

Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Departament de Biologia Vegetal
Unitat de Botànica



**REVISIÓ MORFOLÒGICA I MOLECULAR DELS TÀXONS
LOBULATS DEL GÈNERE *CALOPLACA* (*TELOSCHISTACEAE*,
LIQUENS), AMB ESPECIAL ÈMFASI EN EL GRUP DE
*C. SAXICOLA***

Memòria presentada per Ester Gaya i Bellés
per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques

Programa de Doctorat de Biologia Vegetal

Bienni 1999-2001

Directors de Tesi:

Dr. Xavier Llimona i Pagès

Dr. Pere Navarro i Rosinés

Barcelona, Octubre de 2005

4.4. ELS CARÀCTERS ESPORALS EN EL GRUP DE *C. SAXICOLA*

4.4.1. IMPORTÀNCIA DELS CARÀCTERS ESPORALS EN EL GRUP DE *C. SAXICOLA*:

Les característiques de les espores, especialment la forma i les mides, sovint han tingut un pes considerable a l'hora delimitar espècies en els diferents grups de líquens i, en especial, en el gènere *Caloplaca*. Així, Clauzade & Roux (1985) basen les seves claus per a separar els grups de *Caloplaca* i, concretament, els tàxons del grup de *C. saxicola*, en les dimensions esporals i, principalment, en la relació llargada/engruiximent equatorial.

En aquest apartat, abans de confeccionar la clau dels tàxons tractats en aquest estudi del grup de *C. saxicola*, hem volgut avaluar estadísticament el valor informatiu i el pes de les variables esporals.

L'estadística exploratòria amb caràcters quantitius, anomenats morfomètrics, com són les mides de les espores, pot servir com a mètode per a examinar pautes de variació inter i intraespecífica, i pot permetre la delimitació de tàxons conflictius.

4.4.2. MATERIAL I MÈTODES

Amb aquest objectiu s'han realitzat, per cada exemplar, aproximadament unes 30 mesures de cada un dels diferents caràcters esporals: llargada (Larg), amplada (Amp), engruiximent equatorial ("septe") (Sept), relació llargada/amplada (L/A) i relació llargada/engruiximent equatorial (L/Sept), en un total de 121 exemplars estudiats en l'apartat de Taxonomia: 15 de *C. arnoldii* s.str., 12 de *C. arnoldii* sensu Poelt, 4 de *C. arnoldii* sensu Poelt (formes asiàtiques), 17 de *C. biatorina*, 1 de *C. clauzadeana*, 6 de *C. rouxii*, 6 de *C. nana*, 5 de *C. pseudofulgensia*, 13 de *C. pusilla*, 16 de *C. saxicola* s.str., 6 de *C. tegularis* II – morfotipus d'espores llargament el·lipsoïdals, 20 de *C. tegularis* I – resta de morfotipus). *C. schistidii* ha estat exclosa de l'anàlisi, ja que només disposàvem d'un individu, i les dimensions i la forma de les espores l'allunyaven clarament de la resta de tàxons del grup.

El nombre d'exemplars emprats per als diferents tàxons és divers ja que hem volgut cobrir la totalitat de l'àrea de distribució i la variabilitat observada amb els caràcters qualitius.

A partir de la matriu original, que comprèn el total de 30 mesures esporals per exemplar, hem generat una nova matriu amb les mitjanes de cada exemplar.

4.4.2.1. ANÀLISIS DE COMPONENTS PRINCIPALS (ACP)

Amb aquesta segona matriu, hem realitzat una Anàlisi de Components Principals (ACP). L'ACP és un mètode ampliament utilitzat per a representar dades multivariants. Aquest mètode permet construir unes noves variables a partir de combinacions lineals de les variables originals. La primera d'aquestes noves variables es construeix de manera que constitueixi l'eix de màxima dispersió de les dades. La segona també maximitza la variància, però amb la restricció que aquest segon eix és ortogonal (perpendicular) al primer eix i, per tant, no està correlacionat amb aquest, és a dir, són independents. Les següents variables es construeixen de manera semblant. L'objectiu principal d'aquest mètode és el d'examinar les relacions entre les variables originals i poder generar una representació que, amb un nombre reduït de dimensions, expressi el màxim d'informació. L'ACP no està dissenyat per discriminar grups, però idealment les components amb més variació poden ser degudes a les diferències entre espècies.

4.4.2.2. ANÀLISI DE LA VARIÀNCIA

A continuació hem avaluat el grau de significació de les diferències esporals entre espècies amb una ANOVA d'un factor i una MANOVA per a les 5 variables. L'ANOVA (en anglès: *analysis of variance* = anàlisi de la variància) és un conjunt de mètodes estadístics emprats principalment per a comparar mitjanes de dues o més mostres mitjançant l'estimació de la variància. Així, l'anàlisi de la variància s'utilitza per a avaluar les diferències existents entre mitjanes i les diferències entre combinacions lineals de mitjanes. La MANOVA (en anglès: *multivariate analysis of variance* = anàlisi multivariant de la variància), ens permet fer aquestes comparacions amb totes les variables alhora.

4.4.2.3. ANÀLISI DISCRIMINANT (AD) O ANÀLISI CANÒNICA DE LA VARIÀNCIA (ACV)

Per tal de seleccionar les variables que millor ens separen els grups, hem realitzat una Anàlisi Discriminant (AD) o Anàlisi Canònica de la Variància (ACV). Dacord amb aquest mètode, també es construeixen noves variables però, en aquest cas, les combinacions lineals que es busquen són aquelles que millor discriminen o separen els grups (tàxons) prèviament fixats. El què s'intenta, doncs, és maximitzar la variabilitat entre els grups respecte a la variabilitat interna dels grups, en la representació.

Si es realitza conjuntament amb una selecció de variables, aquest tipus d'anàlisi pot ser útil per a detectar quina combinació de caràcters serveix per a distingir millor els tàxons semblants, independentment que els caràcters estiguin correlacionats o no.

Un cop seleccionades les variables amb l'ACV, hem calculat de nou la MANOVA per a les variables restants, per tal de comprovar si es mantenen les diferències significatives.

4.4.2.4. TEST DE TUKEY/KRAMER

Amb aquest test s'ha realitzat una comparació de mitjanes dos a dos. El test de Tukey és un mètode estadístic post hoc que normalment s'aplica per tal de corregir errors de tipus I (errors comesos en trobar significació allà on no n'hi ha), després de fer una comparació inicial de mitjanes del tipus ANOVA. Aquest mètode s'utilitza perquè la probabilitat de trobar una diferència significativa només per atzar s'incrementa ràpidament amb el número de comparacions dos a dos. A diferència d'una simple ANOVA, el test de Tukey corregeix els resultats segons el nombre de mitjanes en consideració i és, per tant, un mètode estadístic més estricte, que dona una confiança addicional als valors P resultants. La variant del test Tukey/Kramer permet treballar amb diferents mides de mostra. El què en resulta és una matriu de valors de Tukey per cada caràcter. Partint d'aquesta matriu, hem utilitzat les diferències significatives detectades, per a validar estadísticament la utilització de les variables esporals com un caràcter més en la separació dels tàxons dins de la clau dicotòmica.

Tots els càlculs s'han realitzat amb el programa Statview 5.0.1. (SAS Institute Inc. 1992-1998), a excepció de l'ACP i l'ACV, que s'han calculat mitjançant el mòdul d'anàlisi multivariant GINKGO, del paquet de programes VEGANA (De Cáceres et al. 2003).

4.4.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En la taula 4.4.1. es resumeixen, en el cas de les 5 variables estudiades, els valors de la mitjana, la desviació estàndard (entre parèntesis), els percentils després de descartar el 10% dels valors extrems i els valors extrems (entre parèntesis).

L'ANOVA ha resultat significativament diferent per a tots els caràcters ($P < 0,0001$). En la taula 4.4.2. es resumeixen, en el cas de les 5 variables estudiades, els valors de la suma de quadrats, el quadrat de la mitjana, el valor de la F i el valor de la P.

La MANOVA ha resultat significativament diferent per als 5 caràcters amb un valor de Wilks' Lambda de 0,003. El valor de Wilks' Lambda expressa la proporció de variància total deguda a la variància a l'interior de cada grup. El valor obtingut s'utilitza per avaluar el poder discriminadori del model, amb un rang que va des de 1,0 (sense poder discriminadori) a 0,0 (amb bon poder discriminadori). Per tal d'avaluar la significació d'aquest estadístic, la Lambda de Wilks es tradueix a una $F = 23,456$, valor del que s'obté una probabilitat associada $P < 0,0001$.

4.4.3.1. ANÀLISI DE COMPONENTS PRINCIPALS (ACP)

La taula 4.4.3. mostra la matriu de components principals amb els pesos (o valor ponderal) dels caràcters. Aquests coeficients indiquen la contribució relativa de les variables originals en cadascuna de les components principals, de manera que com més alt sigui el valor, tant positiu com negatiu, més gran serà la influència que tingui en la component corresponent. També es representa en la taula 4.4.4. la variància total explicada per a les dues primeres components, així com el percentatge de variància acumulat.

El diagrama de dispersió de les dues primeres components principals es representa a la figura 4.4.1. Aquest diagrama doble (distance biplot) inclou tant els individus com les variables, mitjançant la representació de les coordenades dels primers i els pesos de les segones en forma de vectors.

Taula 4.4.1. Estadístics descriptius per a cada una de les 5 variables estudiades. A dalt: mitjana i desviació estàndard (entre parèntesis). A baix: valors, mínim i màxim, després de descartar el 10% dels valors extrems, i valors extrems (entre parèntesis). Sota el nom del tàxon, la n indica el número d'exemplars estudiats).

	Larg	Amp	Sept	L/A	L/Sept
<i>C. arnoldii</i> s.str. (n=15)	11,1 (1,24) (7,5)9,5-12,8(15)	4,9 (0,54) (3,5)4,5-5,5(6,5)	3,6 (0,59) (2)2,8-4,3(5)	2,3 (0,32) (1,4)1,9-2,7(3,3)	3,2 (0,49) (2,1)2,6-3,9(5,5)
<i>C. arnoldii</i> sensu Poelt (n=12)	11,3 (1,12) (8,5)10-12,8(15,3)	5,8 (0,54) (3,8)5-6,5(7,5)	3,5 (0,41) (2,5)3-4(4,5)	2 (0,26) (1,4)1,6-2,3(3,1)	3,2 (0,38) (2,3)2,8-3,7(4,6)
<i>C. arnoldii</i> (formes asiàtiques) (n=4)	11,8 (1,25) (8,5)10-13,5(14,5)	4,3 (0,46) (3,5)3,8-5(5,5)	2,9 (0,47) (1,5)2,5-3,5(4)	2,8 (0,42) (1,8)2,2-3,3 (3,8)	4,1 (0,81) (2,8)3,3-5(8,9)
<i>C. biatorina</i> (n=17)	12,4 (1,20) (9)10,8-13,8(16,5)	7,3 (0,73) (5)6,5-8(9,5)	2,8 (0,50) (1,5)2-3,5(4,5)	1,7 (0,24) (1,2)1,4-2(2,6)	4,7 (1,06) (2,7)3,5-6,2(9,9)
<i>C. clauzadeana</i> (n=1)	12,6 (1,15) (10,5)11,5-14(14,8)	4,6 (0,34) (3,8)4-5(5,5)	3,5 (0,48) (2,5)3-4(4,5)	2,8 (0,32) (2,2)2,3-3,2(3,3)	3,7 (0,50) (2,6)3-4,4(4,8)
<i>C. rouxii</i> (n=6)	13,2 (1,23) (9,5)11,5-14,8(16,5)	5,6 (0,58) (3,5)4,8-6(7)	4,1 (0,55) (2,5)3,5-4,8(6)	2,4 (0,35) (1,5)2-2,9(3,3)	3,3 (0,47) (2,3)2,7-3,9(5,5)
<i>C. nana</i> (n=6)	9 (0,84) (6,5)8-10(11)	4,3 (0,47) (3)3,5-5(5,5)	2,8 (0,41) (2)2,5-3,5(4)	2,1 (0,32) (1,5)1,7-2,6(2,9)	3,2 (0,51) (2,2)2,7-3,9(5,3)
<i>C. pseudofulgensia</i> (n=5)	11,3 (1,14) (8,5)9,5-12,5(14)	5,3 (0,52) (4)4,5-6(6,5)	3,3 (0,46) (2)2,5-3,8(4,5)	2,2 (0,32) (1,5)1,8-2,5(3,3)	3,5 (0,60) (2,5)2,8-4,2(6,1)
<i>C. pusilla</i> (n=13)	11,9 (1,08) (9)10,5-13,5(15,8)	6,3 (0,73) (4,5)5,5-7(8,5)	3,9 (0,56) (2,5)3-4,5(6)	1,9 (0,22) (1,2)1,6-2,2(2,7)	3,1 (0,42) (2,1)2,6-3,7(4,6)
<i>C. saxicola</i> s.str. (n=16)	12,6 (1,28) (9)11-14,3(18,4)	5,8 (0,64) (4)5-6,5(7,5)	3,4 (0,58) (1,5)2,8-4,5(5)	2,2 (0,33) (1,4)1,8-2,7(3,4)	3,8 (0,80) (2,4)3-4,8(10,2)
<i>C. schistidii</i> (n=1)	16,7 (1,33) (13,8)15-18(20)	5,5 (0,56) (4)4,5-6(6,5)	0,9 (0,21) (0,5)0,8-1,2(1,5)	3,1 (0,33) (2,2)2,7-3,5(3,7)	18,9 (4,88) (10,6)13,7- 23,8(34,2)
<i>C. tegularis</i> I (n=20)	10,1 (1,08) (7)8,5-11,5(14,5)	4,8 (0,48) (3,5)4-5,5(6)	3,2 (0,47) (1,8)2,5-3,8(5)	2,1 (0,31) (1,4)1,7-2,5(3,6)	3,2 (0,51) (2,1)2,6-3,8(6,4)
<i>C. tegularis</i> II (n=6)	11,6 (1,05) (8,5)10-13(14,5)	4,7 (0,46) (3,8)4-5,5(6)	3,4 (0,52) (2)2,5-4(4,5)	2,5 (0,37) (1,7)2,1-3(3,6)	3,5 (0,54) (2,4)2,8-4,2(5,5)

Taula 4.4.2. Resultats de l'ANOVA per a les cinc variables estudiades.

		DF	Suma de quadrats	Quadrat de la mitjana	valor F	valor P
Larg	Espècie	11	133,832	12,167	39,273	<,0001
	Residual	109	33,768	0,310		
Amp	Espècie	11	99,318	9,029	101,662	<,0001
	Residual	109	9,681	0,089		
Sept	Espècie	11	17,350	1,577	13,109	<,0001
	Residual	109	13,115	0,120		
L/A	Espècie	11	7,661	0,696	43,543	<0,0001
	Residual	109	1,743	0,016		
L/Sept	Espècie	11	33,464	3,042	15,736	<,0001
	Residual	109	21,073	0,193		

Taula 4.4.3. Pesos dels caràcters per als 5 caràcters en les dues primeres components (x100) en l'ACP calculat per investigar els patrons de variació dins del grup de *C. saxicola*. El signe indica si la variable està fent una contribució positiva o negativa.

PESOS (LOADINGS)	pc-1	pc-2
Larg	0,38	-0,35
Amp	0,59	-0,35
Sept	-0,27	-0,73
L/A	-0,41	0,2
L/Sept	0,52	0,43

Taula 4.4.4. % de Variàncies total i acumulada

	% Var	% Var Cum.
1	45,65	45,65
2	30,29	75,94

La primera component principal explica un 45,65 % de la variància total i la segona un 30,29 %. Per tant, amb ambdues components s'explica gairebé el 76% de la variància total. En la primera component les variables amb més pes són l'amplada (Amp) i la relació llargada/engruiximent equatorial (L/Sept), i en la segona ho són l'engruiximent equatorial (Sept) i també la relació llargada/engruiximent equatorial (L/Sept).

En confrontar les dues primeres components principals en la gràfica observem que no es formen grups totalment discrets, però sí que hi ha tendències. De fet, les mostres de *C. biatorina* són les que mostren una tendència més gran a definir-se com un grup separat de la resta, explicat per les variables d'amplada (Amp) i de relació llargada/engruiximent equatorial (L/Sept). Aquestes van seguides de les de *C. pusilla*, que es concentren entre els eixos de llargada (Larg) i amplada (Amp). Curiosament, *C. saxicola* s.str. se separa en dos grups, un que s'explica per la relació llargada/engruiximent equatorial (L/Sept) i un altre per la llargada (Larg) i l'engruiximent equatorial (Sept). Els exemplars de *C. tegularis* I i *C. arnoldii* s.str. es troben força barrejats, concentrats en la zona del diagrama on els valors de la relació llargada/amplada (L/A) són més alts.

4.4.3.2. ANÀLISIS DISCRIMINANT (ACV)

El procés de selecció de variables de l'anàlisi discriminant ha conduït a la conclusió de què són els caràcters de llargada (Larg), amplada (Amp), engruiximent equatorial (Sept) i relació llargada/amplada (L/A) els que més contribueixen en la variació canònica a l'hora de discriminar els tàxons. Per aquest motiu, els hem considerat com els caràcters esporals més útils per a separar els tàxons dins del grup de *C. saxicola*. Per això, són apropiats per a incloure'ls en l'elaboració de la clau dicotòmica. La representació gràfica s'ha fet amb les quatre variables seleccionades i es mostra a la figura 4.4.2. (% de variància de la matriu B/W representat en cada eix). També es presenta la matriu d'estructura amb els coeficients canònics, és a dir, els pesos de la combinació lineal de variables que dóna lloc al nou espai (taula 4.4.5.). Aquests coeficients ens indiquen la influència de cada variable original en les funcions discriminants. En la taula 4.4.6. es presenten els valors dels centroides per a cada grup (tàxon) i funció. Els valors de les distàncies entre espècies en l'espai de l'ACV es mostren en la meitat inferior de la taula 4.4.7.

Taula 4.4.5. Coeficients canònics per als 4 caràcters en les variables canòniques (x100) de l'ACV calculat per a investigar la distinció entre els tàxons del grup de *C. saxicola*. El signe indica si el caràcter està fent una contribució positiva o negativa.

COEFICIENTS CANÒNICS	var-1	var-2	var-3	var-4
Amp	7,38	-6,91	7,51	-6,33
L/A	10,39	-23,36	20,53	-15,98
Larg	-1,5	2,73	-4,62	3,54
Sept	-2,05	-0,04	-1,48	-2,25

Taula 4.4.6. Centroides canònics dels grups en l'ACV calculat per a investigar la distinció entre els tàxons del grup de *C. saxicola*.

CENTROIDES CANÒNICS	var-1	var-2	var-3	var-4
<i>C. arnoldii</i> s.str.	-2,88	-0,4	-0,14	-0,29
<i>C. arnoldii</i> sensu Poelt	0,19	1,52	-0,67	-0,09
<i>C. arnoldii</i> (formes asiàt.)	-2,07	-5,37	2,96	-0,23
<i>C. biatorina</i>	8,41	-0,08	1,43	0,07
<i>C. clauzadeana</i>	-2,43	-5,2	0,42	-0,37
<i>C. rouxii</i>	-1,15	-2,01	-3,22	-0,11
<i>C. nana</i>	-4,64	1,74	2,85	0,28
<i>C. pseudofulgensia</i>	-1,21	0,42	-0,24	0,61
<i>C. pusilla</i>	1,57	0,96	-1,48	-1,13
<i>C. saxicola</i> s.str.	0,68	-0,54	-1,79	1
<i>C. tegularis</i> I	-3,24	1,41	0,99	0,13
<i>C. tegularis</i> II	-2,85	-2,77	0,85	-0,4

Taula 4.4.7. Matriu de les distàncies entre espècies en l'espai de l'ACV. [Les abreviacions del tàxons equivalen a: C. arnol s.str.= *C. arnoldii* s.str., C. arnol P = *C. arnoldii* sensu Poelt, C. arnol As = *C. arnoldii* (formes asiàtiques), C. clauz = *C. clauzadeana*, C. pseudo = *C. pseudofulgensia*, C. sax. s.str. = *C. saxicola* s.str., C. tegul II = *C. tegularis* II – morfotipus d'espores llargament el·lipsoïdals, C. tegul I = *C. tegularis* I – resta de morfotipus].

	C. arnol s.str.	C. arnol P	C. arnol As	C. biator	C. clauz	C. rouxii	C. nana	C. pseudo	C. pusilla	C. sax s.str.	C. tegul I	C. tegul II
C. arnol												
C. arnol P	3,67											
C. arnol As	5,91	8,11										
C. biatorina	11,41	8,64	11,85									
C. clauz	4,86	7,31	2,58	12,04								
C. rouxii	3,89	4,56	7,10	10,81	5,01							
C. nana	4,11	5,99	7,57	13,25	7,71	7,95						
C. pseudo	2,07	1,97	6,72	9,80	5,87	3,91	4,81					
C. pusilla	4,92	1,99	8,59	7,60	7,63	4,51	7,74	3,55				
C. sax	4,13	2,64	7,41	8,44	6,17	2,96	7,45	2,65	2,77			
C. tegul I	2,20	3,83	7,16	11,76	6,70	5,82	2,35	2,62	5,58	5,26		
C. tegul II	2,58	5,49	3,44	11,61	2,50	4,49	5,29	3,89	6,28	5,13	4,23	

Si analitzem la representació gràfica (fig. 4.4.2.), podem observar que novament en aquesta anàlisi la millor espècie que es discrimina és *C. biatorina*. Malgrat tot, s'observen tendències en la resta de tàxons tot i existir una certa superposició. Per exemple, els exemplars de *C. saxicola* s.str. presenten menor dispersió que en l'ACP i formen un grup més o menys definit. Les mostres de *C. arnoldii* s.str. i *C. tegularis* I també es discriminen millor. *C. tegularis* II es presenta clarament separada de *C. tegularis* I i *C. rouxii* mostra una certa tendència a separar-se de la resta de grups.

Pel que fa a les distàncies entre espècies en l'ACV, mostrades en la taula 4.4.7., *C. biatorina* presenta, com era esperable, les distàncies més grans en relació amb la resta dels tàxons. És destacable també que les distàncies entre *C. arnoldii* sensu Poelt i *C. arnoldii* – formes asiàtiques (8,11) siguin més grans que no pas les d'espècies reconegudes taxonòmicament i filogenètica (vegeu apartat 4.3 i capítol 5) com *C. pusilla* i *C. arnoldii* Poelt (1,99) o *C. pusilla* i *C. saxicola* s.str. (2,64). També les distàncies entre *C. tegularis* I i *C. tegularis* II són més grans (4,23) que no pas si les comparem amb d'altres espècies com, per exemple, *C. arnoldii* s.str. (2,20 i 2,58, respectivament).

Després d'eliminar el caràcter de L/Sept, la MANOVA ha continuat resultant significativa amb un valor de W Wilks' Lambda de 0,003, $F = 33,166$ i $P < 0,0001$.

Amb aquests resultats, hem observat la dificultat d'obtenir grups discrets utilitzant resums (dues components principals) dels patrons globals de variació. Cal tenir amb compte que és força difícil separar els 12 grups només amb dos eixos. També pot ser que es doni una variabilitat intraespecífica alta que afecti als caràcters quantitius utilitzats. A vegades, si les espècies se separen per un caràcter que és poc variable en altres tàxons, pot ser que aquest caràcter no contribueixi gaire a les primeres components principals, i aleshores les espècies implicades no se separin en un diagrama de dispersió basat en les primeres components principals. Però tot i no haver aconseguit una separació completa dels grups reconeguts prèviament, sí que podem afirmar que, per a una mateixa espècie o morfotipus, s'obté una tendència dels punts a aparèixer agrupats.

L'Anàlisi Discriminant l'hem utilitzat per veure si partint de caràcters quantitius continus es poden discriminar els tàxons que reconeixem en el nostre tractament. Com hem vist, el grup pel qual s'obté un resultat més satisfactori en termes de discriminació ha estat el de *C. biatorina*, una de les espècies més ben definides pels caràcters morfològics qualitius i que, posteriorment s'ha resolt com a un bon grup natural en les anàlisis filogenètiques (capítol 5). Malgrat tot, també hi ha altres tàxons, grups naturals, morfològics o geogràfics, amb els quals no hem obtingut tan bons resultats.

El fet que estiguem analitzant conjuntament tants grups pot fer que, en representar en un gràfic només dues funcions discriminants, estiguem deixant fora la funció que proporciona una millor discriminació per un parell de tàxons determinat. Per aquest motiu, diversos autors (p.ex. Arup 1993b, Lindblom 1997) prefereixen realitzar l'ACV de parells de tàxons propers. Nosaltres hem realitzat aquesta comparació de parells de tàxons o morfotipus, mitjançant el test de Tukey.

4.4.3.3. RESULTATS DE L'APLICACIÓ DEL TEST DE TUKEY/KRAMER

Com acabem d'esmentar, mitjançant el test de Tukey hem calculat les diferències significatives entre parells de tàxons amb l'objectiu de validar estadísticament l'aplicabilitat de les variables esporals en la clau dicotòmica. Els resultats, els hem recollit en quatre taules de doble entrada, que expressen la significació de les comparacions corresponents a cada parell de tàxons. Cada taula correspon a un dels quatre caràcters prèviament seleccionats mitjançant l'anàlisi discriminant. Llargada (Larg) (taula 4.4.8.); amplada (Amp) (taula 4.4.9.); engruïment equatorial (Sept) (taula 4.4.10.); relació llargada/amplada (L/A) (taula 4.4.11.).

Taula 4.4.8. Matriu de significació entre espècies corresponent a la variable de llargada (Larg). La S indica la presència de significació. En la meitat inferior es mostren les diferències en valor absolut entre les mitjanes per espècies del caràcter. [Les abreviatures dels tàxons corresponen a: C. arnol s.str. = *C. arnoldii* s.str., C. arnol P = *C. arnoldii* sensu Poelt, C. arnol As = *C. arnoldii* (formes asiàtiques), C. clauz = *C. clauzadeana*, C. pseudo = *C. pseudofulgensia*, C. sax. s.str. = *C. saxicola* s.str., C. tegul II = *C. tegularis* II – morfotipus d'espores llargament el·lipsoidals, C. tegul I = *C. tegularis* I – resta de morfotipus].

Llargada	C. arnol s.str.	C. arnol P	C. arnol As	C. biator	C. clauz	C. rouxii	C. nana	C. pseudo	C. pusilla	C. sax s.str.	C. tegul I	C. tegul II
C. arnol				S		S	S		S	S	S	
C. arnol P	0,92			S		S	S			S	S	
C. arnol As	0,63	0,54				S	S				S	
C. biator	1,24	1,14	0,61				S	S			S	
C. clauz	1,49	1,40	0,86	0,26			S				S	
C. rouxii	2,07	1,97	1,44	0,83	0,58		S	S	S		S	S
C. nana	2,14	2,23	2,77	3,37	3,63	4,20		S	S	S	S	S
C. pseudo	0,14	0,48	0,49	1,10	1,35	1,93	2,28			S	S	
C. pusilla	0,72	0,63	0,09	0,51	0,77	1,35	2,86	0,58		S	S	
C. sax s.str.	1,44	1,34	0,81	0,20	0,54	0,63	3,57	1,30	0,72		S	S
C. tegul I	1,08	1,17	1,71	2,31	2,57	3,14	1,06	1,22	1,80	2,51		S
C. tegul II	0,42	0,32	0,21	0,82	1,07	1,65	2,55	0,28	0,31	1,02	1,49	

Taula 4.4.9. Matriu de significació entre espècies corresponent a la variable d'amplada (Amp). La S indica la presència de significació. En la meitat inferior es mostren les diferències en valor absolut entre les mitjanes per espècies del caràcter. [Les abreviatures dels tàxons corresponen a: C. arnol s.str.= *C. arnoldii* s.str., C. arnol P = *C. arnoldii* sensu Poelt, C. arnol As = *C. arnoldii* (formes asiàtiques), C. clauz = *C. clauzadeana*, C. pseudo = *C. pseudofulgensia*, C. sax. s.str. = *C. saxicola* s.str., C. tegul II = *C. tegularis* II – morfotipus d'espores llargament el·lipsoidal, C. tegul I = *C. tegularis* I – resta de morfotipus].

Amplada	C. arnol s.str.	C. arnol P	C. arnol As	C. biator	C. clauz	C. rouxii	C. nana	C. pseudo	C. pusilla	C. sax s.str.	C. tegul I	C. tegul II
C. arnol s.str.		S	S	S		S	S		S	S		
C. arnol P	0,89		S	S	S		S	S	S		S	S
C. arnol As	0,60	1,48		S		S		S	S	S		
C. biator	2,35	1,46	2,94		S	S	S	S	S	S	S	S
C. clauz	0,33	1,22	0,27	2,68					S	S		
C. rouxii	0,63	0,26	1,22	1,72	0,96		S		S		S	S
C. nana	0,68	1,56	0,08	3,02	0,35	1,31		S	S	S	S	
C. pseudo	0,34	0,55	0,94	2,00	0,67	0,29	1,02		S			S
C. pusilla	1,39	0,50	1,98	0,96	1,72	0,76	2,06	1,05		S	S	S
C. sax s.str.	0,84	0,05	1,44	1,51	1,17	0,21	1,52	0,50	0,55		S	S
C. tegul I	0,14	1,02	0,46	2,48	0,19	0,77	0,54	0,48	1,52	0,98		
C. tegul II	0,29	1,17	0,31	2,63	0,44	0,92	0,39	0,63	1,67	1,13	0,15	

Taula 4.4.10. Matriu de significació entre espècies corresponent a la variable d'engruiximent equatorial, "septe" (Sept). La S indica la presència de significació. En la meitat inferior es mostren les diferències en valor absolut entre les mitjanes per espècies del caràcter. [Les abreviatures dels tàxons corresponen a: C. arnol s.str.= *C. arnoldii* s.str., C. arnol P = *C. arnoldii* sensu Poelt, C. arnol As = *C. arnoldii* (formes asiàtiques), C. clauz = *C. clauzadeana*, C. pseudo = *C. pseudofulgensia*, C. sax. s.str. = *C. saxicola* s.str., C. tegul II = *C. tegularis* II – morfotipus d'espores llargament el·lipsoidals, C. tegul I = *C. tegularis* I – resta de morfotipus].

Septe	C. arnol s.str.	C. arnol P	C. arnol As	C. biator	C. clauz	C. rouxii	C. nana	C. pseudo	C. pusilla	C. sax s.str.	C. tegul I	C. tegul II
C. arnol s.str.				S			S					
C. arnol P	0,07			S		S	S					
C. arnol As	0,65	0,59				S			S			
C. biator	0,82	0,75	0,17			S			S	S	S	S
C. clauz	0,08	0,01	0,57	0,74								
C. rouxii	0,53	0,60	1,18	1,35	0,61		S	S		S	S	S
C. nana	0,72	0,66	0,07	0,09	0,65	1,26			S	S		
C. pseudo	0,29	0,23	0,36	0,53	0,21	0,82	0,43		S			
C. pusilla	0,34	0,41	0,99	1,16	0,42	0,19	1,07	0,63		S	S	
C. sax s.str.	0,14	0,08	0,51	0,68	0,06	0,67	0,58	0,15	0,48			
C. tegul I	0,35	0,28	0,30	0,47	0,27	0,89	0,38	0,06	0,69	0,21		
C. tegul II	0,16	0,09	0,49	0,66	0,08	0,69	0,57	0,13	0,50	0,02	0,19	

Taula 4.4.11. Matriu de significació entre espècies corresponent a la variable de relació llargada/amplada (L/A). La S indica la presència de significació. En la meitat inferior es mostren les diferències en valor absolut entre les mitjanes per espècies del caràcter. [Les abreviatures dels tàxons corresponen a: C. arnol s.str. = *C. arnoldii* s.str., C. arnol P = *C. arnoldii* sensu Poelt, C. arnol As = *C. arnoldii* (formes asiàtiques), C. clauz = *C. clauzadeana*, C. pseudo = *C. pseudofulgensia*, C. sax. s.str. = *C. saxicola* s.str., C. tegul II = *C. tegularis* II – morfotipus d'espores llargament el·lipsoïdals, C. tegul I = *C. tegularis* I – resta de morfotipus].

L/A	C. arnol s.str.	C. arnol P	C. arnol As	C. biator	C. clauz	C. rouxii	C. nana	C. pseudo	C. pusilla	C. sax s.str.	C. tegul I	C. tegul II
C. arnol s.str.		S	S	S	S				S		S	S
C. arnol P	0,33		S	S	S	S				S	S	S
C. arnol As	0,46	0,80		S		S	S	S	S	S	S	
C. biator	0,56	0,23	1,03		S	S	S	S	S	S	S	S
C. clauz	0,48	0,81	0,01	1,04			S	S	S	S	S	
C. rouxii	0,12	0,46	0,34	0,69	0,35		S		S		S	
C. nana	0,14	0,19	0,60	0,42	0,62	0,26			S			S
C. pseudo	0,12	0,22	0,58	0,44	0,60	0,24	0,02		S			S
C. pusilla	0,39	0,05	0,85	0,18	0,86	0,51	0,25	0,27		S	S	S
C. sax s.str.	0,07	0,26	0,54	0,49	0,55	0,20	0,07	0,05	0,31			S
C. tegul I	0,16	0,17	0,63	0,40	0,64	0,29	0,22	0,04	0,22	0,09		S
C. tegul II	0,24	0,57	0,23	0,80	0,24	0,11	0,38	0,36	0,62	0,31	0,40	

A partir de les matrius obtingudes amb el test de Tukey/Kramer, podem observar que les espècies que presenten diferències significatives varien segons la variable utilitzada. Vist, doncs, que un sol caràcter no permet discriminar tots els tàxons estudiats, si volem fer una clau d'identificació eficaç, haurem d'incloure els quatre caràcters sel·leccionats de manera combinada, al costat de la resta de caràcters qualitius discriminatoris, com ho fem a continuació.

