* y *S. spathularis* ha llevado a Conti *et al.* (1999) a concluir que *Saxifraga* sect. *Gymnopera* constituye un clado monofilético. Pérez Vallines (2011) investigó, mediante el análisis secuencias de ADN tanto nuclear (ITS) como cloroplástico (*rbcl*), el origen y diversidad de las poblaciones de *S. hirsuta* y *S. spathularis* de la Península Ibérica e Irlanda, evidenciándose la posibilidad de usar esas u otras secuencias para estudiar la diversidad de las plantas de la citada sección. Tal potencialidad de uso se ha evidenciado en otras *taxa* del género *Saxifraga*: *S. pentadactylis* complex (Vargas 2001, 2003), *S. oppositifolia* (Holderegger & Abbot 2003) o *S. hirculus* (Oliver *et al.* 2006).

Entre las especies sistematizadas en la sección *Gymnopera* del género *Saxifraga*, *S. hirsuta* muestra una relativamente elevada diversidad genética (Pérez Vallines 2011), un amplio área de distribución y desde el punto de vista sistemático se reconocen dos subespecies: *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* y *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* (Webb 1993; Vargas 1997; Saule 2005). Este último taxón es una planta orófila que crece tanto en los Pirineos occidentales y centrales y en la Cordillera Cantábrica, caracterizada frente a *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* por su menor porte, por sus hojas de menor tamaño, peciolo más corto y limbo algo oblongo-elíptico, no orbicular con base cordada, con menor número de festones. En la descripción de la planta que crece en "...Plan-Pignon..." (Pirineos Atlánticos, Francia) *S. hirsuta* var. *paucicrenata* Gilot (1880) hace referencia a plantas vistas por L. Leresche en la comarca de Reinosa (Cantabria) (Leresche & Levier 1881) que identifica como tal. Por otro lado plantas de ese grupo fueron descritas por otros autores: *S. geum* L. subsp. *hirsuta* (L.) Engl. & Irmsch. var. *cuatrecasasii* Font Quer & Guinea, basada en plantas picoeuropeanas (Guinea 1947); de la misma procedencia y características (Lacaita 1930) son las plantas llamadas *S. geoides* Lacaita, *Cavanillesia* 3: 37 (1930); *S. hirsuta* L. var.

elegans (J.Mackay) D.A. Webb, *Proc. Roy. Irish Acad.* 53(B): 96 (1950) [≡*S. elegans* J.Mackay, *Fl. Hibern.* 1: 65 (1836), nom. illeg, non *S. elegans* Sternb. *Rev. Saxifrag.* 2: 34 (1831)], es un nombre aplicado a plantas con hojas orbiculares de las Turk Mountains de Killarney (Irlanda) (Mackay 1836). No obstante, no hay acuerdo sobre la significación de estas plantas orófilas de *S. hirsuta* y su adecuada sistematización (Laínz & cols. 1959; Laínz 1982).

Planteamiento y objetivos

La diversidad morfológica en relación a un gradiente altitudinal detectada en *S. hirsuta* que ha dado lugar al reconocimiento de dos *taxa* independientes, aunque con categoría diversas, y la diversidad latitudinal puesta en evidencia, atendiendo gen *rbcl* (ADN cloroplástico) (Pérez Vallines 2011), aconseja un análisis de la diversidad genética de la especie en numerosas muestras representativas de la diversidad morfológica y adecuadamente distribuidas, tanto latitudinalmente como altitudinalmente, en el area en que vive. Además, por tal análisis se propone ensayar otros marcadores moleculares, además de los ya usados.

Tal análisis de la diversidad genética de *Saxifraga hirsuta* pretende los siguientes objetivos:

- ✓ Analizar la diversidad entre individuos de territorios basales y de alta montaña en toda o en la mayor parte del área de distribución de *S. hirsuta*.
- ✓ Analizar la diversidad genética entre individuos procedentes de territorios cantábricos occidentales y orientales, pirenaicos e ibéricos.
- ✓ Analizar las afinidades entre *S. hirsuta* s. l. y las otras especies de *Saxifraga* sect. *Gymnopera*.
- ✓ Proponer un modelo sistemático para *S. hirsuta* coherente con los resultados obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras estudiadas

El muestreo realizado pretende una representación adecuada de todo el área de distribución de *Saxifraga hirsuta* s. l. (*Saxifraga hirsuta* subsp. *hirsuta* y *S. h.* subsp. *paucicrenata*), teniendo en cuenta, además, su gradiente altitudinal de distribución en los territorios montañosos. Además, en el estudio se han incluido muestras de otras especies de *Saxifraga* sect. *Gymnopera* (*S. cuneifolia*, *S. spathularis* y *S. umbrosa*) y de otras secciones: *S. aizoides* (sect. *Xanthizoon*), *S. aretioides* (sect. *Porphyron*), *S. granulata* (sect. *Saxifraga*) y *S. rotundifolia* (sect. *Cotylea*) (Figura 1 y Anexo I).

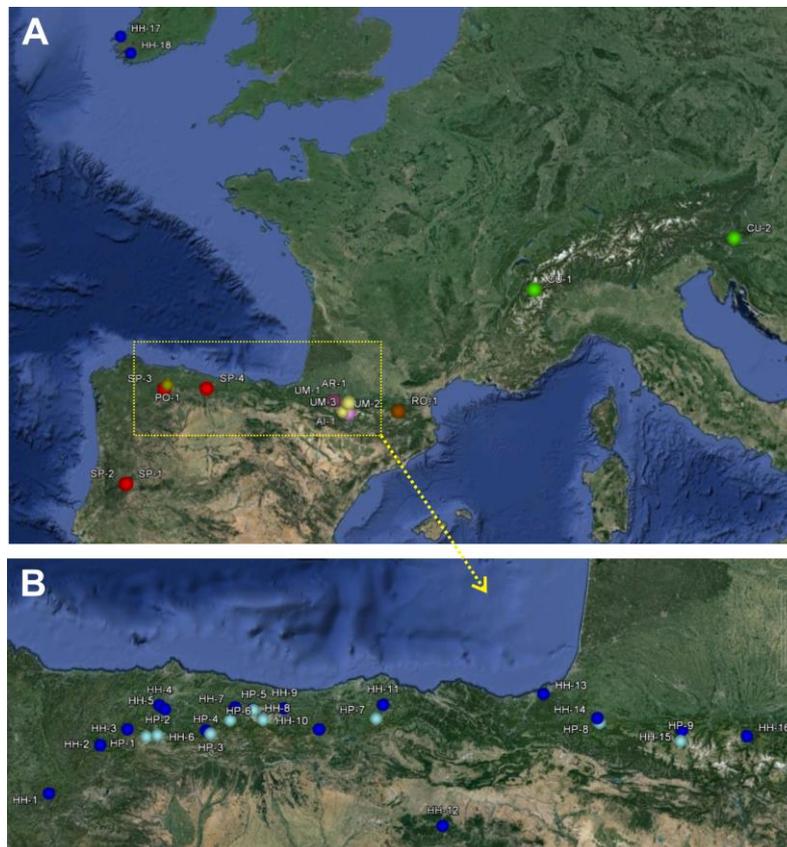


Figura 1. Distribución geográfica de las muestras de *Saxifraga* usadas en este trabajo. A) Muestras de *S. aizoides* (AI), *S. aretioides* (AR), *S. cuneifolia* (CU), *S. granulata* (GR), *S. rotundifolia* (RO), *S. xpolita* (PO), *S. spathularis* (SP) y *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* (HH) en Irlanda; B) Muestras de *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* (HH) y *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* (HP), en el norte de la península Ibérica.

Como grupo externo en los análisis de secuencias ITS se ha usado una de *Itea ilicifolia* Oliv. (Iteaceae J. Agardh), procedente del Genbank (AY138058.1).

Métodos

Extracción de ADN genómico

El ADN total se extrajo a partir de 20-30 mg de material foliar previamente deshidratado en gel de sílice o, en su caso, de 100-150 mg de material congelado a -32°C. El material vegetal se homogeneizó con nitrógeno líquido y el ADN se extrajo con el kit Qiagen DNeasy® Plant Minikit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. El tampón de extracción (Tampón AP1) se modificó mediante la adición de 5% de β-mercaptoetanol y la elución final se realizó en dos eluciones de 100 µL y una de 50 µL con agua destilada y desionizada. Esta última dio mejores resultados en las muestras más complejas debido a la alta concentración de productos secundarios presentes en ellas. Las dificultades en la extracción del ADN de algunas muestras pueden ser debidas a la presencia de altas concentraciones de productos secundarios como fenoles y polisacáridos.