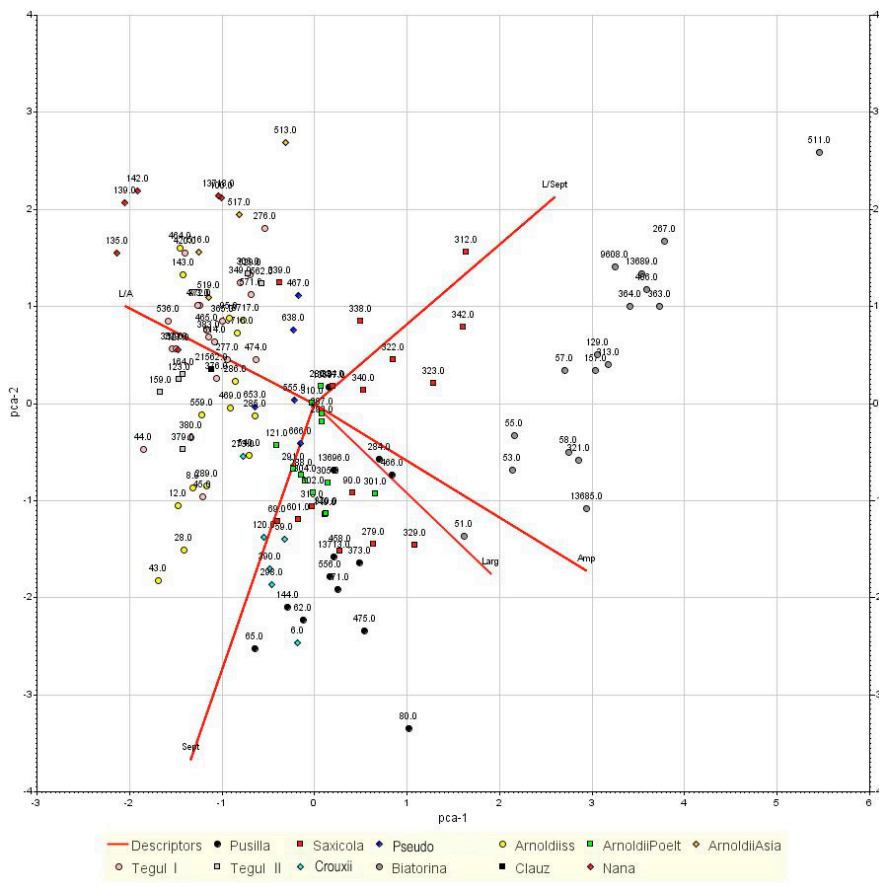


Figura 4.4.1 Gràfic ACP: Diagrama de dispersió de les dues primeres components principals que expliquen un 75,9% de la variància total. Hi apareixen representats alhora els individus (punts) i les cinc variables Larg, Amp, Sept, L/A, L/Sept (vectors).

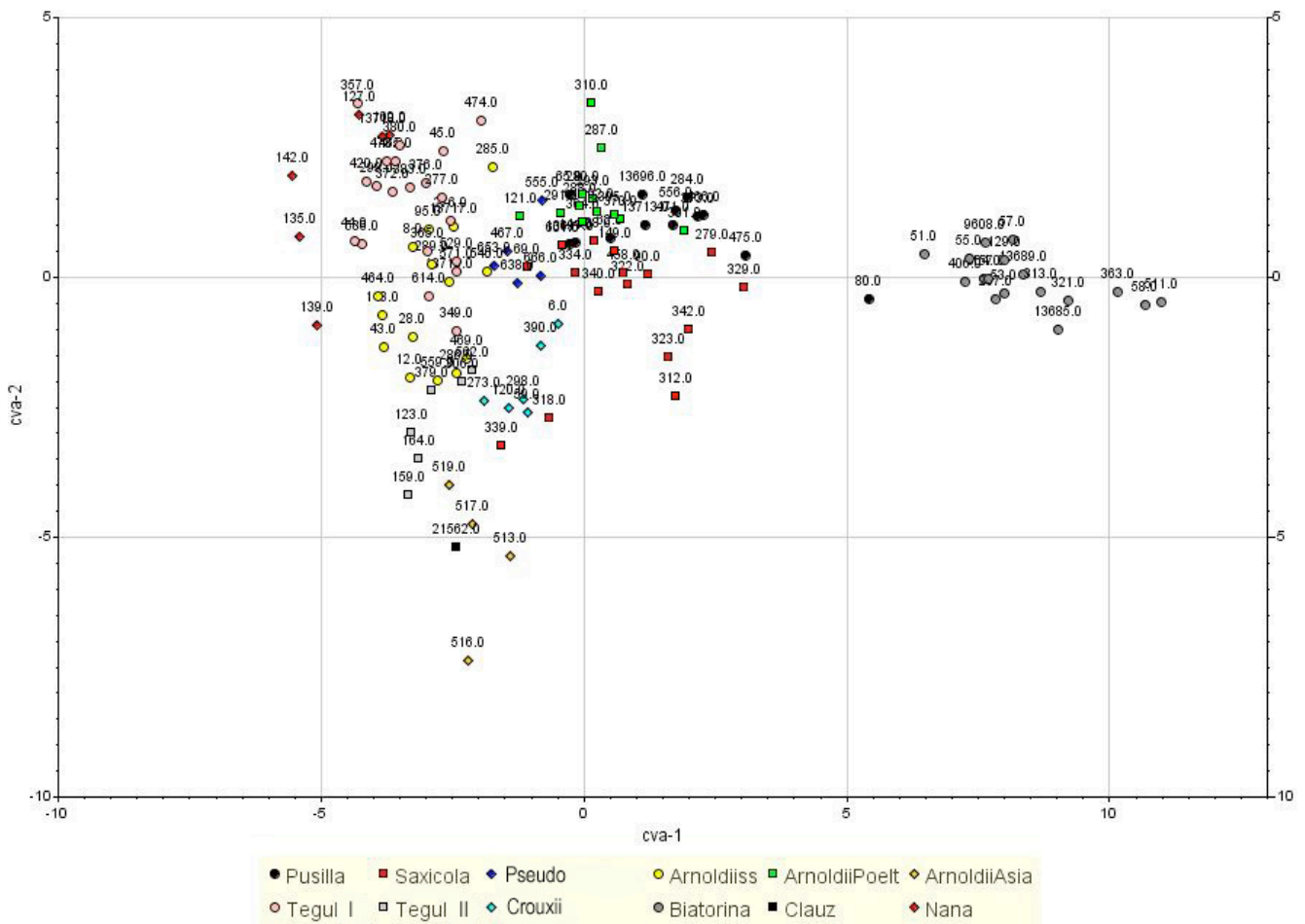


Figura 4.4.2 Gràfic ACV: representació de les coordenades dels individus en els dos primers eixos de l'anàlisi discriminant per a les quatre variables seleccionades: Larg, Amp, Sept, L/A.

4.5. CLAU DELS TÀXONS I MORFOTIPUS DEL GRUP DE C. SAXICOLA

1. Tal·lus crustaci-esquamulós, sovint reduït al marge tal·lí dels apotecis. Ascòspores de (13,8)15-18(20) x (4)4,5-6(6,5) µm, pràcticament sense engruiximent equatorial que queda reduït a un septe, de (0,5)0,8-1,2(1,5) µm de gruix, i amb relació L/A de (2,2)2,7-3,5(3,7). — Sobre molses. Abundant a la regió meridional d'Europa Central. —..... **C. schistidii**
1. Tal·lus crustaci-placodioide. Ascòspores més curtes, que no superen els 15 µm de llargada. Creixent directament sobre substrats rocosos**2**
2. Tal·lus amb soralis crateriformes, que forma rosetes de color groc-ocraci o salmonat, i provist d'abundant pruïna blanca. Apotecis absents o rars. — Ambients enriquits amb nitrats; sobre cims de blocs calcaris o carbonatats, exposats i assolellats. Abundant a l'hemisferi Nord. Coneguda també a Nova Zelanda. — **C. decipiens**
2. Tal·lus no sorediat, amb coloració diversa segons els taxons. Apotecis sempre presents**3**
3. Tal·lus de color salmonat, amb abundant presència de pruïna**4**
3. Tal·lus grocs, taronges o vermells, sense pruïna o poc abundant.....**5**
4. Ascòspores amplament el·lipsoïdals, de (9)10,5-13,5(15,8) x (4,5)**5,5-7**(8,5) µm, amb engruiximent equatorial de (2,5)3-4,5(6) µm i relació L/A de (1,2)**1,6-2,2**(2,7). Lòbuls marginals plans o convexos. Capa algal contínua. — Coniòfil i ornitocopròfil; en murs o parets de roca carbonatada; a vegades en parets verticals no assolellades, a la part inferior d'esperons calcaris exposats als esquitxos de l'aigua de pluja. Àmplia distribució; cosmopolita. — **C. pusilla**
4. Ascòspores llargament el·lipsoïdals, de (10,5)11,5-14(14,8) x (3,8)**4-5**(5,5) µm, amb engruiximent equatorial de (2,5)3-4(4,5) µm i relació L/A de (2,2)**2,3-3,2**(3,3). Lòbuls marginals sempre convexos. Capa algal que forma glomèruls de cèl·lules. — En parets verticals o extraploms calcaris protegits de la pluja i de l'escorrentia. Sud de França..... **C. clauzadeana**

5. Tal·lus de color vermell, vermell ataronjat o vermell rosat.....6
5. Tal·lus de color groc o taronja..... 11
6. Tal·lus de fins a 20 mm de diàmetre. Lòbuls marginals plans i llargs, que arriben a 3 mm de llargada. Ascòspores molt amplament el·lipsoïdals, de (9)11-14(16,5) x (5)6,5-8(9,5) µm, amb engruiximent equatorial de (1,5)2-3,5(4,5) µm i amb relació L/A de (1,2)1,4-2(2,6). — Parts superiors de blocs de roques carbonatades, calcàries o gresos; ocasionalment, sobre roques silícies bàsiques. Distribució holàrtica; preferència montano-alpina. — **C. biatorina**
6. Tal·lus més reduïts, que no superen els 10-11 mm de diàmetre. Lòbuls marginals majoritàriament convexos, més curts, que assoleixen com a molt 1-1,5 mm de llargada. Ascòspores més estretes, típicament el·lipsoïdals, només de 6-6,5(7,5) µm d'amplada, i amb relació L/A en general ≥ 2 7
7. Lòbuls marginals extremadament convexos, sovint reduïts, però sempre visibles, provistos de zones superficials decolorades amb aspecte de pseudocifel·les. Còrtex d'estructura esclero-prosoplectenquimàtica. Apotecis zeorins, immersos o, a vegades, sèssils. Ascòspores de (9,5)11,5-15(16,5) x (3,5)5-6(7) µm; amb engruiximent equatorial de (2,5)3,5-4,8(6) µm i relació L/A de (1,5)2-2,9(3,3). — Cims de blocs de roca carbonatada assolellats i rics en nitrats. Europa, distribució alpina. — **C. rouxii**
7. Lòbuls marginals plans o poc convexos, desprovistos de zones superficials decolorades amb aspecte de pseudocifel·les. Còrtex no esclero-prosoplectenquimàtic. Apotecis pseudolecanorins o lecanorins, mai immersos. Ascòspores més curtes, que no superen els 13,5 µm de llargada8
8. Ascòspores amplament el·lipsoïdals, de (8,5)10-13(15,5) x (4)5-6,5(7,5) µm, amb engruiximent equatorial de (2,5)3-4(4,5) µm i relació L/A de (1,4)1,6-2,3(3,1). Tal·lus format per rosetes sempre ben delimitades, normalment necrosades i esblanqueïdes a la part central, i per lòbuls marginals profundament dividits. — Parets verticals i extraploms assolellats i càlids de roca calcària. Centre d'Europa; distribució alpina.— **C. arnoldii sensu Poelt**
8. Ascòspores el·lipsoïdals més estretes, amb només 4-5,5 µm d'amplada, i relació L/A superior a 2 en la majoria d'espores. Rosetes del tal·lus sovint confluents, sense parts necrosades al centre del tal·lus.9

9. Tal·lus de coloració vermell-rosada, recoberts lleugerament de pruïna. Lòbuls marginals majoritàriament bifurcats. Areòles centrals molt convexes. Apotecis amb el marge i la base del parateci provists de cèl·lules més o menys arrodonides. Ascòspores de (7,5)9,5-13(15) x (3,5)4,5-5,5(6,5) μm , amb engruiximent equatorial de (2)2,8-4,3 μm i relació L/A de (1,4)1,9-2,7(3,3). — Sobre roques carbonatades; en parets verticals i extraploms protegits de l'escorrentia, no assolellats. Abundant a la regió mediterrània; també al Centre d'Europa. — **C. arnoldii s.str.**
9. Tal·lus mai de coloració vermell-rosada i sense pruïna. Lòbuls marginals no o rarament bifurcats. Arèoles centrals planes en la seva majoria. Apotecis sense cèl·lules arrodonides en el marge i la base del parateci. Ascòspores de mides diferents. — Sobre roques no carbonatades. — **10**
10. Ascòspores molt llargament el·lipoidals, de (8,5)10-13,5(14,5) x (3,5)4-5(5,5) μm , amb engruiximent equatorial de (1,5)2,5-3,5(4) μm i relació L/A de (1,8)2,2-3,3(3,8). Tal·lus de color vermell de mini, amb lòbuls marginals contigus i molt imbricats, abundantment dividits, amb sublobulacions estretes i profundes, sense línia hipotal·lina visible. Capa algal contínua. — Distribució alpina; Àsia. —
..... **C. arnoldii sensu Poelt (formes asiàtiques)**
10. Ascòspores d'amplament a llargament el·lipsoïdals, de (7)8,5-11,5(14,5) x (3,5)4-5,5(6) μm , amb engruiximent equatorial de (1,8)2,5-4(5) μm i relació L/A de (1,4)1,7-2,5(3,6). Tal·lus de color taronja-ocraci o taronja-brunenc, amb tonalitats vermelloses. Lòbuls marginals poc contigus i rarament imbricats, provistos de sublobulacions poc profundes, i envoltats d'una línia hipotal·lina del mateix color que el tal·lus. Capa algal dispersa. — Abundant al nord d'Europa. —
..... **C. tegularis (morfotipus de "C. miniatula")**
11. Lòbuls marginals extremadament reduïts, sovint poc o no visibles. Tal·lus de color groc-ocraci o lleugerament ataronjat. Còrtex provist de capa epinecral i amb cristalls de parietina superficials que donen al tal·lus un aspecte rugós. Apotecis grans, de 0,2-2,5(4) mm de diàmetre, que s'agrupen formant glomèruls que recobreixen el tal·lus. Ascòspores de (9)11-14,5(18,4) x (4)5-6,5(7,5) μm , amb engruiximent equatorial de (1,5)3-4,5(5) μm i relació L/A de (1,4)1,8-2,7(3,4) — Parets i murs silícics, calcaris o de morter. Distribució en ambients freds. — **C. saxicola s.str.**
11. Lòbuls marginals ben desenvolupats, sempre visibles o en algun cas, substituïts per una línia hipotal·lina. Còrtex desprovist de capa epinecral, sense cristalls superficials o amb cristalls que no donen un aspecte rugós al tal·lus. Apotecis més petits, de fins a 1,2(1,8) mm de diàmetre, que no formen glomèruls **12**

[NOTA: si s'observen glomèruls d'apotecis i lòbuls reduïts, però les ascòspores són de dimensions inferiors a les de *C. saxicola* s.str. poden correspondre a alguns dels morfotipus de *C. tegularis*, en concret al morfotipus de "*C. saxicola* ssp. *obliterata*", amb ascòspores de (7)8,5-11,5(14,5) x (3,5)4-5,5(6) µm, i al morfotipus d'"ascòspores llargament el·lipsoïdals", ascòspores de (8,5)10-13(14,5) x (3,8)4-5,5(6) µm].

12. Tal·lus que no forma rosetes ben delimitades, de color groc, taronja o taronja-brunenc, desprovistos de pruïna i, aleshores, amb textura cèria, o bé amb una lleugera capa de pruïna, que els hi dóna una tonalitat bruta. Lòbuls marginals convexos i ramificats, o plans i de forma flabel·lada, sense ramificacions, sovint envoltats per una línia hipotal·lina concolor amb el tal·lus. Arèoles que poden quedar reduïdes a grànuls, de 0,05-0,3 mm de diàmetre. Còrtex sense cristalls superficials visibles amb llum polaritzada. Apotecis amb el marge del parateci d'estructura escleroplectenquimàtica de tipus B. — Sobre roques no carbonatades amb poca aportació de nitrats. Distribució temperada i boreal a Europa; també a Amèrica del Nord. —..... ***C. tegularis sensu auct.***

Morfotipus de *C. tegularis sensu auct.*

- A1** Ascòspores de (8,5)10-13(14,5) x (3,5)4-5,5(6), amb engruïment equatorial de (2)2,5-4(4,5) µm i relació L/A de (1,7)2,1-3(3,6). Apotecis en glomèruls o no **morfotipus d'espores llargament el·lipsoïdals**
- A2** Ascòspores més curtes, de (7)8,5-11,5(14,5) x (3,5)4-5,5(6), amb engruïment equatorial de (1,8)2,5-4(5) µm i relació L/A inferior, de (1,4)1,7-2,5(3,6).... **B1-B4**
- B1** Tal·lus de color taronja, taronja-ocraci o taronja-brunenc, sense pruïna. Lòbuls no eixamplats a l'apex; sovint envoltats per una línia hipotal·lina taronja..... **morfotipus de "*C. miniatula*"**
- B2** Tal·lus de color groc, sense pruïna i amb textura cèria, o amb una lleugera capa de pruïna concolor. Lòbuls marginals eixamplats a l'apex, que sovint són substituïts per una línia hipotal·lina groga densament ramificada..... **morfotipus de "*C. obliterascens*"**
- B3** Tal·lus de color groc-ataronjat, taronja brunenc o bru clar. Lòbuls marginals flabel·lats, plans, recoberts d'una lleugera capa de pruïna que dóna una tonalitat bruta. Apotecis agrupats formant glomèruls **morfotipus de "*C. saxicola* ssp. *obliterata*"**
- B4** Tal·lus disgregat en lòbuls dispersos **morfotipus de "*C. pyracooides*"**

12. Tal·lus que forma rosetes ben delimitades, de color groc pàl·lid o groc-ocraci, recobert lleugerament de pruïna, i sovint amb la part central esblanqueïda. Lòbuls sempre plans, eixamplats a l'apex; sense línia hipotal·lina visible. Arèoles no reduïdes a grànuls. Còrtex amb abundants cristalls superficials visibles amb llum polaritzada. Apotecis mai agrupats formant glomèruls, amb el marge del parateci d'estructura para-escleroplectenquimàtica. — Sobre roques carbonatades. — **13**

13. Tal·lus de fins a 8 mm de diàmetre. Lòbuls marginals abundantment sublobulats, amb sublòbuls que se superposen entre ells. Arèoles de 0,3-0,9 mm de diàmetre. Còrtex amb estructura para-escleroplectenquimàtica, rarament escleroplectenquimàtica tipus A o B, amb abundants cristalls superficials que poden arribar a la part hialina. Medul·la també amb abundants cristalls immersos en la part més basal. Apotecis de 0,2-0,8(1) mm de diàmetre. Ascòspores de (8,5)9,5-12,5(14) x (4)4,5-6(6,5) µm. — Parets verticals no assolellades, a la part inferior d'esperons calcaris exposats als esquitxos de l'aigua de pluja. A tot Europa. —
..... **C. pseudofulgensia**

13. Tal·lus més petits, que no superen els 3,5 mm de diàmetre. Lòbuls marginals mitjanament sublobulats, sense sublòbuls superposats. Arèoles més petites, de (0,1)0,2-0,5(0,6) mm de diàmetre. Còrtex d'estructura sempre escleroplectenquimàtica de tipus A o B, amb pocs cristalls superficials. Medul·la sense cristalls. Apotecis més petits, de 0,1-0,3(0,5) mm de diàmetre. Ascòspores més petites, de (6,5)8-10(11) x (3)3,5-5(5,5) µm. — Parets verticals i extraploms protegits de l'escorrentia directa de l'aigua de pluja, sense insolació directa. Catalunya (Espanya) i Àustria. — **C. nana**

'The systematist is primarily a morphologist whose task is to discover the true phylogenetic relationships'

Cummings, 1916

CAPÍTOL 5

FILOGÈNIA DEL GRUP DE *C. SAXICOLA*

5. FILOGÈNIA DEL GRUP DE *C. SAXICOLA*

5.1. ANÀLISI FILOGENÈTICA BASADA EN CARÀCTERS MORFOLÒGICS

5.1.1. INTRODUCCIÓ

El debat taxonòmic sobre el valor de la informació molecular respecte a la que aporten els trets morfològics s'ha mantingut des de l'inici. Actualment hi ha una controvèrsia oberta per la utilització dels caràcters morfològics en els estudis filogenètics. Alguns autors advoquen per la mapació directa d'aquests caràcters sobre les filogènies moleculars, mentre que d'altres continuen defensant la importància de les filogènies basades en la morfologia. Així, en la primera postura destaquem a Scotland *et al.* (2003), segons la qual s'haurien de realitzar recerques integrades on, en l'àmbit d'una filogènia molecular, es duguessin a terme estudis anatòmics detallats i crítics de només uns pocs caràcters morfològics. Aquests autors afirmen que hi ha massa pocs caràcters morfològics que no presentin problemes per a construir filogènies acurades i robustes. Defensen que és millor explorar l'anatomia i la morfologia per a menys caràcters, però que aquests puguin ser usats per a establir una congruència recíproca en relació a les filogènies moleculars. Aquesta aproximació examina cada homòleg morfològic cercant la coherència amb els nodes rellevants de l'arbre molecular, partint del fet que els caràcters morfològics poden ser diagnòstics per a nodes en arbres moleculars i que la congruència taxonòmica proporciona una evidència de precisió (*accuracy*) filogenètica (Hillis 1996, Miyamoto & Fitch 1995). Aquest punt de vista discrepa amb el de Poe & Wiens (2000), que consideren que en les anàlisis filogenètiques s'hi podria incloure molta més variació morfològica de la que s'usa actualment. A més, Hillis & Wiens (2000) afirmen que l'avantatge més gran de les dades morfològiques és la possibilitat d'un mostreig taxonòmic més nombrós. Hillis (1996, 1998) i Graybeal (1998) havien demostrat prèviament que un increment en el nombre de tàxons és important per a la precisió (*accuracy*) filogenètica en anàlisis amb un gran nombre de caràcters. Scotland *et al.* (2003) puntualitzen, però, que el rol del mostreig taxonòmic nombrós és poc clar quan es disposa de pocs caràcters.

Jenner (2004) i Wiens (2004) responen directament a les tesis de Scotland *et al.* (2003) amb diversos arguments. Per a Jenner (2004) la morfologia pot contribuir en les anàlisis de dades combinades donant recolzament a clades amagats (*hidden clade support*), que esdeven aparents només quan els grups de dades es combinen (Damgaard & Sperling 2001, Gatesy & Arctander 2000, Gatesy *et al.* 2003, Murrell *et*

al. 2001). Jenner (op. cit.) també afirma que les dades morfològiques poden ser parcialment incongruents amb les moleculars quan s'analitzen separatament, però combinades l'evidència total pot generar una filogènia ben recolzada. Per la mateixa raó, Rokas *et al.* (2003) mostren que la combinació de grups de dades moleculars aparentment conflictives pot portar a una única filogènia ben recolzada. En alguns casos es dona l'evidència complementària, on cada tipus de dades contribueix en diferents parts de la filogènia (Giribet & Wheeler 2002). La força de la morfologia es troba en el fet que caràcters informatius en diferents nivells de la filogènia estan inclosos normalment en un sol grup de dades: una sèrie de caràcters morfològics pot donar informació de molts gens diferents no lligats (*unlinked*), mentre que els caràcters en un grup donat de dades moleculars es troben sovint lligats i són heredats com una sola unitat (Doyle 1992, Hillis & Wiens 2000). En d'altres casos, la morfologia pot contribuir com a senyal filogenètic únic, on les molècules són completament mudes (Mattern & McLennan 2000). En algunes anàlisis combinades la morfologia pot incrementar el recolzament de certs nodes i reduir-ne el d'altres (Klompen *et al.* 2000, Stach & Turbeville 2002). Finalment, també s'ha de tenir present que en alguns casos pot ser que no afegeixi cap recolzament significatiu a l'anàlisi combinada (Sorhannus 2001).

Wiens (2004), discutint les tesis de Scotland *et al.* (2003), afirma que una de les raons més convincents per continuar recollint dades morfològiques és que permeten resoldre relacions filogenètiques entre tàxons fòssils i comparar-los amb tàxons vius (Hillis & Wiens 2000, Jenner 2004, Maddison 1996). Wiens (2004), a més, enumera d'altres motius per a reconstruir filogènies amb dades morfològiques, entre els què destaquem l'existència de tàxons per als quals és difícil d'obtenir dades moleculars; la importància de disposar de filogènies morfològiques riguroses per a detectar discordances en els resultats moleculars (p.e. Doyle 1992, Hillis & Wiens 2000) – si més no, fins que no s'arribi a l'estadi en què totes les filogènies moleculars siguin reconstruïdes sense error – i també, que moltes de les classificacions de grups importants han estat provades amb anàlisis filogenètiques morfològiques.

En referència als problemes dels caràcters morfològics exposats per Scotland *et al.* (2003), Poe & Wiens (2000) en un treball que es basa en nombrosos estudis estadístics, de simulació i congruència, mostren que els caràcters considerats ambigus per Scotland *et al.* (2003) contenen informació filogenètica. Alguns d'aquests caràcters són els que proporcionen variació quantitativa i contínua (Thiele 1993, Wiens 2001), els caràcters polimòfics (Wiens 1995, 1998a, 1998b, 1999, 2000, Wiens & Servedio 1997, 1998) i els caràcters amb dades absents (*missing data*) (Wiens 1998c). El mateix autor en un altre treball (Wiens 2003) afirma que les simulacions recents suggereixen que la quantitat o proporció de dades absents (*missing data*) en tàxons incomplets pot ser irrellevant per al seu posicionament acurat en l'arbre filogenètic, encara que una alta proporció d'aquestes dades pot limitar la seva capacitat per

canviar les relacions respecte els tàxons més complets. Finalment, Wiens (2004) torna a fer referència al nombre de caràcters i afirma que, quan el nombre de tàxons es fa comparable, l'increment en el nombre de caràcters morfològics pot augmentar la resolució i el recolzament de *bootstrap*.

Per resumir aquesta controvèrsia, l'afirmació de Baker & Gatesy (2002) és força exemplificadora: "*If morphological evidence is ignored, the phylogeny of over 99% of life is ignored*" (Si ignorem l'evidència morfològica, ignorem la filogènia de més del 99% de la vida).

En líquens existeixen diversos treballs que analitzen tant els caràcters morfològics com químics des d'un punt de vista filogenètic (p.e. Aptroot 1991, Grube 1998, Kärnefelt *et al.* 1992, Lumbsch & Tehler 1998, Mattsson 1993, Nordin 2000, Nordin & Mattsson 2001, Scheidegger *et al.* 2001). En aquest sentit, els estudis més representatius són els realitzats per Tehler en l'ordre *Arthoniales* i, en concret, en la família *Roccellaceae* (Tehler 1983, 1990, 1993a, 1993b, 1994b).

A la dècada dels noranta aquest mateix autor (Tehler 1995a, 1995b) i d'altres, com per exemple Lutzoni & Vilgalys (1995), Lutzoni & Brodo (1995) i Crespo *et al.* (1999), comencen ja a combinar les dades morfològiques amb caràcters moleculars; una pràctica que ha seguit fins a l'actualitat, com es pot veure en els treballs de Miadlikowska & Lutzoni (2000) i McDonald *et al.* (2003). Miadlikowska & Lutzoni (2000) incorporen, a més, l'anàlisi filogenètica de les dades químiques (substàncies líquèniques) per separat. Es tracta d'un fet novedós ja que tradicionalment aquest tipus de caràcters s'havien incorporat sempre en les matrius de caràcters morfològics, a excepció feta d'algun treball aïllat (p.e. Culberson 1986).

Després de donar una importància més que considerable als caràcters químics durant els anys seixanta i setanta, i d'haver-se centrat l'atenció en els caràcters moleculars a principis dels noranta, sembla que en l'actualitat hi ha un domini dels estudis on es comparen aquestes dades juntament amb els caràcters morfològics. Malgrat tot, no en tots els treballs es disposa de filogènies morfològiques.

Com afirma Tehler (1994a), els millors estudis sistemàtics i evolutius són aquells que es basen en molts tipus de dades. Un dels usos més importants de les dades moleculars és que representen una eina que pot contrastar les hipòtesis basades en les dades morfològiques i químiques. Segons aquest autor, la congruència entre aquests grups de dades hauria de proporcionar hipòtesis més fiables i ben corroborades per al reconeixement de tàxons monofilètics en líquens.

Coincidint amb les propostes de Scotland *et al.* (2003), alguns liquenòlegs han preferit seleccionar els caràcters morfològics i químics i mapar-los en les corresponents filogènies moleculars (p.e. Grube & Arup 2001, Helms *et al.* 2003, Persoh *et al.* 2004). Però, segons Jenner (2004), si es comparen caràcters morfològics

individuals contra una filogènia molecular ja resolta no s'està avaluant la congruència global dels caràcters. A més, el fet de decidir en quin nivell de la filogènia un caràcter és informatiu també porta lligat assumir la definició i codificació del caràcter. És cert, però, que hi ha una dificultat afegida a l'hora de decidir a priori la utilitat filogenètica dels caràcters morfològics, que en el cas de la mapació no existeix (p.e. Gatesy *et al.* 2003, Jenner & Schram 1999, Schander & Sundberg 2001).

Pel que fa al grup de *C. saxicola*, fins ara no es disposava de cap treball que analitzés la filogènia morfològica. Únicament en el de Kärnefelt (1989) es tracten alguns tàxons del grup de forma superficial, englobats en el què anomena "*Caloplaca* secció *Gasparrinia*". Però, no s'ha de confondre el nom que rep aquesta secció en les seves anàlisis cladístiques (*C. saxicola*) amb el grup considerat en el nostre estudi.

Així, d'acord amb els arguments exposats per diferents autors, com ara Jenner (2004) i Wiens (2004), l'objectiu d'aquest estudi ha estat examinar l'abast de la filogènia morfològica dels tàxons que han quedat circumscrits en el grup de *C. saxicola* a partir de l'estudi filogenètic més ampli realitzat en el capítol 6. En aquesta filogènia s'ha mirat de tenir en consideració tots els caràcters morfològics potencialment útils i no només els que podrien afavorir les nostres hipòtesis inicials.

5.1.2. MATERIAL I MÈTODES

5.1.2.1. MOSTREIG TAXONÒMIC I TRIA DEL GRUP EXTERN

Per fer l'anàlisi filogenètica basada en les dades morfològiques en el grup de *Caloplaca saxicola* s'han seleccionat un total de 60 individus. Entre aquests s'inclouen tant espècimens d'aspecte concordant amb els tipus, com d'altres que representen la variació dels tàxons. S'ha procurat que el nombre d'espècimens triats per cada tàxon estigui relacionat amb la variabilitat morfològica presentada en cada cas. Malgrat tot, en alguns tàxons, donada l'escassetat de material disponible, no s'ha pogut tenir en compte aquesta variabilitat i es troben representats per un espècimen, independentment de la variabilitat morfològica que presenten. D'aquesta manera, hem inclòs en l'anàlisi 6 espècimens de *Caloplaca arnoldii* s.str., 6 de *C. arnoldii* sensu Poelt, 1 de *C. clauzadeana*, 9 de *C. biatorina*, 2 de *C. decipiens*, 1 de *C. nana*, 10 de *C. saxicola* s.str., 6 de *C. pusilla*, 1 de *C. schistidii* i 11 de *C. tegularis* (amb representants dels diferents morfotipus). Com a grup extern (*outgroup*) s'ha emprat *Caloplaca ignea* i tres espècies de *Xanthoria* (*X. candelaria*, *X. elegans* i *X. soreliata*). Sempre que ha estat possible s'han utilitzat espècimens fèrtils. Totes les dades morfològiques utilitzades en les anàlisis filogenètiques s'han obtingut directament dels 60 espècimens analitzats (vegeu taula 5.1 per a informació d'herbari. En cap cas s'han

incorporat dades d'altres espècimens del mateix tàxon ni de la bibliografia. D'aquesta manera hem seguit l'aproximació amb exemplars (*exemplar approach*) esmentada per Prendini (2001).

Taula 5.1. Informació d'herbari dels espècimens emprats en la filogènia del grup de *C. saxicola*. També s'indica el número d'accés al Genbank, quan aquest es disposa, per les 68 seqüències d'ITS nrDNA incloses en aquest estudi. Les seqüències obtingudes directament del Genbank s'indiquen amb un asterisc (*) precedint el nom del tàxon; la resta són seqüències que han estat generades a partir dels espècimens examinats en aquest treball.

Tàxon	Voucher	Nr. d'accés al Genbank
<i>C. arnoldii</i> s.str. 285	Eslovàquia, I. Pisút & J. Poelt (GZU)	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s.str. 143	Espanya, E. Gaya (BCC-lich.)	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s.str. 13716	Espanya, P. Navarro-Rosinés, E. Gaya i N.L. Hladun (BCC-lich. 13716)	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s.str. 28T	França, G. Clauzade (MARSSJ, herb. G. Clauzade, holotipus).	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s.str. 464	Suècia, U. Arup L02302 (LD)	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s.str. 13717	Espanya, E. Gaya i X. Llimona (BCC-lich. 13717)	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s. Poelt 291	Àustria, J. Hafellner (GZU)	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s. Poelt 293	Àustria, U. Arup (Herb. Arup, L97312)	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s. Poelt 301	Àustria, J. Poelt (GZU)	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s. Poelt 304	Àustria, J. Hafellner (GZU)	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s. Poelt 310	Àustria, J. Poelt (GZU)	s.n.
<i>C. arnoldii</i> s. Poelt 370	Àustria, U. Arup (Herb. Arup, L97313)	s.n.
* <i>C. arnoldii</i> s. Poelt 353952	Àustria, U. Arup and M. Grube	AF353952
<i>C. biatorina</i> 313	E.E.U.U., Nebraska, C. Wetmore 77535 (MIN)	s.n.
<i>C. biatorina</i> 321	E.E.U.U., Montana, C. Wetmore 81529 (MIN)	s.n.
<i>C. biatorina</i> 363	E.E.U.U., Arizona, T.H. Nash 35371 (MIN)	s.n.
<i>C. biatorina</i> 267	Espanya, E. Gaya, A. Gómez-Bolea i X. Ariño (BCC-lich.)	s.n.
<i>C. biatorina</i> 364	Espanya, X. Llimona (BCC-lich.)	s.n.
<i>C. biatorina</i> 9608	Espanya, U. Søchting (BCC-lich.)	s.n.
<i>C. biatorina</i> 13685	Espanya, P. Navarro-Rosinés i E. Gaya (BCC-lich. 13685)	s.n.
<i>C. biatorina</i> 13689	Espanya, E. Gaya (BCC-lich. 13689)	s.n.
<i>C. biatorina</i> 406	Pakistan, J. Poelt (GZU)	s.n.
* <i>C. biatorina</i> 353953	U. Arup and M. Grube (1999)	AF353953
<i>C. clauzadeana</i> 21562	França, P. Navarro-Rosinés i C. Roux (MARSSJ, herb. C. Roux 21562-holotipus).	s.n.
<i>C. decipiens</i> 342b	E.E.U.U., Nebraska, C. Wetmore 77865 (MIN)	s.n.
<i>C. decipiens</i> 13692	Espanya, P. Navarro-Rosinés (BCC-lich. 13692)	s.n.
<i>C. ignea</i> 360	Mèxic, C. Wetmore 72440 (MIN)	s.n.
* <i>C. ignea</i> 353950	U. Arup and M. Grube (1999)	AF353950
<i>C. nana</i> 13717b	Espanya, E. Gaya i X. Llimona (BCC-lich. 13717b)	s.n.
<i>C. pusilla</i> 373	E.E.U.U., Minnesota, C. Wetmore 77237 (MIN)	s.n.
<i>C. pusilla</i> 284b	Eslovàquia, I. Pisút & J. Poelt (GZU)	s.n.
<i>C. pusilla</i> 144	Espanya, S. Fos (VAB-LICH. 10393)	s.n.