La cantidad y calidad del ADN genómico extraído se evaluó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1,4 % y 0,5 µg/mL de bromuro de etidio), empleando un sistema Gel Logic 100 (KODAK) y el programa informático KODAK 1D Image Analysis. Los productos de la extracción se utilizaron directamente en la amplificación de fragmentos mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*: PCR).

Amplificación de regiones

Para la elaboración de este estudio se amplificaron dos regiones del ADN cloroplástico, la región cloroplástica no codificante del espaciador intergénico *trnL-F* y la región cloroplástica codificante *rbcL* (*RuBisCO large subunit*). De la región *rbcL* se amplificaron tres fragmentos consecutivos, utilizando las parejas de cebadores Z1F-640R, 520F-949R y 890F-3'R (Tabla 1). Además, se amplificó la región nuclear ITS (*Internal Transcriberd Spacer*), constituida por dos partes, ITS 1 e ITS 2, el ADN no codificante que flanquea una región que codifica la subunidad 5.8S del ARN estructural de los ribosomas.

Para cada pareja de cebadores utilizada (Tabla 1), previamente se optimizaron los parámetros de concentración de MgCl₂, temperatura de anillamiento y número de ciclos en la PCR. Asimismo, se adicionó a la mezcla de reacción DL-Dithiothreitol

(DTT) o dimethyl sulfoxide (DMSO) con el fin de estabilizar la reacción de PCR (Tabla 2).

Tabla 1. Cebadores utilizados en la amplificación de secuencias de cada región mediante PCR, con sus respectivas secuencias y la procedencia de los mismos.

Región	Cebador	Secuencia (5´-3´)	Referencia
ITS	N16F	CGATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTC	Fernández Prieto <i>et al.</i> 2013
	N16R1	GGTTCGCTCGCCGTTACTARGGGAATC	
<i>rbcl</i>	Z1F	ATGTCACCACAAACAGARACTAAAGC	McIntosh <i>et al.</i> 1980
	640R	GCTTCGGCACAAAATAAGAAACG	Fernández Prieto <i>et al.</i> 2013
	520F	CGTGGTGGACTTGAYTTTAC	
	949R	GAATATGATCTCCACCAGACATACG	
	890F	GCATGCMGTTATTGATAGACAGA	
	3´R	CTCGGAACTCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG	Olmstead <i>et al.</i> 1992
<i>trnL-F</i>	Le	GGTTC AAGTCCCTCTATCCC	Taberlet <i>et al.</i> 1991
	Lf	ATTTGAACTGGTGACACGAG	

Las amplificaciones se realizaron en 25 µL de volumen final con 10-20 ng de ADN, 2,5 µL de 10x PCR buffer (Biotools), concentración óptima de MgCl₂ (Tabla 2), 0,2 mM de cada dNTP (Biotools), 0,08 µM de cada cebador (Tabla 1) y 1 U de Taq polimerasa (Biotools). Las reacciones de PCR se realizaron mediante un número de ciclos previamente definido para cada región amplificada que consistieron en 94°C durante 1 min, temperatura óptima de anillamiento durante 45 s y 72°C 1 min, precedidos de una fase de desnaturalización de 5 min a 94°C y finalizándose el proceso con una fase de extensión a 72°C durante 10 min.

Tabla 2. Condiciones óptimas de PCR para los distintos cebadores utilizados.

Región	Pareja de cebadores	MgCl ₂ (mM)	DTT (mM)	DMSO (mM)	Nº de ciclos	Temperatura de anillamiento (°C)
<i>trnL-F</i>	Le-Lf	1,5	10	-	30	52
<i>rbcl</i>	Z1F-640R	4.5	-	70	35	60
	520F-949R					
	890F-3´R					
ITS	N16F-N16R1	4.5	-	70	35	63

La secuenciación de las regiones amplificadas se llevó a cabo a través de un servicio externo (Macrogen), utilizando los mismos cebadores usados en la amplificación (Le para *trnL-F*, 640R, 520F y 890F para *rbcl*, y N16R1 para ITS) y bajo condiciones de terminación BigDye™. Posteriormente, la lectura se realizó en un secuenciador automático 3730XL, también a través de la misma empresa.

Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se alinearon de manera independiente para cada región amplificada, utilizando el alineamiento múltiple MUSCLE (Robert 2004). Los alineamientos obtenidos se corrigieron de forma manual utilizando el programa MEGA versión 5.2 (Tamura *et al.* 2011). Las ambigüedades presentes en la secuencia fueron sustituidas por los símbolos del código internacional de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

El análisis filogenético de estas regiones se efectuó con el programa MEGA versión 5.2 (Tamura *et al.* 2011) mediante los métodos de Máxima Parsimonia (MP) y Maxima Probabilidad (Maximum Likelihood) (ML).

Para el análisis de MP se realizó una búsqueda exhaustiva del mejor árbol filogenético entre 10000 aleatorizaciones de las muestras realizadas mediante “bootstrap”. El tratamiento de los *gaps* se realizó según la opción *all sites* y el método de búsqueda de la máxima parsimonia fue el TBR (*Tree-Bisection-Reconnection*).

Para el análisis de ML también se realizó una aleatorización de las muestras mediante *bootstrap* con 2000 réplicas y se elijo el mejor modelo de sustitución nucleotídica a través de la aplicación de búsqueda del mejor modelo de sustitución según las indicaciones de Tamura *et al.* (2011). El modelo con el menor valor del BIC (*Bayesian Information Criterion*) -el TN93 (Tamura & Nei 1993) con 5 parámetros Gamma- fue usado en el análisis ML.

En el resto de marcadores moleculares (*rbcL*, *trnL-F*) se realizaron genealogías de haplotipos con el programa TCS versión 1.21 (Clement *et al.* 2000) según el criterio de la *statistical parsimony* (Templeton *et al.* 1992).

RESULTADOS

Análisis filogenético de las secuencias de ADN nuclear (ITS)

Los análisis de las secuencias completas del ITS, tanto mediante Máxima Parsimonia (MP) (Figura 2) que mediante Máxima Probabilidad (ML) (Figura 3) producen dos árboles en el que las muestras de *Saxifraga hirsuta* s. l. y *S. umbrosa* forman un clado robusto y claramente discriminado frente al formado por las muestras de *S. spathularis*;

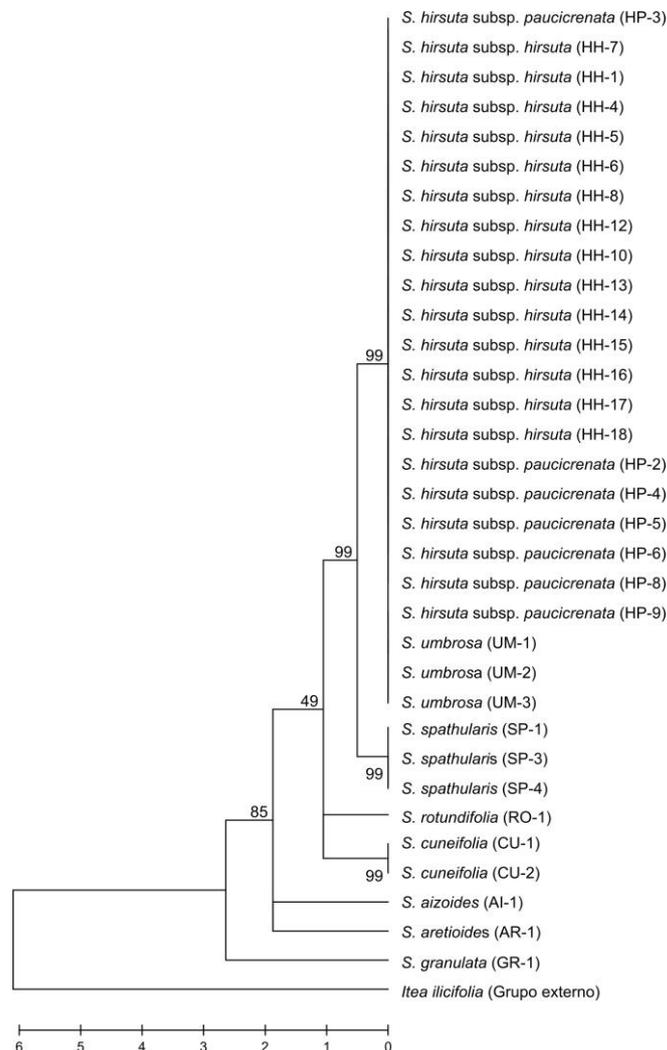


Figura 2. Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Saxifraga* mediante máxima parsimonia (MP): *S. aizoides* (sec. *Xanthizoon*), *S. aretioides* (sec. *Porphyron*), *S. cuneifolia* (sec. *Gymnopera*), *S. granulata* (sec. *Saxifraga*), *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* (sec. *Gymnopera*), *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* (sec. *Gymnopera*), *S. rotundifolia* (sec. *Cotylea*) y *S. spathularis* (sec. *Gymnopera*); grupo externo *Itea ilicifolia* (Iteaceae).

El conjunto de muestras de las citadas especies de la sección *Gymnopera* forman un clado también robusto frente a las muestras de *S. rotundifolia* (sec. *Cotylea*) y *S. cuneifolia*, sistematizada en la sección *Gymnopera*. Las muestras de especies del género *Saxifraga* de otras secciones – *S. aizoides* (sec. *Xanthizoon*), *S. aretioides* (sec. *Porphyrion*) y *S. granulata* (sec. *Saxifraga*)- se discriminan en mayor grado.

En lo que se refiere al árbol obtenido mediante análisis de Máxima Probabilidad (ML) (Figura 3) los resultados son muy similares.

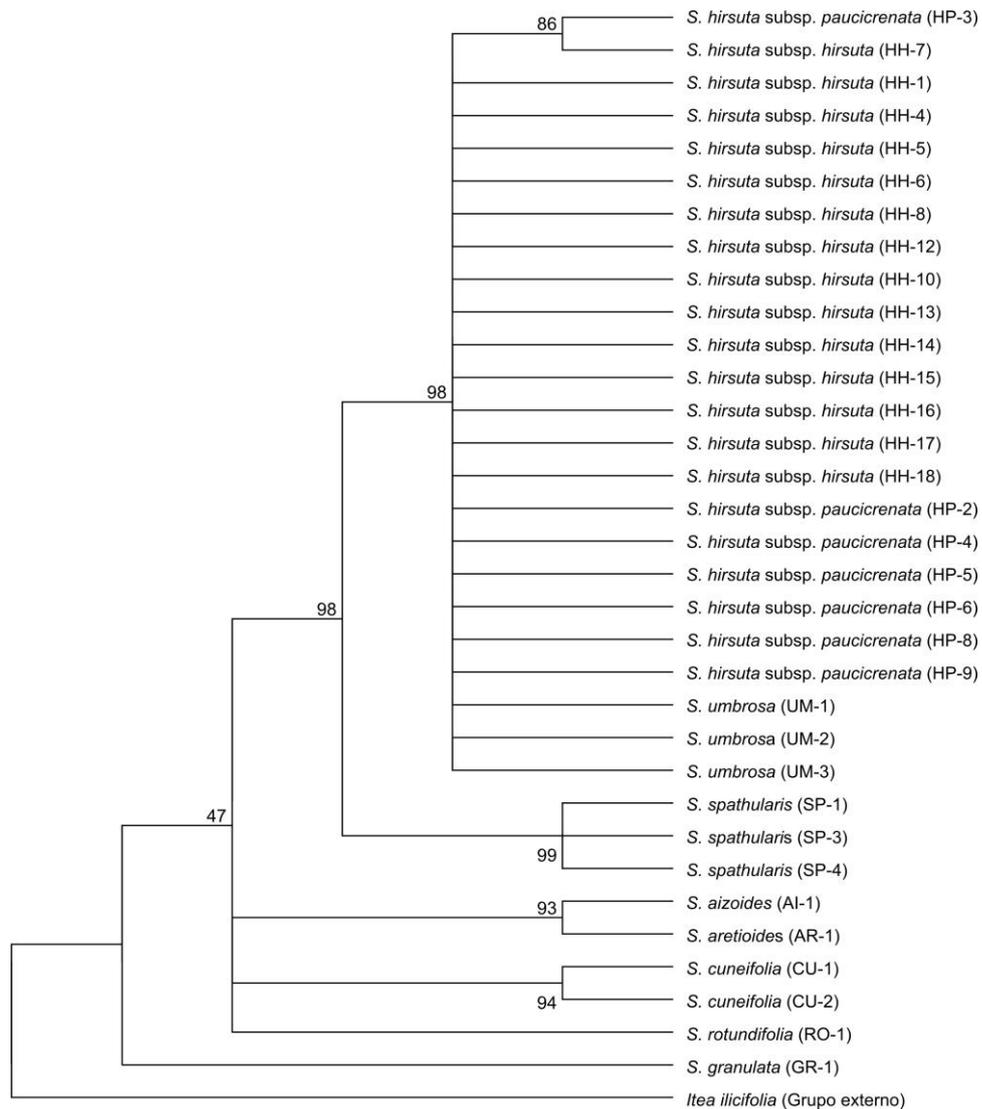


Figura 3. Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Saxifraga* mediante máxima probabilidad (ML): *S. aizoides* (sec. *Xanthizoon*), *S. aretioides* (sec. *Porphyrion*), *S. cuneifolia* (sec. *Gymnopera*), *S. granulata* (sec. *Saxifraga*), *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* (sec. *Gymnopera*), *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* (sec. *Gymnopera*), *S. rotundifolia* (sec. *Cotylea*) y *S. spathularis* (sec. *Gymnopera*); grupo externo *Itea ilicifolia* (Iteaceae).

Análisis de la diversidad haplotípica de las secuencias *rbcl*

Se han analizado secuencias nucleotídicas de una longitud de 1409 pb, correspondientes a 3 fragmentos consecutivos de la región cloroplástica codificante *rbcl*.

Tales secuencias corresponden a 35 muestras de plantas del género *Saxifraga*: 31 de ellas de plantas de la sección *Gymnopera* e incluyen 15 de *S. hirsuta* subsp. *hirsuta*, 9 de *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata*, 2 de *S. spathularis*, 2 de *S. cuneifolia* y 3 de *S. umbrosa*.

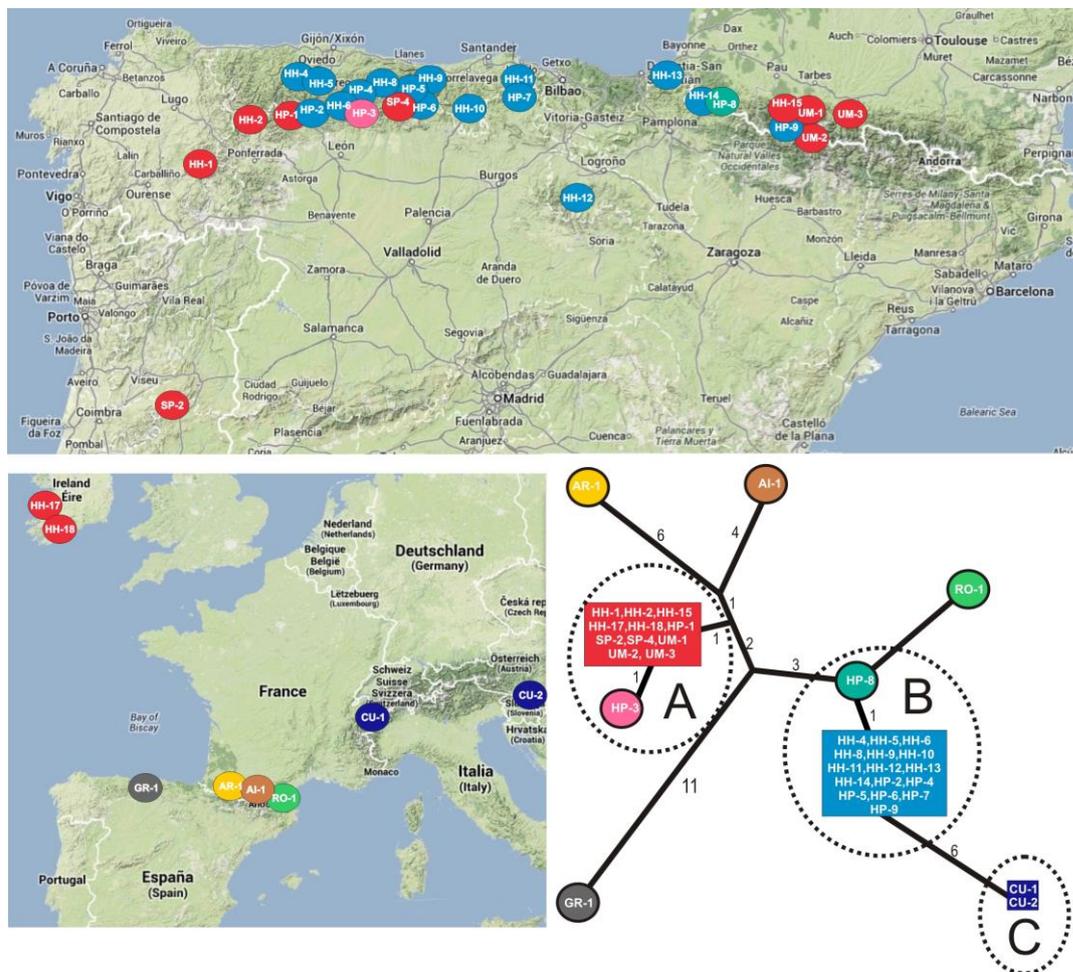


Figura 4. Distribución geográfica de los haplotipos obtenidos del análisis de secuencias de la región cloroplástica *rbcl* en muestras de *Saxifraga*: *S. aizoides* (AI), *S. aretioides* (AR), *S. cuneifolia* (CU), *S. granulata* (GR), *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* (HH), *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* (HP), *S. rotundifolia* (RO) y *S. spathularis* (SP).