<i>C. pusilla</i> 13696	Espanya, E. Gaya i X. Llimona (BCC-lich. 13696)	s.n.
<i>C. pusilla</i> 13697	Espanya, P. Navarro-Rosinés, E. Gaya i N.L. Hladun (BCC-lich. 13697)	s.n.
<i>C. pusilla</i> 13713	Espanya, P. Navarro-Rosinés (BCC-lich. 13713)	s.n.
<i>C. rouxii</i> 298	Àustria, H. Mayrhofer, J. Poelt, R. Türk, A. Vezda & H. Wittmann (GZU)	s.n.
<i>C. rouxii</i> 273	Espanya, E. Gaya, A. Gómez-Bolea i X. Ariño (BCC-lich.)	s.n.
<i>C. rouxii</i> 390	Espanya, P. Navarro-Rosinés (BCC-lich.)	s.n.
<i>C. saxicola</i> 318	E.E.U.U., Idaho, B. McCune 19101 (MIN)	s.n.
<i>C. saxicola</i> 322	E.E.U.U., Montana, C. Wetmore 80703 (MIN)	s.n.
<i>C. saxicola</i> 323	E.E.U.U., Montana, C. Wetmore 81491 (MIN)	s.n.
<i>C. saxicola</i> 312	E.E.U.U., Nebraska, C. Wetmore 77920 (MIN)	s.n.
<i>C. saxicola</i> 340	E.E.U.U., Nebraska, C. Wetmore 77946 (MIN)	s.n.
<i>C. saxicola</i> 342	E.E.U.U., Nebraska, C. Wetmore 77865 (MIN)	s.n.
<i>C. saxicola</i> 334	E.E.U.U., Wyoming, C. Wetmore 81256 (MIN)	s.n.
<i>C. saxicola</i> 338	E.E.U.U., Wyoming, leg C. Wetmore 80927 (MIN)	s.n.
<i>C. saxicola</i> 339	E.E.U.U., Wyoming, C. Wetmore 80858 (MIN)	s.n.
<i>C. saxicola</i> 329	Canadà, W. A. Gould 945 (MIN)	s.n.
* " <i>C. saxicola</i> " 353951	U. Arup and M. Grube (1999)	AF353951
<i>C. schistidii</i> 245	Espanya, E. Gaya i X. Llimona (BCC-lich. 13794)	AY233225 ^a
* <i>C. schistidii</i> 279881	Itàlia, P.L. Nimis i M. Tretiach (TSB 24042)	AF279881
* <i>C. schistidii</i> 279882	Romania, M. Zamfir (UPS 125981)	AF279882
<i>C. tegularis</i> 299	Àustria, W. Petutschnig (GZU)	s.n.
<i>C. tegularis</i> 306	Àustria, H. Mayrhofer 13068 (GZU)	s.n.
<i>C. tegularis</i> 349	E.E.U.U., South Dakota, C. Wetmore 49879 (MIN)	s.n.
<i>C. tegularis</i> 365	E.E.U.U., Arizona, C. Wetmore 54422 (MIN)	s.n.
<i>C. tegularis</i> 357	E.E.U.U., North Dakota, C. Wetmore 80340 (MIN)	s.n.
<i>C. tegularis</i> 277	Escòcia, B.J. Coppins & A. Fletcher s.n. (E)	s.n.
<i>C. tegularis</i> 276	Escòcia, B.J. Coppins & A. Fletcher s.n. (E)	s.n.
<i>C. tegularis</i> 376	Escòcia, B.J. Coppins & A.M. O'Dare 15597 (dupl.) (E)	s.n.
<i>C. tegularis</i> 383	Escòcia, B.J. Coppins 17021 & O.L. Gilbert (E)	s.n.
<i>C. tegularis</i> 420	Espanya, E. Gaya, N. Hladun i P. Hoyo (BCC-lich.)	s.n.
<i>C. tegularis</i> 372	França, E. Gaya i J. Torra (BCC-lich.)	s.n.
* " <i>C. saxicola</i> "? 353951	U. Arup and M. Grube (1999)	AF353951
<i>Xanthoria candelaria</i> 8444	França, X. Llimona, A. Gómez-Bolea i P. Navarro-Rosinés (3b) (BCC-lich. 8444)	s.n.
<i>X. elegans</i> 192	Espanya, E. Gaya (BCC-lich.)	s.n.
* " <i>X. elegans</i> " 278753 [= <i>C. saxicola</i> s.str.]	Antàrtida, Vestfold Hills, P.S. Dyer i G.J. Murtagh (CABI, UK Centre, IMI 384688). [Dyer & Murtagh 2001]	AF278753
<i>X. sorediata</i> 367	Espanya, E. Gaya, A. Gómez-Bolea i X. Ariño (BCC-lich.)	s.n.
* <i>X. sorediata</i> 224348	Suècia, Tehler 7883 (S)	AF224348

^a Gaya et al. (2003). s.n.= sense número.

5.1.2.2. MOSTREIG DE CARÀCTERS

Inicialment s'han avaluat un total de 56 caràcters morfològics (detallats en la taula 5.3), dels quals 18 n'han estat exclosos per alguna de les següents raons: manca de variació del caràcter entre els diferents tàxons, impossibilitat de donar una descripció precisa del caràcter o d'obtenir mesures fiables per dificultats en la seva examinació, o bé, per excessiva variació en un mateix espècimen.

D'aquesta manera, per a l'anàlisi filogenètica s'han mantingut 38 caràcters, la majoria dels quals descriuen aspectes del tal·lus i dels apotecis, a excepció d'un caràcter ecològic (tipus de substrat). Aquest caràcter s'ha inclòs en la matriu de dades, malgrat no fer referència a la morfologia, ja que el considerem important taxonòmicament i evolutiva.

Entre aquest conjunt de 38 caràcters seleccionats hi trobem 26 caràcters discrets i 12 de continus. Els caràcters discrets s'han entrat directament en la matriu de dades utilitzant el programa McClade 4.01 (Maddison & Maddison 2001). Els caràcters continus s'han convertit en discrets per tal d'incorporar-los a la matriu.

Taula 5.3. Llista dels 56 caràcters anatòmics i morfològics considerats potencialment útils per a l'anàlisi filogenètica. Els caràcters numerats es corresponen als inclosos en l'anàlisi. Amb un asterisc s'han marcat els caràcters exclosos per les raons exposades en el text.

Caràcters	Estats
Tal·lus	
1 Forma de creixement	0 = crustàcia-placodioide; 1 = foliosa; 2 = fruticosa-“nana”; 3 = esquamulosa
2 Presència de rosetes	0 = sense rosetes ben delimitades; 1 = amb rosetes ben delimitades; 2 = formant glomèruls
3 Mida màxima de roseta	0 = petita; 1 = gran
4 Fixació al substrat	0 = laxament fixat; 1 = fortament fixat
5 Color del tal·lus	0 = groc glauc; 1 = groc; 2 = taronja ocraci; 3 = taronja; 4 = taronja escarlat, “terra cuita”; 5 = taronja brunenc; 6 = salmó; 7 = vermell; 8 = vermell obscur, granatós
*Gruix del tal·lus	µm
6 Pruïna en el còrtex superior	0 = absent; 1 = present
*Gruix del còrtex	µm
7 Textura del còrtex superior	0 = para-escleroplectenquimàtic; 1 = escleroplectenquimàtic-tipus A; 2 = escleroplectenquimàtic-tipus B; 3 = esclero-prosoplectenquimàtic
*Diàmetre de les cèl·lules del còrtex	µm
8 Pseudocifelles	0 = absent; 1 = present
*Gruix de la capa algal	µm
*Diàmetre de les cèl·lules algals	µm
*Densitat de la medul·la	0 = laxa; 1 = densa
*Gruix de les hifes de la medul·la	µm
9 Còrtex inferior	0 = absent; 1 = present
10 Rizines o hàpters en la cara inferior del tal·lus	0 = absent; 1 = present
11 Arèoles	0 = absent; 1 = present
12 Forma de l'arèola I	0 = plana; 1 = convexa
*Forma de l'arèola II	0 = poligonal; 1 = irregular, fragments de lòbuls; 2 = granular o verrucosa

Taula 5.3. Continuació

Caràcters	Estats
Lòbuls	
13 Lòbul-hàbit I:	0 = decumbent, dorsiventral, prostrat; 1 = aixecat a l'apex, prominent, erecte
14 Lòbul-hàbit II	0 = pla; 1= convex; 2 = fortament convex, subcil·líndric
15 Lòbul-hàbit III	0 = no eixamplats a l'apex; 1 = eixamplats a l'apex
16 Lòbul-hàbit IV	0 = no contigus, no superposats; 1 = contigus, superposats
17 Tipus de divisió dels lòbuls	0 = simple; 1 = ramificat/sublobulat; 2 = molt ramificat (de dues a tres vegades)
18 Longitud màxima del lòbul	0 = lòbuls curts; 1= lòbuls llargs
19 Amplada màxima del lòbul	0 = lòbuls estrets; 1 = lòbuls amples; 2 = lòbuls molt amples
20 Propàguls vegetatius	0 = absent; 1 = present
Apotecis	
21 Presència d'apotecis	0 = absent (o molt rarament present); 1 = present (sempre present)
22 Tipus d'apotecí	0 = pseudolecanorins; 1= lecanorins; 2 = zeorins
23 Localització dels apotecis	0 = dispersos; 1 = agrupats; 2 = formant una massa aglomerada
*Diàmetre de l'apotecí	µm
24 Pruïna en l'apotecí	0 = absent; 1= present
*Forma del disc	0 = còncav; 1 = pla; 2 = convex
25 Color del disc	0 = groc glauc; 1 = groc; 2 = taronja ocraci; 3 = taronja; 4 = taronja escarlat, "terra cuita"; 5 = taronja brunenc; 6 = salmó; 7 = vermell; 8 = vermell obscur, granatós
*Persistència del marge en apotecis madurs	0 = no persistent; 1 = persistent
26 Alçada del marge per sobre del disc en els apotecis madurs	0= no prominent; 1= prominent
26 Textura del marge en els apotecis madurs	0 = llisa; 1 = granulosa, rugosa; 2 = lleugerament crenulada
28 Alçada màxima de l'himeni	0 = himeni estret; 1 = himeni gruixut

Taula 5.3. Continuació

	Caràcters	Estats
29	Gruix màxim del parateci	0 = estret; 1 = ample
	*Tipus d'hipotecí	0 = para-escleroplectenquimàtic; 1 = escleroplectenquimàtic-tipus A; 2 = escleroplectenquimàtic-tipus B; 3 = esclero-prosoplectenquimàtic
	*Disposició de les algues en l'apotecí	0 = més o menys contínues; 1= formant glomèruls distints
	*Disposició de les hifes sota la capa algal de l'apotecí	0 = laxes 1 = compactes
30	Longitud màxima de l'asc	0 = asc's curts; 1 = asc's mitjans; 2 = asc's llargs
31	Amplada màxima de l'asc	0 = asc's molt estrets; 1 = asc's estrets; 2 = asc's amples; 3 = asc's molt amples
32	Ramificació de les paràfisis	0 = poc ramificades; 1 = molt ramificades (més de tres ramificacions)
	*Gruix de l'àpex de les paràfisis	µm
	*Número de cèl·lules engruixides	0 = cap cèl·lula; 1 = una cèl·lula; 2 = dues o més cèl·lules (moniliformes)
33	Longitud esporal	0 = ascòspores curtes; 1 = ascòspores llargues
34	Amplada esporal	0 = ascòspores molt estretes; 1 = ascòspores estretes; 2 = ascòspores amples; 3 = ascòspores molt amples
35	Engruiximent equatorial ("septe")	0 = engruiximent estret; 1 = engruiximent ample
36	Forma de les ascòspores (relació longitud/amplada, L/A)	0= ascòspores amplament el·lipsoïdals; 1= ascòspores llargament el·lipsoïdals
37	Relació longitud esporal/engruiximent equatorial ("septe"), (L/Sept)	0 = engruiximent equatorial que representa aproximadament 1/3 de la longitud esporal; 1 = engruiximent equatorial que representa aproximadament 1/4 de la longitud esporal; 2 = engruiximent equatorial que representa aproximadament 1/5 de la longitud esporal; 3 = engruiximent equatorial pràcticament inexistent que representa aproximadament 1/19 de la longitud esporal
38	Tipus de substrat	0 = roca carbonatada; 1 = roca no carbonatada; 2 = roca volcànica; 3 = molsa
	*Dimensions dels picnidis	µm
	*Distribució biogeogràfica	0 = mediterrània/submediterrània; 1 = montana; 2 = subalpina/alpina/boreal

5.1.2.3. CONVERSIÓ DELS CARÀCTERS CONTINUS A DISCRETS PER A L'ANÀLISI FILOGENÈTICA

El grup de *Caloplaca saxicola* està format per un seguit de tàxons amb morfologia semblant, fet que fa difícil trobar un nombre suficient de caràcters discrets i obvis. Per aquest motiu, en l'anàlisi s'han inclòs diferents caràcters continus que hem considerat importants a l'hora de descriure les espècies i que són força discriminatoris.

Un dels procediments estadístics habituals per convertir els caràcters continus en discrets ha estat el desenvolupat per Lutzoni & Brodo (1995). Després de realitzar una anàlisi de la variança (ANOVA) per a cada caràcter considerat i de conservar només aquells en els quals la hipòtesi nul·la és rebutjada (H_0 = que la mitjana de cada grup sigui igual), s'aplica sobre el caràcter corresponent una comparació de mitjanes dos a dos, utilitzant el test de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*). El test de Tukey és un mètode estadístic *post hoc* que normalment s'aplica per tal de corregir errors de tipus I (l'error comès en trobar significació allà on no n'hi ha), després de fer una comparació inicial de mitjanes del tipus ANOVA. Aquest mètode s'utilitza ja que la probabilitat de trobar una diferència significativa només per atzar s'incrementa ràpidament amb el número de comparacions dos a dos. A diferència d'una simple ANOVA, el test de Tukey corregeix pel nombre de mitjanes en consideració i és, per tant, un mètode estadístic més estricte, que dona una confiança addicional als valors P resultants. Així, en resulta una matriu de valors de Tukey HSD per cada caràcter, i aquesta matriu de probabilitats és aleshores emprada per determinar l'estat del caràcter per cada tàxon. Només les probabilitats inferiors o iguals a 0.01 o, segons McDonald *et al.* (2003), 0.05, són utilitzades per assignar un estat del caràcter a cada tàxon. Aleshores totes les restants probabilitats de la matriu són usades, començant per la més alta, per verificar l'assignació de l'estat del caràcter. Quan es troba una codificació conflictiva per dos tàxons, a aquell que presenta la probabilitat dos a dos més intermèdia (i.e. probabilitats ≤ 0.80 i ≥ 0.01) se li assignen dos estats del caràcter i es codifica com a estat incert (Maddison & Maddison 1992), o bé, com a estat polimòrfic (McDonald *et al.* 2003).

En el present estudi es va intentar aplicar la mateixa metodologia utilitzant el programa SAS System 8.2 (1999), però com les comparacions dos a dos de mitjanes es realitzaven entre tots els espècimens, les matrius de probabilitats de Tukey resultants per cada caràcter esdevenien de dimensions no factibles (60 x 60 espècimens). Per altra banda, el programa presentava la opció d'agrupar les mitjanes en funció dels nivells de significació (Tukey Grouping), però tenia la limitació de crear fins a un màxim de 24 grups de mitjanes superposades. Davant l'elevat nombre de comparacions en tots els caràcters se superava el lílindar de 24 grups i, per tant, aquesta opció també va haver d'ésser descartada. Per solucionar els problemes

exposats es va cercar un mètode alternatiu que permetés la conversió de caràcters continus en discrets sense que comportés limitacions en el nombre d'espècimens. Finalment, es va seleccionar el mètode de classificació *K-means*.

K-means (MacQueen 1967) és un algorisme de classificació no jeràrquic, polític i partitiu. Es tracta d'una tècnica d'anàlisi *cluster* que mira d'establir una partició de *K* grups o *clusters* sobre un conjunt d'objectes dels quals es disposa d'una informació multivariant. L'algorisme *K-means* es basa en la iteració dels següents passos:

- 1) Es calculen les posicions dels centroides (centres geomètrics) dels *K* clústers.
- 2) Per a cada objecte, es calcula la seva distància als *K* centroides.
- 3) Es reassigna cada objecte al *cluster* més proper.

La funció que minimitza en el procés de classificació és la suma total de quadrats dels errors (*Total error sum of squares, TESS*). La solució (partició) final depèn de la configuració dels *clusters* inicialment escollida, raó per la qual és freqüent realitzar diferents execucions de l'algorisme a partir de configuracions inicials aleatòries. El nombre de clústers a cercar (*K*) és un paràmetre del mètode que cal conèixer prèviament. Existeixen estadístics dissenyats per a determinar quin nombre de grups expressen les dades de manera més "natural". Un dels més freqüents és l'estadístic *Pseudo-F* (Calinski & Harabasz 1974). *Pseudo-F* compara la dispersió entre els grups respecte la dispersió dins dels grups, de manera semblant a l'estadístic *F* de l'ANOVA. Com més homogenis siguin els grups internament i més diferenciats entre ells, major serà el valor de l'estadístic.

A partir de les matrius de mitjanes de cadascun dels caràcters s'ha aplicat el mètode amb una partició inicial de 2 *clusters* o grups i posteriorment s'han calculat les *Pseudo-F* fins a un màxim de *K* = 10. Els valors obtinguts s'han explorat gràficament seleccionant aquell nombre de *clusters* que presentava un mínim o punt estacionari (disminució del pendent) més clar. Els màxims de *pseudo-F* gairebé mai han aparegut. L'aplicació de *K-means* i el calcul de *pseudo-F* s'ha fet amb el mòdul d'anàlisi multivariant GINKGO del paquet de programes VEGANA (De Cáceres *et al.* 2003).

En la fig. 5.1 es mostren les corbes de perfil dels valors de la *pseudo-F* pels dotze caràcters continus inclosos en la matriu de dades.

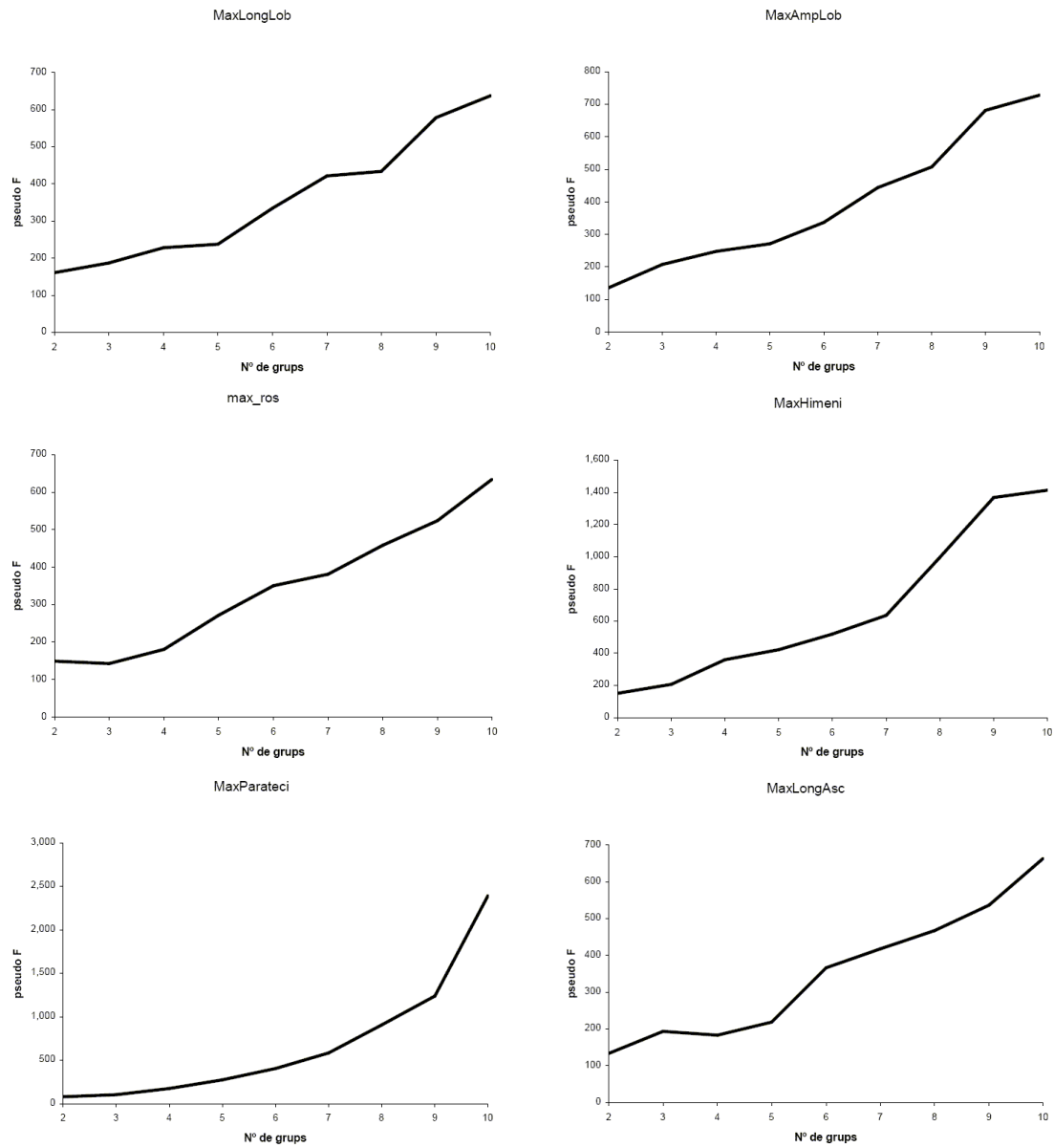


Figura 5.1 Conversió de caràcters continus en discrets. Corbes de perfil dels valors de la *Pseudo-F* pels dotze caràcters continus inclosos en la matriu de dades morfològiques. L'eix d'abscisses correspon al nombre de grups en ordre creixent. [MaxLongLob = Longitud màxima del lòbul, MaxAmpLob = Amplada màxima del lòbul, max_ros = Mida màxima de roseta, MaxHimeni = Alçada màxima de l'himeni, MaxParateci = Gruix màxim del parateci, MaxLongAsc = Longitud màxima de l'asc, MaxAmpAsc = Amplada màxima de l'asc, larg = Longitud esporal, sept = Engruiximent equatorial ("septe"), amp = Amplada esporal, l_a = Forma de les ascòspores (relació longitud/amplada), l_sept = Relació longitud esporal/engruiximent equatorial ("septe")].

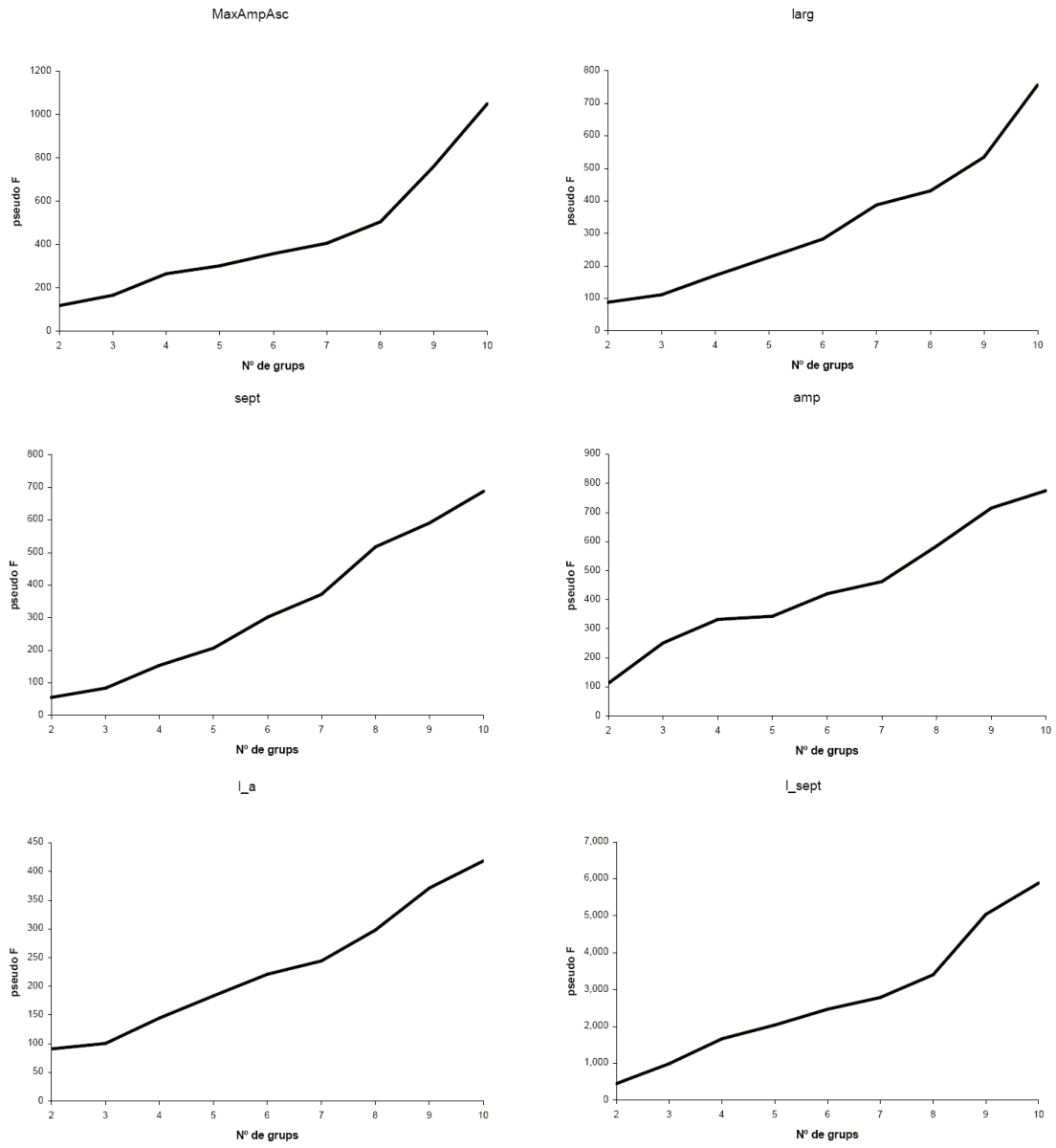


Figura 5.1 Continuació

5.1.2.4. PROBLEMES AMB ELS POLIMORFISMES I LES DADES ABSENTS (*MISSING DATA*)

Un determinat tàxon terminal pot ser monomòrfic, amb un sol estat de caràcter; polimòrfic, amb múltiples estats; incert; o bé, presentar una condició d'absència (*missing data*). En la nostra matriu de dades hem hagut d'incorporar diversos polimorfismes i alguns caràcters absents (*missing data*).

Nixon & Davis (1991) expressaven les seves objeccions als polimorfismes en referència a la codificació dels caràcters absents (*missing data*). El seu punt principal se centrava en si els polimorfismes han de ser codificats com a caràcters absents (*missing data*) o directament com a polimorfismes. El problema potencial sorgeix quan un tàxon terminal és polimòrfic per més d'un caràcter. Si el tàxon terminal es descomposés en parts components monomòrfiques, es podria veure que les distribucions dels estats dels dos caràcters interaccionen de manera que algunes combinacions dels estats no són parsimonioses per l'antecessor comú més recent del tàxon terminal. Deixar el tàxon intacte, però polimòrfic, amaga els problemes i permet que els algorismes utilitzin aquestes combinacions malgrat no siguin parsimonioses. No obstant això, la dificultat en descomposar correctament obliga, en certes circumstàncies, a deixar els tàxons codificats com a polimòrfics. De fet, com afirmen Maddison & Maddison (2001), si assumim la manca d'informació precisa sobre els components monomòrfics, es dona una interpretació més parsimoniosa de l'evolució si deixem els tàxons terminals polimòrfics.

Una manera d'evitar aquesta restricció seria si el caràcter és codificat fent referència a l'espècie i no als individus (Mickey & Mitter 1981, Farris 1983). En emprar caràcters codificats per l'espècie, els algorismes poden permetre polimorfismes en els antecessors. En el nostre cas aquesta mesura no es pot aplicar ja que ens interessa testar la variabilitat individual i sovint el tàxon terminal ja és una espècie en si, cosa que fa que la recodificació no sigui factible. Malgrat tot, codificar tàxons polimòrfics com a tals és millor que codificar-los com a absents (*missing data*).

La codificació d'un tàxon com a dades absents (*missing data*) també s'ha de fer amb precaució. L'estat d'un caràcter pot ser que no estigui a l'abast perquè l'estat no es coneix o bé perquè el caràcter no es pot aplicar al tàxon. Quan el caràcter no es pot aplicar a un tàxon és millor codificar-lo com si tingués un estat extra "no present". La codificació absent (*missing data*) és millor restringir-la a aquelles circumstàncies en què se suposa que l'organisme té alguns dels estats del caràcter, però es desconeix a causa d'una informació incompleta, com s'ha donat en algun dels nostres exemplars (Maddison & Maddison 2001).

5.1.2.5. ANÀLISIS FILOGENÈTIQUES DE LES DADES MORFOLÒGIQUES

5.1.2.5.1. Recursos informàtics disponibles

Totes les anàlisis d'inferència filogenètica s'han executat utilitzant, segons els casos, dos ordinadors PC compatible, amb sistema operatiu Linux (processadors Intel Pentium 4), dos ordinadors iMAC (Mac OS E1-9.2.1) i un processador superescalar de memòria distribuïda Compaq Alpha Server CPQ HPC320 sistema Unix del Centre de Supercomputació de Catalunya (CESCA), que compta amb 8 nodes ES40 (4 EV68, 833 MHz, 64 KB/8 MB), 20 GB de memòria principal, 1128 GB en disc i un rendiment punta de 53,31 Gflops/s, interconnectats amb Memory Channel II de 800 MB/s.

5.1.2.5.2. Grups de dades

Les anàlisis filogenètiques de les dades morfològiques s'han realitzat únicament en una matriu de 60 espècimens. Aquesta matriu l'hem anomenada 60-Morf. (taula 5.2).

5.1.2.5.3. Programari i anàlisis de Màxima Parsimònia (MP)

Les anàlisis filogenètiques s'han realitzat per als 60 espècimens emprant el criteri d'optimització de màxima parsimònia (MP), implementat al programa PAUP*4.0b10 per a UNIX i Macintosh (Swofford 2002).

Tots els canvis entre estats dels caràcters s'han ponderat uniformement i no han estat ordenats (parsimònia de Fitch: qualsevol estat pot transformar-se en qualsevol dels restants amb el mateix increment en longitud i passos, essent aquests reversibles). Per acomodar simultàniament tàxons amb estats dels caràcters múltiples, resultat d'incerteses o polimorfismes, s'ha utilitzat la opció "variable" de PAUP*. Les posicions constants s'han eliminat de les anàlisis.

A causa de les dimensions de la matriu, les cerques que s'han dut a terme han estat heurístiques, ja que una cerca exhaustiva o de tipus *branch-and-bound* hauria estat poc viable pel que fa a requeriments de temps computacional.

L'estratègia de cerca filogenètica ha estat la següent: primer s'ha realitzat un cerca heurística exploratòria de 1000 repeticions amb addició aleatòria de tàxons, RAS (random-addition-sequences), en la qual s'ha comprovat que un gran nombre d'arbres igualment parsimoniosos omplien la memòria abans d'acabar la cerca. Per aquest motiu, per tal de millorar el poder de resolució i disminuir el temps d'anàlisi, s'ha realitzat posteriorment una altra cerca heurística ja definitiva, en dos passos. L'objectiu del primer pas era trobar la longitud dels arbres més parsimoniosos i s'ha dut a terme

amb 1000 RAS i guardant només un arbre per cada rèplica. En el segon pas l'objectiu era trobar tots els arbres igualment parsimoniosos. Aquest pas s'ha realitzat amb 10000 RAS i guardant tots els arbres només quan s'intercanviessin (*swapping*) en un arbre igual o més curt que el més curt trobat en el primer pas. Aquest procediment ha estat necessari a causa del gran nombre d'arbres igualment parsimoniosos resultat de la inclusió de diversos espècimens per la majoria de les espècies, fet que dificultava la resolució per a aquest grup de dades.

En tots dos passos s'han realitzat intercanvis de branca (*branch swapping*) de tipus TBR (*tree bisection-reconnection*), s'ha deixat la opció *Multrees* en efecte (PAUP* guarda tots els arbres mínims que troba durant l'intercanvi de branques) i s'han col·lapsat les branques amb longitud màxima igual a zero.

A part del nombre de passos, en les anàlisis s'han obtingut els valors dels Índexs de Consistència (IC) i de Retenció (IR).

La mesura de confiança o fiabilitat dels "clades" obtinguts, és a dir, el recolzament de les branques per part de les dades, ha estat estimada mitjançant l'anàlisi de *bootstrap* (BP) (Felsenstein 1985) amb cerques heurístiques completes, 10000 rèpliques de *bootstrap*, emprant quatre RAS per rèplica de *bootstrap* i guardant no més de 10 arbres per rèplica de *bootstrap*.

5.1.3. RESULTATS

5.1.3.1. LLISTAT DE CARÀCTERS MORFOLÒGICS

Com ja hem comentat, els valors dels caràcters mostrats en la matriu de dades morfològiques (vegeu taula 5.2) deriven directament de l'estudi dels espècimens emprats en aquest treball. La majoria dels caràcters inclosos en la matriu són utilitzats habitualment per a la determinació i descripció d'espècies del gènere *Caloplaca*, especialment en els tàxons lobulats. Pel fet que hi ha espècimens amb aspecte intermedi i que, en general, es coneix que la majoria d'espècies mostren una variació morfològica interpoblacional, la definició de caràcters i estats de caràcters ha estat, en alguns casos, problemàtica. Aquest ampli rang de variació morfològica trobat en les espècies ha requerit sovint l'ús de caràcters multiestat. Només 22 dels 38 caràcters han estat binaris. Els caràcters que es mostren a continuació han estat inclosos en la matriu de dades morfològiques:

Tal·lus

1. Forma de creixement: 0 = crustàcia-placodioide; 1 = foliosa; 2 = fruticosa-“nana”; 3 = esquamulosa.

Totes les espècies del grup de *C. saxicola*, a excepció de *C. schistidii*, presenten l'estat crustaci-placodioide.

2. Presència de rosetes: 0 = sense rosetes ben delimitades; 1 = amb rosetes ben delimitades; 2 = formant glomèruls.

Malgrat que la formació de glomèruls es pot suposar lligada a factors ambientals, molt probablement a l'abundància de matèria orgànica, es presenta com a un tret constant en els espècimens de *C. saxicola* s.str. i de forma molt esporàdica en exemplars d'altres espècies (p.e. *C. tegularis*). Clauzade & Roux (1985) l'utilitzaven per a diferenciar el que anomenen subespècie *obliterata*, i també Wetmore & Karnefelt (1998) descriuen un dels seus morfotipus de *C. saxicola* a partir de la formació d'aquests glomèruls.