Las otras cuatro corresponden a plantas de otras secciones del género: *S. aizoides* (sec. *Porphyron*), *S. arietoides* (sec. *Porphyron*), *S. granulata* (sec. *Saxifraga*) y *S. rotundifolia* (sec. *Cotylea*).

A partir de las secuencias alineadas se ha construido una red de haplotipos que ha permitido detectar, dentro de la sección *Gymnopera*, la existencia de cinco haplotipos diferentes que se reparten en tres grupos principales (A-C en la Figura 4).

El grupo A está formado por dos haplotipos: el primero está presente en cinco muestras de *S. hirsuta* subsp. *hirsuta*, en una de *S. h.* subsp. *paucicrenata*, en dos de *S. spathularis* y en tres de *S. umbrosa*; el segundo, diferente del anterior por un solo cambio de bases, aparece en una sola muestra de *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata*. El grupo se distribuye geográficamente en tres áreas disjuntas: Irlanda, occidente de la Península Ibérica, alcanzando la mitad occidental de la cordillera Cantábrica, y Pirineos centrales.

El grupo B se diferencia del grupo A en 6-7 bases y está representado también por dos haplotipos: el primero detectado en diez muestras de *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* y en seis de *S. h.* subsp. *paucicrenata*; el segundo, diferente del anterior por un solo cambio de bases, aparece en una sola muestra de *S. h.* subsp. *paucicrenata*. Este grupo evidencia una distribución que va desde el occidente de la cordillera Cantábrica (centro de Asturias) hasta los Pirineos occidentales y en la sierra de La Demanda.

El grupo C integra un solo haplotipo detectado en dos muestras de *S. cuneifolia*, procedentes de los Alpes, y se diferencia del correspondiente al grupo B en seis bases.

Las muestras representativas de las otras secciones del género *Saxifraga* presentan haplotipos distintos a los de la sección *Gymnopera*. La muestra de *S. granulata* reveló el haplotipo más alejado respecto los de la sección *Gymnopera*, con un mínimo de 14 cambios de bases. Las muestras de *S. aizoides* y *S. arietoides* presentan haplotipos próximos al del grupo A, con un número de cambios de 6 y 8, respectivamente. Por último, el haplotipo de *S. rotundifolia* se asocia a la muestra de *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* del grupo B que representa un haplotipo singular.

Análisis de la diversidad haplotípica de la región cloroplástica *trnL-F*

Se han analizado secuencias nucleotídicas de una longitud que varía entre 374 pb, en *S. spathularis* y *S. xpolita*, y 385 pb en *S. arietoides*, *S. umbrosa* y *S. hirsuta* subsp. *hirsuta*.

Tales secuencias corresponden a 38 muestras de plantas del género *Saxifraga*: 35 de ellas corresponden a plantas de la sección *Gymnopera* e incluyen 18 de *S. hirsuta* subsp. *hirsuta*, 9 de *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata*, 2 de *S. spathularis*, 2 de *S. cuneifolia*, 3 de *S. umbrosa* y 1 de *S. xpolita*. Las otras tres corresponden a plantas de otras secciones del género: *S. aizoides* (sec. *Porphyron*), *S. arietoides* (sec. *Porphyron*) y *S. rotundifolia* (sec. *Cotylea*).

A partir de las secuencias alineadas se ha construido una red de haplotipos que ha permitido evidenciar, en esta región no conservada *trnL-F*, una mayor diversidad genética dentro de la sección *Gymnopera*; en ella se ha reconocido la existencia de 15 haplotipos diferentes repartidos en seis grupos (A-F en la Figura 5).

El grupo A integra diez muestras y está formado por cuatro haplotipos: el más numeroso contiene cuatro muestras de *S. hirsuta* subsp. *hirsuta*, una de *S. h.* subsp. *paucicrenata* y una de *S. spathularis*. Dos de los tres haplotipos restantes difieren del primero por un solo cambio de base, uno contiene una muestra irlandesa de *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* y el otro una portuguesa de *S. spathularis* de Portugal y una de *S. xpolita*; el cuarto de los haplotipos integrantes del grupo A, se diferencia del más general en tres bases y corresponde a la muestra de *S. h.* subsp. *paucicrenata* más occidental. Este grupo haplotípico A se distribuye en dos áreas disjuntas: Irlanda y occidente de la península Ibérica, alcanzando la mitad occidental de la cordillera Cantábrica. El grupo B es el más numeroso de todos, con un total de 15 muestras que presentan tres haplotipos bastante similares; el más general es el formado por 13 muestras: ocho de *S. h.* subsp. *hirsuta* y cinco de *S. h.* subsp. *paucicrenata*; los otros dos, con dos cambios cada uno respecto al anterior, están representados cada uno por una muestra de *S. h.* subsp. *hirsuta*. Los haplotipos del grupo B presentan al menos 20 bases diferentes al grupo A y se distribuye por la cordillera cantábrica, al este del centro de Asturias, y los Pirineos occidentales.

El grupo C presenta dos haplotipos, con tres cambios de base entre sí, e integra las dos muestras alpinas de *S. cuneifolia*.

El grupo D, con un solo haplotipo, está formado por una muestra de *S. h.* subsp. *hirsuta* y dos de *S. umbrosa*; geográficamente se localiza en los Pirineos centrales.

Las muestras representativas de las otras secciones se relacionaron en la red de haplotipos con las zonas de conexión de los grupos A, B y C.

S. rotundifolia es la más alejada, mientras que *S. aizoides* y *S. aretioides* están más proximas al punto de conexión de los tres grupos.