3. Mida màxima de roseta: 0 = petita (grup 1, ≤ 11 mm, centroide = 6.08); 1 = gran (grup 2, > 11 mm, centroide = 16.29).

Les mides grans de rosetes les trobem a *C. biatorina*, *C. clauzadeana* i en alguns espècimens de *C. pusilla*, estat que les aproxima a la mida de *Xanthoria elegans* i *X. sorediata*.

4. Fixació al substrat: 0 = laxament fixat; 1 = fortament fixat.

S'ha codificat independentment de la presència o no de còrtex inferior. El tipus de fixació ha estat sovint utilitzat en la bibliografia per a distingir entre diferents espècies de tal·lus lobulat (Arup 1995b, Poelt & Hinteregger 1993, Wetmore & Karnefelt 1998). Poelt & Hinteregger (1993) diferencien *C. biatorina* per la fixació al substrat a través, únicament, d'una estreta banda longitudinal que recorre els lòbuls. Aquest tret no ha estat observat en els espècimens estudiats i, per tant, no s'ha tingut en consideració.

5. Color del tal·lus: 0 = groc glauc (240); 1 = groc (211-215, 226-230, 242-245); 2 = taronja ocraci (246-247); 3 = taronja (196-197); 4 = taronja escarlat, “terra cuita” (181-182); 5 = taronja brunenc (186-187, 191-193, 201-203); 6 = salmó (169-170, 174-175, 179-180, 183-185, 189-190, 194-195, 198-200, 204-205); 7 = vermell (151-153, 156-158, 166-168); 8 = vermell obscur, granatós (171-173).

Els números entre parèntesi després de cada color fan referència a la codificació de colors emprada. S'ha seguit el Code Universel des Couleurs (E. Séguy 1936).

Pel que fa a la coloració del tal·lus, s'ha observat tant variabilitat intraespecífica com en un mateix espècimen. Per aquest motiu, en cada color s'han agrupat diferents tonalitats, representades per la numeració, en un intent d'englobar el màxim d'aquesta variació. Els estats d'aquest caràcter s'han ordenat en certa manera, de la coloració més clara (grocs) a la més fosca (vermells). El salmó s'ha considerat una continuació del taronja, modificat per la presència de pruïna.

6. Pruïna en el còrtex superior: 0 = absent; 1 = present.

Aquest caràcter també es troba lligat a factors ambientals. Un mateix espècimen pot variar en funció de la disposició en el substrat i dels aports de carbonat càlcic que rebí, però, en general, s'observa una constància considerable en certes espècies.

7. Textura del còrtex superior: 0 = para-escleroplectenquimàtic; 1 = escleroplectenquimàtic-tipus A; 2 = escleroplectenquimàtic-tipus B; 3 = escleroprosopectenquimàtic.

La nomenclatura emprada en aquest caràcter s'explica en l'apartat de caràcters morfològics estudiats.

8. Pseudocifel·les: 0 = absent; 1 = present.

En algun tàxon, com *C. rouxii*, s'observa l'aprimament del còrtex en certs punts del tal·lus, el què produeix pseudocifel·les.

9. Còrtex inferior: 0 = absent; 1 = present.

La presència de còrtex inferior permet separar les tres espècies del gènere *Xanthoria*.

10. Rizines o hàpters en la cara inferior del tal·lus: 0 = absent; 1 = present.

Aquest caràcter també caracteritza les tres espècies de *Xanthoria*.

11. Arèoles: 0 = absent; 1 = present.

L'estat 0 es presenta únicament a *C. saxicola* s.str., *C. schistidii* i a les tres espècies de *Xanthoria*.

12. Forma de l'arèola: 0 = plana; 1 = convexa.

En alguns casos aquest caràcter presenta problemes d'assignació d'estat. Així, a *C. arnoldii* sensu Poelt, *C. biatorina*, *C. rouxii*, *C. nana* i *C. pusilla* es presenten espècimens amb arèoles planes i convexes alhora.

Lòbuls

13. Lòbul-hàbit I: 0 = decumbent, dorsiventral, prostrat; 1 = aixecat a l'apex, prominent, erecte.

L'estat 0 és present a totes les espècies del grup *C. saxicola*, exceptuant algun espècimen que per causa del substrat mostra un lleuger aixecament dels àpexs.

14. Lòbul-hàbit II: 0 = pla; 1 = convex; 2 = fortament convex, subcil·líndric.

A causa de la presència de formes intermèdies, aquest caràcter, a vegades, presenta algun problema d'assignació, sobretot entre els estats 0 i 1 (p.e. a *C. biatorina*, *C. pusilla*). Malgrat tot, en la majoria dels casos, s'observen estats prou delimitats com per no tenir problemes a l'hora de codificar. Com és el cas, per exemple, dels lòbuls fortament convexos que apareixen de forma constant a *C. saxicola* s.str. i *C. rouxii*.

15. Lòbul-hàbit III: 0 = no eixamplats a l'apex; 1 = eixamplats a l'apex.

Els lòbuls eixamplats a l'apex apareixen bàsicament a *C. biatorina* i *C. pusilla*, dos tàxons que es localitzen en el clade del grup B.

16. Lòbul-hàbit IV: 0 = no contigus, no superposats; 1 = contigus, superposats.

En diversos tàxons es presenta contigüitat, però no sempre arriben a superposar-se (p.e. *C. biatorina*).

17. Tipus de divisió dels lòbuls: 0 = simple 1 = ramificat/sublobulat 2 = molt ramificat (de dues a tres vegades).

En general, els lòbuls en els tàxons del grup de *C. saxicola* s.str. presenten cert grau de ramificació. L'excepció es troba a *C. saxicola* s.str. i *C. schistidii* que presenten lòbuls no ramificats.

18. Longitud màxima del lòbul: 0 = lòbuls curts (grup 1, centroide = 0.92); 1 = lòbuls llargs (grup 2, centroide = 2.61).

Aquest caràcter aproxima *C. decipiens*, *C. biatorina* i *C. ignea* amb *Xanthoria elegans* i *X. sorediata*.

19. Amplada màxima del lòbul: 0 = lòbuls estrets (grup 1, centroide = 0.54); 1 = lòbuls amples (grup 2, centroide = 0.92); 2 = lòbuls molt amples (grup 3, centroide = 1.31).

Les amplades més grans de lòbul es localitzen en el clade B i el grup extern.

20. Propàguls vegetatius: 0 = absent; 1 = present.

En aquest caràcter hem inclòs com a propàguls vegetatius tant soREDIS com isidis, sense fer-ne distinció.

Apotecis

21. Presència d'apotecis: 0 = absent (o molt rarament present); 1 = present (sempre present).

La presència d'apotecis a *C. decipiens* s'ha esmentat en la literatura (Egea 1984, Verseggy 1970, Nordin 1972, Poelt 1954, 1969, Purvis *et al.* 1992, Wade 1965, Wetmore & Kanrefelt 1998) recalcant sempre la seva raresa. En el nostre cas, tots els exemplars que hem estudiat, tant els inclosos en l'apartat de filogènia morfològica com els de l'apartat de taxonomia, no presenten mai fructificacions. Per aquest motiu s'ha considerat l'estat de caràcter 0 per a *C. decipiens*. El mateix cas s'ha donat a *Xanthoria candelaria* i *X. soREDIATA*. L'ocurrència esporàdica d'apotecis també es coneix a *X. candelaria* (Clauzade & Roux 1985, Lindblom 1997, Poelt & Petutschnig 1992a, 1992b, Purvis *et al.* 1992) i, encara que més rarament, a *X. soREDIATA* (Clauzade & Roux 1985, Giralt *et al.* 1993, Lindblom 1997, Poelt & Petutschnig 1992a), però els espècimens aquí considerats no han estat trobats mai fèrtils.

22. Tipus d'apotecí: 0 = pseudolecanorins; 1 = lecanorins; 2 = zeorins.

La majoria d'apotecis són de tipus pseudolecanorí o zeorí, encara que algunes vegades s'observen formes intermèdies on només és visible el marge tal·lí (lecanorins).

23. Localització dels apotecis: 0 = dispersos; 1 = agrupats; 2 = formant una massa aglomerada.

S'entén per massa aglomerada un conjunt d'apotecis que s'agrupen densament, poden arribar a perdre el contacte amb el tal·lus i donar un aspecte frutescent (de coixinet).

24. Pruïna en l'apotecí: 0 = absent; 1 = present.

S'aplica el mateix que pel caràcter 6.

25. Color del disc: 0 = groc glauc (240); 1 = groc (211-215, 226-230, 242-245); 2 = taronja ocraci (246-247); 3 = taronja (196-197); 4 = taronja escarlat, "terra cuita" (181-182); 5 = taronja brunenc (186-187, 191-193, 201-203); 6 = salmó (169-170, 174-175, 179-180, 183-185, 189-190, 194-195, 198-200, 204-205); 7 = vermell (151-153, 156-158, 166-168); 8 = vermell obscur, granatós (171-173).

De la mateixa manera que en el cas del tal·lus (caràcter no. 5), els números entre parèntesi després del color es refereixen a la codificació de colors emprada seguint el Code Universel des Couleurs (E. Séguy 1936).

26. Alçada del marge per sobre del disc en els apotecis madurs: 0= no prominent; 1= prominent.

A vegades s'observen formes intermèdies, però en alguns tàxons aquest caràcter és presenta de forma constant i ben delimitada amb un estat o altre (p.e. *C. arnoldii* sensu Poelt, *C. saxicola* s.str.).

27. Textura del marge en els apotecis madurs: 0 = llisa; 1 = granulosa, rugosa; 2 = lleugerament crenulada.

Les formes de marge llis es concentren en els espècimens que formen part del llinatge 1.

28. Alçada màxima de l'himeni: 0 = himeni estret (grup 1, centroide = 64.58); 1 = himeni gruixut (grup 2, centroide = 83.71).

Aquest caràcter separa les espècies del llinatge 1 i alguns espècimens de *C. arnoldii* sensu Poelt.

29. Gruix màxim del parateci: 0 = estret (grup 1, centroide = 70.32); 1 = ample (grup 2, centroide = 102.93).

Els màxims gruixos de parateci es donen en el llinatge 1, a excepció feta de l'espècimen de *C. clauzadeana*.

30. Longitud màxima de l'asc: 0 = ascs curts (grup 1, centroide = 51.28); 1 = ascs mitjans (grup 2, centroide = 60.92); 2 = ascs llargs (grup 3, centroide = 66.87).

Aquest caràcter separa els tàxons del llinatge 1, a excepció de *C. clauzadeana* i d'un dels exemplars de *C. arnoldii* s.str.

31. Amplada màxima de l'asc: 0 = ascs molt estrets (grup 1, centroide = 12.13); 1 = ascs estrets (grup 2, centroide = 14.52); 2 = ascs amples (grup 3, centroide = 16.38); 3 = ascs molt amples (grup 4, centroide = 18.34).

Les amplades més grans d'ascs les presenten *C. biatorina*, *C. saxicola* s.str., *C. pusilla*, *C. ignea* i *X. elegans*, essent *C. biatorina* la que concentra els valors extrems.

32. Ramificació de les paràfisis: 0 = poc ramificades; 1 = molt ramificades (més de tres ramificacions).

A l'hora de descriure les espècies del gènere *Caloplaca*, en general, s'ha tingut en compte el tipus de ramificació de les paràfisis (medial, apical), el grau d'anastomosi, l'eixamplament de l'última o últimes cèl·lules (paràfisis capitades o dilatades), etc. Però davant la impossibilitat d'establir límits clars en alguns d'aquests caràcters, i donada la gran variabilitat intraespecífica que només permetia descriure tendències, s'ha optat per discretitzar únicament el grau de ramificació, el qual pot ser codificat menys arbitràriament.

33. Longitud esporal: 0 = ascòspores curtes (grup 1, centroide = 10.41); 1 = ascòspores llargues (grup 2, centroide = 12.66).

Les longituds esporals més curtes es concentren en els espècimens del llinatge 1 i a *C. arnoldii* sensu Poelt, així com a *C. ignea* i *X. elegans*.

34. Amplada esporal: 0 = ascòspores molt estretes (grup 1, centroide = 4.73); 1 = ascòspores estretes (grup 2, centroide = 5.64); 2 = ascòspores amples (grup 3, centroide = 6.24); 3 = ascòspores molt amples (grup 4, centroide = 7.24).

Aquest caràcter separa principalment els tàxons del llinatge 1 de la resta de tàxons considerats.

35. Engruiximent equatorial ("septe"): 0 = engruiximent estret (grup 1, centroide = 2.74); 1 = engruiximent ample (grup 2, centroide = 3.53).

Caràcter constant per a la majoria dels tàxons, tot i que s'observa certa variabilitat intraespecífica en el cas de *C. saxicola* s.str.

36. Forma de les ascòspores (relació longitud/amplada, L/A): 0 = ascòspores amplament el·lipsoïdals (grup 1, centroide = 1.95); 1 = ascòspores llargament el·lipsoïdals (grup 2, centroide = 2.41).

Les formes llargament el·lipsoïdals es donen en majoritàriament a *C. arnoldii* s.str., *C. clauzadeana*, *C. saxicola* s.str., *C. rouxii* i *C. schistidii*.

37. Relació longitud esporal/engruiximent equatorial ("septe"), (L/Sept): 0 = engruiximent equatorial que representa aproximadament 1/3 de la longitud esporal (grup 1, centroide = 3.2); 1 = engruiximent equatorial que representa aproximadament 1/4 de la longitud esporal (grup 2, centroide = 3.83); 2 = engruiximent equatorial que representa aproximadament 1/5 de la longitud esporal (grup 3, centroide = 5.07); 3 = engruiximent equatorial pràcticament inexistent que representa aproximadament 1/19 de la longitud esporal, espores típicament septades (grup 4, centroide = 18.85).

Clauzade & Roux (1985) donen molta importància a aquest caràcter, fins al punt que les claus de determinació dels tàxons del grup de *C. saxicola* es basen per diferenciar-los en la relació L/Sept.

38. Tipus de substrat: 0 = roca carbonatada; 1 = roca no carbonatada; 2 = roca volcànica; 3 = molsa.

Taula 5.2. Matriu de dades per als caràcters morfològics. La informació d'herbari dels tàxons es troba llistada en la taula 5.1 . Els caràcters i estats dels caràcters es troben descrits en la secció de Material i Mètodes. ? = estat del caràcter desconegut o no aplicable. En alguns tàxons, per a determinats caràcters que eren altament polimòrfics, se'ls han assignat estats de caràcter múltiples i s'han analitzat com a: A = 0&1; B = 0&2; C = 1&2; D = 1&5; E = 1&6; F = 2&3; G = 3&4; H = 3&5, I = 4&5, J = 4&7; K = 5&7; L = 6&7; M = 7&8; N = 0&1&2; O = 0&1&3; P = 1&2&3; Q = 1&3&6; R = 2&3&5; S = 4&7&8; T = 2&3&4&5; U = 3&4&5&6; V = 1&3&4&5&6. Uns pocs caràcters han estat codificats com a incerts per a determinats tàxons i analitzats com a : W = 0/1. Aquests polimorfismes i incerteses s'han analitzat de manera diferent utilitzant la opció "variable" a PAUP*.

OTU	1									2									3																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8											
<i>Cteularis</i> 376	0	A	0	1	R	0	2	0	0	0	1	0	0	0	A	1	0	1	0	1	0	A	0	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1		
<i>Cteularis</i> 277	0	A	0	1	R	0	2	0	0	0	1	0	0	0	A	1	0	1	0	1	0	1	A	0	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	
<i>Carnoldii</i> s.tr.285	0	A	0	1	U	1	C	0	0	0	1	1	0	1	A	1	2	0	1	0	1	0	1	1	H	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	
<i>Carnoldii</i> s.tr.28T	0	A	0	1	U	1	C	0	0	0	1	1	0	1	A	1	2	0	0	0	1	0	1	1	H	A	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	
<i>Carnoldii</i> s.tr.143	0	A	0	1	U	0	C	0	0	0	1	1	0	1	A	1	2	0	0	0	1	0	1	0	H	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Carnoldii</i> s.tr.13716	0	A	0	1	U	1	C	0	0	0	1	1	0	1	A	A	2	0	1	0	1	0	1	1	H	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	
<i>Carnoldii</i> s.tr.13717	0	A	0	1	U	1	C	0	0	0	1	1	0	1	A	A	2	0	0	0	1	0	1	1	H	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cteularis</i> 306	0	N	0	A	1	A	C	0	0	0	1	1	A	1	1	1	1	0	0	0	1	1	C	0	F	A	A	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
<i>Cteularis</i> 349	0	N	0	1	U	1	C	0	0	0	1	1	0	1	A	1	2	0	0	0	1	0	C	1	H	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	W	
<i>Cteularis</i> 365	0	N	0	1	Q	1	2	0	0	0	1	1	0	1	A	1	1	0	0	0	1	A	1	1	3	A	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	W	
<i>Cteularis</i> 372	0	A	0	1	D	0	2	0	0	0	1	0	0	0	1	A	1	0	0	0	1	0	1	0	H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
<i>Cteularis</i> 299	0	A	0	1	5	0	2	0	0	0	1	0	0	0	A	1	0	0	0	0	1	0	A	0	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
<i>Cteularis</i> 420	0	A	0	1	5	0	2	0	0	0	1	0	0	0	A	1	0	0	0	0	1	0	A	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Cclauzadeana</i> 21562	0	A	1	1	6	1	2	0	0	0	1	1	0	C	0	A	1	0	1	0	1	1	N	1	1	5	A	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
<i>Cteularis</i> 383	0	A	0	1	A	A	2	0	0	0	1	0	0	A	1	A	1	0	0	0	1	0	A	A	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Cteularis</i> 276	0	A	0	A	A	0	2	0	0	0	1	0	A	A	1	A	2	0	0	0	1	1	A	0	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
<i>Cnana</i> 13717b	0	1	0	1	1	1	C	0	0	0	1	A	0	A	A	1	1	0	0	0	1	0	A	1	P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cteularis</i> 357	0	N	0	A	C	0	2	0	0	0	1	1	A	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	3	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>Carnoldii</i> s.tr.464	0	A	0	1	V	A	C	0	0	0	1	1	0	1	A	1	2	0	0	0	1	0	1	A	H	A	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	W	
<i>Carnoldii</i> s.Poelt370	0	1	0	1	4	A	1	0	0	0	1	A	0	1	A	1	2	0	0	0	1	0	A	A	5	0	A	0	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	
<i>Carnoldii</i> s.Poelt293	0	1	0	1	4	A	1	0	0	0	1	A	0	1	A	1	2	0	0	0	1	0	A	A	5	0	A	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
<i>Carnoldii</i> s.Poelt301	0	1	0	1	4	0	1	0	0	0	1	A	0	1	A	1	2	0	1	0	1	0	A	0	5	0	A	1	0	1	2	0	1	2	1	0	0	0	
<i>Carnoldii</i> s.Poelt310	0	1	0	1	4	0	1	0	0	0	1	A	0	1	A	1	2	0	0	0	1	0	A	0	5	0	A	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	
<i>Carnoldii</i> s.Poelt291	0	1	0	1	4	0	1	0	0	0	1	A	0	1	A	1	2	0	0	0	1	0	A	0	5	0	A	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
<i>Carnoldii</i> s.Poelt304	0	1	0	1	4	0	1	0	0	0	1	A	0	1	A	1	2	0	0	0	1	0	A	0	5	0	A	1	0	1	2	0	0	1	1	0	0	0	
<i>Csaxicola</i> s.tr.312	0	2	0	1	C	0	P	0	0	0	0	?	0	2	0	1	A	0	2	0	1	N	2	0	F	1	1	1	1	2	2	0	1	1	0	1	2	0	
<i>Csaxicola</i> s.tr.342	0	2	0	1	C	0	P	0	0	0	0	?	0	2	0	1	A	0	1	0	1	1	N	2	0	F	1	1	1	1	2	2	0	1	1	0	1	2	0
<i>Csaxicola</i> s.tr.340	0	2	0	1	C	0	P	0	0	0	0	?	0	2	0	1	A	0	1	0	1	1	N	2	0	F	1	1	1	1	2	2	0	1	1	1	1	1	0
<i>Csaxicola</i> s.tr.318	0	2	0	1	P	0	P	0	0	0	0	?	0	2	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0	T	1	1	1	0	2	2	0	1	1	1	1	1	W	
<i>Csaxicola</i> s.tr.322	0	2	0	1	C	0	P	0	0	0	0	?	0	2	0	1	0	0	0	0	1	1	N	2	0	T	1	1	1	1	1	2	0	1	1	0	1	2	
<i>Csaxicola</i> s.tr.339	0	2	0	1	P	0	P	0	0	0	0	?	0	2	0	1	0	0	0	0	1	1	N	2	0	T	1	1	1	0	2	0	0	1	0	0	1	1	W
<i>Csaxicola</i> s.tr.323	0	2	0	1	C	0	P	0	0	0	A	1	0	2	0	1	0	0	0	0	1	1	N	2	A	F	1	1	1	0	1	2	0	1	1	1	1	1	0

OTU	1									2									3																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8												
<i>Csaxicola s.tr.329</i>	0	2	0	1	P	0	P	0	0	0	0	?	0	2	0	1	0	0	1	0	1	N	2	0	T	1	1	1	1	2	2	0	1	2	1	0	1	0	1	0
<i>Csaxicola s.tr.334</i>	0	B	0	1	C	A	P	0	0	0	0	?	0	2	0	1	A	0	1	0	1	A	N	A	F	1	A	1	0	1	2	0	1	1	1	0	1	0	1	0
<i>Csaxicola s.tr.338</i>	0	2	0	1	P	A	1	0	0	0	0	?	0	2	0	1	A	0	0	0	1	0	2	A	T	1	A	1	0	1	2	0	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>Crouxii</i> 273	0	1	0	1	J	0	3	1	0	0	1	A	0	2	A	1	A	0	0	0	1	N	1	0	M	A	N	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
<i>Crouxii</i> 390	0	1	0	1	4	0	3	1	0	0	1	A	0	2	0	1	A	0	0	0	1	2	1	0	M	A	N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
<i>Crouxii</i> 298	0	1	0	1	4	0	3	1	0	0	1	A	0	2	A	1	A	0	1	0	1	2	1	0	M	A	N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
<i>Cpusilla</i> 373	0	1	1	1	6	1	C	0	0	0	1	A	0	A	A	1	C	0	1	0	1	B	1	1	K	A	A	1	0	1	2	0	1	2	1	0	0	0	0	0
<i>Cpusilla</i> 284b	0	0	0	1	L	1	C	0	0	0	1	A	0	A	1	1	C	0	0	0	1	B	1	1	K	A	A	1	0	1	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0
<i>Cpusilla</i> 13696	0	0	1	1	6	1	C	0	0	0	1	A	0	A	1	1	C	0	2	0	1	B	1	1	K	A	A	1	1	1	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0
<i>Cpusilla</i> 13713	0	A	1	1	6	1	C	0	0	0	1	A	0	A	1	1	C	0	1	0	1	B	1	1	K	A	A	1	0	1	2	0	1	2	1	0	0	0	0	0
<i>Cpusilla</i> 144	0	0	1	1	6	1	C	0	0	0	1	A	0	A	1	1	C	0	2	0	1	B	1	1	K	A	A	1	0	1	3	0	1	2	1	0	0	0	0	0
<i>Cpusilla</i> 13697	0	0	0	1	6	1	C	0	0	0	1	A	0	A	1	1	C	0	2	0	1	B	1	1	K	A	A	0	0	1	2	0	1	1	1	0	1	0	1	0
<i>Cdecipiens</i> 342b	0	A	1	A	E	1	3	0	0	0	A	1	0	C	1	1	C	1	2	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Cdecipiens</i> 13692	0	A	1	A	6	1	3	0	0	0	A	1	0	C	1	1	C	1	2	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Cschistidii</i> 245	3	0	1	W	1	0	2	0	0	0	0	?	0	0	W	0	0	0	1	0	1	2	0	0	3	0	0	1	1	2	3	0	1	1	0	1	3	3	3	3
<i>Cbiatorina</i> 13685	0	1	1	1	G	0	F	0	0	0	1	A	0	A	1	A	C	1	2	0	1	2	A	0	S	A	B	1	1	2	2	0	1	3	1	0	2	0	2	0
<i>Cbiatorina</i> 267	0	1	1	1	G	0	C	0	0	0	1	A	0	A	1	A	C	1	1	0	1	B	A	0	S	A	B	1	0	2	3	0	1	3	0	0	2	0	2	0
<i>Cbiatorina</i> 13689	0	1	1	1	G	0	C	0	0	0	1	A	0	A	1	A	C	1	1	0	1	B	A	0	J	A	0	1	0	2	3	0	1	3	0	0	2	0	2	0
<i>Cbiatorina</i> 364	0	A	1	1	G	0	C	0	0	0	1	A	0	A	1	A	C	1	1	0	1	B	A	0	J	A	B	1	0	2	3	0	1	3	0	0	2	0	2	0
<i>Cbiatorina</i> 9608	0	1	1	1	G	0	C	0	0	0	1	A	0	A	1	A	C	1	1	0	1	B	A	0	S	A	B	1	0	2	2	0	1	3	0	0	2	1	1	0
<i>Cbiatorina</i> 321	0	1	1	1	G	0	C	0	0	0	1	A	0	A	1	A	C	1	2	0	1	B	A	0	S	A	B	1	0	2	3	0	1	3	0	0	1	0	1	0
<i>Cbiatorina</i> 313	0	1	1	1	G	0	C	0	0	0	1	A	0	A	1	A	C	1	2	0	1	2	A	0	S	A	B	1	0	2	3	0	1	3	0	0	2	0	2	0
<i>Cbiatorina</i> 363	0	1	1	1	C	1	C	0	0	0	1	A	0	A	1	A	C	1	2	0	1	B	A	1	J	A	N	1	0	2	3	0	1	3	0	0	2	0	2	0
<i>Cbiatorina</i> 406	0	A	1	1	G	0	C	0	0	0	1	1	0	A	1	A	C	1	1	0	1	B	A	0	J	A	B	1	0	2	3	0	1	3	0	0	2	1	1	0
<i>Cignea</i> 360	0	0	1	1	G	0	0	0	0	0	A	1	0	0	A	A	1	1	1	0	1	2	A	0	M	0	0	1	0	1	2	0	0	1	0	0	1	2	1	2
<i>Xcandelaria</i> 8444	2	0	1	0	O	0	P	0	1	1	0	?	1	0	W	0	2	0	1	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>Xelegans</i> 192	1	1	1	0	3	0	3	1	1	1	0	?	1	2	0	0	2	1	2	0	1	A	C	0	I	A	0	1	0	1	2	0	0	2	1	0	1	0	1	0
<i>Xsorediata</i> 367	1	1	1	0	O	0	F	0	1	1	0	?	1	0	W	0	2	1	2	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?

5.1.3.2. ANÀLISIS FILOGENÈTIQUES DE LES DADES MORFOLÒGIQUES

5.1.3.2.1. Resolució i recolzament del criteri d'optimització

Els 38 caràcters morfològics que s'han emprat en l'anàlisi MP1 han resultat parsimoniosament informatius. La cerca heurística en aquest grup de dades ha generat 71 arbres igualment més parsimoniosos, de 618 passos, que s'han resumit en un arbre de consens estricte (*strict consensus*) mostrat en la fig. 5.2. El valor de l'Índex de Consistència (IC) ha estat de 0,741 i el de l'Índex de Retenció (IR) de 0,669.

La topologia generada per aquesta anàlisi morfològica presenta un gran nombre de politomies. Les relacions entre espècies han quedat majoritàriament sense resoldre, probablement a causa de la manca de suficients caràcters morfològics, o bé, per conflicte entre aquests. No es disposa, per tant, de prou informació filogenètica per a proporcionar delimitacions robustes en el grup intern (*ingroup*) ni tampoc en relació al grup extern (*outgroup*).

A causa del poc poder de resolució de la morfologia per a aquesta selecció de 60 OTUs, probablement per l'esmentada manca de suficients caràcters, els valors de *bootstrap* per sobre del 50% són rars (només en 8 internodes tenim un valor de *bootstrap* BP > 50 %) mentre que els superiors o iguals al 70% queden restringits únicament a quatre internodes (fig. 5.2).

5.1.3.2.2. Relacions filogenètiques

Basant-nos només en la morfologia, el grup de *C. saxicola* no el podem considerar monofilètic. Malgrat tot, això es deu exclusivament a la ubicació en el grup intern de *C. ignea*, que es troba a la base del grup format per *C. schistidii* i *C. biatorina*. La relació establerta entre aquestes tres espècies, però, no presenta cap tipus de recolzament. Aquest grup, al seu torn, ocupa una posició basal respecte la resta de tàxons del grup de *C. saxicola*; una relació que novament es mostra sense recolzament. En el següent internode després de la divergència dels dos espècimens de *C. decipiens*, que es presenten com a una entitat monofilètica amb un dels pocs recolzaments significatius de l'arbre (valor de *bootstrap* BP = 86%), apareix un clade pràcticament constituït per politomies on només destaquen un grup monofilètic format per de *C. saxicola* s.str. i *C. rouxii* (però sense significació estadística) i un altre grup que incorpora espècimens de diversos tàxons (*C. arnoldii* s.str., *C. nana*, *C. tegularis*) relacionats de forma parafilètica i, en general, sense confiança. Els espècimens que conformen el llinatge de *C. saxicola* s.str. presenten un recolzament baix (BP = 58%), mentre que *C. rouxii* es mostra ben recolzada (BP = 98%). A nivell intraespecífic, els

diferents espècimens de *C. saxicola* es relacionen de forma incerta sense recolzament.

Pel que fa al grup extern, a part de *C. ignea*, les tres espècies de *Xanthoria* s'arrelen al grup *C. saxicola* amb un recolzament significatiu BP = 83%. *X. elegans* és l'espècie més propera, amb un valor de bootstrap de BP = 56%.

D'aquests resultats es pot concloure que, a partir només de l'anàlisi morfològica aïllada, la posició filogenètica i les relacions entre els membres del grup *C. saxicola* romanen força incertes.

En fer la comparació d'aquesta topologia amb les obtingudes en les anàlisis MP i ML de les dades d'ITS s'observen coincidències en la delimitació de certes espècies emprant la monofília com a criteri d'agrupació (p.e. *C. saxicola* s.str., *C. rouxii*, *C. biatorina*). Pel que fa a les principals divergències, aquestes es troben en la relació germana entre *C. biatorina* i *C. schistidii*, la posició basal d'aquestes dues espècies respecte la resta d'espècies del grup, la posició de *C. decipiens* i, evidentment, l'arrelament del grup intern.

5.2. ANÀLISI FILOGENÈTICA MOLECULAR

5.2.1. INTRODUCCIÓ

Grube & Kroken (2000) afirmen que els complexos d'espècies (*species complex*) que presenten variabilitat morfològica són excel·lents models per a fer estudis moleculars amb l'objectiu de delimitar les espècies i esbrinar, així, com els caràcters morfològics es distribueixen en i entre les espècies. Aquests estudis moleculars, doncs, poden servir per avaluar classificacions anteriors i proporcionar si és necessari delimitacions més acurades de les espècies.

En general, les dades moleculars, juntament amb l'evidència morfològica i la distribució biogeogràfica i els microhàbitats, han permès millorar el coneixement de l'evolució al nivell específic en líquens. Aquests estudis integradors ajuden a refinar els conceptes d'espècie o de complex d'espècie, i aprofundir en la biologia i adaptació ecològica de la simbiosi líquènica.

Per aquest motiu, després de fer un estudi detallat de la morfologia dels tàxons del grup de *C. saxicola*, es va decidir realitzar-ne la filogènia molecular i examinar quines de les morfoespècies que havíem reconegut prèviament es corresponien amb espècies filogenètiques.

Selecció del marcador molecular.

El DNA més freqüentment utilitzat en filogènia de fongs i, per extensió, de líquens ha estat el DNA ribosòmic del nucli (nrDNA). Els paquets o *clusters* de gens ribosòmics de fongs s'organitzen en aproximadament 200 repeticions en tàndem (*tandem repeats*) (Butler & Metzenberg 1989). Aquestes regions rDNA permeten fer comparacions filogenètiques a molt nivells taxonòmics (Bruns *et al.* 1991). En els *repeats* de rDNA hi ha tres gens codificadors: el gen de la subunitat petita (18S), el gen de la subunitat gran (28S) i el gen 5.8S; i dos espaiadors interns (ITS1 i ITS2), que es transcriuen conjuntament com una sola unitat. Els rRNAs codificats pels gens 18S, 5.8S i 28S esdevenen parts estructurals dels ribosomes i són essencials per a la síntesi proteica. En general, aquests gens es troben molt més conservats que no pas els ITS, raó per la qual s'han emprat en filogènies de gran escala. En canvi, els espaiadors ITS varien més lliurement ja que els seus trànscrips són escapçats del rRNA i descartats. Les regions ITS s'han considerat útils per a fer comparacions taxonòmiques de gèneres propers i espècies estretament relacionades. Existeix

encara un tercer espaiador, l'espaiador intergènic o IGS, que no es transcriu, roman entre parells de "repeats" i és encara més variable que l'ITS.

La facilitat pel disseny d'encebadors de les regions rRNA també a portat al seu ús majoritari. A més, Berbee & Taylor (2001) apunten a favor de les regions rRNA que els arbres de gens ribosomals i els d'espècies tenen una gran probabilitat de coincidir, almenys en el cas d'espècies allunyades.

En general, les regions del nrDNA (SSU, LSU) que evolucionen més lentament s'han emprat en estudis filogenètics de grans categories taxonòmiques (Gargas *et al.* 1995, Lutzoni *et al.* 2001, Miadlikowska & Lutzoni 2004, Persoh *et al.* 2004, Reeb *et al.* 2004), però també s'han utilitzat per a resoldre la posició d'algunes espècies no fructificades, de tàxons amb emplaçament taxonòmic incert i en la revisió de grans gèneres (Arup & Grube 1999, Miadlikowska & Lutzoni 2000, Platt & Spatafora 1999, Stenroos & DePriest 1998). Darrerament, també s'han realitzat alguns estudis a gran escala que combinen les subunitats nuclears amb les subunitats mitocondrials del rDNA (Lumbsch *et al.* 2004, Lumbsch *et al.* 2005, Wicklund & Wedin 2003), i també amb d'altres gens com l'RPB2 (p.e. Reeb *et al.* 2004).

Les regions que evolucionen més ràpidament, com l'ITS i els introns SSU, s'han utilitzat per tal d'estudiar les relacions a nivells taxonòmics més baixos. Bridge & Arora (1998) suggereixen per a la delimitació d'espècies, a més de l'ITS, algunes parts de SSU o LSU, així com de les regions IGS. No obstant això, rarament s'ha observat una variació significativa a LSU i SSU entre espècies de gèneres propers (p.e. Myllys *et al.* 1998) i aquesta s'ha trobat només limitada a unes poques regions hipervariables. En general, aquestes regions són massa constants en un gènere (Grube & Kroken 2000). Contràriament, l'IGS sembla que ha evolucionat tan ràpidament, amb el guany i pèrdua de repeticions en tàndem, que ha estat difícil dissenyar encebadors que amplifiquin productes de PCR únics i, poder així, establir l'homologia entre les unitats de repetició amplificades (Cubero & Crespo 1998).

Així, l'ITS ha resultat ser una font valuosa de caràcters útils per a delimitar gèneres de líquens i per a determinar-ne la filogènia a nivell infragenèric (p.e. Arup & Grube 1998, 1999, 2000, Cubero *et al.* 2004, Ivanova & Hafellner 2002, Lutzoni 1997, Martín *et al.* 2003, McDonald 2003, Molina *et al.* 2002, Ohmura 2002, Printzen & Lumbsch 2000, Thell *et al.* 1998, Tibell 2001a, 2001c) i, fins i tot, per a resoldre problemes en famílies, com ara les *Roccellaceae* (Myllys *et al.* 1999a), *Parmeliaceae* (Crespo & Cubero 1998, Mattsson & Wedin 1998), *Physciaceae* (Grube & Arup 2001, Lohtander *et al.* 2000), *Lobariaceae* (Thomas *et al.* 2002), *Pannariaceae* (Ekman & Jorgensen 2002), *Teloschistaceae* (Gaya *et al.* 2003). Però, majoritàriament, la variació de l'ITS s'ha emprat per delimitar espècies. Les diferències entre seqüències d'ITS s'han utilitzat com a recolzament per a la descripció d'espècies noves (Goffinet & Miadlikowska 1999, McCune *et al.* 2002, Printzen *et al.* 2001), o en la separació

d'espècies estretament relacionades (Franc & Kärnefelt 1998, Groner & LaGreca 1997, Martín *et al.* 2000, Niu & Wei 1993, Tibell 2001b). A més, en certs casos, s'ha detectat la variabilitat intraespecífica també amb l'ús d'aquesta regió (Dyer & Murtagh 2001, Lohtander *et al.* 1998a, 1998b, Murtagh *et al.* 2002, Vinuesa *et al.* 2001). Malgrat tot, la variació d'ITS no sempre resol clarament espècies morfològiques (Ivanova *et al.* 1999, Thell & Miao 1999). El problema és la manca de reciprocitat; a vegades, les dades de l'ITS o qualsevol altre locus aïllat són suficients per recolzar una hipòtesi filogenètica, però són insuficients per rebutjar-la.

Per aquest motiu, darrerament han aparegut diversos treballs a diferents nivells taxonòmics on l'ITS es combina amb la subunitat gran o petita, tant del rDNA nuclear com del mitocondrial, o amb d'altres gens, per exemple el de la β -tubulina (Ihlen & Ekman 2002, Kasalicky *et al.* 2000, Lohtander *et al.* 2002, Mialikowska *et al.* 2002, Molina *et al.* 2004, Myllys *et al.* 2001, Ott *et al.* 2004, Wedin *et al.* 1999).

En referència als complexos i grups d'espècies, la regió ITS ha demostrat ser útil, tant sola com combinada amb algun altre gen, per a provar la circumscripció de les corresponents espècies (Grube *et al.* 2004, Heidmarsson 2003, La Greca 1999, Miadlikowska *et al.* 2003, Stocker-Wörgötter *et al.* 2004, Thell *et al.* 2000).

Com antecedents d'estudis filogenètics moleculars del grup de *Caloplaca saxicola* podem remarcar que no es disposava fins ara de cap treball previ de filogènia molecular en el grup. De fet, el nostre estudi constitueix la segona aproximació a nivell molecular que es realitza en un complex d'espècies del gènere *Caloplaca*. La primera ha estat la de Muggia *et al.* (2004) i es refereix als tàxons endolítics de la secció *Pyrenodesmia*, un estudi per al qual s'ha emprat també la regió ITS.

La tria del marcador molecular ha estat relativament senzilla. Donada l'abundància de treballs que han demostrat la utilitat de la regió ITS, sobretot a nivell infragenèric, hem considerat adient iniciar l'estudi dels tàxons lobulats del gènere *Caloplaca* utilitzant aquest marcador molecular.

5.2.2. MATERIAL I MÈTODES

5.2.2.1. MOSTREIG TAXONÒMIC I TRIA DEL GRUP EXTERN

Per a l'estudi molecular s'han emprat un total de 62 espècimens del grup de *C. saxicola* que representen 14 tàxons reconeguts o possibles. Per tal d'incloure el màxim de diversitat en el nostre mostreig, per a cada morfotipus s'ha mirat de seqüenciar un mínim de dos exemplars i s'ha intentat incorporar també espècimens procedents de poblacions el més distants possibles. La majoria de seqüències han estat generades en el decurs d'aquest estudi, però algunes han estat recuperades del GenBank

[*C. "saxicola"* AF353951, *C. "arnoldii"* AF353952, *C. biatorina* AF353953] (Arup & Grube 1999).

En el cas de *Fulgensia schistidii* (= *Caloplaca schistidii*), en un estudi previ (Gaya *et al.* 2003) ja es posava de manifest que la seva posició filogenètica era molt propera a la del grup de *C. saxicola*, però no arribava a quedar del tot resolta. En l'anàlisi actual hem decidit incloure 3 espècimens d'aquesta espècie, per tal d'aclarir-ne la situació. Una de les seqüències ha estat generada durant aquest treball i les altres dues s'han aconseguit del GenBank [AF279881, AF279882] (Kasalicky *et al.* 2000).

També s'ha obtingut del GenBank una seqüència inclosa amb el nom de *Xanthoria elegans*, procedent de l'Antàrtida [AF278753] (Dyer & Murtagh 2001), de la qual dubtàvem de la seva correcta determinació. Els autors esmentats ja havien suggerit la presència d'un problema taxonòmic subjacent davant la gran divergència que obtenien entre seqüències de la regió ITS de diversos espècimens de *X. elegans*. Gaya *et al.* (2003) ja van demostrar que l'esmentada seqüència pertanyia al grup de *C. saxicola* i en aquest treball hem volgut assegurar-ne la correcta posició.

La tria del grup extern s'ha realitzat amb la comparació del nostre alineament de seqüències del grup de *C. saxicola* amb les seqüències de diverses espècies dels gèneres *Caloplaca* i *Xanthoria* i, també, tenint en compte les relacions filogenètiques establertes en arbres més inclusius generats al llarg d'aquest treball, tant en l'arbre general de la família *Teloschistaceae* (capítol 6) com en l'inclòs en l'estudi de Gaya *et al.* (2003). D'aquesta manera, hem seleccionat com a grup extern sis espècimens que representen quatre tàxons: *Caloplaca ignea* (2 espècimens), un d'ells tret del GenBank [AF353950] (Arup & Grube 1999), *Xanthoria elegans* (1 espècimen), *X. candelaria* (1 espècimen), *X. soreliata* (2 espècimens), un d'ells també del GenBank [AF224348] (Lohtander *et al.* 2000). Vegeu taula 5.1 per a informació d'herbari de les 68 seqüències incloses en aquest estudi.

Per a les subsegüents anàlisis filogenètiques, s'han preparat dues matrius de dades. Una de completa, amb les 68 seqüències especificades, i una altra de més reduïda, amb només 60 seqüències per a l'anàlisi combinada amb la morfologia. En aquesta última anàlisi hem descartat les vuit seqüències obtingudes del GenBank que procedien d'espècimens per als quals no disposàvem d'informació morfològica.

5.2.2.2. OBTENCIÓ DE LES DADES MOLECULARS

Per tal d'obtenir les seqüències d'ITS s'han seguit els següents passos generals: extracció del DNA total, amplificació dels fragments de DNA mitjançant la tècnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) i seqüenciació automàtica del producte amplificat.

Les mostres utilitzades provenen tant de recol·leccions pròpies, dipositades en l'herbari BCN (ex BCC), com de material en préstec dels següents herbaris: E, GZU,

LD, MARSSJ, MIN, VAB-LICH i de l'herbari personal de U. Arup. La informació dels espècimens apareix resumida en el llistat de la taula 5.1 (per a informació més detallada sobre la localitat de recol·lecció, consulteu el material estudiat del capítol 4). L'obtenció de dades moleculars s'ha realitzat per a la majoria d'espècimens al laboratori molecular del nostre departament, però algunes de les seqüències han estat obtingudes durant diferents estades al laboratori del Dr. Lutzoni, al Field Museum's Pritzker Laboratory of Molecular Systematics and Evolution (Chicago) i al Biology Department de la Universitat de Duke (Durham).

Prèviament a l'extracció del DNA, s'ha separat el tal·lus líquènic del substrat per raspat mitjançant una fulla d'afaitar esterilitzada i amb l'ajut d'agulles emmanegades. En algun cas, la mostra s'ha pogut arrencar directament amb l'ajut d'unes pinces fines. S'ha tingut especial cura a no malmetre el material d'herbari, que sovint era escàs o antic. Especialment pel que fa als tipus estudiats, s'ha intentat utilitzar el mínim possible de mostra. En tots els casos, hem disposat de l'autorització dels corresponents herbaris, i s'han utilitzat majoritàriament espècimens amb una antiguitat inferior als 20 anys.

5.2.2.2.1 Extracció del DNA

Per a l'extracció del DNA genòmic hem utilitzat el kit de Puregene (GENTRA systems) i hem seguit, amb algunes modificacions, el protocol per a fongs filamentosos indicat pel fabricant que resumim a continuació:

Lisat cel·lular. - Els petits fragments de mostra que contenen tant el fotobiont com el micobiont s'han dipositat en un eppendorf de 1,5 ml que s'ha submergit en nitrogen líquid durant uns minuts. A continuació s'ha obert amb cura el tub, que per evitar que salti el tap es pot col·locar en gel perquè s'escalfi lleugerament, i s'ha procedit a triturar el material amb un èmbol de plàstic. Posteriorment, s'ha homogeneïtzat el material afegint a cada eppendorf entre 100 i 300 µl de Solució de Lisis Cel·lular (*Cell Lysis Solution*), una solució tampó ja preparada que conté EDTA, SDS i Tris, quantitat que depèn del volum de mostra inicial (5-10 mg). A continuació s'hi ha afegit 1-3 µl de proteïnasa K (10 mg/ml, relació 1µl proteïnasa K per 100 µl de solució de lisis) i una punta de llanceta de pols de PVPP (Polivinil-polipirrolidona). La pols de PVPP capta els polisacàrids i d'altres metabolits secundaris. Després d'agitar uns segons en un vòrtex, s'han deixat les mostres incubant a 55°C en estufa tota una nit.

Tractament amb Rnasa. - S'ha afegit 1-3 µl de RNasa Solució A (4 mg/ml) al lisat cel·lular (en la mateixa proporció que la proteïnasa K) i, després de barrejar la mostra invertint els eppendorfs unes 25 vegades, s'han deixat en incubació a 37°C durant 15 minuts.

Precipitació de proteïnes. - Posteriorment a la incubació s'han deixat refredar les mostres a temperatura ambient i s'ha afegit al lisat cel·lular 35-100 µl de Solució de Precipitació de Proteïnes (*Protein Precipitation Solution*), en proporció de 100 µl per cada 300 µl de Solució de Lisis Cel·lular. S'ha mesclat tot amb un vortejat de 20 segons i, per facilitar la precipitació, s'han deixat les mostres en gel durant 15 minuts. Seguidament s'ha realitzat una centrifugació de 3 minuts a 13.000-16.000 x g. Després de la centrifugació s'ha recuperat la fase aquosa i se l'ha transvasat a un nou eppendorf de 1,5 ml.

Precipitació del DNA. - En els nous eppendorfs, s'hi ha afegit 100-300 µl d'isopropanol al 100% (2-propanol), s'han barrejat les mostres invertint els tubs suaument unes 50 vegades i s'ha centrifugat novament a 13.000-16.000 x g durant 3 minuts. En aquest pas es pot observar el DNA com un petit sediment blanc (*pellet*). S'ha eliminat el sobrenadant i el sediment (*pellet*) s'ha rentat amb 100-300 µl d'etanol al 70%. S'ha realitzat una altra centrifugació a 13.000-16.000 x g durant 3 minuts i s'ha eliminat de nou el sobrenadant. Els eppendorfs s'han invertit, escorregut en paper absorbent i s'han deixat eixugar a l'aire durant 15-30 minuts.

Hidratació del DNA. - Finalment, el sediment s'ha posat de nou en suspensió en 30 µl d'aigua pura autoclavada. El DNA s'ha rehidratat incubant la mostra a 65°C durant 1 hora. L'eppendorf s'ha de colpejar suaument, periòdicament, per a facilitar la dispersió del DNA. La solució final s'ha emmagatzemat a -20°C.

Comprovació del DNA. - La concentració de DNA s'ha examinat en un gel d'agarosa a l'1% preparat amb TBE* i tenyit amb bromur d'etidi. Per a fer la comprovació s'ha emprat 3 µl de producte d'amplificació barrejats amb 1 µl de tampó de càrrega (*loading buffer*). La visualització es fa amb un transil·luminador de llum ultravioleta. *El TBE és una solució tampó que conté Tris-Acetatsòdic, EDTA i àcid bòric a pH 8. Aquest tampó és el mateix en el què se submergeix el gel durant l'eletroforesi.

5.2.2.2.2. Amplificació del DNA

A partir del producte d'extracció del DNA total s'ha amplificat el fragment escollit en aquest estudi per mitjà de la tècnica de la PCR (*Polymerasa Chain Reaction*). Els encebadors (*primers*) universals emprats ja havien estat publicats (taula 5.4) i el seu funcionament en líquens ha estat àmpliament contrastat en diversos treballs (veure introducció). En general, l'amplificació ha estat realitzada amb els encebadors ITS1/1F/5 i ITS4, però en els casos en què ha hagut problemes d'amplificació s'han emprat els encebadors interns 5.8S, 5.8SR, ITS2 i ITS3, combinats amb els anteriors: ITS1/5.8S, ITS1F/5.8S, ITS5/5.8S, ITS4/5.8SR, ITS1/2, ITS1F/2, ITS5/2, ITS4/3.

<u>Encebador</u>	<u>Seqüència 5' → 3'</u>	<u>Referència</u>	<u>no. bp</u>
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)	19
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns (1993)	22
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White <i>et al.</i> (1990)	20
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White <i>et al.</i> (1990)	20
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> (1990)	20
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> (1990)	22
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	Vilgalys & Hester (1990)	17
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGC	Vilgalys & Hester (1990)	18

Taula 5.4 - Composició nucleotídica del encebadors utilitzats en l'amplificació i seqüenciació del nrDNA. La seva síntesi s'ha encarregat al servei de síntesi de Roche-MB (TIB MOLBIOL Syntheselabor).

La reacció d'amplificació s'ha preparat en un eppendorf de 0,2 ml, on s'hi han barrejat 5µl de tampó (x10); 5 µl de dNTPs (8mM); 2,5 µl de cada iniciador (10µM); 0,5 µl de MgCl₂ (50mM); 1,5 µl de BSA (*Bovin Serum Albumin*, Biolabs); 0,3 µl de Taq (5U/µl) (Biotools); 1-2 µl d'DNA genòmic i aigua esterilitzada fins a un volum final de 50 µl.

Els cicles de la PCR s'han realitzat en un aparell Perkin-Elmer GeneAmp 2400. Les condicions de temperatura i temps han estat les següents: un cicle inicial de desnaturalització d'1 minut a 95°C, unit a 25 cicles de desnaturalització d'1 minut a 95°C, anellament de 45 segons a 52°C i polimerització de 2 minuts a 72°C, seguit de 15 cicles d'1 minut a 95°C, 45 segons a 52°C i 2 minuts a 72°C amb una extensió addicional de temps de 5 segons per cicle. Finalment s'han mantingut les mostres durant 10 minuts a 72°C per completar l'extensió final dels encebadors, després de la qual els productes de l'amplificació s'han mantingut a 4°C fins al moment de la seva visualització.

En cada reacció s'ha incorporat un còctel sense DNA com a control negatiu per tal d'assegurar l'absència de contaminacions.

La comprovació dels resultats de la PCR s'ha realitzat, igual que en la comprovació de les extraccions, per mitjà d'eletoforesi en gel d'agarosa (1%) i TBE, tenyit amb bromur d'etidi. S'han emprat també 3 µl de producte d'amplificació, barrejats amb 1 µl de tampó de càrrega (*loading buffer*).

En el cas que no s'hagi obtingut una correcta amplificació amb el protocol estàndard, s'ha portat a terme una sèrie de probes alternatives, destinades a optimitzar les condicions de reacció:

- S'ha procedit a detectar la concentració més adequada mitjançant la preparació de diverses concentracions del DNA total, i la realització de reaccions d'amplificació amb cada concentració.

- S'ha incrementat la concentració de $MgCl_2$ o s'ha disminuït la temperatura d'anellament a $50^{\circ}C$, en els casos en què no s'ha obtingut el producte amplificat, o bé, si aquest ha resultat escàs. Cal anar amb compte, ja que pel fet de disminuir l'especificitat, es corre el risc d'afavorir una unió inespecífica dels encebadors a d'altres regions del genoma.

- O a la inversa, s'ha procedit a disminuir la concentració de $MgCl_2$, incrementar la temperatura d'anellament a $54^{\circ}C$, o reduir el temps d'anellament de 45 a 40 segons, quan s'ha obtingut més d'un producte o bandes no prou nítides.

- S'ha reamplificat amb encebadors interns (*nested primers*) quan el producte era escàs. El programa de reamplificació és similar al normal, simplement es redueix el nombre de cicles de 25 a 20, i s'incrementa la temperatura d'anellament a $54^{\circ}C$. S'utilitza 1 μl de PCR, en lloc del DNA genòmic com a motlle. La primera amplificació es realitza amb la parella d'encebadors ITS1/4 o ITS1F/4, mentre que en la reamplificació s'utilitzen les parelles ja esmentades (ITS1/5.8S, ITS1F/5.8S, ITS5/5.8S, ITS4/5.8SR, ITS1/2, ITS1F/2, ITS5/2, ITS4/3).

- L'amplificació del DNA per parts és útil en els casos en què el DNA es troba degradat. En aquest cas, s'amplifiquen els fragments ITS1 i ITS2 per separat. Les parelles d'iniciadors són les mateixes que en la reamplificació (ITS1/5.8S, ITS1F/5.8S, ITS5/5.8S, ITS4/5.8SR, ITS1/2, ITS1F/2, ITS5/2, ITS4/3).

5.2.2.2.3. Purificació del producte amplificat

Després de comprovar l'existència de l'amplificat s'ha procedit a la neteja del producte de la PCR per tal d'eliminar les restes d'iniciadors, dNTPs i d'altres ingredients del còctel. Aquest procés s'ha realitzat mitjançant dos sistemes de purificació:

(1) En un dels sistemes s'ha fet servir el Cycle-Pure Kit (E.Z.N.A.), seguint els protocols proporcionats pel fabricant. S'ha transferit la reacció de la PCR a un eppendorf de 1,5 ml i s'ha afegit 4 volums (200 μl) de Buffer CP (solució tampò proporcionada pel fabricant). Després de passar la mescla pel vòrtex i barrejar-la bé, s'ha transferit a una columneta (HiBind® DNA spin-column, E.Z.N.A.), engalzada en un tub de 2 ml (també proveït) i s'ha centrifugat a $10.000 \times g$ durant 1 minut a

temperatura ambient. Un cop descartat el líquid s'ha procedit a rentar la columna amb 750 µl de Wash Buffer (proveït), prèviament diluït amb etanol absolut, i s'ha tornat a centrifugar la columna a 10.000 x g durant 1 minut a temperatura ambient. Aquest darrer pas s'ha repetit amb uns altres 750 µl de Wash Buffer. Després de descartar novament el líquid s'ha centrifugat la columna buida a 10.000 x g durant 1 minut per tal d'eixugar la matriu. Segons el fabricant aquest pas és crític per tal d'aconseguir una quantitat òptima de DNA. Un cop eixugada la columna s'ha col·locat en un eppendorf nou de 1,5 ml i s'hi han afegit 40 µl d'aigua pura esterilitzada. Finalment, s'ha realitzat una darrera centrifugació a 10.000 x g durant 1 minut per tal disoldre el DNA. Alternativament, s'han emprat les columnes Ultrafree-MC 30,000 NMWL de la marca MILLIPORE.

(2) En l'altre sistema de purificació s'ha utilitzat GELase (GELase™ Agarose Gel-Digesting Preparation, Epicenter #G31100). Els productes de la PCR, amb el volum reduït prèviament a 10 µl en *Speed-vac*, s'han purificat en un gel d'agarosa 1% preparat amb TAE, del qual s'han tallat les bandes desitjades i s'han disposat en un tub de 0,5 ml, deixant-les fondre durant 10 minuts en un bany sec a 70°C. Seguidament, s'han transferit a un altre bany sec a 42-45°C durant 2-5 minuts, per tal de refredar-les i s'hi ha afegit 1 µl de gelasa. Aleshores, s'ha deixat actuar a l'enzim durant un mínim de dues hores. Alternativament, s'ha emprat el Gel Extraction Kit (E.Z.N.A.). Igual que en el mètode anterior s'han tallat les bandes del gel, però en aquest cas, un cop determinat el volum aproximat de la secció de gel, se l'ha col·locat en un eppendorf de 1,5 ml afegint Binding Buffer (proveït pel fabricant) en quantitat equivalent a 3-4 vegades el volum del gel. La mescla s'ha incubat a 55°C-65°C durant 7 minuts aproximadament, per tal de fondre-la. Cada 2-3 minuts se l'ha agitat per facilitar el procés. Un cop dissolta, s'ha controlat el pH i afegit acetat de sodi (5M) pH 5,2 per rebaixar el pH, en el cas que les mostres viessin a taronja o vermell (pH > 8). Segons el fabricant, la quantitat de DNA disminueix significativament si el pH és superior a 8. A continuació s'han transferit 750 µl de la solució DNA/agarosa a una columneta (HiBind® DNA spin-column, E.Z.N.A.) engalzada en un tub net de 2 ml (proveït) i s'ha centrifugat a 10.000 x g durant 1 minut a temperatura ambient. Un cop descartat el líquid s'ha procedit a rentar la mostra afegint 750 µl de Wash Buffer (proveït), diluït prèviament amb etanol, i després d'esperar uns 2-3 minuts s'ha centrifugat a 10.000 x g durant 1 minut a temperatura ambient. S'ha repetit un cop més el rentat i s'ha centrifugat la columna buida per eixugar la matriu. La columna s'ha col·locat en un nou tub de 1,5 ml i s'ha afegit uns 40 µl d'aigua pura esterilitzada realitzant un darrer centrifugat per recuperar el DNA diluït.

5.2.2.2.4. Seqüenciació

Ambdues cadenes dels productes de PCR purificats han estat seqüenciades amb els mateixos iniciadors de la PCR pel mètode *cycle sequencing* utilitzant terminadors marcats (aquest procediment està basat en el mètode de Sanger *et al.* 1977). S'han seqüenciat les dues direccions del fragment amplificat per tal de minimitzar la presència de posicions nucleotídiques dubtoses. El kit emprat ha estat Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (ABI PRISM, Perkin-Elmer, Applied Biosystems) i s'han seguit les instruccions del fabricant. Les reaccions de seqüenciació s'han preparat seguint dos protocols:

1. Per a un volum final de 10 µl: 1,5 µl de Big Dye, 2,5 µl de tampó Big Dye (5 µl 1M MgCl₂, 200 µl 1M Tris pH 9 i 795 µl d'aigua estèril doblement destilada), 2 µl d'aigua estèril doblement destilada, 1 µl d'encebador 10 µM i 3 µl de producte de PCR purificat.
2. Per a un volum final de 8 µl: 3 µl de Big Dye, 2 µl d'aigua estèril doblement destilada, 1,5 µl d'encebador 10 µM i 1,5 µl de producte de PCR purificat.

La reacció de seqüenciació s'ha realitzat en el mateix Perkin-Elmer GeneAmp 2400 amb un cicle inicial de 3 minuts a 94°C, unit a 25 cicles de 10 segons a 96°C, 5 segons a 52°C i 4 minuts a 60°C cada cicle.

Els productes seqüenciats s'han precipitat amb el següent protocol: els 8-10 µl de reacció de seqüència s'han transferit a un eppendorf de 1,5 ml on s'han barrejat amb 64 µl d'etanol al 95% i 26-28 µl d'aigua estèril doblement destilada. Després d'un vòrtex, s'ha precipitat durant 15 minuts a temperatura ambient i, seguidament, s'ha centrifugat durant 20 minuts a 14000 rpm. Un cop centrifugat i havent eliminat la solució d'etanol, s'han afegit 200 µl d'etanol al 70% i s'ha procedit a centrifugar novament a 14000 rpm durant 5 minuts. Després de decantar el sobrenadant s'ha repetit aquest rentat una vegada més i, finalment, després de decantar l'etanol, s'ha deixat assecar el sediment a l'aire durant un mínim de 15 minuts.

La reacció de seqüència ha estat processada als Serveis Científico-Tècnics (SCT) de la Universitat de Barcelona amb un seqüenciador automàtic de DNA per electroforesi capil·lar ABI Prism 3730 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). Algunes de les seqüències han estat també processades al Field Museum's Pritzker Laboratory of Molecular Systematics and Evolution (Chicago) amb un seqüenciador automàtic de DNA ABI 377 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) i al Biology Department de la Universitat de Duke (Durham) amb el mateix seqüenciador que als SCT.

Un cop obtingudes, les seqüències han estat sotmeses a cerques de BLAST per a una primera verificació de la seva identitat.

5.2.2.3. ANÀLISIS FILOGENÈTIQUES DE LES DADES MOLECULARS

5.2.2.3.1. Alineament

Els fragments de seqüències s'han engalzat amb els programes Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor 1995) i Sequencer Navigator 1.0.1 (Applied Biosystems Inc 1989-94) i s'han aliniat manualment amb McClade 4.01 (Maddison & Maddison 2001). La delimitació de regions ambigües en els alineaments, la seva codificació inequívoca i l'elaboració de "*step matrices*" simètriques per cadascun d'aquests caràcters codificats s'ha realitzat utilitzant un mètode desenvolupat per Lutzoni *et al.* (2000) amb el programa INAASE 2.3b.

5.2.2.3.2. Grups de dades

Les anàlisis filogenètiques s'han realitzat en dos grups de dades: un grup de 60 d'espècimens, dels quals es disponia tant de dades morfològiques com de seqüències d'ITS, i un altre de 68 espècimens restringit a seqüències d'ITS. D'ara en endavant, farem referència als dos grups de dades amb les abreviacions següents: 60-ITS, 68-ITS, respectivament.

5.2.2.3.3. Programari

Les anàlisis de màxima parsimònia (MP) i màxima versemblança (ML) s'han executat amb el programa PAUP*4.0b10 per a UNIX i Macintosh (Swofford 2002), i les probabilitats posteriors bayesianes (PP) s'han calculat amb el programa MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001).

5.2.2.3.4. Anàlisis de màxima parsimònia (MP)

S'han realitzat tres cerques MP: una per a 60-ITS que inclou posicions aliniades no ambiguament i caràcters INAASE codificats (MP2), una altra per a 68-ITS restringida exclusivament a posicions aliniades no ambiguament (MP3), i una tercera, també per a 68-ITS, utilitzant les posicions aliniades no ambiguament i els caràcters INAASE codificats (MP4).

Les regions aliniades no ambiguament de cada matriu de dades han estat subjectes simultàniament a *step matrices* simètriques. Per a construir les *step matrices*, els canvis entre tots els estats dels caràcters a cada posició de les regions aliniades no ambiguament s'han resumit emprant la opció d'estat del caràcter *Show character status/full details/hide excluded characters* del menú *Data* a PAUP*. S'han

considerat els quatre nucleòtids i els gaps com a cinquè estat del caràcter. De la taula resultant, la columna *States*, que mostra tots els estats dels nucleòtids trobats a cadascuna de les posicions aliniades no ambiguament i no constants, s'ha guardat com a un fitxer de text a part. Aquest fitxer s'ha utilitzat com a fitxer d'entrada (*input file*) per al programa STMatrix 2.1 (François Lutzoni & Stefan Zoller, Dept. of Biology, Duke University), el qual genera una *step matrix* (en format Nexus) a partir del càlcul de freqüències de canvis recíprocs (*reciprocal*) d'un estat a un altre. Aquestes freqüències són, aleshores, convertides en costos de canvis utilitzant el logaritme natural negatiu (Felsenstein 1981a, Wheeler 1990). Les regions aliniades no ambiguament de l'ITS nrDNA han estat subjectes a tres *step matrices* separades, corresponents a les regions ITS1, 5.8S i ITS2.

Les posicions constants i les aliniades ambiguament s'han eliminat de les cerques MP. Malgrat tot, algunes d'aquestes regions aliniades ambiguament s'han integrat en les anàlisis filogenètiques en ser substituïdes per caràcters codificats inequívocament, que es troben subjectes a *step matrices* específiques obtingudes amb el programa INAASE 2.3b (Lutzoni *et al.* 2000). Amb aquest mètode es recupera el senyal filogenètic d'aquestes regions sense vulnerar l'homologia posicional (*positional homology*). Malgrat tot, només les regions ambigües amb menys de 32 estats de caràcter poden ésser recodificades a caràcters INAASE.

Per cada anàlisis MP, s'ha realitzat una cerca amb 1000 repeticions amb addició aleatòria de tàxons (RAS: *random addition sequence*), intercanvis de branca (*branch swapping*) de tipus TBR (*tree bisection-reconnection*), deixant la opció *Multrees* en efecte (PAUP* guarda tots els arbres mínims que troba durant l'intercanvi de branques) i col·lapsant les branques amb longitud màxima igual a zero.

Les proporcions de *bootstrap* (BP) s'han estimat amb cerques heurístiques completes. Per a 68-ITS amb només regions no ambigües (MP3), s'han realitzat 1000 rèpliques de *bootstrap*, emprant dos RAS per rèplica de *bootstrap* amb els mateixos paràmetres que en les anàlisis MP inicials. A 68-ITS incloent caràcters INAASE (MP4), s'han calculat 300 rèpliques de *bootstrap*, emprant dos RAS per rèplica de *bootstrap* amb els mateixos paràmetres que en les anàlisis MP inicials. A 60-ITS (MP2), com en la morfologia, s'han calculat 10000 rèpliques de *bootstrap*, utilitzant quatre RAS per rèplica de *bootstrap* i guardant no més de 10 arbres per rèplica de *bootstrap*. El nombre de RAS per rèplica de *bootstrap* s'ha calculat prenent en consideració el número de vegades que l'arbre més curt s'ha trobat durant la cerca heurística utilitzant el grup de dades original. A 68-ITS amb només regions no ambigües (MP3) les 1000 rèpliques s'han repartit en cinc cerques separades de 200 rèpliques cadascuna. A 68-ITS incloent caràcters INAASE (MP4) les 300 rèpliques s'han efectuat separatament en tres cerques de 100 rèpliques de *bootstrap* cadascuna.

5.2.2.3.5. Anàlisi de màxima versemblança o *likelihood* (ML)

La cerca ML s'ha realitzat només per a la matriu 68-ITS. Les posicions constants s'han inclòs a l'anàlisi. Per tal de seleccionar el model de substitució nucleotídica i els paràmetres per a les cerques ML s'ha utilitzat el *Hierarchical Likelihood Ratio Test* (HLRT) de Huelsenbeck & Crandall (1997), amb una aproximació *bottom-up*, i l'Akaike Information Criteria (AIC) d'Akaike (1973) amb el programa Modeltest 3.06 (Posada & Crandall 1998). Paral·lelament, l'HLRT també s'ha calculat a PAUP* amb una aproximació *top-down* per comprovar si s'obtenien models alternatius. Amb aquesta darrera aproximació les taxes per als diferents tipus de substitució poden ser comparades fàcilment i descartades si es consideren innecessàries. Buckley *et al.* (2002) donen prioritat a l'aproximació AIC enfront de la més àmpliament utilitzada HLRT, i basen la seva selecció en qüestions metodològiques. Entre aquestes indiquen que l'ús de pesos Akaike normalitzats (Akaike 1978) facilita la identificació de grups de models amb ajust semblant a les dades i, també, que la incertesa en la selecció del model pot ser quantificada amb l'ús d'aquests pesos, a diferència dels *likelihood-ratio tests* (Burnham & Anderson 1998).

En aquest estudi, l'objectiu d'estimar el model amb diferents mètodes ha estat el de provar empíricament la sensibilitat de les anàlisis ML als canvis en el model de substitució seleccionat per una o altra aproximació. És a dir, comprovar si utilitzant els diferents models obtinguts pels diferents mètodes, aquests convergeixen en una mateixa topologia o no. Goldman (1993) ja va descriure l'aproximació *best fit* del model en funció de les dades, però va ser llargament obviat. Buckley *et al.* (2002) afirmen que el coneixement que existeix sobre els efectes que poden tenir petits canvis en l'estructura del model de reconstrucció filogenètica és encara limitat i, per això, també recomanen realitzar anàlisis de sensibilitat entre models per tal assegurar que les conclusions extretes siguin estables (Buckley *et al.* 2001, Buckley & Cunningham 2002).

Així, s'han executat tres cerques ML amb cadascun dels models obtinguts pels diferents mètodes descrits anteriorment.

Per a l'HLRT (ML1), el model de substitució seleccionat ha estat el TrN+G (Tamura & Nei 1993) amb freqüències de base (A = 0.1912, C = 0.3023, G = 0.2683, T = 0.2383), matriu de taxes de substitució (A < - > C = 1.0000, A < - > G = 2.8920, A < - > T = 1.0000, C < - > G = 1.0000, C < - > T = 5.3436, G < - > T = 1.0000) i paràmetre *shape* de distribució gamma = 0.2418.

Per l'AIC (ML2), el model ha estat el GTR+I+G (Lanave *et al.* 1984) amb freqüències de base (A = 0.1791, C = 0.3093, G = 0.2787, T = 0.2328), matriu de taxes de substitució (A < - > C = 1.1869, A < - > G = 3.8086, A < - > T = 2.6292, C < - > G

= 0.8630, C < - > T = 6.7783, G < - > T = 1.0000), paràmetre *shape* de distribució gamma = 0.7269 i proporció de posicions invariables I = 0.4204.

Finalment, amb l'HLRT calculat a PAUP* amb l'aproximació *top-down* (ML3) s'ha seleccionat el model HKY+G (Hasegawa-Kishino-Yano 1985) amb freqüències de base (A = 0.1797, C = 0.3146, G = 0.2571, T = 0.2486), ratio ti/tv = 2.1501 i paràmetre *shape* de distribució gamma = 0.2238. En els tres casos, les cerques heurístiques ML s'han executat amb el mateix paquet de dades que MP3, amb 1000 RAS, el nombre de rearranjaments limitat a 40000/RAS, intercanvis de branca (*branch swapping*) de tipus TBR (*tree bisection-reconnection*), opció *Multrees* en efecte, guardant tots els arbres i col·lapsant les branques amb longitud màxima igual a zero.