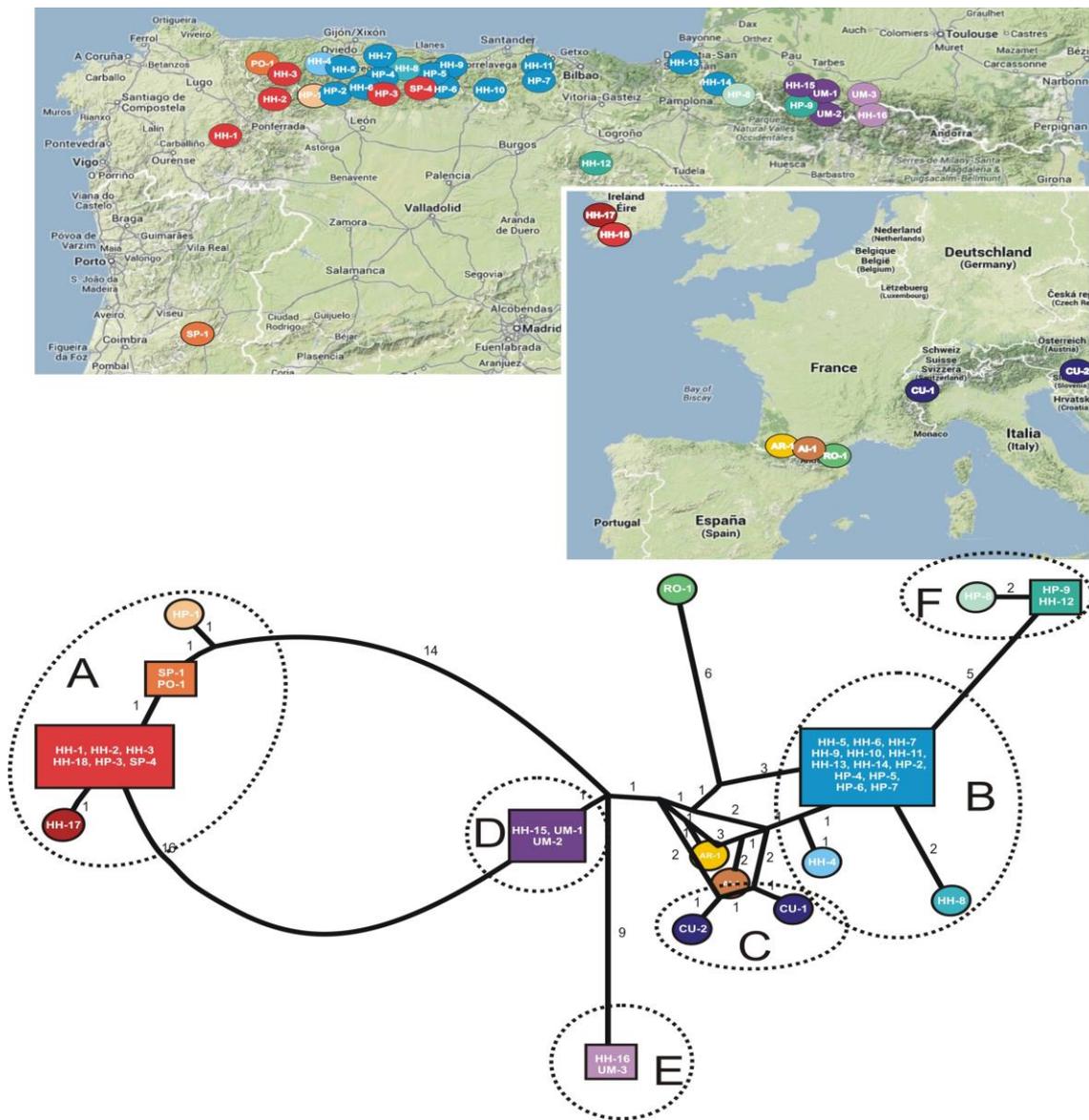


Figura 5. Distribución geográfica de los haplotipos obtenidos del análisis de secuencias de la región cloroplástica *trnL-F* en muestras de *Saxifraga*: *S. aizoides* (AI), *S. aretioides* (AR), *S. cuneifolia* (CU), *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* (HH), *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* (HP) y *S. rotundifolia* (RO).

DISCUSIÓN

En los estudios filogenéticos mediante secuencias nucleotídicas es muy importante la elección de los marcadores moleculares que se utilizan ya que cada marcador ha tenido una historia evolutiva diferente. Si hablamos de regiones conservadas que han sido sometidas a selección natural ya podemos deducir que su tasa de mutación será mucho más reducida respecto a una región no conservada y su significado filogenético habrá que interpretarlo por separado (Wolf *et al.* 1987; Gielly & Taberlet 1994).

También hay que tener en cuenta la diferencia entre regiones nucleares y regiones cloroplásticas, ya que se sabe que adoptan dos estrategias diferentes de pasar de generación a generación. Las regiones nucleares están sujetas a la recombinación genética a través del *crossing-over* durante la gametogénesis, su dispersión, a través del polen, puede alcanzar grandes distancias. Estas características le dan una trascendencia filogenética, capaz de detectar los flujos génicos más recientes en la escala evolutiva; en consecuencia constituyen caracteres taxonómicos importantes para la construcción de los sistemas de clasificación a nivel específico e intraespecífico (Baldwin *et al.* 1995).

El ADN cloroplástico en la mayoría de las plantas con semillas y en particular en las angiospermas, se transmite solo por vía materna, ya que el polen está privado de cloroplastos; esto implica que la dispersión de la información contenida en ADN cloroplástico está estrictamente relacionada con la dispersión por semillas. Por este motivo, el estudio del ADN cloroplástico es muy útil para la detección de haplotipos ligados a territorios particulares que permiten elaborar modelos filogeográficos a escala detallada (Harris & Ingram 1991).

En este estudio, el uso del marcador nuclear ITS y de las regiones cloroplásticas *rbcL* y *trnL-F* nos ha dado una amplia visión de la diversidad genética existente en *S. hirsuta* s. l. y también información sobre sus relaciones filogenéticas con otras especies del género *Saxifraga*, en particular las de la sección *Gymnopera*.

El primer objetivo de este trabajo es averiguar si entre *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* y *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* existen diferencias genéticas que apoyen la conveniencia de reconocer tales subespecies. *S. h.* subsp. *hirsuta* es una planta ampliamente representada en toda el área de distribución de *S. hirsuta* s. l. y, de acuerdo con muchos autores, está sustituida por *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* en las zonas de montaña a mayor altitud (Webb 1993; Vargas 1997; Saule 2005). Morfológicamente se

distinguen sobre todo por el tamaño y la forma de las hojas, más pequeñas y alargadas en *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* que suele ser una planta más pequeña y con inflorescencias menos ramificadas que *S. hirsuta* subsp. *hirsuta*.

El análisis de la red de haplotipos construido con las secuencias *rbcL* distingue dos grupos principales (A-B en la Figura 4) y en ambos están integradas muestras de plantas sistematizadas en las dos subespecies, es decir no responde a variaciones altitudinales y no es coherente con la sistemática habitualmente aceptada para *S. hirsuta* s. l. Por el contrario, la distribución de los haplotipos reconocidos mediante tales secuencias es geográfica; así el grupo A (Figura 4) tiene una amplia distribución disyunta (Ibérica occidental, ibérica y pirenaica central) e incluye muestras sistematizadas como *S. hirsuta* subsp. *hirsuta*, como *S. h.* subsp. *paucicrenata* e, incluso, como *S. spathularis* o *S. umbrosa*; este mismo haplotipo fue reconocido en muestras de *S. spathularis* procedentes de Irlanda (Pérez Vallines 2011). Por el contrario, el grupo B integra exclusivamente muestras de *S. hirsuta* s. l., de ambas subespecies, que se distribuyen en un área cantábrico y pirenaico, además de la sierra de La Demanda, central respecto al grupo anterior. Tales resultados permitirían suponer que el haplotipo A sería el que presentase un probable ancestro común del grupo, ampliamente distribuido, antes de su diversificación por aislamiento en los refugios glaciales montañosos de la zona de Somiedo y de los Pirineos y que los haplotipos del grupo B, exclusivos de *S. hirsuta* s. l., surgieron posteriormente y lo sustituyeron en la zona central norte ibérica. Otra cuestión es cuál pueda ser el origen de los haplotipos del grupo B y aunque plantas como *S. rotundifolia* o *S. cuneifolia*, que crecen desde los Pirineos orientales hacia Centroeuropa (Webb 1993) puedan ser candidatos adecuados, la hipótesis precisa de más datos para su confirmación.

La diversidad genética de *S. hirsuta* s. l. estudiada de acuerdo al análisis de las secuencias *trnL-F*, ha evidenciado un mayor número de haplotipos (15) respecto a los que se encontraron en el análisis de los *rbcL* (4).

El análisis de la red de haplotipos construido con las secuencias *trnL-F* distingue seis grupos principales (A-F en la Figura 5) de los cuales sólo el grupo C formado por las dos muestras de *S. cuneifolia* no incluye muestras representativas de *S. hirsuta* s. l., es decir, que tal como se observó en el análisis de los haplotipos del gen *rbcL*, no responde a variaciones altitudinales y no es coherente con la sistemática aceptada de *S. hirsuta* s. l. (Webb 1993; Vargas 1997). También en este caso la distribución de los haplotipos es meramente geográfica.

Las plantas representativas del grupo A están formadas por muestras que coinciden con las del occidente de la Península Ibérica y de Irlanda, detectadas en el grupo A del análisis haplotípico del gen *rbcL*, que además incluía un grupo de plantas de los Pirineos centrales. Estas últimas coinciden con los grupos D y E del análisis haplotípico de la región *trnL-F*. Según estos resultados podemos deducir que a partir de un ancestro común que unía las áreas de distribución disjuntas del grupo A del análisis del gen *rbcL*, se aislaron 3 grupos de plantas que siguieron diferentes líneas evolutivas. El grupo A del análisis del *trnL-F* tiene un haplotipo común entre la Península Ibérica e Irlanda, por lo que probablemente es el haplotipo más cercano evolutivamente al ancestro común de la sección *Gymnopera* y que se ha descubierto también en muestras de *S. spathularis*. En Irlanda se ha hallado un haplotipo autóctono que pertenece al grupo A y que no está presente en la Península Ibérica, éste podría ser el comienzo de una nueva línea evolutiva hibérmica paralela a la línea evolutiva de los haplotipos del grupo A, autóctona de la Península Ibérica.