Per tal d'avaluar la confiança de les relacions obtingudes en les anàlisis ML s'ha realitzat una anàlisi bayesiana (Huelsenbeck *et al.* 2000, Larget & Simon 1999), tal i com s'implementa a MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), i s'han utilitzat les probabilitats posteriors bayesianes (PP) resultants. El mateix model i nombre de *rate categories* emprats a la cerca ML s'han utilitzat per a les anàlisis B/MCMCMC. Totes les anàlisis bayesianes s'han iniciat amb arbres a l'atzar. Un de cada 100 arbres s'ha mostregjat per 5.000.000 de generacions amb quatre cadenes i paràmetres de substitució actualitzats durant la cerca. Per assegurar que totes les cadenes convergien al mateix nivell, l'arbre de consens *majority rule* s'ha calculat amb PAUP* emprant només els darrers 37.500 de 50.000 arbres mostrejats. S'han exclòs (*burnin*) els primers 12.500 arbres per evitar aquells que puguin haver estat mostrejats abans de la convergència de les cadenes de Markov. L'exclusió d'arbres s'ha realitzat traçant els valors de *log-likelihood* dels punts de mostra contra el temps de generació i determinant que l'estacionaritat s'aconsegueix quan els valors de *log-likelihood* dels punts de mostra arriben a un valor d'equilibri estable (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Així, els 12.500 arbres inicials s'han descartat abans que s'aconseguís l'estacionaritat. La cerca bayesiana s'ha repetit tal i com ja s'ha descrit per confirmar el resultat de la primera anàlisi. L'arbre de consens *majority rule* final s'ha obtingut reunint tots els arbres seleccionats d'ambdues cerques (75.000 arbres). La probabilitat posterior de cada bipartició topològica s'ha estimat per la freqüència d'aquestes biparticions al llarg dels 75.000 arbres mostrejats. Els internodes amb PP $\geq 95\%$ s'han considerat estadísticament significatius. A diferència dels valors de *bootstrap* no paramètric (Felsenstein 1985) aquestes són probabilitats estimades dels clades sota el model assumit (Rannala & Yang 1996).

5.2.3. RESULTATS

5.2.3.1. ALINEAMENTS (TAULA 5.6)

La mida final de la matriu 60-ITS ha estat de 746 posicions. D'aquestes, un total de 384, que representen 24 regions aliniades ambigüament, han estat excloses de l'anàlisi. També s'han eliminat les posicions constants, 278 en total. Els 84 caràcters restants s'han combinat amb 22 caràcters INAASE codificats, els quals han substituït 22 de les 24 regions aliniades ambigüament. D'aquesta manera, el nombre final de caràcters variables ha estat de 106, dels quals 77 han resultat parsimoniosament informatius.

La mida final de la matriu 68-ITS ha estat de 747 posicions, de les quals un total de 385, que representen 24 regions aliniades ambigüament, han estat excloses de les anàlisis MP3, MP4, ML1, ML2, ML3 i B/MCMCMC. Dels 362 caràcters inclosos a les anàlisis ML i B/MCMCMC, 274 han resultat ser constants i 88 variables. A les anàlisis MP3 i MP4, les 274 posicions constants han estat eliminades. A MP3, dels 88 caràcters restants 59 han resultat ser parsimoniosament informatius. A MP4, 20 caràcters INAASE codificats, que substitueixen 20 regions aliniades ambigüament, s'han combinat amb els 88 caràcters per a donar un total de 108 caràcters no constants, dels quals 82 són parsimoniosament informatius.

5.2.3.2. COMPARACIÓ DE LA RESOLUCIÓ I EL RECOLZAMENT ENTRE CRITERIS D'OPTIMITZACIÓ (TAULA 5.5)

La cerca no uniformement ponderada MP2 (regions aliniades no ambigüament i 22 caràcters INAASE codificats) que s'ha executat en la matriu 60-ITS mostra 48 arbres igualment més parsimoniosos de 513,39 passos, els quals formen part d'una illa trobada 983 vegades de 1000 RAS. El valor de l'Índex de Consistència (IC) ha estat de 0,733 i el de l'Índex de Retenció (IR) de 0,877.

La cerca no uniformement ponderada MP3 (només regions aliniades no ambigüament) en la matriu 68-ITS ha generat 393 arbres igualment més parsimoniosos de 239,74 passos. Aquests arbres formen part de sis illes, una de les quals ha estat trobada 990 vegades de 1000 RAS i les cinc restants només una vegada. El valor de l'Índex de Consistència (IC) ha estat de 0,659 i el de l'Índex de Retenció (IR) de 0,874.

Amb l'anàlisi MP4 (regions aliniades no ambigüament i 20 caràcters INAASE) s'ha obtingut un total de 1299 arbres igualment més parsimoniosos distribuïts en cinc illes, una de les quals s'ha trobat 996 vegades de 1000 RAS i la resta una. La longitud del millor arbre és de 493,41 passos. El valor de l'Índex de Consistència (IC) ha estat de 0,713 i el de l'Índex de Retenció (IR) de 0,887.

Les tres anàlisis MP generen topologies força similars, però es produeixen discrepàncies en la resolució i en la confiança obtingudes a partir de les anàlisis de *bootstrap*. El primer que s'ha observat és una reducció en la resolució filogenètica de resultes de l'increment d'espècimens. En afegir noves seqüències, 8 en total, que són gairebé idèntiques a les ja existents, i que representen només variacions menors d'algunes espècies per a les quals volíem considerar la seva validesa, es genera una redundància que es veu traduïda en un increment en el nombre d'arbres més parsimoniosos (48 a MP2 enfront de 393 a MP3 i 1299 a MP4). Respecte al nombre d'internodes ben recolzats (valor de *bootstrap* BP \geq 70%), les anàlisis MP2 i MP4, que tenen topologies molt properes, en presenten un nombre semblant (26 a MP2 i 29 a MP4, 21 dels quals són comuns). Cal remarcar que dels internodes amb recolzament significatiu no coincidents, 5 corresponen a nodes terminals que agrupen les noves seqüències de 68-ITS afegides a les ja existents per a una mateixa espècie. En canvi, el nivell de confiança que s'obté amb MP3 és inferior, amb només 13 internodes significativament recolzats (9 si no es consideren els internodes que recolzen els espècimens addicionals). En general, cap de les discrepàncies entre biparticions resulta significativa en comparar els valors de *bootstrap* \geq 70% entre les diferents anàlisis.

És sorprenent que, malgrat l'addició dels caràcters INAASE, el nivell de resolució filogenètica de l'anàlisi MP4 respecte a MP3 resulti inferior (1299 a MP4 enfront de 393 arbres a MP3). Per contra, com ja hem indicat, el nivell de confiança aconseguit amb el recolzament de *bootstrap* és superior a MP4 (29 internodes BP \geq 70% respecte els 13 de MP3). Cal destacar que en cinc internodes amb BP \geq 70% a MP4 no s'obté cap recolzament a MP3 i, al contrari, només en un cas MP3 proporciona recolzament significatiu BP = 75% mentre que a MP4 no arriba al 70% (*C. tegularis* 299 + *C. tegularis* 372). Amb referència al nombre total d'internodes resolts, l'anàlisi MP4 segueix mostrant superioritat envers MP3 (37 enfront 29). Aquestes diferències es donen principalment en el llinatge 1 i a *C. biatorina*. És precisament en el llinatge 1 on es troben les principals discrepàncies entre les topologies de MP2 i MP4, encara que no tenen significació.

L'anàlisi ML1 ha generat 7 arbres més probables (-ln = 1467,34455), que són part de 5 illes, i s'han obtingut 774 vegades de 1000 RAS. A ML2 també s'han trobat 7 arbres més probables (-ln = 1460,542445), que formen part de 5 illes i s'han obtingut 694 vegades de 1000 RAS. Finalment, ML3 ha generat novament 7 arbres més probables (-ln = 1469,77750), part de 5 illes, que s'han trobat 752 vegades de 1000 RAS. Els arbres de ML1 i ML2 són exactament iguals. És a dir, sota els dos models de substitució s'obtenen les mateixes 7 topologies igualment més probables. Pel que fa a ML3, 6 dels 7 arbres obtinguts són també iguals als de les cerques anteriors, i el setè arbre presenta una topologia lleugerament diferent en el llinatge 1. Davant aquests resultats es pot inferir que les dades no són sensibles als diferents models triats per a

ML1 i ML2, mentre que sí s'observa aquesta sensibilitat en canviar al model obtingut per a ML3. Tenint en compte que aquest darrer model ha estat calculat manualment a Paup* mitjançant una aproximació *top-down*, pot ser que la seva estimació no hagi estat tan acurada com a Modeltest. Per aquest motiu s'ha decidit donar major credibilitat als dos models triats pel programa Modeltest i, així, optar per un d'aquests dos a l'hora d'avaluar la confiança amb B/MCMCMC. Donada la robustesa de les dades i el poc efecte que té la tria d'un o altre model sobre els resultats finals s'ha escollit el model més senzill, l'HLRT (TrN+G-ML1), per motius de temps computacional. A partir d'ara, ens referirem exclusivament a ML1.

La cerca ML1 presenta clarament una major resolució filogenètica que no pas les cerques de màxima parsimònia (MP) en relació al nombre d'arbres generats (només 7 arbres igualment més probables a ML1). No obstant això, el nombre d'internodes que presenten probabilitats posteriors $PP \geq 95\%$ és de 22, un valor que només supera al de MP3 (13 internodes $BP \geq 70\%$). En deu nodes amb recolzament significatiu $BP \geq 70\%$ per a MP4 l'anàlisi ML1 presenta set d'aquests internodes amb $PP < 95\%$, i tres sense cap tipus de recolzament. MP2 mostra un internode amb $BP \geq 70\%$ per al qual ML1 tampoc presenta cap recolzament. Només dos internodes amb valors $BP \leq 70\%$ a l'anàlisi MP4 reben una probabilitat posterior $\geq 95\%$ a ML1 i, en aquests dos casos, s'obté també recolzament significatiu a MP2 o MP3. Per tant, no hi ha cap internode que rebi $PP \geq 95\%$ que no presenti recolzament significatiu en els valors de *bootstrap* d'alguna de les tres cerques de parsimònia. Pel que fa al nombre d'internodes resolts, MP4 supera lleugerament a ML1 (37 davant de 36). Finalment, ML1 presenta una única discrepància significativa entre biparticions amb MP4 ($PP = 96$ i $BP = 72\%$), la qual és compartida per MP3, però en aquest cas, sense recolzament.

En resum, en les anàlisis només amb ITS, MP4 és la cerca que genera un nombre més gran d'internodes fortament recolzats, si es tenen en compte els internodes que recolzen els espècimens addicionals al grup de dades de 68 espècimens, fins i tot comparat amb ML1. Per contra, si no es consideren aquests internodes addicionals MP2 és la cerca que presenta més internodes recolzats significativament i, en general, un major nombre d'internodes resolts.

Taula 5.5. Taula sinòptica de les comparacions de recolzament de nodes i resultats de les anàlisis entre els diferents grups de dades 60-Morf, 60-ITS, 60-Morf+ITS i 68-ITS.

Tipus d'anàlisi	60-Morf (MP1)	60-ITS (MP2)	60- Morf+ITS (MP5)	(MP3)	68-ITS (MP4)	(ML1)
	MP-BP	MP + I-BP	MP + I-BP	MP-BP	MP + I-BP	ML-PP
Nombre de rèpliques o arbres mostrejats (BP/PP)	10.000 ^a	10.000 ^a	10.000 ^a	1000 ^b	300 ^b	75.000
Nombre d'internodes resolts (≥50%)	8	36	32	22+7*=29	29+8*=37	28+8*=36
Nombre d'internodes recolzats significativament	4	26	27	9+4*=13	23+6*=29	18+4*=22
Nombre d'arbres obtinguts	71	48	192	393	1299	7

Els nodes s'han considerat significatius si els valors de recolzament són ≥70% per a MP i ≥95% per les anàlisis bayesianes. BP, proporcions de bootstrap; I, addició de caràcters INAASE; ML, anàlisi de màxima versemblança; MP, anàlisi de màxima parsimònia; PP, probabilitats posteriors. Per tal de comparar les topologies derivades del grup de dades de 68 espècimens amb les topologies que infereixen relacions entre els 60 espècimens, els internodes que recolzen els tàxons addicionals al grup de dades de 68 espècimens s'han indicat amb un asterisc (*). (^a) Guardant no més de 10 arbres per rèplica de bootstrap, (^b) guardant tots els arbres.

Taula 5.6. Taula sinòptica dels grups de dades emprats per a les anàlisis MP, ML i bayesiana .

	60-Morf (MP1)	60-ITS (MP2)	60-Morf+ITS (MP5)	68-ITS (MP3)	68-ITS (MP4)	68-ITS (ML1)
Nombre total de posicions	38	746 (+22)	784 (+22)	747	747 (+20)	747
Nombre de posicions excloses*	0	662	662	659	659	385
Nombre de posicions constants	0	278	278	274	274	274
Nombre de posicions variables	38	106	122	88	108	88
Nombre de regions alineades ambig. (No. de posicions)	0	24 (384)	24 (384)	24 (385)	24 (385)	24 (385)
Nombre de regions ambigües recodificades (INAASE)	0	22	22	0	20	0
Nombre total de car. analitzats.	38	106	144	88	108	362
Nombre de posicions parsimoniosament inform.	38	77	115	59	82	NA

*Les posicions excloses inclouen les regions aliniades ambiguament. NA = No aplicable.

5.2.3.3. RELACIONS FILOGENÈTIQUES

El grup de *C. saxicola* apareix definit com a una entitat monofilètica i es troba fortament recolzat en totes les anàlisis d'ITS (BP = 100% per a MP2-4, PP = 100% a ML1; fig. 5.3-4.7). La primera divergència que es produeix en aquest grup dóna lloc a dos llinatges (1 i 2; fig. 5.3-4.7) amb desigual recolzament estadístic i desigual resolució.

Llinatge 2 – Grup A.

El llinatge 2 el constitueixen la majoria d'espècimens emprats en aquest estudi i apareix, amb consistència, com a un grup monofilètic altament significatiu en totes les topologies, a excepció de MP3 (BP = 95% a MP2, BP = 96% a MP4, PP = 99% a ML1). En el cas de MP3 presenta un valor de *bootstrap* llinar del 52%. Aquest llinatge 2 el formen dos grups germans (A i B), cadascun amb més d'una espècie. En el grup A, *C. arnoldii* sensu Poelt i *C. saxicola* s.str. + *C. rouxii* comparteixen un antecessor comú més recent, amb un fort recolzament en les anàlisis que inclouen caràcters INAASE codificats (BP = 93% a MP2 i BP = 96% a MP4), mentre que a MP3 i ML1, tot i presentar la mateixa relació filogenètica, no s'aconsegueix recolzament estadístic; a ML1 la probabilitat posterior cau per sota del 95%, PP = 80%, i a MP3 no s'obté cap valor de *bootstrap*. *C. arnoldii* sensu Poelt agrupa els espècimens que morfològicament s'ajusten al concepte que Poelt tenia d'aquest tàxon (Poelt 1954, 1969 i Poelt & Hinteregger 1993). En totes les anàlisis es confirma l'estatus monofilètic de l'espècie amb un bon recolzament (BP = 76% a MP2, BP = 81% a MP3, BP = 79% a MP4 i PP = 99% a ML1). Pel que fa a les relacions entre els espècimens romanen incertes. Només un grup de quatre individus (tres en el cas de MP2) es revela monofilètic (BP = 86% a MP2, BP = 61% a MP3 i BP = 85% a MP4; amb una PP = 94% lleugerament per sota del nivell de significació).

El clade *C. saxicola* s.str. + *C. rouxii*, presenta una afiliació filogenètica poc resolta entre tàxons. Tant les anàlisis MP com ML1 ens permeten reconèixer quatre grups que es mostren monofilètics amb un recolzament estadístic irregular. Per una banda, *C. saxicola* s.str. es troba repartida en tres dels quatre llinatges esmentats (*C. saxicola* I, II i III), dels quals *C. saxicola* I rep recolzament a MP2 (BP = 99%), a MP4 (BP = 100%) i a ML1 (PP = 96%); *C. saxicola* II només a MP2 (BP = 79%) i MP4 (BP = 83%); mentre que *C. saxicola* III no presenta un bon recolzament, en cap anàlisi MP el valor de *bootstrap* arriba al 70% i la PP es troba per sota del 95% a ML1. En les anàlisis de la matriu 68-ITS, aquest darrer grup *C. saxicola* III inclou un espècimen atribuït a *Xanthoria elegans*, recol·lectat a l'est de l'Antàrtida per Dyer & Murtagh (2001) i que es troba inclòs en el seu estudi filogenètic. La seqüència d'aquest exemplar (AF278753) ja havia estat utilitzat prèviament a Gaya *et al.* (2003), on apareixia sempre com a germà de *C. arnoldii*. En afegir nous espècimens al grup, l'exemplar de l'Antàrtida ha canviat lleugerament la seva posició i ha quedat relacionat

directament amb *C. saxicola* s.str. Cal indicar que els exemplars considerats com a *C. saxicola* s.str. en aquest estudi concorden amb les característiques del neotipus de l'espècie designat per Nordin (1972), i que coincideixen amb un dels tres morfotipus descrits per Wetmore & Karnefelt (1998) [vegeu capítol 4]. De fet, tots els espècimens que hem emprat per representar *C. saxicola* s.str. procedeixen d'Amèrica del Nord ja que no ha estat possible disposar de material prou fresc d'altres àrees. El quart grup del clade *C. saxicola* + *C. rouxii* correspon a *C. rouxii*. Els tres espècimens que la representen formen una entitat monofilètica robusta (BP = 100 a MP2 i MP4, BP = 86 a MP3 i PP = 100 a ML), però en cap cas es resol la seva posició filogenètica respecte a *C. saxicola* s.str.

Llinatge 2 – Grup B

Respecte al grup B, aquest incorpora els tàxons següents: *C. biatorina*, *C. decipiens*, *C. pusilla* i *C. schistidii*. Aquest clade, a diferència del grup A, presenta un bon recolzament en totes les anàlisis (BP = 96%, BP = 91%, BP = 98% a MP2, MP3, MP4, respectivament, i PP = 100% a ML1), encara que les relacions entre els quatre tàxons no sempre romanen resoltes. En aquest sentit, quan es comparen les anàlisis ML1 i MP3 amb MP2 i MP4 (fig. 5.3-5.6), s'observa que, en afegir els caràcters codificats INAASE, s'incrementa la significació estadística i, en reduir el nombre d'individus (MP2), es millora la resolució i es redueix la incertesa filogenètica a nivell interespecífic en el grup. En conseqüència, a MP3 es reconeixen quatre clades monofilètics que delimiten els quatre tàxons esmentats amb un nivell de significació variable: *C. decipiens* i *C. schistidii* reben valors de *bootstrap* BP > 70% i *C. biatorina* i *C. pusilla* BP < 70%; però sense arribar a determinar l'afiliació filogenètica entre ells. A ML1 el resultat és similar, *C. biatorina* i *C. pusilla* també es revelen com a dos tàxons monofilètics i, a més, s'estableix una relació germana entre *C. decipiens* i *C. schistidii* que no s'observa a MP3, però no s'obtenen probabilitats posteriors significatives, tot i que el monofilètisme de *C. biatorina* i *C. pusilla* es troba en el llindar de recolzament, amb una PP = 94% per a cadascun dels dos grups. En canvi, a MP2 les relacions interespecífiques varien significativament. *C. schistidii* divergeix primer i constitueix un llinatge independent de la resta del grup. Aquesta posició basal en el clade B no arriba, però, a obtenir suficient significació estadística (BP = 51%). La següent divergència es dona amb *C. decipiens*, una espècie que manté una relació germana amb la resta del grup, el qual incorpora *C. biatorina* i *C. pusilla* com a tàxons germans monofilètics (BP = 74%). Finalment, a MP4 el clade es resol semblantment a MP3, però el recolzament de *bootstrap* per a cada tàxon és superior, exceptuant *C. schistidii* que presenta BP = 95% en tots dos casos.

Respecte a les relacions que s'estableixen entre els espècimens de *C. pusilla*, podem remarcar que totes les anàlisis reconstrueixen, amb bon recolzament, un grup monofilètic per als espècimens procedents de la península Ibèrica. Un exemplar

provinent d'Àustria queda estretament relacionat amb el grup ibèric, però sense recolzament significatiu. I, en posició basal, trobem un espècimen d'Amèrica del Nord que comparteix l'antecessor comú amb la resta d'exemplars. *C. biatorina* comprèn el mostreig més nombrós del grup B, amb 9 espècimens que cobreixen una àmplia àrea de distribució. En aquest tàxon també es reconeixen diversos llinatges en funció de les anàlisis. En concret, destaca el clade constituït per dos espècimens procedents dels Pirineus catalans i un del Pakistan, que rep recolzament en totes les cerques (el valor de *bootstrap* més baix es dona a MP3 amb BP = 59%). Aquest clade és germà d'un segon llinatge, on trobem la resta d'exemplars, de procedència diversa, i que, alhora, presenta una baixa significació estadística; a les anàlisis MP els valors de *bootstrap* oscil·len entre > 50% i < 70% i a ML1 no arriba al 95% de probabilitat posterior. En aquest segon grup de *C. biatorina*, en les anàlisis MP2 i MP4 es reconstrueix, amb bon recolzament (BP = 70% a MP2, BP = 85% a MP4), un clade monofilètic constituït exclusivament per individus d'Amèrica del Nord. A MP4, a part, un espècimen obtingut del GenBank (*C. biatorina*353953), del qual malauradament no coneixem la procedència, ocupa una posició basal en aquest segon llinatge. Cal esmentar que a ML1 els tres exemplars d'Amèrica del Nord no queden resolts, mentre que la resta d'espècimens s'agrupen en un clade sense recolzament.

Finalment, es confirma l'estatus monofilètic de *C. schistidii*, representada per tres espècimens en les anàlisis MP3, MP4 i ML1, en les quals s'obté bon recolzament estadístic (BP = 95% a MP3 i MP4, i PP = 100% a ML1). Les dues seqüències extreïdes del GenBank procedents d'Itàlia i Romania s'agrupen monofilèticament en les tres anàlisis amb BP > 70% i PP > 95%.

Llinatge 1.

El llinatge 1 es presenta com un grup més conflictiu i amb menys recolzament que no pas el llinatge 2 (BP = 56% a MP2, BP = 60% a MP3, BP = 61% a MP4 i sense probabilitat posterior). De fet, s'hi distingeixen diferents morfotipus, descrits com a espècies potencials, amb una afiliació filogenètica que no ha pogut ser resolta amb confiança en les anàlisis realitzades en aquest estudi. Les relacions entre els diversos exemplars varien considerablement d'una anàlisi a l'altra, sense arribar a establir relacions clares i ben recolzades. Així, ni *C. arnoldii* s.str. ni *C. tegularis*, aquesta darrera representada per diversos morfotipus, no s'han resolt com a espècies monofilètiques en cap de les anàlisis. Malgrat tot, s'observen certes relacions germanes que es mantenen al llarg de les diferents topologies obtingudes. Per exemple, a MP2, MP4 i ML1, s'obté sempre un clade ben recolzat constituït per *C. clauzadeana* i dos espècimens de *C. tegularis* d'origen alpí. A MP3, aquesta relació també es retroba, però cau per sota el 70% de recolzament de *bootstrap*. Per altra banda, dos exemplars de *C. tegularis* 349+365 procedents d'Amèrica del Nord també es presenten monofilètics en totes les anàlisis (BP = 96% a MP2, BP = 95% a MP4,

PP = 96% a ML1), novament amb BP < 70% a MP3. En les anàlisis de màxima parsimònia, l'exemplar de *C. arnoldii* s.str. 28T, que correspon al tipus de *C. saxicola* ssp. *biatorinoides*, es mostra sempre estretament relacionat amb un altre exemplar de *C. arnoldii* s.str. procedent d'Eslovàquia, relació que no s'obté a ML1. L'únic exemplar de *C. nana*, o bé no es troba resolt o bé s'agrupa amb exemplars diversos de *C. tegularis* i *C. arnoldii* s.str. sense recolzament significatiu. Cal indicar també, que en les anàlisis MP3, MP4 i ML1, la seqüència extreta del Genbank amb el nom de *C. saxicola*353951, generada en l'estudi d'Arup & Grube (1999), apareix sempre inclosa en el llinatge 1. Aquest fet ens fa suposar que l'exemplar corresponent no sigui una *C. saxicola* en sentit estricte. Probablement, es tracti d'una *C. tegularis*, però mentre no es pugui examinar l'exemplar en qüestió preferim deixar-la com a dubtosa (?).

Grup extern.

Pel que fa a les relacions en el grup extern, es produeixen algunes discrepàncies entre els diferents mètodes. Així, a ML1 i MP3 *C. ignea* s'estableix com a més propera al grup de *C. saxicola* amb un recolzament de PP = 99% i BP = 67%, seguida de *Xanthoria candelaria* (PP = 98% i BP = 83%), *X. elegans* (PP = 99% i BP = 97%) i, com a grup més basal, *X. sorediata* (PP = 99% i BP = 97%). Contràriament, a MP4 l'espècie més propera al grup de *C. saxicola* no és *C. ignea* sinó *X. candelaria*, però amb un recolzament baix (BP = 68%). En aquest cas, la següent divergència, més externa, vindria donada per *C. ignea* amb un valor de *bootstrap* del 97%. A MP2 els resultats són lleugerament diferents, però cal tenir en compte que el nombre d'espècimens inclosos en el grup extern disminueix en dos, fet que dificulta la comparació directa respecte les anàlisis de 68-ITS. En aquesta cerca, l'únic exemplar de *C. ignea* forma un grup monofilètic amb *X. candelaria*, amb un recolzament de *bootstrap* poc significatiu (BP = 63%) i, al seu torn, aquest clade estableix una relació germana amb el grup *C. saxicola* amb una significació estadística del 96%.

5.3. ANÀLISI FILOGENÈTICA COMBINADA

5.3.1. MATERIAL I MÈTODES

5.3.1.1. ANÀLISIS FILOGENÈTIQUES DE LA MATRIU COMBINADA

5.3.1.1.1. Grups de dades

L'anàlisi filogenètica combinada s'ha realitzat en una matriu de 60 espècimens que inclou caràcters morfològics i moleculars. Aquesta matriu combinada s'ha construït afegint la matriu de dades morfològiques a continuació dels caràcters INAASE codificats en la matriu de dades moleculars emprada en l'anàlisi MP2. Aquest nou grup de dades l'hem anomenat 60-Morf+ITS.

5.3.1.1.2. Anàlisis de màxima parsimònia (MP)

S'ha realitzat una sola cerca MP per a 60-Morf+ITS (MP5), en la qual, semblantment a MP2, s'han utilitzat les posicions aliniades no ambiguament i els caràcters INAASE codificats, amb les respectives *step matrices* especificades en l'apartat de filogènia molecular. En aquest cas, les posicions constants i les aliniades ambiguament també han estat eliminades de les cerques. Per a aquest darrer anàlisi, s'ha realitzat una cerca amb 1000 repeticions amb les mateixes condicions utilitzades en l'anàlisi molecular. Les proporcions de *bootstrap* (BP) s'han estimat igual que per a MP2.

5.3.1.1.3. Test de congruència filogenètica entre particions de dades

Un dels debats més importants en filogènia i sistemàtica fa referència al dilema de com actuar quan diferents particions de dades recolzen filogènies contradictòries, és a dir, quan entren en conflicte (p.e. Bull *et al.* 1993, Cunningham 1997, de Queiroz *et al.* 1995, Doyle 1992, Huelsenbeck *et al.* 1996, Kluge 1989, Miyamoto & Fitch 1995, Rodrigo *et al.* 1993, Wiens 1998d). La possibilitat que els grups de dades tinguin una història filogenètica diferent ha estat considerat com a un argument prou sòlid per a no combinar-los en anàlisis filogenètiques (p.e. Bull *et al.* 1993, de Queiroz 1993).

En la literatura es troben, principalment, tres propostes per tractar amb aquest problema: combinar-les sempre (Barrett *et al.* 1991, Chipindale & Wiens 1994, Kluge 1989, Kluge & Wolf 1993), no combinar-les mai (Lanyon 1993, Miyamoto & Fitch 1995)

o combinar-les en funció del grau d'incongruència (Bull *et al.* 1993, de Queiroz 1993, Huelsenbeck *et al.* 1996, Larson 1994).

Combinar-les sempre = Evidència total o anàlisi simultània. - Kluge (1989) proposa que l'anàlisi filogenètica s'hauria d'efectuar sempre utilitzant tota l'evidència (aproximació *Total evidence = character congruence*). Tots els caràcters independents a l'abast dels sistemàtics haurien de ser combinats i analitzats emprant parsimònia. Kluge (1989) estén el seu argument per incloure no només caràcters sinó també tàxons. Alguns autors justifiquen estadísticament aquesta aproximació afirmant, per exemple, que diverses dades que evolucionen a taxes diferents poden interaccionar positivament per resoldre diferents nivells d'un arbre filogenètic (Hillis 1987); o bé, que els caràcters combinats poden recolzar grups que no es detectarien en les anàlisis separades. El problema és que si l'heterogeneïtat de les dades és freqüent, combinar-les pot dur a una estima de la filogènia errònia (Huelsenbeck *et al.* 1996). En general, la major part dels autors partidaris de l'evidència total consideren que l'anàlisi simultània de la matriu combinada és l'única aproximació vàlida, malgrat l'existència d'incongruències de qualsevol grau de significació (Baker & DeSalle 1997, DeSalle & Brower 1997, Kluge 1989, Miller *et al.* 1997, Nixon & Carpenter 1996).

No combinar-les mai = Congruència taxonòmica o anàlisi partida/dividida. - Miyamoto & Fitch (1995) sostenen que les particions no haurien de combinar-se, sinó que s'haurien d'estimar els arbres filogenètics separatament, a partir de cada partició, i comparar-los mitjançant consens o congruència taxonòmica (Mickevich 1978), és a dir, combinant els arbres obtinguts en un de consens. L'avantatge principal d'aquesta opció és que els arbres estimats de diferents grups de dades poden ser emprats per corroborar certes agrupacions. Aquest mètode ha estat rebutjat per partidaris de l'anàlisi simultani (Nixon & Carpenter 1996). El problema principal és que aquest mètode no distingeix els casos en què l'error de mostreig és el responsable d'obtenir diferents arbres filogenètics d'aquells en què són els diferents processos evolutius de les dades els què causen les estimacions conflictives (Huelsenbeck *et al.* 1996).

Combinació condicional. - Bull *et al.* (1993), Rodrigo *et al.* (1993) i de Queiroz (1993) presenten una aproximació alternativa que proposa que les particions se sotmetin a un *test* estadístic d'homogeneïtat. Es considera que les particions de dades heterogènies són aquelles que donen lloc a estimes de la filogènia significativament diferents. Així, amb la combinació condicional, les dades es combinen només si els arbres que s'obtenen de les diferents particions de dades no són significativament diferents. Bull *et al.* (1993) descriu certes situacions en les quals combinar les dades pot dur a una estima menys acurada (precisa) de la filogènia. En essència, aquest mètode advoca per l'evidència total excepte quan les dades són incongruents. Els partidaris d'aquesta tercera opció suggereixen que la decisió de combinar o no depèn del grau d'incongruència (Bull *et al.* 1993, de Queiroz 1993, Larson 1994, Huelsenbeck

et al. 1996). Mentre que les incongruències dèbils poden ser degudes a una mida de mostra inadequada (Bull *et al.* 1993, Omland 1994), les incongruències fortes requereixen una anàlisi més detallada, ja que poden indicar diferents històries entre particions, o bé, que una o més particions vulnerin les suposicions del mètode filogenètic (Cunningham 1997). S'han dirigit diverses crítiques cap a la combinació condicional (Chipindale & Wiens 1994, Eernisse & Kluge 1993, Jones *et al.* 1993, Kluge *et al.* 1993). Entre aquestes, es troba la dificultat de detectar les particions adequades i el dubte de com tractar amb filogènies contradictòries. De fet, el problema potencial més seriós d'aquesta opció són els falsos positius en els *tests* d'incongruència. Malgrat tot, els defensors advoquen per la capacitat que té de prevenir la combinació de dades heterogènies que puguin dur a estimes errònies, de detectar conflictes significatius i descobrir nous processos evolutius.

Actualment, el fet d'examinar la incongruència entre particions de dades s'ha convertit en un procés rutinari i les proves o *tests* que s'han desenvolupat per tal de comparar les particions de dades o els arbres que se'n produeixen són molt nombrosos (p.e. Farris *et al.* 1994, Huelsenbeck & Bull 1996, Kishino & Hasegawa 1989, Larson 1994, Rodrigo *et al.* 1993, Shimodaira & Hasegawa 1999, Swofford *et al.* 1996, Waddell *et al.* 1999, 2000). Entre aquests *tests* podem destacar:

Test de Templeton (Templeton 1983). - Els anomenats *goodness-of-fit tests* poden ser usats per tal de mesurar la incongruència entre particions de dades (Bull *et al.* 1993, Larson 1994). Aquests *tests* determinen si les topologies alternatives difereixen significativament en com de bé s'ajusten a una partició de dades (Kishino & Hasegawa 1989, Prager & Wilson 1988, Templeton 1983). Ja en el seu moment Lutzoni & Vilgalys (1995) i Cunningham (1997) van considerar que els *tests* de *goodness-of-fit* eren massa conservadors.

Test ILD (*Incongruence length Difference*). - Aquest *test* es basa en la diferència entre el nombre de passos requerits en les anàlisis individuals i combinades (Farris *et al.* 1994, Mickevich & Farris 1981). La distribució de l'estadístic ILD s'estima calculant l'ILD per a la partició original i després per a una sèrie particions aleatòries (Farris *et al.* 1994). El *test* ILD també se l'anomena *partition homogeneity test* (PAUP*). Segons Cunningham (1997) el *test* ILD era el què millor funcionava a l'hora de predir la precisió (*accuracy*) de les dades combinades. Barker & Lutzoni (2002), però, recolzen d'altres estudis que rebutgen el *test* ILD com a mesura no esbiaxada de congruència filogenètica (Darlu & Lecointre 2002, Dolphin *et al.* 2000, Graham *et al.* 1998), i demostren la seva ineficiència com a indicador d'homogeneïtat entre particions i de combinabilitat sota el criteri de precisió (*accuracy*) filogenètica.

Test d'incongruència topològica. - Rodrigo *et al.* (1993) van proposar tres *tests* per a avaluar la incongruència entre particions de dades basant-se en la congruència topològica. El segon d'aquests (*Test* de Rodrigo) va resultar ser el més apropiat per a

poder determinar si les particions eren significativament incongruents. Aques *test* ha estat àmpliament discutit i rebutat en detall per Lutzoni & Vilgalys (1995), Lutzoni (1997) i Lutzoni & Barker (1999).

Darrerament molts autors han començat a utilitzar enfocaments bayesians per a examinar l'heterogeneïtat en el senyal filogenètic entre diferents particions (Buckley 2002, Kauff & Lutzoni 2002, Lumbsch *et al.* 2004, Miadlikowska & Lutzoni 2004, Miadlikowska *et al.* 2003, Reeb *et al.* 2004).