El grupo B está compuesto por tres haplotipos que están representados por plantas exclusivamente de *S. hirsuta* s. l., dos son exclusivos de dos muestras independientes asturianas, el tercero está formado por 13 muestras que se distribuyen uniformemente desde la Cordillera Cantábrica occidental hasta los Pirineos, a indicar una continuidad genética que se había descrito en precedencia en el análisis de los *rbcL*. Esto podría suponer o un flujo génico continuo en toda el área de distribución mediante el transporte del polen o una colonización muy rápida de nuevos territorios que ha permitido conservar el mismo haplotipos en un área muy grande. Considerando que las muestras de *S. hirsuta* s. l. de la región norte occidental de la Península Ibérica son las que tienen un haplotipo más parecido al haplotipo ancestral, se podría teorizar la hipótesis de que el haplotipo B tenga un origen pirenaico y que haya colonizado los territorios ocupados anteriormente por el haplotipo A. Estos territorios corresponderían a la región geográfica que unía las poblaciones disjuntas del haplotipo A detectado en el análisis de los *rbcL* (Figura 4).

Los grupos D y E (Figura 5), están representados por plantas geográficamente cercanas entre ellas, son genéticamente distintos según el análisis del *trnL-F* (10 cambios de bases) y el hecho de que compartan el mismo haplotipo del gen *rbcL* (A en la figura 4) las distingue de las demás muestras analizadas de los Pirineos. Esta caracterización genética se podría explicar fácilmente si se analiza la orografía de las áreas de distribución de los dos haplotipos. Los Pirineos, en general están

caracterizados por la presencia de valles muy profundos que podrían dificultar el flujo génico de poblaciones cercanas, produciendo un aislamiento geográfico que conduciría a diferentes líneas evolutivas.

El último, el grupo F, está presente en dos plantas de los Pirineos centrales y en una de la sierra de La Demanda. Este grupo al parecer tiene una historia evolutiva más próxima al grupo B ya que comparte el mismo haplotipo del gen *rbcL*, pero, al igual que los grupos D y E, tiene un haplotipo particular de la región *trnL-F* debido probablemente a una causa común; el aislamiento geográfico de los valles profundos de los Pirineos. La lejanía de la muestra de la sierra de la Demanda, es de difícil interpretación y sería oportuno ampliar el muestreo en las dos áreas de distribución.

El análisis de las secuencias nucleares ITS a través de la construcción de árboles filogenéticos nos ha revelado importantes informaciones del punto de vista filogenético y evolutivo. En primer lugar, todas las muestras de *S. hirsuta s. l.* y las muestras de *S. umbrosa*, se agrupan en un único clado robustamente soportado estadísticamente. Este resultado, apoya la hipótesis del origen pirenaico de *S. hirsuta s. l.* por parte de una población que se ha aislado primero y diferenciado genéticamente en los Pirineos y que luego, gracias probablemente a un cambio de las condiciones ambientales, ha podido remplazar las especies que poblaban esos territorios. La separación del clado formado por *S. hirsuta s. l.* y *S. umbrosa* respecto a un clado soportado estadísticamente, constituido únicamente por muestras de *S. spathularis*, confirma otra hipótesis que se había detectado en el análisis de los haplotipos cloroplásticos basada en la presencia de un ancestro común ampliamente distribuido, común a estos dos grupos de plantas. *S. cuneifolia* no parece tener una estricta relación filogenética con las especies de la sección *Gymnopera* porque forma un clado independiente más próximo a especies de otras secciones del género *Saxifraga*, la ramificación que las divide está débilmente soportada y sería interesante estudiar más adecuadamente esta especie, relacionarla con las otras tres especies de las sección *Gymnopera* y con las especies del género *Saxifraga* que comparten su área de distribución.

El origen pirenaico de *S. hirsuta s. l.* como se ha teorizado antes, podría tener más de una explicación, una de estas podría ser la influencia de otra especie del género, presente en los Pirineos, que habría podido establecer un flujo génico con la especie ancestral de la sección *Gymnopera* generando el ancestro de *S. hirsuta s. l.*

De acuerdo con las conclusiones derivadas del análisis de la diversidad genética en *Saxifraga hirsuta s. l.* y de sus afinidades con otras especies de la sección *Gymnopera*

se debe discutir el modelo taxonómico coherente con ellas, a sabiendas de que tales conclusiones afectan a otras especies de la citada sección.

En primer lugar, en lo que respecta a la delimitación de la sect. *Gymnopera* del género *Saxifraga*, los resultados de este trabajo hacen dudar de que la sistematización más adecuada de *Saxifraga cuneifolia* L. sea esa, sin que tampoco podemos hacer ahora una propuesta sistemática alternativa. Para ello es necesario hacer un análisis global del género que incluya una amplia representación de especies de cuantas más secciones sea posible. La exclusión de *S. cuneifolia* de la sect. *Gymnopera* tendría como consecuencia el que el área de distribución de la última estuviera limitado a los territorios ibéricos más oceánicos, además de Irlanda; téngase en cuenta que las especies de la sección tal como quedaría delimitada medran en los territorios pirenaicos occidentales y centrales y, en los últimos fundamentalmente en su vertiente septentrional que es la más oceánica.

En la sección así concebida se sistematizarían de acuerdo con tal propuesta las plantas habitualmente identificadas como *Saxifraga hirsuta* s. l., *S. spathularis* y *S. umbrosa*. Los resultados de los análisis de diversidad genética presentados aquí, coincidentes en alto grado con los obtenidos por Pérez Vallines (2011) parecen apoyar claramente la independencia sistemática de *S. spathularis*, que muestra una clara homogeneidad atendiendo a criterios tanto moleculares –ADNn y ADNcl– como a morfológicos y distribuida por los territorios noroccidentales ibéricos e Irlanda (Webb 1993; Vargas 1997). Otra cuestión bien diferente es cuál es el nombre correcto de tal *taxon*. Como indica Nieto Feliner (1985) la tipificación de *Saxifraga umbrosa* L. en un icono de la obra de Magnol (1697) (Pugsley 1936; Webb 1987b) determina el que la indicación locotípica sea “*Habitat in Montibus apud Cantabros*” lo que pone en duda la identidad con la planta pirenaica a la que tradicionalmente se asimila (Webb 1993; Vargas 1997); no obstante la propia tipificación realizada por Pugsley (1936) es contradictoria con el concepto que el mismo tiene de *S. umbrosa* L. de la que se indica se distribuye por los Montes Cantábricos y el Pirineo; desde luego la planta a la que aplicamos el nombre *S. spathularis* no se conoce en los Pirineos y por tanto debiera analizarse si tal lectotipificación no entra en serio conflicto con el protólogo (epígrafe b del Art. 9.19 del CIN (McNeill *et al.* 2012); en tal caso debiera realizarse una nueva lectotipificación. Por tales razones se propone seguir usando los nombres *S. spathularis* y *S. umbrosa* de la forma tradicionalmente aceptada (Webb 1993; Vargas 1997; McGregor 2008).

Otra cuestión bien distinta es la independencia específica entre *S. hirsuta* y *S. umbrosa* que de acuerdo con los resultados obtenidos no es clara y tampoco las diferencias morfológicas que habitualmente se consideran criterios adecuados para su diagnosis son muy acusadas. De todos modos, antes de establecer conclusiones firmes al respecto habrá que realizar análisis más exhaustivos, incluyendo mayor número de muestras de las plantas de ambas especies en los territorios pirenaicos donde medran ambas y de los presuntos híbridos, identificados como *S. xgeum* L., *Sp. Pl.*: 401 (1753).