En aquest estudi hem optat també per una combinació condicional i hem emprat el mètode proposat per Mason-Gamer & Kellog (1996). Abans de combinar els grups de dades de morfologia (60-Morf) i ITS (60-ITS) per als 60 espècimens en un entorn MP, la congruència filogenètica ha estat avaluada per a cada partició de dades. Aquesta avaluació s'ha realitzat inspeccionant els internodes amb valors de *bootstrap* $\geq 70\%$ que resultaven de les anàlisis separades de *bootstrap* per a morfologia i ITS (Mason-Gamer & Kellog 1996). D'aquesta manera, si les anàlisis de *bootstrap* en dues particions diferents proporcionen un recolzament $\geq 70\%$ per a dues relacions filogenètiques alternatives (s'entén una monofilètica i l'altra no monofilètica) amb al mateix grup de dades, s'interpreta aquest fet com a una incongruència potencial entre les dues particions.

5.3.2. RESULTATS

5.3.2.1. ALINEAMENTS (TAULA 5.6)

La mida final de la matriu 60-Morf+ITS ha estat de 806 caràcters (moleculars + morfològics + caràcters INAASE). A l'igual que a 60-ITS, un total de 384 posicions, que representen 24 regions aliniades ambigüament, s'han exclòs de l'anàlisi juntament amb les 278 posicions constants. Així, els 22 caràcters INAASE codificats han substituït 22 regions aliniades ambigüament i s'han combinat amb els 122 caràcters restants (moleculars + morfològics). El nombre final de caràcters variables ha estat de 144, dels quals 115 han resultat parsimoniosament informatius.

5.3.2.2. COMBINACIÓ DE DADES MORFOLÒGIQUES I MOLECULARS

Les topologies generades en les anàlisis morfològiques i moleculars mostren certes diferències. Malgrat tot, cap de les distintes relacions obtingudes en les anàlisis separades rep un valor de *bootstrap* $> 70\%$ i, per tant, el fet de combinar aquests dos grups de dades no hem considerat que tingués cap efecte contraproductiu a l'hora d'estimar les relacions filogenètiques entre els tàxons (Cunningham 1997). Només en un cas, el valor de *bootstrap* entre clades conflictius ha estat $> 70\%$. Es tracta de

l'internode que separa les tres espècies de *Xanthoria* de la resta de tàxons. En el cas de MP2, *X. candelaria* forma un grup monofilètic amb *C. ignea*, amb un valor de *bootstrap* BP = 63% i, al seu torn, aquest clade s'arrela al grup de *C. saxicola* amb BP = 100%. En canvi, a MP1, *C. ignea* es troba formant part d'un clade sense recolzament amb *C. schistidii* i *C. biatorina*, que juntament amb la resta d'espècimens del grup de *C. saxicola* constitueixen una entitat monofilètica, amb un recolzament BP = 83%. A l'anàlisi combinada, a l'igual que a MP2, *C. ignea* es troba fora del grup de *C. saxicola*; grup que rep un recolzament de *bootstrap* del 100%. D'acord amb l'estudi filogenètic més general (capítol 6), *C. ignea*, un tàxon com hem vist problemàtic, es troba correctament ubicat en l'arbre combinat.

Malgrat que s'ha seguit la proposta de Mason-Gamer & Kellog (1996) pel que fa a la combinació de particions, a posteriori, també s'ha emprat la metodologia de Wiens (1998d). Aquest autor planteja, a part de les tres exposades en la metodologia, una quarta recomanació a l'hora de tractar amb grups de dades amb diferents històries filogenètiques: combinar les dades, però mirant sempre d'acomodar explícitament les diferències en la història filogenètica. És a dir, un cop combinades i analitzades dues particions, que es prenguin els arbres obtinguts de les dades combinades com a la millor estima de la filogènia, però considerant qüestionables aquelles parts de l'arbre que es troben en conflicte i estan recolzades significativament en les dades analitzades per separat. Segons Wiens (1998d), les parts en conflicte es podrien considerar com a feblement recolzades fins que es disposi de més grups dades que acabin d'afavorir alguna de les resolucions en conflicte. D'aquesta manera, es permet que les regions que comparteixen la mateixa història en les diferents particions siguin estimades emprant el major nombre de caràcters possibles. A més, l'avantatge d'incrementar el nombre de caràcters pot ser més gran que els errors causats per les dades incorrectes en regions adjacents de l'arbre. En resum, combinar grups de dades amb àrees localitzades que presenten un desajust pot millorar la precisió (*accuracy*) filogenètica en àrees de l'arbre amb la mateixa història, sense arribar a incrementar-la en les que difereixen. Wiens (1998d) també fa esment del desequilibri en el nombre de caràcters entre grups de dades, una qüestió que pot afavorir el fet de donar més fiabilitat a una de les particions (amb més nombre de caràcters). En el nostre cas, la matriu morfològica només compta amb 38 caràcters i alguns d'aquests fan que *C. ignea*, l'espècie conflictiva, s'aproximi clarament a *C. biatorina*; ja que macroscòpicament són dues espècies que presenten moltes semblances (coloració, tipus de lòbuls...). El més probable és que es tracti d'un procés de convergència morfològica. A més, el patró biogeogràfic d'ambdós tàxons no té cap coincidència. *C. ignea* és una espècie marítima restringida al sud de Califòrnia (E.E.U.U.) i Baja Califòrnia (Mèxic), amb preferència per les roques àcides (Arup 1995b), mentre que *C. biatorina*, en canvi, presenta una distribució montano-alpina, on es desenvolupa principalment en roques carbonatades, calcàries o gresos en la majoria dels casos.

A part, hi ha un altre aspecte de les dades a esmentar. En el cas de l'anàlisi morfològica, els arbres obtinguts difereixen del molecular principalment per la presència de politomies. Segons Coddington & Scharff (1996) i Scharff & Coddington (1997) aquestes politomies són probablement resultat de la manca de resolució i no té sentit "mantenir-les" quan hi ha arbres alternatius que recolzen resolucions completament dicotòmiques. Nosaltres advoquem les idees de Poe & Wiens (2000) pel que fa a l'ús de la filogènia morfològica i la potencialitat dels caràcters morfològics i, ja que no s'han produït discrepàncies significatives importants, considerem que les politomies de l'arbre morfològic no són un impediment per a la seva combinació amb l'arbre molecular.

5.3.2.3. COMPARACIÓ DE LA RESOLUCIÓ I EL RECOLZAMENT ENTRE CRITERIS D'OPTIMITZACIÓ

La cerca no uniformement ponderada MP5 (regions aliniades no ambigüament i 22 caràcters INAASE codificats) realitzada en la matriu 60-Morf+ITS ha generat 192 arbres igualment més parsimoniosos de 1180,10 passos. Aquests arbres formen part de cinc illes, una d'elles freqüentada 405 vegades de 1000 RAS i les quatre restants només una vegada. El valor de l'Índex de Consistència (IC) ha estat de 0,746 i el de l'Índex de Retenció (IR) de 0,818.

La topologia obtinguda en l'anàlisi combinada MP5 (fig. 5.7) coincideix majoritàriament amb les generades en les anàlisis amb ITS, tot i que presenta certes discrepàncies que es comentaran més endavant.

La cerca MP5 suposa un increment en el nombre d'arbres més parsimoniosos respecte a MP2 (48 enfront de 192 arbres), fet que pot explicar-se pel major nombre de caràcters inclosos en l'anàlisi combinada. Novament, aquesta disminució en la resolució filogenètica no es tradueix en una reducció en el recolzament de *bootstrap* total. L'anàlisi MP5 mostra 27 internodes amb valor BP $\geq 70\%$, un més que a MP2 i quatre més que a MP4, si no es consideren els internodes que recolzen els tàxons addicionals. Dos d'aquests internodes no presenten recolzament significatiu en cap de les anàlisis esmentades i dos més recolzen internodes nous. Tanmateix, quatre internodes que a MP2 reben recolzament de *bootstrap* $\geq 70\%$, a MP5 presenten BP $< 70\%$, o bé, no reben cap tipus de recolzament.

En relació a l'anàlisi morfològica, és evident l'increment en el nivell de confiança obtingut a partir del *bootstrap*, així com del nombre de nodes resolts (fig. 5.2 i 5.7). Com ja s'ha comentat abans, no s'observa cap discrepància significativa entre biparticions i, només en un cas, l'anàlisi MP1 presenta un valor de *bootstrap* significatiu en un internode que té BP $< 70\%$ a MP5.

5.3.2.4. RELACIONS FILOGENÈTIQUES

La topologia de l'arbre de consens estricta basat en el grup de dades combinades reflexa majoritàriament les relacions filogenètiques obtingudes en les anàlisis separades de les dades moleculars, a excepció de canvis menors. Així, el grup de *C. saxicola* rep un recolzament de *bootstrap* del 100%, semblant a les cerques anteriors, i presenta la mateixa divergència en els dos llinatges 1 i 2. En aquesta anàlisi, però, els valors de recolzament per a aquests dos llinatges varien sensiblement. Si bé el llinatge 2 es manté per sobre del 70%, presenta una disminució del valor de *bootstrap* respecte a les cerques MP2 i MP4 (81% davant de 95% a MP2 i 96% a MP4). El llinatge 1, en canvi, aconseguix ara, per primera cop, un fort recolzament (BP = 87%), probablement resultat de la contribució de les dades morfològiques.

Llinatge 2 – Grup A.

Al llinatge 2 es reconstrueixen, de nou, dos grups monofilètics ben recolzats (BP = 88% al grup A i BP = 84% al grup B), però amb resolucions lleugerament diferents als resultats moleculars. Pel que fa al grup A, *C. arnoldii* sensu Poelt i *C. saxicola* s.str. + *C. rouxii* segueixen mantenint una relació germana i cadascun dels dos clades rep un recolzament del 85% i 83% respectivament, uns valors que superen els obtinguts fins ara per a *bootstrap*. Cal destacar que en el clade de *C. arnoldii* sensu Poelt les relacions filogenètiques entre espècimens es troben més resoltes, tot i que en cap cas no s'aconsegueix un recolzament estadístic. És clar que aquests resultats es veuen influïts per l'augment de caràcters, malgrat que no són suficients per a aconseguir un recolzament adequat.

En el grup *C. saxicola* s.str. + *C. rouxii* la discrepància més significativa es produeix en la relació entre ambdós tàxons. En les anàlisis moleculars, per bé que els tres espècimens de *C. rouxii* restaven delimitats com a una entitat monofilètica robusta, en cap cas no es resolva la seva relació amb *C. saxicola* s.str. En l'anàlisi combinada es reconstrueix una relació germana en la qual ambdós tàxons apareixen compartint un antecessor comú amb bon recolzament i, alhora, cadascun constitueix un grup monofilètic ben recolzat (BP = 84% per a *C. saxicola* s.str. i BP = 100% per a *C. rouxii*). Aquesta relació es donava ja a l'anàlisi morfològica, però no rebia significació estadística a nivell de l'antecessor comú i en el cas de l'estatus monofilètic de *C. saxicola* s.str. el valor de *bootstrap* era només del 58%. Pel que fa a les relacions intraespecífiques, a *C. saxicola* s.str. es reconstrueixen els mateixos tres grups, amb una posició filogenètica incerta, dos dels quals es troben ben recolzats (BP = 99% i 81%). A *C. rouxii* es presenta una relació més estreta entre els espècimens 273 i 390, però sense recolzament.

Llinatge 2 – Grup B.

En relació al grup B, el llinatge format per *C. pusilla* + *C. biatorina* que es donava a MP2 desapareix i, en canvi, es reconstrueixen dos grups germans sense recolzament (*C. pusilla* + *C. decipiens* i *C. biatorina* + *C. schistidii*). Cal esmentar que la relació estreta entre *C. schistidii* i *C. biatorina* també s'observa a l'anàlisi morfològic sense significació. *C. pusilla* es resol igual que a la filogènia molecular i guanya en recolzament en la relació germana entre els espècimens de la península Ibèrica i l'exemplar austríac (BP = 82%). *C. biatorina* presenta els mateixos llinatges que a MP2, tot i que disminueix el recolzament en el grup constituït pels dos espècimens procedents dels Pirineus catalans i un del Pakistan (58% enfront de 76%), i el perd totalment en el segon llinatge que agrupa la resta d'exemplars. Manté, però, el grup monofilètic dels individus procedents d'Amèrica del Nord (BP = 76%).

Llinatge 1.

El llinatge 1 presenta, com sempre, molta incertesa. En posició basal es distingeix l'espècimen nordamericà de *C. tegularis* 357, el qual manté una relació germana amb la resta de constituents del grup. Com es podia preveure, no es detecta recolzament per a l'agrupació de la resta d'exemplars, els quals, amb tot, reconstrueixen nous llinatges que no s'havien observat en les anàlisis anteriors. Per exemple, diversos espècimens de *C. tegularis*, en especial els procedents de les illes Britàniques, i *C. nana* formen una entitat monofilètica, mentre que alguns representants de *C. arnoldii* s.str., juntament amb dos exemplars de *C. tegularis* 349+365 d'Amèrica del Nord, en reconstrueixen una altra. Cal puntualitzar que no s'obté recolzament per cap dels dos grups. La relació *C. clauzadeana* + *C. tegularis* 299-372 es manté amb un BP < 70%, i *C. tegularis* 299+372 augmenta el recolzament amb un BP = 93%, aconseguint el valor més alt de totes les anàlisis de parsimònia. Pel que fa a les agrupacions monofilètiques de dues *C. tegularis* 376+277 britàniques, *C. arnoldii* s.str. 28T amb *C. arnoldii* s.str. 285 i les dues *C. tegularis* 349+365 nordamericanes, en tots els casos mantenen el nivell de significació (BP = 85%, 92% i 92%, respectivament).

Grup extern.

Finalment, el grup extern perd el clade format per *C. ignea* i *X. candelaria* que es donava a MP2 amb baix recolzament, i *C. ignea* recupera la proximitat al grup *C. saxicola* amb poc recolzament (BP = 52%), seguida per la posició més basal de *X. candelaria* (BP = 97%). No es produeixen canvis respecte a *X. elegans* i *X. sorediata*.

5.3.3. DISCUSSIÓ GENERAL DE LA FILOGÈNIA DEL GRUP *C. SAXICOLA*

La filogènia presentada en aquest estudi no és només la primera que es reconstrueix per al grup de *C. saxicola*, sinó també per a un nombre important de tàxons del subgènere *Gasparrinia*. Aquesta filogènia es basa, principalment, en espècimens d'Europa i Amèrica del Nord, amb algun representant d'altres parts del món. Algunes d'aquestes espècies tenen una àmplia ecologia i mostren certa variabilitat morfològica, mentre que d'altres sembla que es troben restringides a ambients molt concrets i presenten un aspecte molt constant. En general, no es detecta patró geogràfic en els arbres obtinguts, tot i que es donen algunes excepcions, que comentarem més endavant. Caldria disposar per a cada espècie d'un mostreig taxonòmic més extens i de poblacions de diferents àrees geogràfiques per a tenir un estudi biogeogràfic més minuciós.

En aquest treball es confirma la delimitació monofilètica del grup de *C. saxicola* i la relació germana amb *C. ignea* i tres espècies de *Xanthoria*. Les anàlisis filogenètiques recolzen la delimitació de diverses espècies incloses en el grup, malgrat que són poc conclouents sobre les relacions interespecífiques.

5.3.3.1. CONTRIBUTIÓ RELATIVA DE LES DADES MORFOLÒGIQUES I MOLECULARS A L'ANÀLISI FINAL COMBINADA

En l'estudi de les dades morfològiques s'ha pogut comprovar que els caràcters sinapomòrfics sols (fig. 5.7) no proporcionen suficient informació per a circumscriure les espècies. Per aquest motiu l'aproximació més pràctica inclou la combinació de sinapomorfies amb d'altres trets morfològics, indicats en l'apartat de morfologia i taxonomia, que poden ser usats per a definir una espècie.

A causa d'una certa superposició dels rangs de variació morfològica entre espècies, la reconstrucció, exclusivament a partir de caràcters morfològics, de les relacions filogenètiques en el grup de *C. saxicola* és molt limitada. En ser analitzades separatament, les dades morfològiques no confirmen el monofiletisme del grup estudiat. Cap dels llinatges monofilètics que inclouen més d'una espècie i que apareixen tant en les cerques d'ITS (fig. 5.3-5.6) com en l'anàlisi combinada (fig. 5.7), no es reconstrueixen com a entitats monofilètiques si la morfologia s'analitza de manera separada, a excepció feta del clade *C. saxicola* s. str. + *C. rouxii* que, en aquest cas, no rep recolzament estadístic (fig. 5.2).

Basant-nos només en els caràcters morfològics, en el grup de *C. saxicola* es distingeix un gran llinatge que inclou tots els espècimens del grup excepte els de *C. biatorina*, *C. decipiens* i *C. schistidii*. En aquest gran llinatge, el clade format per *C. saxicola* s. str. + *C. rouxii* delimita dos tàxons que es caracteritzen, principalment, per tenir els lòbuls molt curts o gairebé absents, tal-lus gruixuts i espores estretament

el·lipsoïdals. L'altre clade que es distingeix en aquest gran llinatge inclou tots els espècimens de *C. tegularis*, *C. nana*, i una *C. arnoldii* s.str. Aquest clade artificial agrupa majoritàriament les formes de tonalitats grogues a groc ataronjades, amb tal·lus de lòbuls plans, que es troben concentrades en el llinatge 1, reconstruït en les anàlisis moleculars i combinada. En cap cas les relacions filogenètiques en els dos únics grups monofilètics que es reconstrueixen en aquest gran llinatge es troben resoltes.

Com ja s'ha comentat en l'apartat de resultats, *C. decipiens* resta en una posició basal respecte aquest gran llinatge, probablement discriminada per la presència de propàguls vegetatius. Pel que fa al clade més basal del grup, *C. biatorina* + *C. schistidii* + *C. ignea*, la relació de *C. biatorina* i *C. schistidii* pot venir explicada, principalment, pel tipus d'engruiximent equatorial de l'espóra, molt estret en tots els casos. La proximitat de *C. ignea* a *C. biatorina* és clara. Les dues espècies presenten gran semblança macroscòpica, probablement fruit d'un fenomen de convergència, amb una mateixa coloració vermellova al tal·lus i apotecis, i uns lòbuls de longitud considerable. Mentre que *C. biatorina* és pròpia de zones alpines o montanes d'Europa, Amèrica del Nord i Àsia, *C. ignea* es coneix només de Califòrnia i, per tant, sembla ser un tàxon endèmic d'aquesta regió marítima de clima càlid. Per aquest motiu es fa difícil d'establir relacions de tipus biogeogràfic entre ambdues espècies.

Cal no oblidar que totes aquestes relacions no tenen recolzament estadístic, pel que és arriscat treure'n conclusions filogenètiques. Malgrat tot, encara que la quantitat d'informació filogenètica que proporciona la morfologia quan s'analitza separatament és mínima, sempre contribueix a augmentar la resolució i recolzament de *bootstrap* en l'anàlisi combinada. En aquest estudi, l'addició de dades morfològiques a les dades de l'ITS molt rarament han fet disminuir el recolzament de *bootstrap* (taula 5.5).

Les topologies basades només en dades d'ITS revelen, en sentit ampli, les mateixes relacions entre grups que en l'anàlisi combinada (fig. 5.3-5.7), i confirmen el monofilèticisme del grup de *C. saxicola*. Els tàxons reconstruïts en l'anàlisi combinada són també entitats monofilètiques en els arbres d'ITS, a excepció de *C. saxicola* s.str. Cal indicar que les principals discrepàncies es produeixen, bàsicament, en les relacions entre tàxons en el llinatge 1 i el grup B.

5.3.3.2. REONEIXEMENT FILOGENÈTIC DE LES ESPÈCIES TRACTADES EN L'APARTAT DE TAXONOMIA I MORFOLOGIA

En avaluar la delimitació morfològica de les espècies del grup de *C. saxicola* estudiades en l'apartat de taxonomia i morfologia, s'ha trobat concordança completa amb la filogènia combinada per a set espècies acceptades en el grup: *C. arnoldii* sensu Poelt, *C. biatorina*, *C. decipiens*, *C. saxicola* s.str., *C. schistidii*, *C. rouxii* i *C.*

pusilla. En canvi, *C. tegularis* sensu auct., *C. arnoldii* s.str. i les espècies provisionals, *C. clauzadeana* i *C. nana*, han quedat sense resoldre.

Pel què fa al tàxon que dóna nom al grup, *C. saxicola* s.str., ens hem trobat amb dificultats a l'hora de delimitar-lo morfològicament i de poder seleccionar espècimens representatius per a l'estudi filogenètic. El desconeixement general o una circumscripció mal entesa d'aquest tàxon comporten problemes d'identificació i, sovint, el material examinat que s'ha trobat etiquetat com a *C. saxicola* ha resultat pertànyer a d'altres tàxons. Com ja hem comentat en l'apartat de taxonomia, el tipus de Hoffman no ha estat localitzat, raó per la qual no s'ha pogut estudiar. Així, s'ha pres com a tipus el neotipus seleccionat per Nordin (1972). Malauradament, només alguns exemplars procedents d'Amèrica del Nord han pogut ésser inclosos en l'estudi filogenètic ja que els pocs espècimens europeus identificats amb certesa eren massa vells o la mostra era escassa per a poder realitzar una correcta extracció del DNA.

En les anàlisis de la matriu 68-ITS, un exemplar procedent de l'Antàrtida, recol·lectat per Dyer & Murtagh (2001), resta inclòs en el llinatge de *C. saxicola* s.str. Per la iconografia donada per aquest autors sembla que es pugui tractar de *C. saxicola*, però caldria realitzar-ne l'estudi anatòmic per a estar-ne segurs. Cal afirmar, doncs, que la circumscripció filogenètica obtinguda per a *C. saxicola* s.str., a partir majoritàriament de material americà, es correspon amb la delimitació morfològica considerada en aquest estudi. Aquesta delimitació coincideix amb un dels tres morfotipus descrits per Wetmore & Karnefelt (1998) per a *C. saxicola*, concretament amb el caracteritzat per tenir grans apotecis aglomerats i lòbuls extremadament curts. En subsegüents estudis caldria ampliar el mostreig amb material procedent d'altres àrees distants per a assegurar si aquest tàxon de distribució cosmopolita és una bona espècie filogenètica o no.

Si prenem la delimitació de *C. saxicola* en sentit ampli, a part de *C. saxicola* ssp. *saxicola*, trobem el què s'ha considerat com a diferents subespècies. Aquestes han estat especialment tractades per Clauzade & Roux (1985) i *C. saxicola* ssp. *pulvinata* és una de les més ben conegudes i àmpliament distribuïdes a l'hemisferi nord. De fet, aquesta subespècie és troba tan estesa, com ja ho feia palès Weddell (1876), que sovint se l'ha confosa com a *C. saxicola* típica, o bé, se l'ha deixada voluntàriament englobada en un concepte més ampli de l'espècie (Poelt 1954, 1969, Wade 1965, Nordin 1972, Wetmore & Karnefelt 1998). En efecte, Clauzade & Roux (1985) són els únics que inclouen un tractament infraespecífic per a *C. saxicola*. Així, en base a tàxons ja descrits per autors previs, descriuen diferents subespècies o fan noves combinacions en un intent de cobrir la variabilitat morfològica d'aquest complex. *C. saxicola* ssp. *pulvinata*, per a la qual nosaltres hem recuperat el nom de *C. pusilla* en l'apartat de taxonomia, sinonimitzant-les, és un tàxon que difereix de *C. saxicola* típica en molts trets morfològics. Per exemple, entre d'altres caràcters, presenta lòbuls més

desenvolupats, plans o poc convexos, amb una pruïna abundant que dóna normalment una coloració salmonada, i espores més amples. En l'estudi filogenètic hem intentat incloure exemplars que representessin tota la variabilitat morfològica descrita per a aquest tàxon en el capítol 5. *C. pusilla* representa un llinatge monofilètic sovint ben recolzat (fig. 5.3, 5.5 i 5.7), no germà de *C. saxicola* s.str., i es troba, de fet, més estretament relacionada amb d'altres espècies, com ara *C. biatorina* o *C. decipiens*, raó per la qual *C. pusilla* pot considerar-se una bona espècie tant morfològica com filogenètica.

Com ja s'ha comentat, tant *C. saxicola* s.str. com *C. pusilla* presenten una àmplia distribució mundial, fins i tot, amb algun representant a l'hemisferi sud. Per aquest motiu, considerem que seria interessant fer-ne estudis poblacionals per tal de dilucidar si la seva disjunció a gran escala es deu a l'antiguitat d'aquestes espècies, o bé, a haver sofert una extensa dispersió a llarga distància [*widespread long-distance dispersal*] (Printzen *et al.* 2003). Cal tenir en compte que s'han realitzat pocs estudis sobre la dispersió de líquens i la seva distribució a escala global. La presència a l'Antàrtida de propàguls de líquens i briòfits procedents de milers de quilòmetres de distància ha estat demostrada per Kappen & Straka (1988) i Marshall (1996). En un altre estudi, Crespo *et al.* (2002) s'ocupen de l'àmplia distribució en *Parmelia saxatilis* corroborant la visió dispersalista d'Aptroot (Galloway & Aptroot 1995), treballs que consideren que les disjuncions bipolars d'espècies és el resultat d'un origen relativament recent i d'una subsegüent dispersió. Recentment Muñoz *et al.* (2004) han explicat les afinitats florístiques, tant de líquens com de molses i falgueres, entre masses de terra allunyades a l'hemisferi sud per una connexió a través dels vents globals.

A part de *C. pusilla*, un altre tàxon considerat com a subespècie de *C. saxicola* per Clauzade & Roux (1985) és *C. saxicola* ssp. *miniata*, que es coneix únicament de zones d'alta muntanya. Pels motius exposats en l'apartat de taxonomia, en aquest estudi li donem un nom nou, *C. rouxii*, basant-nos, en part, en el concepte que Clauzade & Roux (1985) tenien de *C. saxicola* ssp. *miniata*. En aquest cas, les anàlisis moleculars no han resolt la relació d'aquest tàxon amb *C. saxicola* s.str., però, contràriament, en l'anàlisi combinada, *C. rouxii* presenta una relació germana robusta amb *C. saxicola* s.str., amb un recolzament estadístic significatiu. (fig. 5.7). Pel conjunt de trets morfològics que caracteritzen aquesta espècie, la seva distribució i ecologia específiques i la posició que ocupa la relació germana que estableix amb *C. saxicola* s.str. en l'arbre, al mateix nivell d'altres relacions interespècies, hem considerat que *C. rouxii* també presenta una correspondència filogenètica al nivell d'espècie. Pel que fa a la seva distribució, de moment, només la coneixem d'Europa.

Continuant amb el grup de *C. saxicola* s.l., trobem *Caloplaca arnoldii* sensu Poelt, un altre tàxon que ha presentat moltes dificultats de circumscripció. Clauzade &

Roux (1985) el combinen com a subespècie de *C. saxicola*, mentre que Poelt (1954, 1969) i Poelt & Hinteregger (1993) el consideren com a espècie independent. El problema principal ha sorgit en examinar l'exiccata de Weddell i comprobar que el material que ell considerava com a *Lecanora arnoldii* era el que nosaltres hem anomenat *C. arnoldii* s.str., i no pas el concepte que en tenia Poelt (Poelt 1954, 1969) [vegeu les discussions de l'apartat de taxonomia]. Tanmateix, el concepte més generalment acceptat de *C. arnoldii* es correspon precisament amb el de Poelt (Poelt 1954, 1969), amb una aparença més robusta, rosetes ben delimitades i espores de dimensions més grans. Per aquest motiu, en l'estudi filogenètic, seguint la decisió presa en l'apartat de taxonomia i morfologia, hem preferit deixar el nom de *C. arnoldii* sensu Poelt per a designar tot el material que es corresponia amb el concepte d'aquest autor, i que procedia del Centre d'Europa, incloent el material cedit per U. Arup, utilitzat en el seu estudi molecular sobre *C. demissa* (Arup & Grube 1999). En totes les anàlisis, *C. arnoldii* sensu Poelt apareix com a una espècie diferenciada filogenèticament, germana de *C. saxicola* s.str. i de *C. rouxii* en el grup A. Malgrat tot, cal esmentar que la delimitació morfològica de *C. arnoldii* sensu Poelt a vegades entra en conflicte amb alguns exemplars de *C. arnoldii* s.str., fet que pot dificultar la seva identificació si no es disposa d'un estudi anatòmic detallat. No obstant això, les anàlisis filogenètiques diferencien bé els dos tàxons i situen a *C. arnoldii* s.str. en el llinatge 1, sense cap relació amb *C. arnoldii* sensu Poelt. Davant d'aquests resultats, és podria concloure que es tracta de dues espècies críptiques, no detectades fins ara.

Aquest problema no és nou, diversos estudis moleculars ja han demostrat l'ocurrència d'espècies filogenètiques críptiques en espècies líquèniques ben delimitades per caràcters morfològics (Kroken & Taylor 2001), i també l'existència de variació infraespecífica en alguns líquens àmpliament distribuïts (Zoller *et al.* 1999). Seguint el concepte pràctic de morfoespècie, àdhuc quan *tests* d'incompatibilitat i evidència molecular diferencien espècies filogenètiques (Petersen & Hughes 1999), Crespo *et al.* (2002) consideren que no és apropiat separar-les taxonòmicament. Malgrat tot, apunten que és necessari fer estudis morfològics exhaustius per assegurar que realment no es puguin diferenciar morfològicament. En el nostre cas, com ja s'ha esmentat, s'ha realitzat un estudi morfomètric i anatòmic detallat, el qual ha permès observar diferències en l'estructura del còrtex i la mida esporal. Per aquest motiu, nosaltres, tot i la semblança morfològica que presenten ambdós tàxons, hem mantingut la diferenciació entre *C. arnoldii* s.str. i *C. arnoldii* sensu Poelt, recolzada per les anàlisis moleculars. Cal tenir en compte, però, que el clade de *C. arnoldii* sensu Poelt presenta correlació geogràfica ja que els espècimens emprats provenen tots del Centre d'Europa.

Així com *C. arnoldii* sensu Poelt es troba sempre formant un clade monofilètic, *C. arnoldii* s.str. apareix en el llinatge 1 de manera que la seva delimitació morfològica entra en conflicte amb la seva circumscripció filogenètica. En cap de les anàlisis

C. arnoldii s.str. no es reconstrueix com un clade monofilètic sinó que queda sense resoldre establint relacions incertes amb la resta de tàxons del llinatge 1. De fet, cap dels morfotipus inclosos en aquest llinatge resulten ben circumscrits filogenèticament, com tampoc s'observa un patró geogràfic, a excepció del cas de dues *C. tegularis* americanes, que apareixen sempre com a monofilètiques, i de dues *C. tegularis* més de les illes Britàniques. Cal esmentar aquí una problemàtica afegida que complica la taxonomia del grup. Una part del material que anomenem en aquest treball com a *C. tegularis* ha estat considerat tradicionalment pels autors anglesos com a *C. arnoldii* (vegeu Coppins & Fletcher 2001, i capítol 5). En el nostre estudi, hem inclòs els exemplars de illes Britàniques etiquetats com a *C. arnoldii* en el concepte ampli de *C. tegularis*, ja que aquests exemplars concordaven amb els diferents morfotipus de *C. tegularis* descrits en l'apartat de morfologia. Com ja hem esmentat, en la nostra filogènia, cap d'aquests morfotipus es presenta com a monofilètic. En aquest llinatge conflictiu també hi trobem dues possibles noves espècies, *C. clauzadeana* i *C. nana*, de les quals es disposava de poc material, i només s'han pogut seqüenciar els espècimens que podem considerar com a tipus.

En aquest llinatge, doncs, la problemàtica taxonòmica i nomenclatural ha quedat traduïda en una manca de resolució filogenètica. Sembla ser que la dificultat en la delimitació morfològica mostrada pels taxònoms clàssics presenta també una base genètica. Les diferències entre aquests tàxons potencials podrien ser aparentment degudes només a plasticitat fenotípica. Es fa difícil, però, explicar les grans divergències morfològiques entre, per exemple, *C. clauzadeana*, *C. nana* o *C. tegularis*, com a simple variació morfològica en una mateixa unitat taxonòmica. Per aquest motiu, l'estatus taxonòmic del llinatge 1 i els morfotipus que s'hi inclouen resta incert en espera d'un estudi més detallat del grup on s'incloguin més dades.

Malgrat tot, podem plantejar-nos algunes hipòtesis. Comparativament, les longituds de branca entre els tàxons del llinatge 1 són semblants o, fins i tot, menors a les observades entre els espècimens d'una mateixa espècie en els grups A i B (fig. 5.6). Aquest fet podria apuntar a taxes evolutives diferents entre els llinatges 1 i 2. D'aquesta manera, hom podria suposar un origen més recent del llinatge 1, on els seus tàxons estarien encara en un procés d'especiació que en l'actualitat no hauria acabat, a diferència de les espècies ben delimitades del llinatge 2. En definitiva, pot ser que les espècies del llinatge 1 no hagin estat aïllades genèticament per un període suficient de temps i d'aquí la manca de correlació amb els caràcters morfològics fixats. No obstant, la procedència diversa dels exemplars del llinatge 1 dificulta el poder trobar una explicació de l'origen de diversificació. La presència d'exemplars d'Amèrica del Nord portaria de nou a la discussió sobre la fragmentació ancestral i la dispersió a llarga distància. Qüestions que creiem no poden ser abastades en aquest estudi.

Cal no oblidar que en certs casos les dades moleculars poden conduir a la inferència de relacions filogenètiques incorrectes. En aquest sentit, una possible explicació dels resultats obtinguts podria venir donada per un fenomen de recombinació interespecífica, però caldria desenvolupar estratègies de mostreig especials i dissenyar locus específics que detectin recombinacions, per tal d'establir la importància d'aquest procés en l'evolució del grup. Grube & Kroken (2000) apunten també la recombinació intraespecífica com a una possible explicació de la variabilitat fenotípica en complexos d'espècies, on no es dona correlació entre els caràcters morfològics i la delimitació de diferents espècies. Aquest cas és definit per Poelt (1994) com a tipus d'"espècies variables genèticament". Per altra banda, també es pot haver originat per la presència d'un polimorfisme ancestral (*lineage sorting*) que s'hauria fixat en el llinatge 1 (Kroken & Taylor 2001), per l'existència d'introgressió de DNA d'espècies properes mitjançant hibridació, o bé, per la transferència horitzontal de material genètic. En qualsevol cas, un estudi centrat en el llinatge 1 seria necessari per tal de discernir els factors que n'han determinat l'evolució.