En lo que se refiere a *Saxifraga hirsuta* s. l. que constituye el objetivo principal de este trabajo los resultados obtenidos y atendiendo a la discusión realizada cuestionan en muy alto grado el tratamiento sistemático habitualmente aceptado (Webb 1993; Vargas 1997; McGregor 2008) en él se reconocen dos subespecies: *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* y *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata*. Las plantas habitualmente asignadas a la segunda de las subespecies de las montañas pirenaicas y cantábricas habitualmente identificadas como *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* atendiendo a la diversidad evidenciada mediante el uso de marcadores moleculares presentan haplotipos distintos que marcan afinidades más estrechas con las plantas de *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* que medran en los territorios basales que con plantas orófilas de territorios alejados. El modelo de diversidad que, atendiendo a los resultados obtenidos, se puede reconocer en *S. hirsuta* s. l. tiene poco que ver en una diversificación altitudinal y más con su dispersión territorial. En consecuencia, no parece adecuado el reconocimiento de *S. hirsuta* subsp. *paucicrenata* que parece consecuencia de la reunión de plantas orófilas de diversos territorios con una cierta convergencia morfológica y que representarían ecomorfosis de plantas diversas genéticamente y que han sido descritas en territorios muy alejados: *Saxifraga geoides* Lacaite y *S. geum* subsp. *hirsuta* var. *cuatrecasassi* Font i Quer & Guinea, de los Picos de Europa, *S. hirsuta* var. *paucicrenata* Leresche ex Guillot, de los Pirineos Atlánticos, y *S. elegans* J.Mackay [= *S. hirsuta* var. *elegans* (J.Mackay) D.A.Webb] de Irlanda.

CONCLUSIONES

- El análisis de los marcadores cloroplásticos *rbcL* y *trnL-F*, así como el marcador nuclear ITS han permitido evaluar la diversidad haplotípica y filogenética de la sección *Gymnopera* del género *Saxifraga*.
- Las secuencias del gen *rbcL* han proporcionado una visión de la diversidad haplotípica ancestral de la sección.
- El análisis de las secuencias de la región intergénica *trnL-F* indican una gran diversidad haplotípica presente en la sección asociada a su distribución geográfica.
- La región nuclear ITS permitió evaluar las relaciones filogenéticas a nivel de especie y de subespecie de la sección, además de sus relaciones con especies de otras secciones del género.
- No se ha detectado ninguna relación genética entre el gradiente altitudinal y la distribución a nivel de subespecie de *S. hirsuta* s.l.
- La información obtenida de los tres marcadores nucleares nos permite plantear una hipótesis sobre el origen de la sección, teorizando la presencia de un ancestro común a *S. hirsuta* s. l. y *S. spathularis*, ampliamente distribuido en la Península Ibérica y en Irlanda.
- En los refugios glaciales de la zona de Somiedo y de los Pirineos la sección *Gymnopera* presenta una alta diversidad haplotípica.
- *S. umbrosa* podría tener un rol muy importante en el origen filogenético de *S. hirsuta* s. l.
- Los Pirineos y la cordillera Cantábrica son dos focos de diversidad genética en la distribución geográfica de la sección.
- Los resultados obtenidos nos permiten hacer una revisión taxonómica de la sección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APG. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 161:105-21.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS & Donoghue MJ. 1995.** The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 247-77.
- Brouillet L & Elvander PE. 2007.** *Saxifraga* L. En: Flora of North America Editorial Committee (Eds.) 1993+. *Flora of North America North of Mexico*. 16+ Vols. New York and Oxford. Vol. 8, pp. 43-5, 48-50, 68, 131-3, 141, 146.
- Clement M, Posada D & Crandall K. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9(10):1657-60.
- Conti E, Soltis DE, Harding TM & Schneider J. 1999.** Phylogenetic relationships of the silver saxifrages (*Saxifraga*, Sect. *Ligulatae* Haworth): implications for the evolution of substrate specificity, life histories, and biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13: 536–55.
- Don D. 1822.** A monograph of the genus *Saxifraga*. *Trans. Linn. Soc. London* 13: 341-452.
- Edgar RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids. Res.* 32(5): 1792-7.
- Engler HGA & Irmscher E. 1919.** Saxifragaceae- *Saxifraga*.. En: Engler A (Ed.) *Das Pflanzenreich. Regni vegetabilis conspectus* . Auftrage der Königl. pressus. Akademie der Wissenschaften. IV. 117, 1-709.
- 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): 769-77.
- Gillot MX. 1880.** Compte rendu des berborisations faites du 21 au 25 juillet 1880 dans le Pays Basque. *Bull. Soc. Bot. France* 27: 33-40.
- Gornall RJ, Ohba H & Jintang P. 2000.** New Taxa, Names, and Combinations in the *Saxifraga* (Saxifragaceae) for the Flora of China. *Novon* 10: 375-7.
- Gornall RJ. 1987.** An outline of a revised classification of *Saxifraga* L. *Botanical J. Linn. Soc., Bot.* 95: 273-92.
- Guinea E. 1947.** De mi primer viaje a Picos de Europa. *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 7: 335-56.
- Harris SA & Ingram R. (1991).** Chloroplast DNA and biosystematics: the effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* 39:393-412.
- Haworth AH. 1812.** *Synopsis Plantarum Succulentarum*. Ed. Richardi Taylor et Soch., Londini pp. 633.
- Haworth AH. 1821.** *Saxifragearum enumeratio*. Ed. Veneunt apud wood. London, pp. 291.
- Holderegger R & Abbott R. 2003.** Phylogeography of the artic-alpine *Saxifraga oppositifolia* (Saxifragaceae) and some related taxa based on cpDNA and ITS sequence. *Amer. J. Bot.* 90: 931–6.
- Jintang P, Gornall R & Ohba H. 2001.** *Saxifraga* L. En: Wu, Z.Y. & Raven P.H. (Eds.) *Flora of China*. Vol. 8 (Brassicaceae through Saxifragaceae). Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 280–344.
- Lacaita C. 1930.** Novitia quaedam et notabilia hispánica II. *Cavanillesia*, 3: 20-47.
- Laínz M & cols. 1959.** Aportaciones al conocimiento de la flora cántabro-astur, III. *Collect. Bot. (Barcelona)* 5(3): 671-96.
- Laínz M. 1982.** *Mis contribuciones al conocimiento de la flora de Asturias*. Instituto de Estudios Asturianos, Oviedo, pp. 102.

- Leresche L & Levier E. 1881.** *Deux excursions botaniques dans le nord de l' Espagne et le Portugal en 1878 et 1879.* Ed. Georges Bridel, Lausanne, pp. 199.
- Mackay JT. 1836.** *Flora Hibernica. Vol. 1.* William Curry Jun and Company, Dublin
- Magnol P. 1697.** *Hortus Regius Monspeliensis, sive catalogus plantarum quae in Horto Regio Monspeliensi demonstrantur.* Ed. Apud Honoratum Pec, Montpellier, pp. 209.
- McGregor M. 2008.** *Saxifrages: A Definitive Guide to the 2000 Species, Hybrids & Cultivars.* Timber Press, Portland, pp. 384.
- McIntosh L, Poulsen C & Bogorad L. 1980.** Chloroplast gene sequence for the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase of maize. *Nature* 288: 556–60.
- McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Pruf'Homme van Reine WF, Smith GF, Wiersema JH & Turland NJ (Eds). 2012.** *Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (Código de Melbourne).* Edición en español a cargo de Greuter, W & Rankin Rodríguez, R. C.S.I.C., Madrid, pp. 213.
- 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: 5-239.
- Oliver, C, Hollingsworth, PM & Gornall, RJ. 2006.** Chloroplast DNA phylogeography of the arctic-montane species *Saxifraga hirculus* (Saxifragaceae). *Heredity* 96: 222–31.
- Olmstead, RG, Michaels, HJ, Scott, KM & Palmer, JD. 1992.** Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcL*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79: 249-65.
- Pérez Vallines R. 2011.** *Origen y diversidad de poblaciones disyuntas de Saxifraga sect. Gymnopera: península Ibérica-Irlanda.* Trabajo de fin de Máster, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, Oviedo, pp. 29.
- Pugsley HW. 1936.** *The British Robertsonian saxifrages.* *J. Linn. Soc., Bot.* 50: 267-89.
- Saule M. 2005.** *La grande flore illustrée des Pyrénées.* (2ª ed.) Ed. Rando, Frande, pp. 730.
- Soltis DE, Kuzoff RK, Conti E, Gornall R & Ferguson K. 1996.** *matK* and *rbcL* gene sequence data indicate that *Saxifraga* (Saxifragaceae) is polyphyletic. *Am. J. Bot.* 83(3): 282-371.
- Solti DE, Kuzoff RK, Mort ME, Zanis M, Fishbein M, Hufford L, Koontz J & Arroyo MK. 2001.** Elucidating deep-level phylogenetic relationships in Saxifragaceae using sequences of six chloroplastic and nuclear DNA regions. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 88: 669-93.
- Soltis DE. 2007.** Saxifragaceae. *Fam. & Gen. Vasc. Pl.*, Ed. K. Kubitzki 9: 418-35.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G & Bouvet J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant. Mol. Biol.* 17: 1105-9.
- Tamura K & Nei M. 1993.** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molec. Biol. Evol.*, 10: 512-26.
- 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: 2731-9.
- Templeton AR, Crandall KA & Sing CF. 1992.** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-33.
- Vargas P, Morton CM & Jury SL. 1999.** Biogeographic patterns in Mediterranean and Macaronesian species of *Saxifraga* (Saxifragaceae) inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences. *Amer. J. Bot.* 86: 724-34.
- Vargas P. 1997.** *Saxifraga* L. En: Castroviejo, S; Aedo, C; Lainz, M; Morales, R; Muñoz Garmendia, F; Nieto Feliner, G; Paiva, J (eds.) *Flora ibérica* 5. C.S.I.C., Madrid, 162-242.
- Vargas P. 2000.** A phylogenetic study of *Saxifraga* sect. *Saxifraga* (Saxifragaceae) based on nrDNA ITS sequences. *Pl. Syst. Evol.* 223: 59-70.

- Vargas P. 2001.** Phylogenetic and evolutionary insights into *Saxifraga pentadactylis* complex (Saxifragaceae): variation in nrITS sequences. *Nordic J. Bot.* 21: 75-82.
- Vargas P. 2003.** Molecular evidence for multiple diversification patterns of alpine plants in Mediterranean Europe. *Taxon* 52: 463–76.
- Webb DA. 1987a.** Taxonomic and nomenclatural notes on *Saxifraga* L.. En: AO Chater (ed.) *Flora Europaea: Notulae systematicae ad Floram Europaeam spectantes*. Series 2. No. 1. *Bot. J. Linn. Soc.* 95: 227-51.
- Webb DA. 1987b.** Typification of the Linnean species of *Saxifraga*. *Bot. J. Linn. Soc.* 95: 59-272.
- Webb DA. 1988.** A new subspecies of *Saxifraga cuneifolia* L. En: AO Chater (ed.) *Flora Europaea: Notulae systematicae ad Floram Europaeam spectantes*. Series 2. No. 2. *Bot. J. Linn. Soc.* 97: 355.
- Webb DA. 1993.** *Saxifraga* L. En: Tutin, TG, Burges, NA, Chater, AO, Edmondson, JR, Heywood, VH, Moore, DM, Valentine, DH, Walters, SM & Webb, DA (eds.) *Flora Europaea* 1. Cambridge University Press, Cambridge, 437-58.
- Wolfe KH, Li, WH, & Sharp, PM. 1987.** Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84(24): 9054-8.

ANEXO I

Muestras usadas: sistemática, código de identificación y localidad de origen.

Taxon	Código	Localidad
<i>Saxifraga</i> sección <i>Gymnopera</i>		
<i>S. cuneifolia</i>	CU-1	Petit San Bernard, prox. Pont Serrand, 1833 m, 32T 0337986/50635, La Thuile (Val de Aosta, Italia)
<i>S. cuneifolia</i>	CU-2	Entre Mt. Greben y Mt. Veliki Travnik, Črna na 1317 m, 33T 483212/5142224 (Koroškem, Eslovenia)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-1	Aceña do Sordo, Folgoso do Caurel, 627 m, 29T 648914/4716504 (Lugo, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-2	Entre Larón y Fondos de Vega, Cangas del Narcea, 785 m, 29T 693664/4760991 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-3	Cerca de Villar de Vildas, Somiedo, 796 m, 29T 717412/4775855 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-4	Tuñón, Sto. Adriano, 113 m, 30T 257959/4797804 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-5	Entre La Vara y el Pumar, 437 m, 30T 262718/4794222 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-6	Cuevas, Aller, 754 m, 30T 298300/4774410 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-7	Amieva, 193 m, 30T 324388/4793706 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-8	Entre los Lagos de Covadonga y la Vega de Ario, Cangas de Onís, 1257 m, 30T 339966/4791708 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-9	Desfiladero de Urdón, Peñarrubia, 154 m, 30T 367134/4791435 (Cantabria, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-10	Subida al Puerto de Palombera, Hermandad de Campoo-Cabuerniga, 879 m, 30T 396986/4772101 (Cantabria, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-11	Entre Ramales y Arredondo, Ruesga, 147 m, 30T, 453309/4791679 (Cantabria, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-12	Camino a Bonicaparra, Ezcaray, 1025 m, 30T 501436/4684416 (Rioja, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-13	Entre San Sebastian-Hendaya, Arragua, 127 m, 30T 593068/4796546 (Guipúzcoa, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-14	Cerca de Arnéguy, 312 m, 30T 639452/4773866 (Pirineos Atlánticos, Francia)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-15	Cerca de Eaux Bonnes, 857 m, 30T 713629/4760669 (Pirineos Atlánticos, Francia)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-16	Entre Arreau y Aragnouet, Alto Garona, 1295 m, 31T 281731/4751732 (Altos Pirineos, Francia)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-17	Connor's Pass, península de Dingle, 279 m, 29U 418607/5782836 (Kerry, Irlanda)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>hirsuta</i>	HH-18	Rio Glengariff, al norte de Glengariff, 18 m, 29U 460791/5734039 (Cork, Irlanda)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>paucicrenata</i>	HP-1	Picos Albos, Somiedo, 1888 m, 29T 734472/4769973 (Asturias, España)

Taxon	Código	Localidad
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>paucicrenata</i>	HP-2	Peñón de Ventana, Puerto de Ventana, Teverga, 1631 m, 29T 744102/4771652 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>paucicrenata</i>	HP-3	El Fielato, Puerto de San Isidro, Aller, 1268 m, 30T 302024/4771369 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>paucicrenata</i>	HP-4	Pico Tiatordos, Caso-Ponga, 1950 m, 30T 319615/4782773 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>paucicrenata</i>	HP-5	Pico Ceñal, entre Lagos de Covadonga y Vega de Ario, Cangas de Onís, 1440 m, 30T 340423/4790895 (Asturias, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>paucicrenata</i>	HP-6	Torre de La Palanca, Macizo Central de los Picos de Europa, 2438 m, 30T 348404/4782303 (León, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>paucicrenata</i>	HP-7	Portillo de Lunada, 1317 m, 30T 446890/4779901 (Burgos, España)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>paucicrenata</i>	HP-8	Plan Pignon, Arnéguy, 1215 m, 30T 641156/4769749 (Pirineos Atlánticos, Francia)
<i>S. hirsuta</i> subsp. <i>paucicrenata</i>	HP-9	Cerca de Lac de Fabrèges, Laruns, 1314 m, 30T 712025/4751314 (Pirineos Atlánticos, Francia)
<i>S. spathularis</i>	SP-1	Subida a la Sierra de la Estrela, 1852m, 29T 0618712/4464555 (Beira Baxa, Portugal)
<i>S. spathularis</i>	SP-2	Cuenca del río Zézere, sobre Manteigas, 1308 m, 29T 621462/4465697 (Guarda, Portugal)
<i>S. spathularis</i>	SP-3	Trascastro, Somiedo, 1698 m, 29T 0710003/4763113 (Asturias, España)
<i>S. spathularis</i>	SP-4	Puerto de Pandetrave, 1552 m, 30T 347174/4774426 (León, España)
<i>S. umbrosa</i>	UM-1	Col d'Aubisque, 1662 m, 30T 716637/4761811 (Pirineos Atlánticos, Francia)
<i>S. umbrosa</i>	UM-2	Barrage d'Oisseaux, nr. Cirque de Gavarnie, 2134 m (Altos Pirineos, Francia)
<i>S. umbrosa</i>	UM-3	Cascada d'Arises, Artigues, 1338 m, 31T 271249/4756367 (Altos Pirineos, Francia)
<i>S. xpolita</i>	PO-1	Cerca de Villar de Vildas, Somiedo, 796 m, 29T 717412/4775855 (Asturias, España)
<i>Saxifraga</i> otras secciones		
<i>S. aizoides</i>	AI-1	Pista de Chisagües, Bielsa (Huesca, España)
<i>S. aretioides</i>	AR-1	1627m, 30T 717727/4762075 (Pirineos Atlánticos, Francia)
<i>S. granulata</i>	GR-1	Sureste del Embalse del Ebro, cerca de Cabañas de Virtus, Valdebezana, 854 m, 30T, 430221/4762141 (Burgos, España)
<i>S. rotundifolia</i>	RO-1	Entre La Forgé y Ascou-Pailhères, 1220 m, 31T 411377/4729954 (Arège, Francia)