Si tornem al llinatge 2, un dels tàxons que ha comportat menys problemes de delimitació ha estat *C. biatorina*. Amb material procedent d'Europa, Amèrica del Nord i Àsia ha estat una de les espècies més àmpliament representades en l'estudi filogenètic, on la seva circumscripció monofilètica ha corroborat la delimitació morfològica. *C. biatorina*, en general reconeguda com a espècie pels autors europeus (p.e. Poelt 1954, 1969, Nordin 1972, Clauzade & Roux 1985, Nimis 1993), ha estat considerada pels autors d'Amèrica del Nord com a un morfotipus de *C. saxicola* (Wetmore & Karnefelt 1998). En aquest estudi, tres espècimens d'origen nordamericà, etiquetats com a *C. saxicola*, però que en realitat corresponen a *C. biatorina*, resten perfectament inclosos en el clade de *C. biatorina* i, fins i tot, en les anàlisis MP2, MP4 i MP5, mostren un lleuger patró geogràfic ja que reconstrueixen un subgrup ben recolzat en *C. biatorina*. En canvi, un espècimen asiàtic apareix formant un subclade amb dos exemplars europeus, sempre amb bon recolzament en totes les anàlisis. Aquest subgrup presenta una relació germana amb un altre clade que engloba la resta d'espècimens de *C. biatorina*, on s'inclou l'esmentat subgrup de mostres nordamericanes. Curiosament, els dos exemplars europeus i l'asiàtic es caracteritzen per l'ecologia; tots tres es troben per sobre dels 2.000 m d'altitud, el què representa les màximes cotes d'entre els exemplars mostrejats del tàxon, a excepció d'una de les mostres nordamericanes. Aquesta separació dels espècimens més alpins d'origen europeu i asiàtic pot donar algun apunt sobre l'origen d'aquesta espècie de clara preferència pels ambients freds. La hipòtesi de la supervivència i aïllament en refugis glacials, amb una possible invasió postglacial a zones més baixes, es deixa entreveure.

Com apunten Printzen *et al.* (2003), explicar les disjuncions contemporànies de molts líquens és difícil, ja que les raons històriques i ecològiques són, a priori,

igualment probables en molts casos. Malgrat les grans distàncies geogràfiques entre les seves àrees de distribució fraccionades (*part ranges*), líquens disjunts ocorren en hàbitats ecològics molt similars. Així, una disjunció gran, com la holàrtica de *C. biatorina*, podria ser resultat de requeriments ecològics específics, juntament amb habilitats excepcionals de dispersió a llarga distància. L'espècie podria haver sorgit en una de les *part ranges* i dispersat després a àrees amb condicions ecològiques semblants (Högberg *et al.* 2002). A més, àrees ecològiques similars, que ara es troben separades, sovint són romanents d'estatges de vegetació que en el passat havien estat coherents.

La gran estabilitat dels caràcters morfològics i la bona circumscripció filogenètica de *C. biatorina* la converteixen en una ferma candidata per a posteriors estudis de poblacions que ajudin a dilucidar les hipòtesis filogeogràfiques.

De les tres espècies sorediades (*C. decipiens*, *C. cirrochroa* i *C. obliterans*) que tradicionalment s'havien inclòs en el grup de *C. saxicola*, només *C. decipiens* queda filogenèticament circumscrita en el grup. *C. cirrochroa* i *C. obliterans* es revelen com a tàxons filogenèticament molt allunyats, malgrat les semblances morfològiques que denoten amb d'altres espècies del grup de *C. saxicola* (vegeu capítol 5). Els dos espècimens inclosos de *C. decipiens*, procedents d'Europa i Amèrica del Nord, són monofilètics, però la seva relació amb les altres espècies del grup de *C. saxicola* ha quedat incerta. En alguns casos, apareix com a més propera a *C. pusilla*, en d'altres a *C. schistidii*, i sovint queda sense resoldre. Ara bé, es troba clarament més estretament relacionada amb les espècies del llinatge B que a les d'altres grups. De fet, l'ecologia de *C. decipiens* és exactament la mateixa que la de *C. pusilla*, sovint creixen juntes, i morfològicament el tal·lus d'ambdós tàxons presenta moltes semblances. Cal tenir en compte que el material examinat de *C. decipiens* ha estat sempre sorediat, en cap cas s'han trobat exemplars fèrtils, per la qual cosa no ha estat possible de provar cap hipòtesi que faci referència al concepte de *species pair* amb aquest tàxon en concret (p.e. Lohtander *et al.* 1998a, Lohtander *et al.* 1998b, Myllys *et al.* 1999b).

Finalment, per a *C. schistidii* (= *Fulgensia schistidii*), que en les anàlisis de la matriu 68-ITS ha corroborat la seva monofília amb dues seqüències del GenBank, es confirma la seva inclusió en el grup de *C. saxicola*, fet que ja es va demostrar en el treball de Gaya *et al.* (2003). La coloració més ataronjada, la presència de lòbuls, encara que molt reduïts, les espores septades, el còrtex i la medul·la més compactes que la resta d'espècies de *Fulgensia* s.str. són característiques morfològiques que ajuden a explicar aquesta estreta relació. D'aquesta manera, es proposa recuperar per a *F. schistidii* (Anzi) Poelt el nom de *C. schistidii* (Anzi) Zahlbr., i seguir, així, a alguns autors que, de fet, sempre l'han considerada com a *Caloplaca* (Nowak & Tobolewski 1975 i Oxner 1993).

5.3.3.3. COMPARACIÓ DE LA RESOLUCIÓ I EL RECOLZAMENT ENTRE CRITERIS D'OPTIMITZACIÓ

En general, les topologies obtingudes pels diferents mètodes d'anàlisi (MP, ML, B/MCMCMC) amb les diferents matrius, exceptuant la de morfologia, han diferit poc pel que fa a la delimitació de la majoria d'espècies i a les relacions existents entre elles. En totes les anàlisis moleculars i en la combinada s'han reconstruït els dos llinatges principals: 1 i 2. El llinatge 2, ben recolzat, ha inclòs sempre els grups A (*C. arnoldii* sensu Poelt, *C. saxicola* s.str., *C. rouxii*) + B (*C. biatorina*, *C. decipiens*, *C. pusilla*, *C. schistidii*), estretament relacionats, mentre que el no o poc recolzat, si exceptuem l'anàlisi combinada, llinatge 1 ha englobat sempre les espècies conflictives, no resoltes, *C. arnoldii* s.str., *C. clauzadeana*, *C. nana* i *C. tegularis*.

Així, doncs, l'ITS nrDNA, amb la inclusió dels caràcters INAASE i de la morfologia no han pogut delimitar filogenèticament la totalitat de morfoespècies que s'han avaluat (veure Kroken & Taylor 2001), però sí que n'han confirmat un nombre considerable.

En alguns casos, la inclusió dels caràcters INAASE ha permès recuperar informació poblacional, com en el cas de les *C. biatorina* d'Amèrica del Nord, les quals s'han reconstruït monofilèticament només en les anàlisis que inclouen aquests caràcters.

El fet de treballar només amb un grup d'espècies ens havia fet suposar, a priori, que la inclusió d'aquests caràcters codificats INAASE no suposaria un efecte tan important com el què es donava a nivell de família en el treball de Gaya *et al.* (2003), ja que el percentatge de posicions aliniades ambigüament era menor. No obstant això, hem pogut observar novament que la inclusió d'aquests caràcters recodificats en tres de les quatre anàlisis de parsimònia ha resultat avantatjós a l'hora de reconstruir la filogènia del grup de *C. saxicola*. Hem pogut constatar un augment del nombre d'internodes recolzats en comparació als obtingut en l'anàlisi de parsimònia ponderada restringida a regions aliniables no ambigüament (taula 5.5). El nombre d'internodes significativament recolzats ha variat poc entre les matrius que incorporaven caràcters INAASE: 68-ITS (MP4), 60-Morf+ITS (MP5) i 60-ITS (MP2). És superior només en dos internodes a 68-ITS (MP4) i, bàsicament, en internodes terminals que recolzen els clades formats pels espècimens afegits de nou i els previs pertanyents a un mateix tàxon (fig. 5.5). Així, l'augment en nombre de seqüències redundants no ha comportat grans diferències. La resolució també s'ha vist afectada per aquests caràcters recodificats, ja que en comparar les topologies obtingudes de les dues matrius de 68-ITS, una amb INAASE i l'altra sense, es produeix un augment de 8 biparticions en la primera (MP4). Fins i tot, les matrius de 60-Morf+ITS i 60-ITS mostren una major resolució en comparació a 68-ITS sense INAASE (taula 4.5).

Pel que fa al mètode de màxima versemblança (ML), amb el nivell d'incertesa filogenètica calculat amb l'aproximació bayesiana, no ha mostrat tenir major poder a l'hora de resoldre la filogènia del grup de *C. saxicola*. I el nombre d'internodes recolzats significativament ha estat menor en comparació a les anàlisis de parsimònia que incorporaven els caràcters INAASE. Segons l'estudi de simulació que compara el rendiment estadístic del *bootstrapping* de ML i MP amb una aproximació bayesiana MCMCMC (Alfaro *et al.* 2003), el *bootstrapping* MP sovint recolza menys internodes (BP \geq 70%) que el *bootstrap* de ML o B/MCMCMC. En el nostre cas, amb l'addició de caràcters INAASE, el *bootstrap* de MP ha proporcionat un nivell més alt de confiança filogenètica que no pas l'aproximació bayesiana. Per tant, l'addició de caràcters INAASE a l'anàlisi MP ha suposat un augment del nivell de confiança filogenètica que no pas l'ús de mètodes més potents, és a dir, que requereixen menys dades per tal de convergir en la topologia correcta (Huelsenbeck & Hillis 1993, Yang 1996), com poden ser B/MCMCMC o ML.

Els estudis empírics pel que fa a la idoneïtat del model de substitució a les anàlisis ML demostren que les dades presenten robustesa al model triat. Per tant, d'acord amb Buckley *et al.* (2002), podem suggerir que els resultats i les conclusions extretes són estables.

Finalment, en referència a l'anàlisi combinada, la inclusió de caràcters morfològics, si bé no ha implicat un increment significatiu en el nombre d'internodes recolzats, sí que ha permès un augment de la resolució (taula 5.5), que en alguns casos ha afectat a relacions interespecífiques que no quedaven resoltes només amb les dades moleculars (p.e. *C. saxicola* s.str. + *C. rouxii*, fig. 5.7). La manca de caràcters morfològics discriminatoris en un grup d'espècies tan properes ha obligat a la inclusió d'alguns caràcters que podem considerar problemàtics com els polimòrfics o els absents (*missing*) (Scotland *et al.* 2003). Malgrat aquest fet i la poca resolució que aporta la filogènia morfològica en el grup de *C. saxicola*, som del mateix parer que Wiens (2004) en el què respecta a la necessitat de reconstruir la filogènia a partir de la morfologia i a la inclusió dels anomenats caràcters problemàtics, però que contenen informació filogenètica útil, com demostren Poe & Wiens (2000). És important la inclusió de filogènies basades en caràcters morfològics que serveixin de control per als resultats moleculars, de manera que proporcionin una font de corroboració rigurosa i independent per als arbres basats en dades moleculars (p.e. Doyle 1992, Hillis & Wiens 2000, Jenner 2004).

La filogènia que hem reconstruït proveeix d'un marc per a posteriors estudis sistemàtics, biogeogràfics i evolutius en el grup de *C. saxicola*. Amb els resultats obtinguts es pot concloure que per guanyar confiança en les relacions existents entre els membres d'aquest grup no serà suficient afegir nous tàxons sinó que caldrà, probablement, incloure caràcters moleculars addicionals. També serà necessari tenir

en compte d'altres espècies que no hem considerat en aquest estudi, com per exemple *C. havaasii*, *C. pseudofulgensia* o les del grup de *C. persica* que tradicionalment han estat relacionades per la morfologia amb el grup de *C. saxicola*, i que podrien pertànyer a aquest grup. És possible que en afegir nous tàxons els principals grups que hem obtingut per a aquest grup no tinguin canvis marcats, cosa que sí es podria donar en les seves relacions.

Figura 5.2. Anàlisi MP1. Relacions filogenètiques entre 60 espècimens del grup de *C. saxicola* i del grup extern (*Caloplaca ignea*, *Xanthoria candelaria*, *X. elegans* i *X. sorediata*). Arbre de consens estricte de 71 arbres més parsimoniosos basat en dades morfològiques. Longitud de l'arbre = 618 passos, IC = 0,741, IR = 0,669. Els valors de recolzament de bootstrap BP \geq 50% es mostren sobre l'internode corresponent. Amb un asterisc s'indiquen els valors BP \geq 70%, però $<$ 95%, i les branques més gruixudes destaquen els BP \geq 95%.

Figura 5.3. Anàlisi MP2. Relacions filogenètiques entre 60 espècimens del grup de *C. saxicola* i del grup extern (*Caloplaca ignea*, *Xanthoria candelaria*, *X. elegans* i *X. sorediata*). Arbre de consens estricte de 48 arbres més parsimoniosos basat en l'ITS nrDNA (posicions aliniades no ambigüament i 22 caràcters INAASE). Longitud de l'arbre = 513,39 passos, IC = 0,733, IR = 0,877. Els valors de recolzament de bootstrap BP \geq 50% es mostren sobre l'internode corresponent. Amb un asterisc s'indiquen els valors BP \geq 70%, però $<$ 95%, i les branques més gruixudes destaquen els BP \geq 95%.

Figura 5.4. Anàlisi MP3. Relacions filogenètiques entre 68 espècimens del grup de *C. saxicola* i del grup extern (*Caloplaca ignea*, *Xanthoria candelaria*, *X. elegans* i *X. sorediata*). Arbre de consens estricte de 393 arbres més parsimoniosos basat en l'ITS nrDNA (només amb les posicions aliniades no ambigüament). Longitud de l'arbre = 239,74 passos, IC = 0,659, IR = 0,874. Els valors de recolzament de bootstrap BP \geq 50% es mostren sobre l'internode corresponent. Amb un asterisc s'indiquen els valors BP \geq 70%, però $<$ 95%, i les branques més gruixudes destaquen els BP \geq 95%.

Figura 5.5. Anàlisi MP4. Relacions filogenètiques entre 68 espècimens del grup de *C. saxicola* i del grup extern (*Caloplaca ignea*, *Xanthoria candelaria*, *X. elegans* i *X. sorediata*). Arbre de consens estricte de 1299 arbres més parsimoniosos basat en l'ITS nrDNA (posicions aliniades no ambigüament i 20 caràcters INAASE). Longitud de l'arbre = 493,41 passos, IC = 0,713, IR = 0,887. Els valors de recolzament de bootstrap BP \geq 50% es mostren sobre l'internode corresponent. Amb un asterisc s'indiquen els valors BP \geq 70%, però $<$ 95%, i les branques més gruixudes destaquen els BP \geq 95%.

Figura 5.6. Anàlisi ML1. Relacions filogenètiques entre 68 espècimens del grup de *C. saxicola* i del grup extern (*Caloplaca ignea*, *Xanthoria candelaria*, *X. elegans* i *X. sorediata*). Un dels 7 arbres més probables basat en l'ITS nrDNA (només amb les posicions aliniades no ambigüament). -ln likelihood = 1467,34455. Els valors de les probabilitats posteriors PP \geq 50% es mostren sobre l'internode corresponent. Amb un asterisc s'indiquen els valors PP \geq 95%, i els PP \geq 99% es ressalten amb branques més gruixudes.

Figura 5.7. Anàlisi MP5. Relacions filogenètiques entre 60 espècimens del grup de *C. saxicola* i del grup extern (*Caloplaca ignea*, *Xanthoria candelaria*, *X. elegans* i *X. sorediata*). Arbre de consens estricte de 192 arbres més parsimoniosos basat en dades combinades de morfologia i l'ITS nrDNA (posicions aliniades no ambigüament i 22 caràcters INAASE). Longitud de l'arbre = 1180,10 passos, IC = 0,746, IR = 0,818. Els valors de recolzament de bootstrap BP \geq 50% es mostren sobre l'internode corresponent. Amb un asterisc s'indiquen els valors BP \geq 70%, però $<$ 95%, i les branques més gruixudes destaquen els BP \geq 95%. Els requadres amb fletxes inclouen el grup de sinapomorfies inequívokes que recolzen les espècies.

Figura 5.2.

Morfologia - MP1
 Arbre de *strict consensus*
 60 OTUs, 38 caràcters

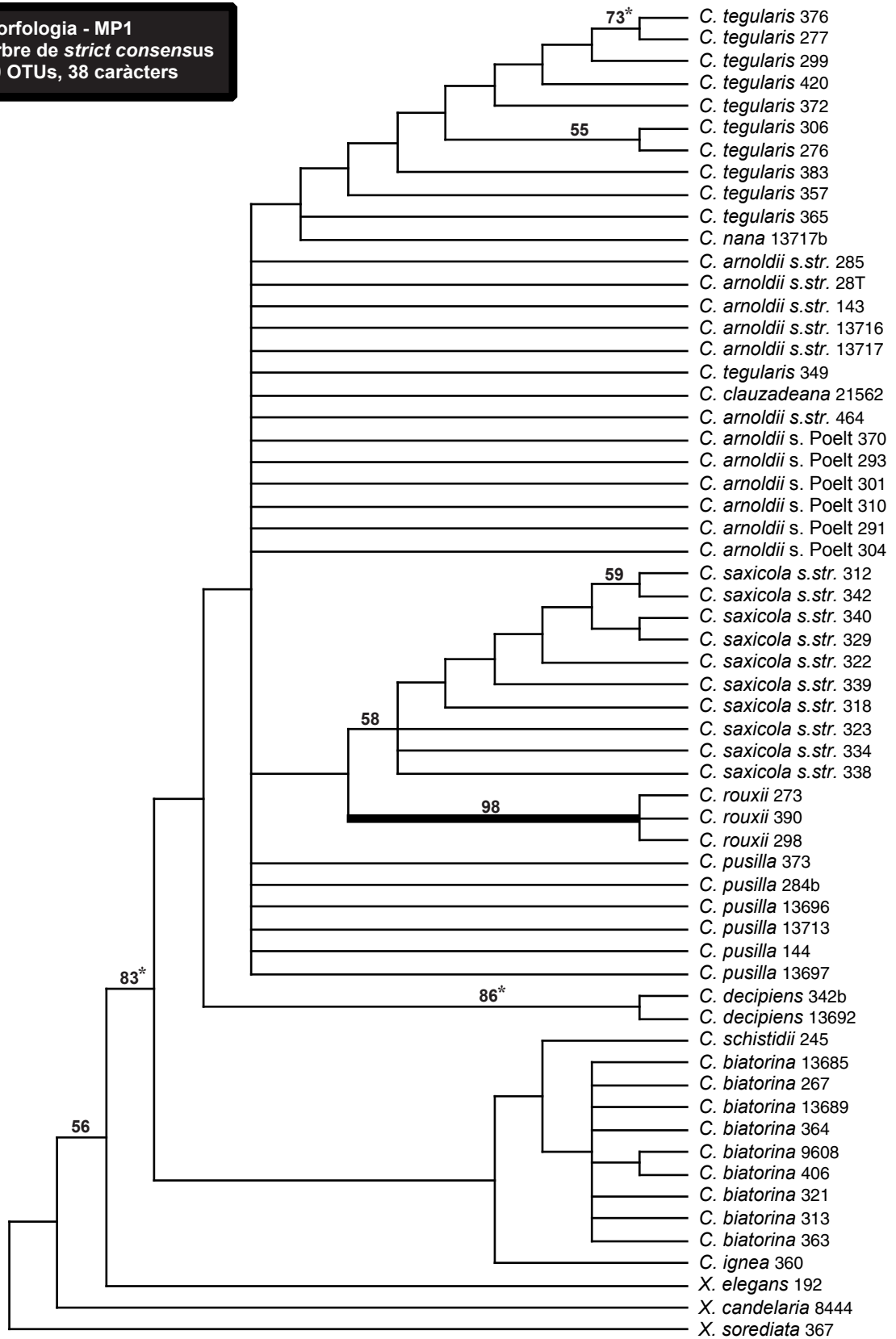


Figura 5.3.

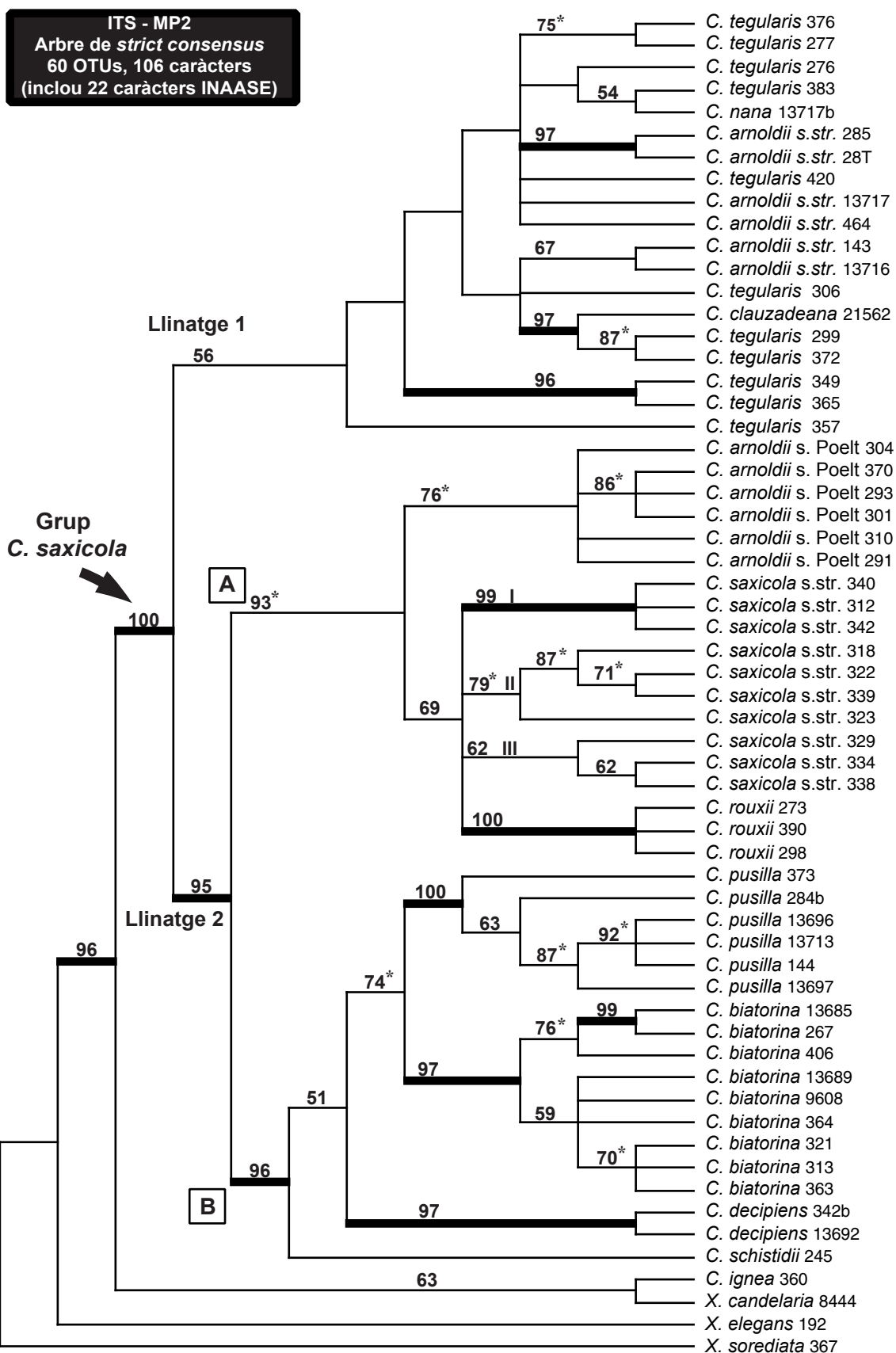


Figura 5.4.

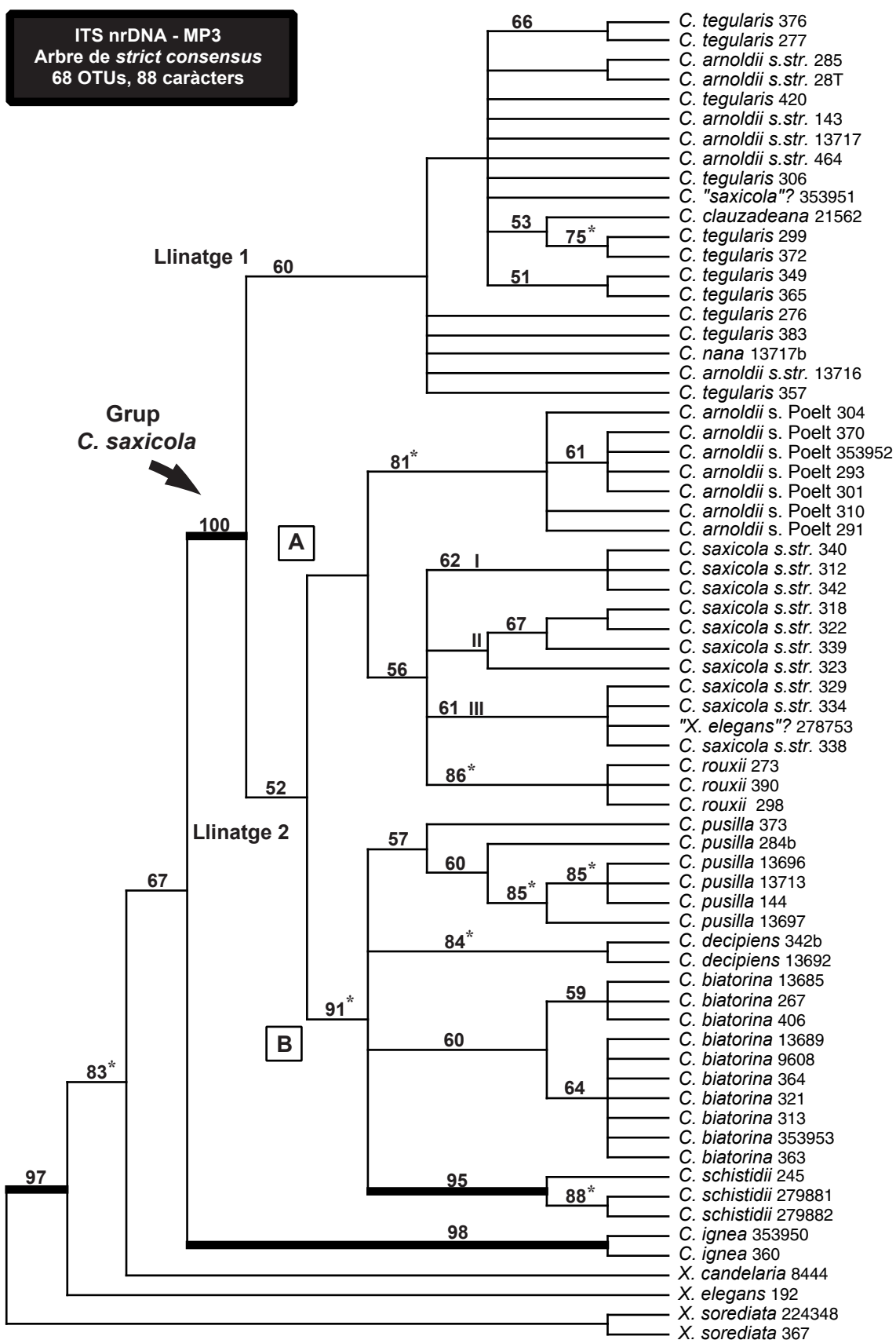


Figura 5.5.

ITS nrDNA - MP4
 Arbre de *strict consensus*
 68 OTUs, 108 caràcters
 (inclou 20 caràcters INAASE)

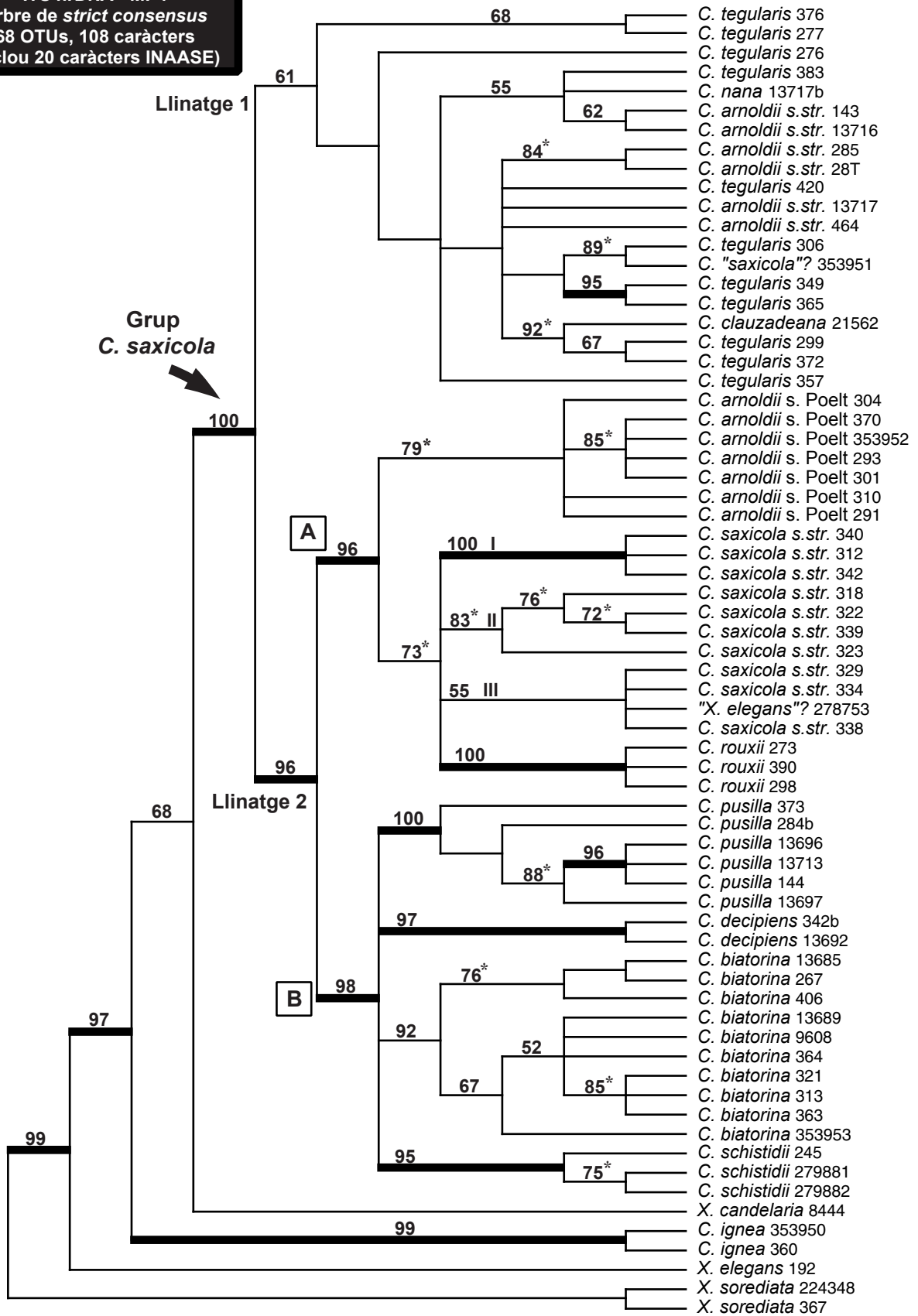


Figura 5.6.

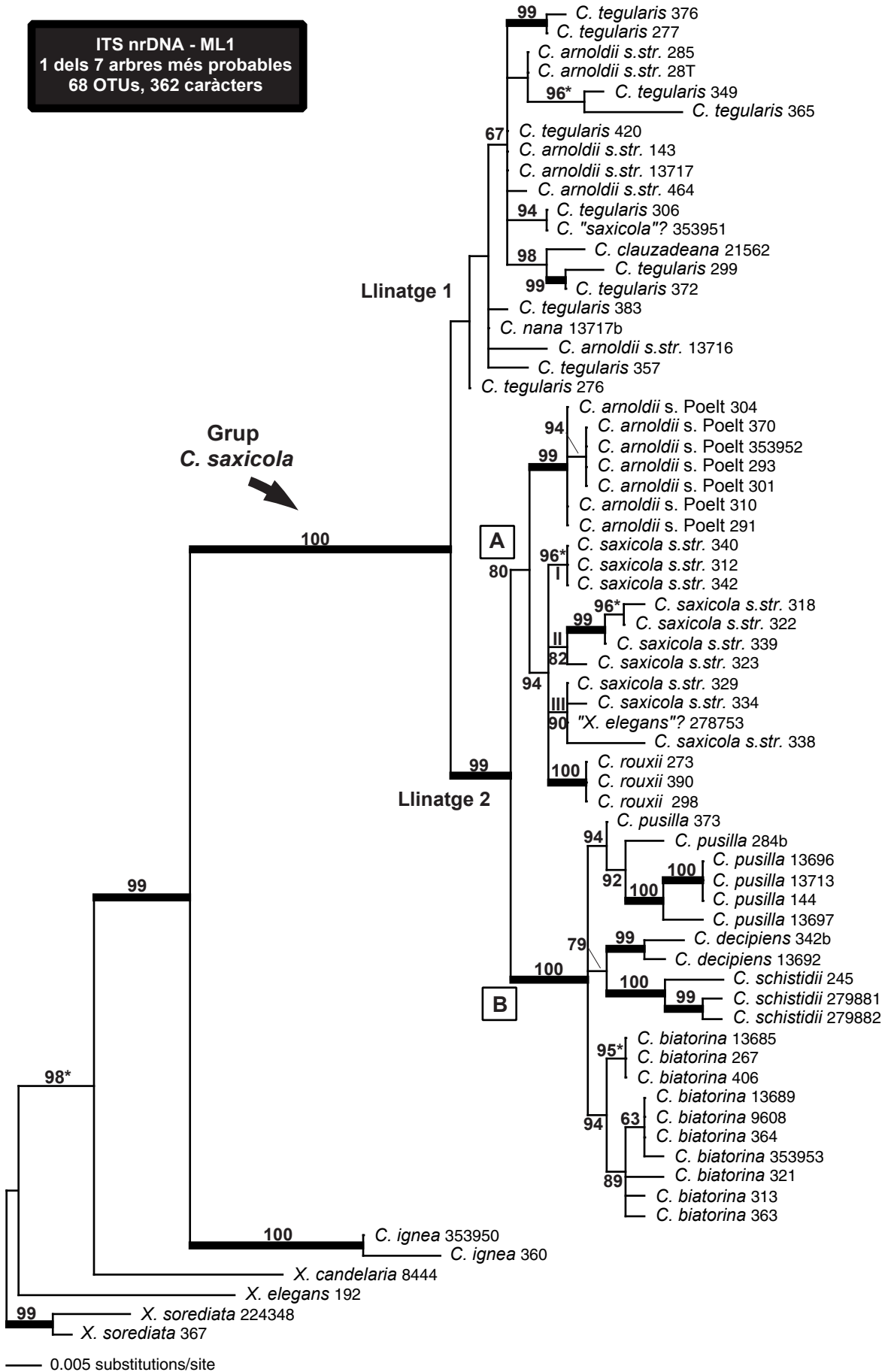


Figura 5.7.

ITS nrDNA + Morfologia - MP5
 Arbre de strict consensus
 60 OTUs, 144 caràcters
 (inclou 22 caràcters INAASE)

